(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0000969
(43) 공개일자 2016년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0078312
(22) 출원일자 2014년06월25일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
최수영
강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 706호 (후평동, 동아아파트)
박진서
강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 1404호 (후평동, 동아아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

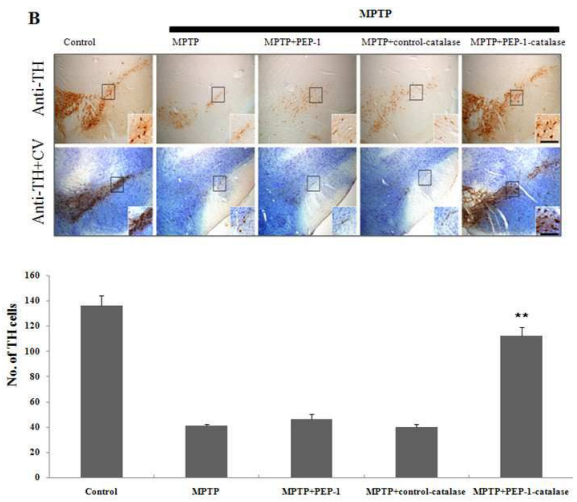
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 **카탈라제 융합단백질을 포함하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

파킨슨병은 뇌의 흑색질 내에서 도파민 뉴런이 점차 상실되는 신경퇴행성 질환이다. 본 발명자들은 PEP-1-카탈라제 융합단백질이 SH-SY5Y 신경아세포종 세포 및 파킨슨병 동물모델에서 산화 스트레스로부터 도파민 뉴런을 보호할 수 있음을 밝혀내었다. PEP-1-카탈라제 융합단백질은 SH-SY5Y 세포 내로 그리고 뇌의 흑색질 내로 잘 이동함을 웨스턴 블랏 분석으로 확인하였다. PEP-1-카탈라제 융합단백질은 MPP^+로 유도되는 활성산소종 생성 및 DNA 단편화를 현저히 저해하였으며, 결과적으로 SH-SY5Y 세포의 생존을 유도했다. 나아가, TH 항체 및 크레실 바이올렛 염색을 이용한 면역조직화학 분석 데이타는 PEP-1-카탈라제 융합단백질이 MPTP와 같은 산화 스트레스에 대하여 흑색질 내의 도파민 세포를 현저히 보호함을 나타낸다. 따라서, PEP-1-카탈라제 융합단백질은 파킨슨병의 예방 및 치료 용도로 이용 가능하다.

대 표 도 - 도4b



(72) 발명자

한규형

강원 춘천시 새청말길 26, 107동 1402호 (우두동, 강변코아루아파트)

조윤신

강원도 강릉시 화부산로99번길 12 강릉교동롯데캐슬아파트 104동 802호

이근욱

서울특별시 동작구 동작대로39길 22, 113동 805호 (동작동, 이수힐스테이트)

권혁일

서울특별시 광진구 능동로1길 15 한강우성아파트 102동 1206호

음원식

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

조성우

서울 송파구 양재대로 1218, 257동 704호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)

김덕수

충남 천안시 동남구 다가6길 6, 301호 (다가동, 그린빌)

권오신

대구 수성구 화랑로 26, 101동 1407호 (만촌동, 우방하이츠)

김대원

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

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093812

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 새로운 Biomolecule Delivery System을 이용한 질환 치료제 개발 : 질환치료용 생리활성 고분자 신소재 물질 탐색 및 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 카탈라제 단백질의 N-말단 및 C-말단 중 한 군데 이상에 단백질 수송 도메인이 공유결합된 카탈라제 융합단백질을 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 PEP-1 펩타이드임을 특징으로 하는 카탈라제 융합단백질을 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 융합단백질은 서열번호 16인 것을 특징으로 하는 카탈라제 융합단백질을 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 카탈라제 융합단백질의 도파민 뉴런 보호작용에 관한 것으로서, 단백질 수송 도메인과 공유결합된 카탈라제 융합단백질은 뇌의 흑색질 내로 원활히 이동하며, 활성산소종 생성 및 DNA 단편화를 현저히 저해하였으며, 산화 스트레스에 대하여 흑색질 내의 도파민 뉴런을 현저히 보호하는 것으로 나타나 카탈라제 융합단백질은 파킨슨병의 예방 및 치료 용도로 이용 가능하다.

배 경 기 술

[0002] 파킨슨병은 흑색질 치밀부 (substantia nigra par compacta) 내의 도파민 뉴런 상실로 특징지어지는 신경퇴행성 질환이다 [1]. 전형적인 증상은 근육 경직, 운동완서 (bradykinesia) 및 떨림과 자세 불안정과 같은 운동 장애를 포함한다. 파킨슨병 환자는 특징적으로 등이 굽는 자세를 하고 일반적으로 65세 이상 노인에서 주로 발생한다 [2]. 파킨슨병은 흑색질 치밀부에서 도파민 뉴런의 현저한 손실로 특징지어진다. 과도한 활성산소종 생성, 산화 스트레스, 잘못 접힌 (misfolded) 단백질 및 손상된 미토콘드리아 기능과 같은 다양한 자극들이 파킨슨병의 원인으로 알려져 있다 [3]. 신경세포 사멸의 정확한 메카니즘은 완전히 이해되지는 않았지만, 파킨슨병 발병은 노화, 염증, 화학물질 및 유전인자를 포함한 많은 위험인자와 관계가 있다 [1, 4-6].

[0003] 카탈라제는 활성산소종(ROS)으로 인한 세포에 해로운 영향을 억제하는 효소로 알려져 있다. 카탈라제는 하이드록실 라디칼의 발생을 방지하고 과산화수소를 분해하여 물과 산소를 만들어 내는 과정을 통하여 세포를 보호한다. 카탈라제는 산소 자유 라디칼을 제거하여 세포를 산화-환원 상태를 유지하는데 매우 중요하다 [7].

[0004] 단백질 수송 도메인(PTD)은 특정 수용체 없이 세포와 조직에 고분자를 열 변환 할 수 있는 작은 펩타이드이다 [8]. 단백질 수송 도메인을 사용한 예로서, 유전자 변형 Tat - PRDX6 융합단백질은 눈의 수정체 상피 세포사멸의 지연, 백내장 보호 기능을 하는 단백질을 전달하여 안질환 지연에 효과적인 방법이 될 수 있음을 최근 연구에서 밝혔다 [9]. 이전의 연구에서, 본 발명자들은 PEP-1 단백질 수송 도메인과 결합한 융합단백질을 다양한 세포로 형질 도입하여 피부 염증 및 신경 질환 등 각종 질병으로부터 효율적으로 보호한다는 것을 밝힌바 있다 [10, 11, 12, 13].

선행기술문헌

비특허문헌

[0005]

(비특허문헌 0001) [1] Choi,H.S.; Ahn,J.J.; Kim,S.Y.; Lee,S.H.; Kim,D.W.; Yoo, K.Y.; Won,M.H.; Kang,T.C.; Kwon,H.J.; Kang,J.H.; Choe, S.W.; Kwon,O.S.; Park,J.S.; Eum,W.S.; Choi,S.Y. : PEP-1-SOD fusion protein efficiently protects against paraquat-induced dopaminergic neuron damage in a Parkinson disease mouse model. Free Radical Biology & Medicine 41:1058-1068; 2006.

(비특허문헌 0002) [2] Dawson,T.M.;Dawson,V.L. : Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease.Science 302:819-822; 2003.

(비특허문헌 0003) [3] Chinta,S.J.;Andersen,J.K. : Redox imbalance in Parkinson's disease. Biochim.Biophys.Acta 1780:1362-1367; 2008.

(비특허문헌 0004) [4] Hunot, S.; Hirsch, E. C. : Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. Ann. Neurol. 53:S49-60; 2003

(비특허문헌 0005) [5] Dauer, W.; Przedborski, S. : Parkinson's disease: mechanisms and models.Neuron 39:889-909; 2003.

(비특허문헌 0006) [6] C. Henchcliffe,; M. Flint Beal. : Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis, Nat. Clin. Pract.Neuro.4 :600-609; 2008

(비특허문헌 0007) [7] Kim,D.W.; Jeong,H.J.;Kang,H.W.; Shin,M.J.; Sohn,E.J.; Kim,M.J.; Ahn,E.H.; Ahn,J.J.; Jang,S.H.;Yoo,K.Y.; Won,M.H.;Kang,T.C.; Hwang,I.K.;Kwon,O.S.;Cho,S.W.; Park, J.;Eum,W.S.; Choi, S.Y. : Transduced human PEP-1-catalase fusion protein attenuates ischemic neuronal damage. Free Radical Biology & Medicine 47: 941-952; 2009

(비특허문헌 0008) [8] Im,S.J.;Lee,S.K. : protein transdcution domain(PTD) and its application. biowave vol. 8 No. 142006

(비특허문헌 0009) [9] Eri Kubo.; NigarFatma.; Yoshio Akagi.; David R,; Beier.; Sanjay; P. Singh.; Dhirendra; P. Singh. : TAT-mediated PRDX6 protein transduction protects against eye lensepithelial cell death and delays lens opacity. Am J Physiol Cell Physiol294: C842-855: 2008.

(비특허문헌 0010) [10] Choi,S.Y.;Ahn,E.H.; Kim,D.W.; Shin,M.J.; Jo,H.S.; Eom,S.A.; Kim,D.S.; Park,E.Y.; Park,J.H.; Cho,S.W.;Park,J.; Eum,W.S.; Hwang,H.S. : Fenobam promoted the neuroprotective effect of PEP-1-FK506BP following oxidative stress through increasing its transduction efficiency. BMB Reports. BMB Reports 46(11):561-566;2013

(비특허문헌 0011) [11] Kim,M.J.; Kim,D.W.; Park,J.H.; Kim,S.J.; Lee,C.H.; Yong,J.Y.; Ryu,E.J.;Cho,S.B.; Yeo, H.J.; Hyeon,J.Y.; Cho,S.W.; Kim,D.S.; Son,O.R.;Park,J.S.; Han,K.H;Cho,Y.S.;Eum,W.S.;Choi,S.Y. : PEP-1-SIRT2 inhibits inflammatory response and oxidative stress induced cell death via expression of antioxidant enzymes inmurinemacrophages. ElsevierInc.63:432-445;2013

(비특허문헌 0012) [12] Choi,J.H.; Kim,D.W.; Yoo,D.Y,; Jeong,H.J.; Kim,W.S.; Jung,H.Y.; Nam,S.M.; Kim,J.H.; Yoon,Y.S.; Choi,S.Y.; Hwang,I.K. : Repeated Administration of PEP-1-Cu,Zn-Superoxide Dismutase and PEP-1-Peroxiredoxin-2 to Senescent Mice Induced by D-galactose Improves the Hippocampal Functions. Neurochem Res 38:2046-2055;2013

(비특허문헌 0013) [13] Lee,Y.P.; Kim,D.W.; Kang,H. W.; Hwang,J.H.; Jeong,H.J.; Sohn,E.J.;Kim,M.J.;Ahn,E.H.;Shin,M.J.; Kim,D.S.; Kang,T.C.; Kwon,O.S.; Cho,S.W.; Park,J.; Eum,W.S.; Choi,S.Y. : PEP-1-heat shock protein 27 protects from neuronaldamage in cells and in a Parkinson's disease mouse models. FEBS J.279(11):1929-42; 2012

(비특허문헌 0014) [14] FLORIAN M.; FREIMOSER.; CLAUDE A.; JAKOB.; MARKUS AEBI.; AND URS TUOR. : The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay Is a Fast and Reliable Method

for Colorimetric Determination of Fungal Cell Densities.Appl. Environ. Microbiol.65(8):3727;1999

(비특허문헌 0015) [15] Kim,M.J.;Kim,D.W.;Jeong,H.J.;Sohn,E.J.;Shin,M.J.;Ahn,E.H.;Kwon,S.W.; Kim,Y.N.; Kim, D.S.; Park, J.;Eum,W.S.;Hwang,H.S.;Choi,S.Y. : Tat-Frataxin protects dopaminergic neuronal cells against MPTP-induced toxicity in a mouse model of Parkinson's disease. Biochimie.94(11):2448-56;2012

(비특허문헌 0016) [16] Ahn,E,H,;Kim,D.W.;Shin,M.J.;Kim,Y.N.;Kim,H.R.;Woo,S.J.;Kim,S.M.;Kim,D.S.;Kim,J.; Park, J.;Eum,W.S.;Hwang,H.S.;Choi,S.Y. : PEP-1-ribosomal protein S3 protects dopaminergic neurons in an MPTP-induced Parkinson's disease mouse model. Free RadicBiol Med. 55:36-45;2013

(비특허문헌 0017) [17] Teresa C, Moloney.; Rhona Hyland.; Daniel O'Toole.; Alexia Paucard.; DenizKirik.; AideenO'Doherty.; Adrienne M, Gorman.; Eil_isDowd. : Heat Shock Protein 70 Reduces a-Synuclein-Induced Predegenerative Neuronal Dystrophy in the a-Synuclein Viral Gene Transfer Rat Model of Parkinson's Disease. CNS Neuroscience &Therapeutics :1-9; 2013

(비특허문헌 0018) [18] R. K. B.; Pearce 1,2, A.; Owen 1, S.; Daniel 2,; P. Jenner 1,; and C. D. Marsden 2 : Alterations in the distribution of glutathione in thesubstantianigra in Parkinson's disease. J Neural Transm 104:661-677;1997

(비특허문헌 0019) [19] SiddharthKaul.; ArthiKanthasamy.; Masashi Kitazawa.; VellareddyAnantharam.; Anumantha G. Kanthasamy. : Caspase-3 dependent proteolytic activation of protein kinase C mediates and regulates 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-induced apoptotic cell death in dopaminergic cells :relevance to oxidative stress n dopaminergic degeneration. EuropeanJournalof neuroscience, Vol. 18:1387-1401;2003

(비특허문헌 0020) [20] Fuenzalida,K.; Quintanilla,R.; Ramos,P; Piderit,D; Fuentealba,R.A.; Martinez,G.; Inestrosa,N.C.; Bronfman,M. : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma up-regulates the Bcl-2 anti-apoptotic protein in neurons and induces apoptosis. J. Biol. chem. 282: 37006-37015; 2007.

(비특허문헌 0021) [21] Ryo Hashimoto.;Jing Yu.; Hideki Koizumi.; Yasuyoshi Ouchi.; Tetsuro Okabe. : Ginsenoside Rb1 Prevents MPP+-Induced Apoptosis in PC12 Cellsby Stimulating Estrogen Receptors with Consequent Activation ofERK1/2, Akt and Inhibition of SAPK/JNK, p38 MAPK. Evidence-Based Complementary and Alternative MedicineVolume Article ID 693717, 8 pages2012

(비특허문헌 0022) [22] Mates, M. : Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology 153:83-104; 2000.

(비특허문헌 0023) [23] Morris, M. C.; Depollier, J.; Mery, J.; Heitz, F.; Divita, G. A. peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. Nat. Biotechnol. 19:1173-1176; 2001

(비특허문헌 0024) [24] Jehangir S Wadia.; Steven F Dowdy. : Protein transduction technology. Current Opinion in Biotechnology 13:52-56;2002

(비특허문헌 0025) [25] Jian-hui Zhu.; Craig Horbinski.;FengliGuo,Simon Watkins.;Yasuo Uchiyama.;Charleen T. Chu : Regulation of Autophagy by Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases During 1-Methyl-4-Phenylpyridinium-Induced Cell Death. AJP January 170(1):75-86; 2007

(비특허문헌 0026) [26] Choi,W.S.; L. M. T. Canzoniero.; S. L. Sensi.; Karen L. O'Malley.;Gwag,B.J.; Sohn,S.H.; Kim,J.E.; Oh,T.H.;B.E.H.; Oh,Y.J. : Characterization of MPP+-Induced Cell Death in a Dopaminergic Neuronal Cell Line : Role of Macromolecule Synthesis,Cytosolic Calcium, Caspase, and Bcl-2-Related Proteins. Experimental Neurology 159:274-282;1999

(비특허문헌 0027) [27] Shengquan Hu.; Renwen Han,;.ShinghungMak,;.Yifan Han., : Protection against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+)-induced apoptosis by water extract of ginseng (Panax ginseng C.A. Meyer) in SH-SY5Y cells. Journal of Ethnopharmacology135:34-42;2011

(비특허문헌 0028) [28] Won-Seok Choi,;So-Young Yoon,; Tae H. Oh,; Eui-Ju Choi,; Karen L. O'Malley,; and Young J. Oh. : Two Distinct Mechanisms Are Involvedin 6-Hydroxydopamine- and MPP+-InducedDopaminergic Neuronal Cell Death:Role of Caspases, ROS, and JNK.Journal of Neuroscience Research 57:86-94 ;1999

(비특허문헌 0029) [29] Heather L.; Martin, Ross B.; Mounsey,; Sarah Mustafa,; KinnariSathe,; Peter Teismann.: Pharmacological manipulation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR reveals a role for anti-oxidant protection in a model of Parkinson's disease. Experimental Neurology 235 :528-538; 2012

(비특허문헌 0030) [30] Hausenloy, D.J.; Yellon, D. M. : New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase(RISK)-pathway. Cardiovasc Res,61(3)448-460:2004

(비특허문헌 0031) [31] Burke, R.E. : Inhibition of mitogen-activated protein kinase and stimulation of Akt kinase signaling pathways: Two approaches with therapeutic potential in the treatment of neurodegenerative disease. Pharmacol.Ther.114, 261-277;2007

(비특허문헌 0032) [32] BALACHANDAR VENKATESAN.; LENIN MAHIMAINATHAN,; FALGUNI DAS.;NANDINI GHOSH-CHOUDHURY.;AND GOUTAM GHOSH CHOUDHURY.J. : Downregulation of Catalase by Reactive Oxygen Species Via PI 3Kinase/Akt Signaling in Mesangial Cells. Cell. Physiol. 211: 457-467;2007

(비특허문헌 0033) [33] Lim KS.;WonYW.;Park YS.; Kim YH. : Preparationand functional analysis of recombinant protein transduction domain-metallothionein fusion proteins. Biochimie92, 964-970. 2010

(비특허문헌 0034) [34] St Martin JL.;KluckenJ.;Outeiro TF.; Nguyen P.; Keller-McGandyC.;Cantuti-Castelvetri I.; GrammatopoulosTN.; Standaert DG.; Hyman BT;.McLeanPJ. : Dopaminergic neuron loss and up-regulation of chaperone protein mRNA induced bytargeted over-expression of alpha-synuclein in mouse substantia nigra. J Neurochem100:1449-1457;2007

(비특허문헌 0035) [35] Wang H.;Zhong CY.; Wu JF.; Huang YB.;Liu CB. : Enhancement of TAT cell membrane penetration efficiency by dimethyl sulphoxide. J Control Release143:64-70;2010

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 카탈라제 융합단백질이 세포막과 뇌혈관장벽 (blood brain barrier)을 효과적으로 투과하여 MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)로 유도된 파킨슨병 동물모델에서 신경보호효과를 나타내는지를 알아보고, 카탈라제 융합단백질을 포함하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명자들은 SH-SY5Y 세포와 파킨슨병의 동물모델에서 PEP-1-카탈라제 융합단백질의 보호 효과를 살펴보았다. 파킨슨병은 뇌의 흑색질 내에서 도파민 뉴런이 점차 상실되는 신경퇴행성 질환이다. 발명자들은 카탈라제 융합단백질이 SH-SY5Y 신경아세포종 세포 및 파킨슨병 동물모델에서 산화 스트레스로부터 도파민 뉴런을 보호할 수 있음을 밝혀내었다. 카탈라제 융합단백질은 SH-SY5Y 세포 내로 그리고 뇌의 흑색질 내로 잘 이동함을 웨스턴 블랏 분석으로 확인하였다. 카탈라제 융합단백질은 MPP^+로 유도되는 활성산소종 생성 및 DNA 단편화를 현저히 저해하였으며, 결과적으로 SH-SY5Y 세포의 생존을 유도했다. 신경보호 효과는 카탈라제 융합단백질이 친-자기세포사멸 매개자 및 항-자기세포사멸 매개자의 수준에 영향을 미침으로써 얻어진다. 나아가, TH 항체 및 크레실 바이올렛 염색을 이용한 면역조직화학 분석 데이타는 카탈라제 융합단백질이 MPTP와 같은 산화 스트레스에 대하여 흑색질 내의 도파민 세포를 현저히 보호함을 나타낸다. 따라서, 카탈라제 융합단백질은 파킨슨병의 예방 및 치료 용도로 이용 가능하다.

[0008] 카탈라제 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 경구 또는 주사 형태로 제형화할 수 있다. 경구용 조성물로는 예를 들면 정제 및 젤라틴 캡슐이 있으며, 이들은 활성 성분 이외에도 희석제(예: 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활탁제(예: 실리카, 탤크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)을 함유하고, 정제는 또한 결합제(예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸셀룰로스 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 위함 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0009] 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㎍~100㎎/㎏을 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.

[0010] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.

[0011] "카탈라제 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 카탈라제를 포함하며, 단백질 수송 도메인과 화물 분자(cargo molecule, 즉 본 발명에서는 카탈라제를 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서와 도면에서 구체적인 일 실시예로서 "PEP-1-카탈라제"는 카탈라제 융합단백질 중 카탈라제의 N-말단에 PEP-1 단백질 수송 도메인이 결합된 것을 말한다.

[0012] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.

[0013] 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. 구체적으로 본 명세서에서 표적 세포는 뇌세포 또는 신경세포를 의미한다.

[0014] 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 펩타이드(서열번호 3)를 말한다.

[0015] 본 명세서의 "목표 단백질"은 PEP-1 단백질 수송 도메인과 공유결합을 이루어 세포 내로 도입되어 활성을 나타내는 분자를 의미한다. "화물 분자"와 동일한 의미이다.

[0016] 또한, 본 명세서에서는 단백질 또는 펩타이드를 세포 내로 "도입"시키는 것에 대하여 "형질도입", "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.

[0017] 본 발명은 인간 카탈라제 단백질의 N-말단 및 C-말단 중 한 군데 이상에 단백질 수송 도메인이 공유결합된 카탈라제 융합단백질을 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송 도메인이 PEP-1 펩타이드임을 특징으로 하는 카탈라제 융합단백질을 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 융합단백질이 서열번호 16인 것을 특징으로 하는 카탈라제 융합단백질을 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 PEP-1-카탈라제 융합단백질은 SH-SY5Y 세포 내로 시간 의존적, 투여량 의존적으로 세포 내로 투과되었고, 나아가 세포 내 PEP-1-카탈라제 융합단백질 수준이 48시간 동안 상당히 유지되었다.

[0021] 또한, 본 발명의 PEP-1-카탈라제 융합단백질은 MPP^+에 대한 반응인 활성산소종 생성을 현저히 억제하였다.

[0022] 본 발명의 PEP-1-카탈라제 융합단백질은 MPP^+로 유도되는 산화 스트레스로부터 세포를 보호할 수 있다.

[0023] 본 발명의 PEP-1-카탈라제 융합단백질은 뇌혈관장벽을 효과적으로 가로지를 수 있으며, MPTP로 유도되는 파킨슨병 마우스 모델에서 MPTP 독성에 대하여 도파민 뉴런을 보호하는 것으로 나타났고, MPTP에 의해 유도되는 흑색질에서의 도파민 뉴런의 사멸을 억제하여 운동기능 장애를 감소시킬 수 있을 것으로 예측된다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 PEP-1-카탈라제 융합단백질의 정제 및 SH-SY5Y 세포 내로 PEP-1-카탈라제 융합단백질의 투과를 나타낸다. (A) 카탈라제 단백질과 PEP-1-카탈라제 융합단백질의 정제를 나타낸다. (B) 카탈라제 단백질과 PEP-1-카탈라제 융합단백질 정제 후 정제된 단백질은 12% SDS-PAGE 및 항-히스티딘 항체를 이용한 웨스턴 블랏팅으로 분석하였다. 레인 1 : 마커, 레인 2~5 : 비유도, 레인 3~6 : 유도, 레인 4~7 : 정제 (C) SH-SY5Y 세포 내로 PEP-1-카탈라제 융합단백질의 투과를 나타낸다. SH-SY5Y 세포는 PEP-1-카탈라제 융합단백질 및 카탈라제 단백질 (0.5~3 μM)로 3시간 동안 배양하고, PEP-1-카탈라제 융합단백질 및 카탈라제 단백질 (3 μM)에서 1~3시간 배양한 것이다.각 시료에서 PEP-1-카탈라제 융합단백질 또는 카탈라제 단백질은 웨스턴 블랏으로 분석하였다. (D) 공촛점 형광현미경으로 관찰한 것이다. 스케일 바=50㎛. (E) 세포도입된 PEP-1-카탈라제 융합단백질의 SH-SY5Y 세포 내 안정성을 나타낸다. PEP-1-카탈라제 융합단백질 (3 μM)을 3~60시간 동안 처리하여 웨스턴 블랏 분석으로 세포 내 수준을 측정하고 후에 밀도계로 밴드 강도를 측정하였다.

도 2는 MPP^+에 의한 세포 사멸 및 활성산소종 생성에 대한 PEP-1-카탈라제 융합단백질의 억제 효과를 나타낸다. (A) 세포는 각각 PEP-1-카탈라제 융합단백질, 카탈라제 단백질 (3.0 μM)로 3시간 동안 처리하고, MPP^+ (4.0 mM)로 17시간 처리하였다. 세포 생존률은 MTT 분석을 사용하여 평가하였다. $^*P<0.01$, MPP^+ 처리된 세포와 비교하였다. (B) 사전 처리 후, PEP-1-카탈라제 및 카탈라제 단백질 3 μM로 SH-SY5Y 세포를 3시간 동안 처리하고, MPP^+ 4mM을 40분 동안 처리하였다. 세포 내 활성산소 수준은 DCF-DA로 염색하고 검출하였고, ELISA 플레이트 리더로 측정하였다. 스케일 바=50㎛. $^{**}P<0.01$, MPP^+ 처리된 세포와 비교하였다.

도 3은 SH-SY5Y 세포에서 MPP^+에 의한 DNA 단편화와 세포사멸을 억제하는 PEP-1-카탈라제 융합단백질의 효과를 나타낸다. 사전 처리한 후, 3 μM PEP-1-카탈라제 융합단백질, 카탈라제 단백질을 SH-SY5Y 세포에 3시간 동안 처리하고, 세포를 14시간 30분 동안 MPP^+(4 mM)로 처리하였다. DNA 단편화는 TUNEL 염색에 의해 검출하고, 형광강도는 ELISA 플레이트 리더로 측정하였다. 스케일 바==50㎛. $^{**}P<0.01$, MPP^+ 처리된 세포와 비교하였다. (B) PEP-1-카탈라제 융합단백질 및 카탈라제 단백질 3 μM을 SH-SY5Y 세포에 처리한 후, 세포에 MPP^+ 4 mM을 처리하고, 각각 10분 (pAkt), 3시간 (Bax) 및 35분 (p-p38) 동안 처리하였다. 표시된 단백질 수준은 웨스턴 블랏 분석으로 측정하고, 밴드 강도는 농도계로 측정하였다. $^{**}P<0.01$, MPP^+ 처리된 세포와 비교하였다.

도 4는 파킨슨병 동물 모델에서 도파민 신경 세포를 보호하는 PEP-1-카탈라제 융합단백질의 효과를 나타낸다. (A) PEP-1-카탈라제 융합단백질 뇌혈관장벽을 가로지르게 했다. 마우스에 PEP-1-카탈라제 융합단백질 (2mg/kg)을 복강주사하였다. 6시간 후, 마우스는 희생시켜 뇌를 절편화하고 항 히스티딘 항체로 염색하였다. 스케일 바=100㎛. (B) 보호 기능은 면역 반응 신경 세포를 티로신 수산화 효소 (TH)와 크레실 바이올렛 (CV)으로 염색하여 확인하였다. MPTP (20mg/kg) 주입, 카탈라제 단백질, PEP-1 펩타이드 및 PEP-1-카탈라제 융합단백질 (2mg/kg)의 각 그룹 (N = 5)에서 복강주사 후 7일 후 뇌 조직을 얻었다. 스케일 바=100㎛ 및 50㎛. (C) 보호 및 침투 기능은 자신의 항체 이중 염색과 TH 면역 반응으로 확인하였다. MPTP (20mg/kg) 주입, 카탈라제 단백질, PEP-1 펩타이드 및 PEP-1-카탈라제 융합단백질 (2mg/kg) 각각 복강주사 하고, 12시간 후에 희생시켰다. 그 후, PEP-1-카탈라제 융합단백질 및 카탈라제 단백질은 그의 항체 및 이차 항체 FITC-라벨을 사용하여 검출하고, DA 뉴런은 TH 및 테트라 메틸 로다민 이소티오시아네이트 이차 항체를 사용하여 검출하였다. DA 뉴런 (TH 항체), 빨강; 대조군 카탈라제 단백질 또는 PEP-1-카탈라제 융합단백질 (그의 항체), 녹색. 스케일 바=100㎛ 및 18.8

㎛.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다. 특히, 각 실험예의 결과로서 구체적인 실시예에서 제조한 여러 가지 융합단백질 중 PEP-1-카탈라제 융합단백질을 시료로 한 데이터를 기재하였으나, 그 외의 Tat, 올리고라이신, 올리고아르기닌 등 다양한 단백질 수송 도메인을 이용한 융합단백질들 또한 PEP-1-카탈라제 융합단백질을 시료로 한 시험 결과와 유사한 정도의 결과를 나타낸다.

[0026] **재료 및 세포 배양**

[0027] p38, p-p38, Akt, p-Akt, Bax, 및 Bcl-2 토끼 항체는 Cell signaling (Denvers, MA, USA)에서 구입하였다. 다른 기본 항체는 및 이차 항토끼 항체는 Santa Cruz Biotechnology (미국)에서 구입하였다. 명시되지 않는 다른 화학 물질과 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 최상급으로 구입하였다. PEP-1 펩타이드는 Peptron (Daejeon, Korea)에서 합성하였다.

[0028] SH-SY5Y 사람 신경아세포종 세포는 가열 분활성화 우태혈청 (10% FBS) 및 항생제 (100㎍/㎖ 스트렙토마이신, 100U/㎖ 페니실린)을 함유한 EMEM 배지 내에서 37 ℃, 95% 공기 및 5% CO_2의 습한 환경 하에서 배양하였다.

[0029] **PEP-1-카탈라제 융합단백질 정제**

[0030] PEP-1-카탈라제 융합단백질의 구축 및 과발현은 이전에 학습한 바와 같이 정제하였다 [7]. 간단히, 형질전환 균체 성장 및 IPTG로 유도하였다. 수확된 세포를 결합완충액 (5mM의 이미다졸, 500mM의 NaCl, 20mM Tris-HCl, PH 7.9)에 4℃에서 초음파 분쇄기로 분쇄(sonication)하였다. 원심분리하여 상층액을 즉시 Ni^{2+}-니트릴로 트리아세틱 애시드 세파로즈 수퍼플로우(Ni^{2+}-nitrilotriacetic acid sepharose super flow) 컬럼에 부하하고 10배 부피의 결합 완충액과 6배 부피의 세척 완충액 (60mM 이미다졸, 500 mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)으로 세척한 다음 용출 완충액 (500 mM 이미다졸, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9)로 융합단백질을 용출하였다. 이어, 융합단백질이 포함된 분획들을 모아 24시간 동안 PD-10 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 분획 중에 포함된 염분을 제거하였다. 정제된 단백질 농도는 우혈청 알부민을 표준물질로 사용하여 브래드포드 (Bradford) 방법으로 측정하였다 [7].

[0031] **SH-SY5Y 신경아세포종 세포로 PEP-1-카탈라제 융합단백질의 세포 도입**

[0032] PEP-1-카탈라제 융합단백질을 투과시키기 위해 SH-SY5Y 세포를 60㎜ 접시에서 배양하였다. 세포는 다양한 농도의 PEP-1-카탈라제 융합단백질 (0.5~3 μM)로 3시간 동안 처리하고, PEP-1-카탈라제 융합단백질 3 μM 농도에서 시간을 달리하여 (1~3시간) 처리하였다. 세포는 트립신-EDTA로 처리하고 PBS로 세척하였다. 세포는 하비스트하여 세포 추출물을 제조하였고, 웨스턴 블랏 분석에 사용하였다.

[0033] **웨스턴 블랏 분석**

[0034] 웨스턴 블랏 분석을 위해, 세포 분쇄액 내의 단백질을 12% SDS 폴리아크릴아마이드 젤로 분리한 다음 젤에 있는 단백질을 나이트로셀룰로스 막 (nitrocellulose membrane; Amersham, UK)으로 전기이동시켰다. 막은 TBS-T 완충액 (25 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5)에 녹인 5% 탈지분유로 1시간 동안 블로킹하였고, 일차 및 이차항체로 반응시켰다. 토끼 항 히스티딘 항체, p38, p-p38, Akt, p-Akt, Bax 및 Bcl-2 항체 (1:10,000 희석) 및 호스래디쉬 퍼옥시데이즈가 결합된 2차 항체 (1 : 10,000 희석)와 함께 배양하였다. 결합된 항체 복합체는 제조업체의 지침에 따라 화학발광 탐지 키트를 사용하여 탐지하였다 (Amersham, Piscataway, NJ,USA) [7].

[0035] **세포 생존율 분석**

[0036] 세포 생존율은 MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide}를 이용하여 발색 반응으로 평가하였다 [14]. 세포는 96웰 플레이트에 시딩하여 PEP-1-카탈라제 융합단백질 (1~3 ㎛)로 3시간 처리한 다음, PBS로 세척하고, 4 mM MPP^+(1-methyl-4-phenylpyridinium)로 17시간 동안 배양배지에 가하였다. 세포 생존율은 MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide}를 이용하여 발색 반응으로 평가하였다. ELISA 마이크로플레이트 판독기 (Labsystems Multiskan MCC/340)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포 생존율은 융합단백질을 처리하지 않은 대조군 세포에 대한 백분율로 나타내었다.

[0037] **공촛점 현미경 관찰**

[0038] SH-SY5Y 세포 내의 PEP-1-카탈라제 융합단백질과 카탈라제 단백질을 탐지하기 위해 세포를 유리 커버슬립 상에 시드하고 PEP-1-카탈라제 융합단백질과 카탈라제 단백질 3μM 농도로 3시간 동안 처리하였다. 세포를 PBS로 두 번 세척한 다음 실온에서 5분간 4% 파라포름알데하이드로 고정시키고 항히스티딘 1차 항체 및 알렉사 플루오르 488 결합된 2차 항체 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 차례대로 배양하였다. 핵은 1㎍/㎖의 4'6-다이아미디노-2-페닐인돌 (4'6-diamidino-2-phenylindole; Roche Applied Science, Basel, Switzerland)로 5분간 염색하였다. 형광은 올림푸스 FV-300 공촛점 형광현미경으로 분석하였다 (Olympus, Tokyo, Japan) [15].

[0039] **활성산소종 측정**

[0040] 활성산소종에 의해 DCF (2',7'-dichlorofluorescein)로 전환되는, 활성산소종에 민감한 안료 DCF-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate)를 사용하여 SH-SY5Y 세포 내의 활성산소종 농도를 결정하였다. 활성산소종 생성에 대한 PEP-1-카탈라제 융합단백질의 효과를 시험하기 위해 SH-SY5Y 세포에 PEP-1-카탈라제 융합단백질 (3μM)을 한 시간 처리한 군과 처리하지 않은 군에 각각 MPP^+ (4mM)를 40분 동안 가하였다. SH-SY5Y 세포는 PBS로 두 번 세척한 후 30μM DCF-DA로 30분간 처리하고 DPBS로 두 번 세척하였다. 세포의 형광 이미지는 Eclipse 80i 형광 현미경(Nikon, Tokyo, Japan)으로 촬영하였다.

[0041] **TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling) 분석**

[0042] 유리 커버슬립 상의 SH-SY5Y 세포에 각각 PEP-1-카탈라제 융합단백질, 카탈라제 단백질(2mM)를 가하여 37℃로 3시간 배양한 다음 MPP^+ (4.0mM)에 14시간 30분 동안 노출시켰다. TUNEL 염색은 세포 사멸 탐지키트 (Roche Applied Science, Basel, Switzerland)를 이용하여 수행하였다. 형광현미경 사진은 Eclipse 80i 형광현미경 (Nikon, Tokyo, Japan)으로 찍었다 [16].

[0043] **실험 동물**

[0044] 수컷, 6주령, C57BL/6 마우스를 한림대 실험동물센터에서 구입하였다. 마우스는 일정 온도 (23℃)와 일정 상대습도 (60%)에서 12시간 사이클로 명암 조절하여 사육하였다. 물과 사료에는 자유롭게 접근 가능하였다. 동물과 관련된 모든 실험 절차와 관리는 국립수의과학검역원 (National Veterinary Research & Quarantine Service of Korea)의 실험동물 보호 및 이용에 관한 가이드를 따랐고, 이를 한림대학교 의과대학 동물 보호 및 이용 위원회가 입증한다. 이전의 연구대로 파킨슨병 모델을 제조하였다 [17]. 마우스에는 MPTP를 20mg/kg 투여량으로 두 시간 간격으로 주사하였다. PEP-1-카탈라제 융합단백질의 파킨슨병 보호효과를 확인하기 위해 MPTP 처리 12시간 전 2.0 mg/kg의 단백질을 한 차례 피하주사하였다. 마우스 (각 군마다 n=5)는 다음과 같이 다섯 개의 군으로 나누었다: 1) 무처리 대조군, 2) MPTP 처리군, 3) $MPTP^+$ PEP-1-카탈라제 융합단백질 처리군, 4) $MPTP^+$ PEP-1 펩타이드 처리군, 및 5) $MPTP^+$ 대조군 카탈라제 처리군. 마우스는 마지막 주사로부터 일주일 후 희생시켰다.

[0045] **면역조직화학**

[0046] 면역염색은 이전의 연구에서 설명하였다 [1, 18]. 3% 우혈청 알부민이 함유된 PBS로 실온에서 30분간 조직 절편을 처리하여 블로킹시키고 PEP-1-카탈라제 융합단백질 및 카탈라제 단백질을 탐지하기 위해 히스티딘 항체 또는 도파민 뉴런을 탐지하기 위해 티로신 하이드록실레이즈 (tyrosine hydroxylase; TH) 항체를 넣어 배양하였다. 바이오틴이 결합된 염소 항토끼 항체를 2차 항체로 이용하였다. 살아 있는 뉴런에서 발견되는 과립체이고 조면 소포체 (rough endoplamic reticulum)로 생각되는 니슬 소체 (Nissl bodies)를 염색하기 위해 크레실 바이올렛 역염색을 수행하였다. 절편은 DAB (3,3'-diaminobenzidine) 함유 0.1M 트리스 완충액으로 시각화하여 젤라틴 코팅된 슬라이드에 올려놓았다. 영상은 올림푸스 DP72 디지탈 카메라 및 DP2-BSW 현미경 디지탈 카메라 소프트웨어로 촬영 및 분석하였다. 도면은 Adobe Photoshop 7.0 (San Jose, CA, USA)을 이용하였다.

[0047] **통계 분석**

[0048] 데이타는 각각의 독립된 실험에서 얻은 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 평균값 간의 차이는 일방 ANOVA를 이용하여 분석하였다. Newman-Keuls post hoc 분석은 ANOVA 시험에서 차이가 관찰된 때 채용하였다 ($p < 0.01$).

[0049] **결과 1 : PEP-1-카탈라제 융합단백질 구축과 정제**

[0050] 카탈라제 단백질과 PEP-1-카탈라제 융합단백질 발현벡터를 구축하였고, 그 개요도는 도 1A에 나타내었다. PEP-1-카탈라제 및 카탈라제 단백질은 IPGT로 과발현 시키고, Ni^{2+}-니트릴로 트리아세틱 애시드 세파로즈 수퍼플로우 (Ni^{2+}-nitrilotriacetic acid sepharose super flow) 컬럼으로 정제하였다. 정제된 단백질은 PBS 완충액으로 24시간 동안 세척하여 염분을 제거하였다. 도 1B와 같이, PEP-1-카탈라제 융합단백질의 과발현 및 정제는 SDS-PAGE와 웨스턴 블랏 분석으로 확인하였다.

[0051] SH-SY5Y 세포로 PEP-1-카탈라제 융합단백질 전달을 조사하기 위해, PEP-1-카탈라제 융합단백질을 농도(0.5~3 μM) 및 시간을 달리하여 (1~3 시간)으로 배양 배지에서 처리하였다. 이어서, 형질도입 효율을 확인하기 위해 웨스턴 블랏 분석을 실시하였다. PEP-1-카탈라제 융합단백질은 단백질의 투여량 및 시간 의존적으로 세포 내로 형질 도입되었다. 그러나, 카탈라제 단백질은 세포 내에 형질 도입되지 않았다 (도 1C). 더 명확 PEP-1-카탈라제 융합단백질의 세포로 형질 도입 여부를 확인하기 위해, 본 발명자들은 그의 항체 DAPI, 알렉사 fluor-488 복합 이차 항체를 사용하여 공촛점 형광 현미경 분석을 실시하였다. 도 1D와 같이, 카탈라제 단백질이 처리된 세포에서는 형광 물질이 검출되지 않는 반면, PEP-1-카탈라제 융합단백질이 처리된 세포에서는 강한 형광 물질이 검출되었다. 이러한 결과는 PEP-1-카탈라제 융합단백질이 효율적으로 SH- SY5Y 세포로 침투되었음을 나타낸다. SH-SY5Y 세포 내로 투과된 PEP-1-카탈라제 융합단백질의 안정성을 평가하기 위하여 3시간 동안 PEP-1-카탈라제 융합단백질 (3 μM)을 형질 도입하였다. 세포 내 PEP-1-카탈라제 융합단백질은 60시간 동안 배양하였다. PEP-1-카탈라제 융합단백질의 세포 내 수준이 48시간까지 증가하였다(도 1E). 따라서, 이 데이타는 PEP-1-카탈라제 융합단백질이 SH-SY5Y 세포 내에 투과하여 48시간 동안 세포 내에 상당량 머물러 있음을 말해준다.

[0052] **결과 2: 투과된 PEP-1-카탈라제 융합단백질은 MPP^+에 의한 활성산소종 생성과 세포사멸을 저해한다.**

[0053] MPP^+는 세포 내 활성산소종의 생성을 유도하여, DNA 손상 및 세포 사멸을 일으킨다 [19]. 따라서, 투과된 PEP-1-카탈라제 융합단백질이 신경독성물질에 의해 유도된 신경세포 사멸에 대해 세포를 보호하는지를 알아보기 위해 세포 생존에 대한 MPP^+의 효과를 시험하였다. PEP-1-카탈라제 융합단백질은 세포 생존율은 융합단백질 투여량 의존적으로 증가하였따. 세포를 17시간 동안 MPP^+(4 mM)로 처리하였다. 도 2A와 같이 세포의 46%만이 생존했다. 그러나, PEP-1-카탈라제 융합단백질을 미리 처리한 세포의 생존율은 투여량 의존적으로 증가하여 최고 농도를 사용한 경우 76% 이상이었다. 반면, 대조군 카탈라제 단백질은 같은 조건 하에서 보호 효과를 나타태지 않았다.

[0054] 또한, 본 발명자들은 PEP-1-카탈라제 융합단백질이 MPP^+에 의해 유도되는 세포 내 활성산소종 생성을 억제하는지 시험하였다. 세포를 MPP^+에 40분간 노출시키면, MPP^+가 DCF 신호를 현저히 증가시켰다. $MMPP^+$로 처리된 세포

는 MPP^+ 유도된 세포 내 활성산소종의 생성을 보여주는 대조군 세포에 비해 높은 강도의 형광을 나타내었다. 대조군 카탈라제 단백질이 처리된 세포에서는 활성산소종 생성은 MPP^+ 와 유사했다. 그러나, PEP-1-카탈라제 융합단백질은 MPP^+에 의한 세포 내 활성산소종 생성을 억제 하였다(도 2B). 이러한 결과는 PEP-1-카탈라제 융합단백질이 MPP^+에 의해 유도되는 활성산소종의 생성을 억제함을 말해준다.

[0055] **결과 3: PEP-1-카탈라제 융합단백질은 MPP^+에 의한 DNA 손상과 세포 신호전달 조절을 보호한다.**

[0056] 본 발명자들은 MPP^+에 의한 DNA 단편화에 PEP-1-카탈라제 융합단백질의 보호 효과를 알아보기 위하여 TUNEL 분석을 수행하였다. PEP-1-카탈라제 융합단백질로 처리한 후, 세포를 14시간 30분 동안 MPP^+에 노출하였다. 이어서 DNA 단편화는 형광 현미경을 이용하여 관찰하였다. 도 3A와 같이, PEP-1-카탈라제 융합단백질은 DNA 단편화를 현저히 억제하였다. 이러한 데이타는 PEP-1-카탈라제 융합단백질이 자기세포사멸을 억제함으로써 신경세포를 보호함을 암시한다. 다음으로, 본 발명자들은 MPP^+에 의해 유도된 PEP-1-카탈라제 융합단백질의 세포 신호 존재 여부를 확인했다. 몇몇 연구에서는 MPP^+로 인한 세포 손상은 Akt, Bax 및 p38의 인산화 발현 수준 증가 및 세포에서 세포 사멸 단백질 및 BCL-2 발현 수준을 증가시킴을 입증하였다 [20, 21]. 도 3B와 같이 Akt, Bax 및 P38의 인산화 발현 수준은 MPP^+ 처리한 세포에서 현저히 증가하였다. 그러나 Akt, Bax 및 p38의 발현 수준은 PEP-1-카탈라제 융합단백질 농도 의존적으로 감소하였다. 한편, BCL-2의 발현 수준은 MPP^+ 처리한 세포에서 감소하였다. 그러나, PEP-1-카탈라제 융합단백질은 BCL-2 발현을 증가시켰다. 이러한 결과는 PEP-1-카탈라제 융합단백질이 Akt, Bax, BCL-2 및 P38 세포 신호 전달을 조절함으로써 SH-SY5Y 세포에서 MPP^+에 의한 DNA 단편화를 억제한다는 것을 알 수 있다.

[0057] **결과 4: 마우스의 뇌로 투과된 PEP-1-카탈라제 융합단백질은 파킨슨병 동물 모델에서 도파민 신경 세포를 보호한다.**

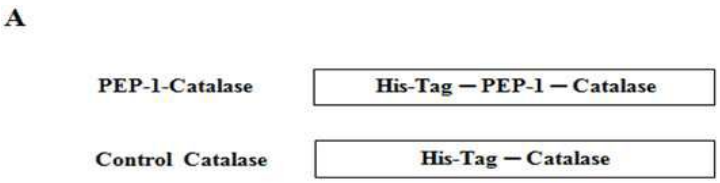
[0058] PEP-1-카탈라제 융합단백질의 뇌혈관장벽을 가로지르는 인비보 세포도입능을 평가하기 위해 PEP-1-카탈라제 융합단백질 및 카탈라제 단백질 (2mg/kg)을 피하주사하고 6시간 후 뇌를 채취하여 뇌 안의 PEP-1-카탈라제 융합단백질 및 카탈라제 단백질 위치를 히스티딘 항체를 이용하여 확인하였다. 면역조직화학 데이타는 PEP-1-카탈라제 융합단백질을 처리한 시료만이 흑색질을 포함하는 뇌실질 (parenchyma) 내에서 강한 면역반응성이 흩어져 있음을 보여주어 PEP-1-카탈라제 융합단백질만 뇌혈관장벽을 가로지를 수 있음을 말해준다 (도 4A). 이러한 결과는 PEP-1-카탈라제 융합단백질이 뇌와 뇌혈관장벽을 가로지름을 나타낸다.

[0059] 또한, PEP-1-카탈라제 융합단백질의 MPTP-유발 도파민 신경 세포 사멸 방지 여부를 조사했다. 세포 생존율은 티로신 수산화 효소 (TH) 항체와 크레실 바이올렛 (CV) 염색을 이용하여 면역 조직 화학 염색에 의해 평가하였다 (도 4B). MPTP 처리한 마우스에서, 도파민 신경 세포 사멸은 샴 수술 대조군 마우스에 비해 현저히 증가하였다. 또, 대조군 카탈라제 단백질 처리군 및 PEP-1 펩티드 처리군 마우스는 MPTP 처리한 마우스와 유사했다. 그러나, PEP-1-카탈라제 융합단백질 처리 마우스에서는 도파민 신경 세포 생존율이 현저히 증가하였다.

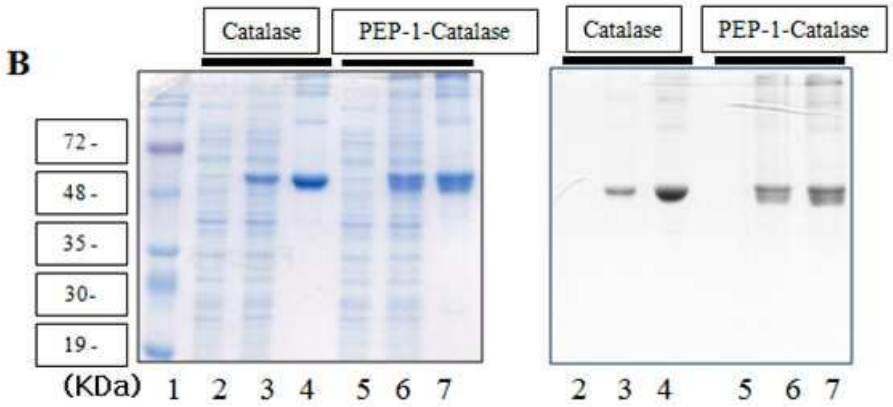
[0060] 또한, 본 발명자들은 PEP-1-카탈라제 융합단백질이 뇌혈관장벽을 넘어 흑색질 주변에 MPTP에 의해 유도되는 도파민 신경세포 사멸로부터 신경세포를 보호할 수 있는지를 시험하였다. PEP-1-카탈라제 단백질 (2mg/kg)을 복강주사하고 MPTP 주사 후 12시간 경과한 다음 뇌를 채취하여 얻은 뇌 조직에 TH 항체 (빨간색)와 히스티딘 항체 (녹색)로 두 번 염색하였다. 도 4C와 같이, 샴 수술 대조군 및 기타 그룹은 TH 염색에 차이가 없다. 그러나, 녹색 형광은 PEP-1-카탈라제 융합단백질 투여군에서만 검출되었다. 이러한 결과는 PEP-1-카탈라제 융합단백질이 효율적으로 뇌혈관장벽을 가로지르고, MPTP에 의한 도파민 신경 세포 사멸에 대한 보호 효과가 있음을 보여준다.

도면

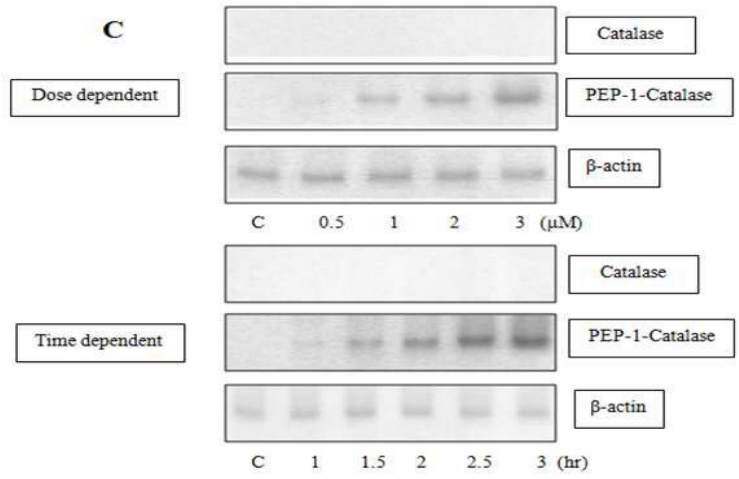
도면1a



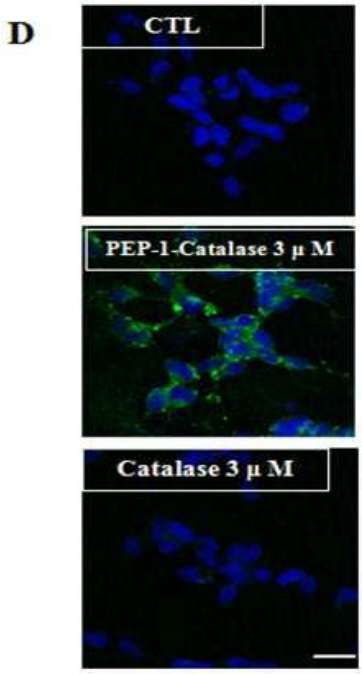
도면1b



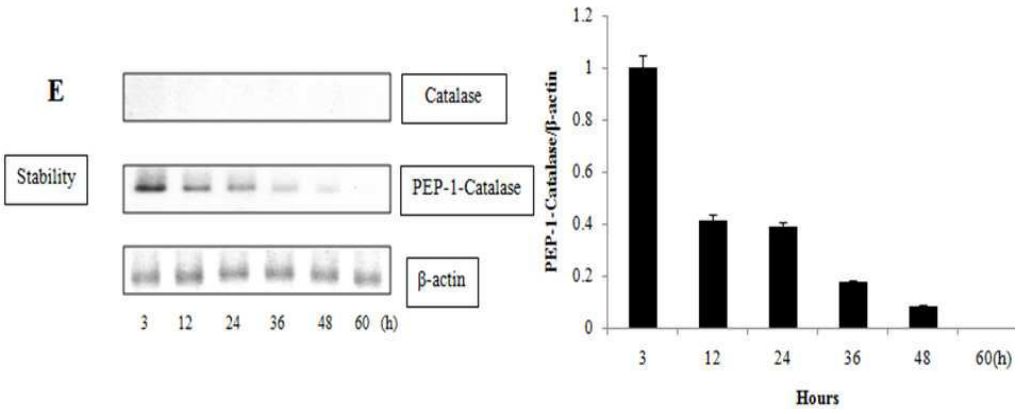
도면1c



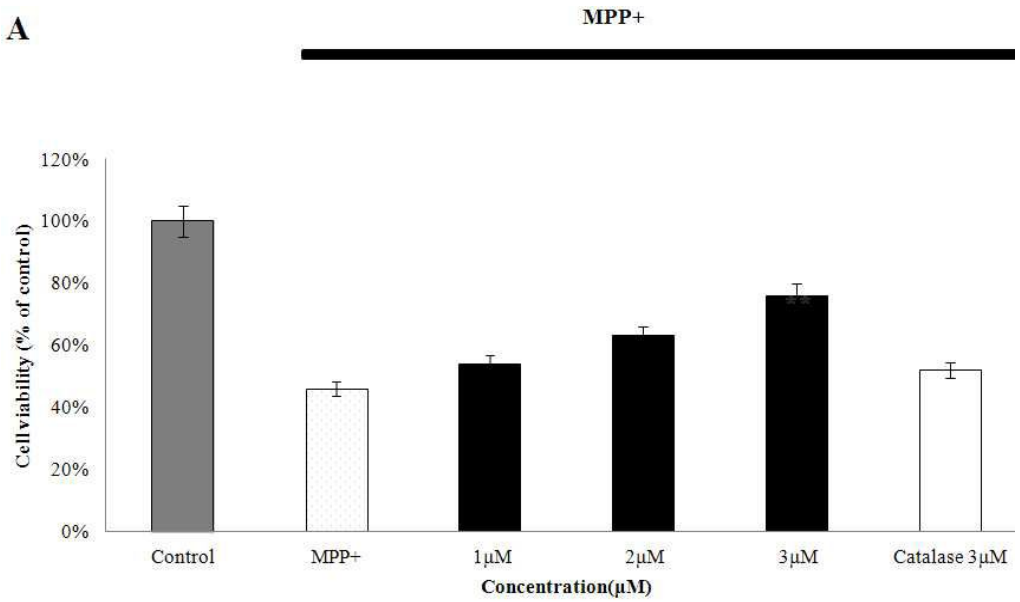
도면1d


D
CTL
PEP-1-Catalase 3 μ M
Catalase 3 μ M

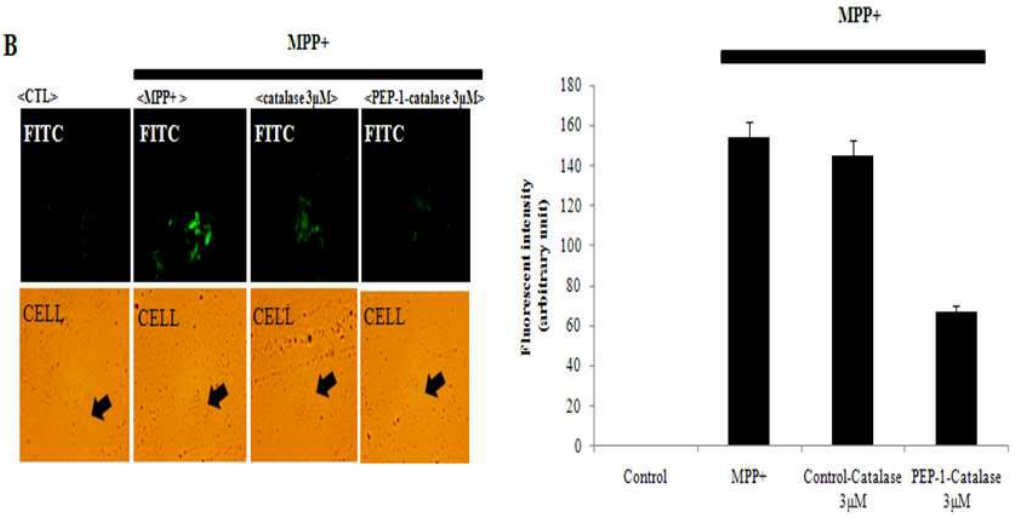
도면1e


E
Stability
Catalase
PEP-1-Catalase
β-actin
3 12 24 36 48 60 (h)
PEP-1-Catalase/β-actin
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
3 12 24 36 48 60(h)
Hours

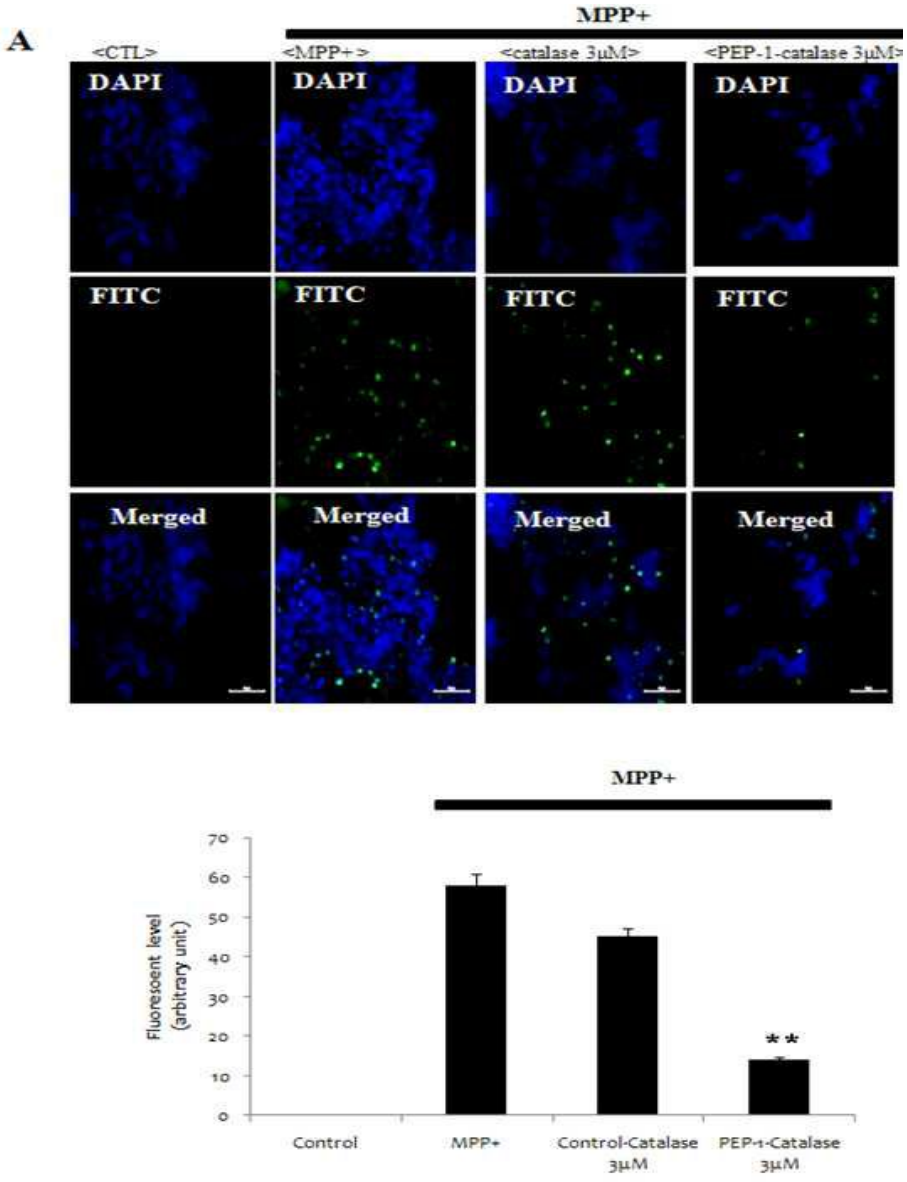
도면2a


A
MPP+
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Cell viability (% of control)
Control
MPP+
1μM
2μM
3μM
Catalase 3μM
Concentration(μM)

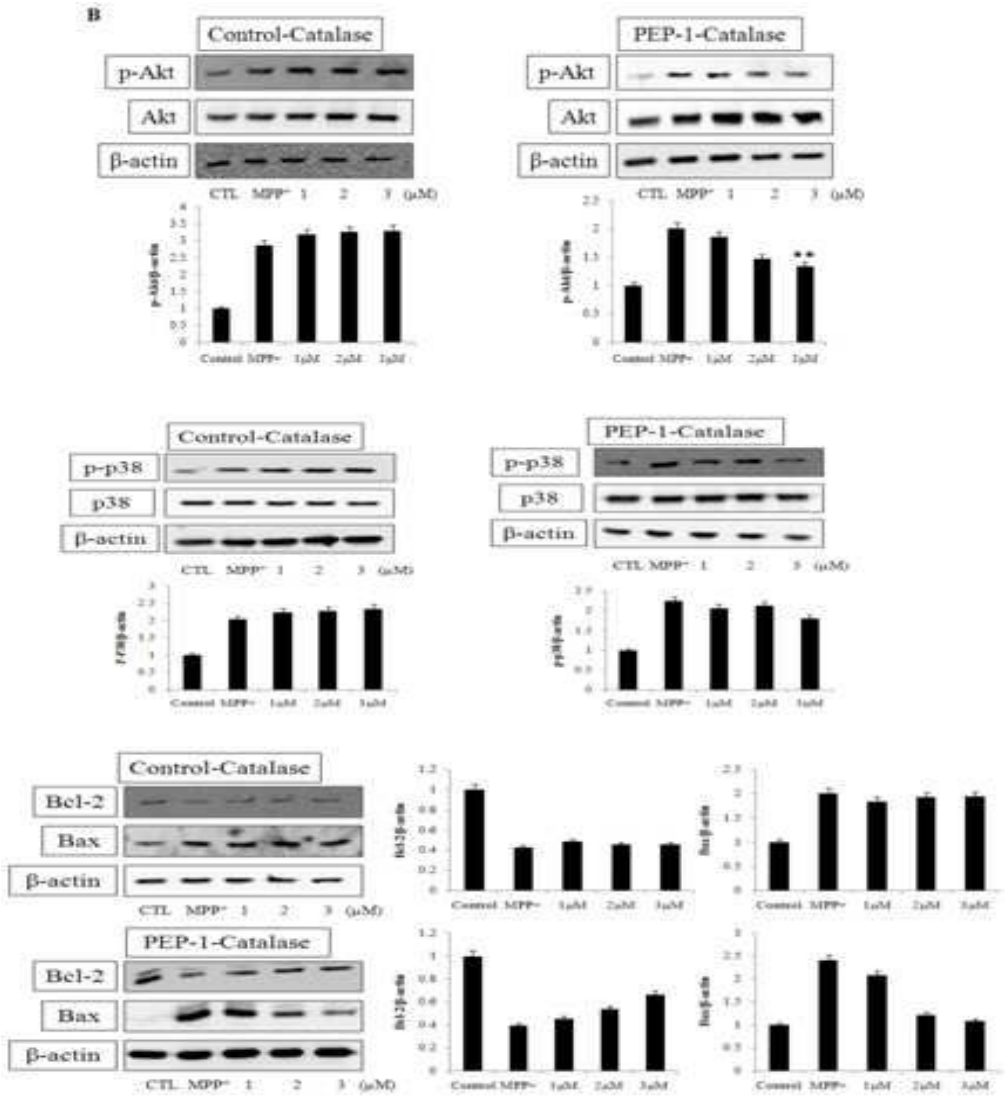
도면2b


B
MPP+
<CTL>
<MPP+>
<catalase 3μM>
<PEP-1-catalase 3μM>
FITC
CELL
MPP+
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Fluorescent intensity (arbitrary unit)
Control
MPP+
Control-Catalase 3μM
PEP-1-Catalase 3μM

도면3a


A
MPP+
<CTL>
<MPP+>
<catalase 3μM>
<PEP-1-catalase 3μM>
DAPI
FITC
Merged
MPP+
Fluorescent level (arbitrary unit)
70
60
50
40
30
20
10
0
**
Control
MPP+
Control-Catalase 3μM
PEP-1-Catalase 3μM

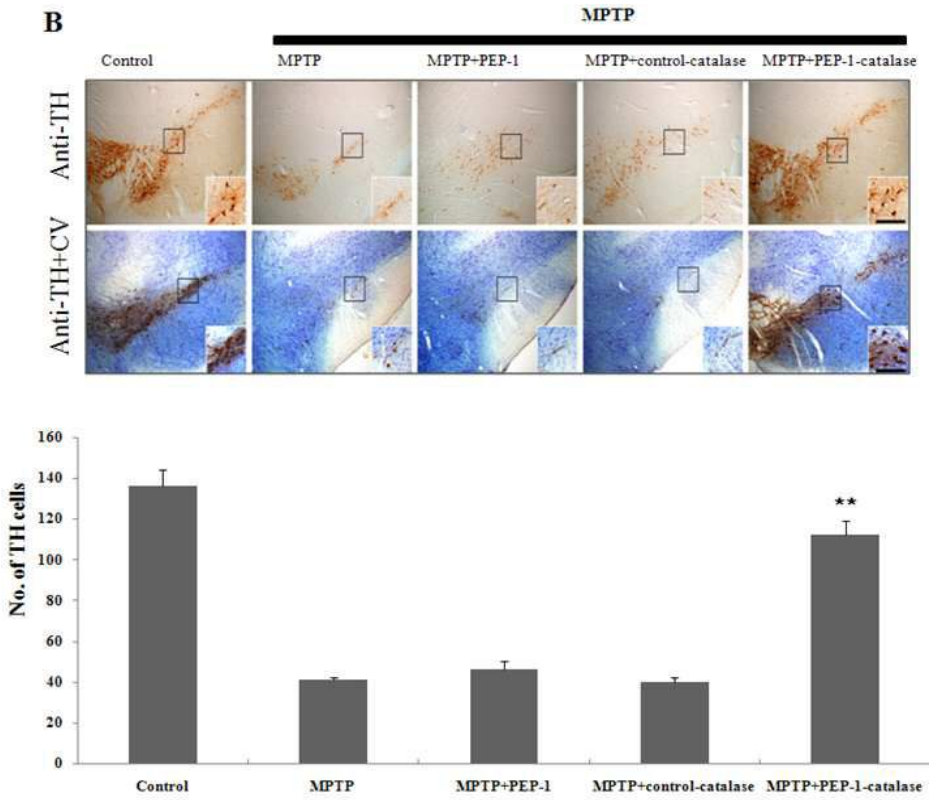
도면3b


B
Control-Catalase
p-Akt
Akt
β-actin
PEP-1-Catalase
p-p38
p38
Control-Catalase
PEP-1-Catalase
Bcl-2
Bax
β-actin
CTL MPP+ 1 2 3 (μM)

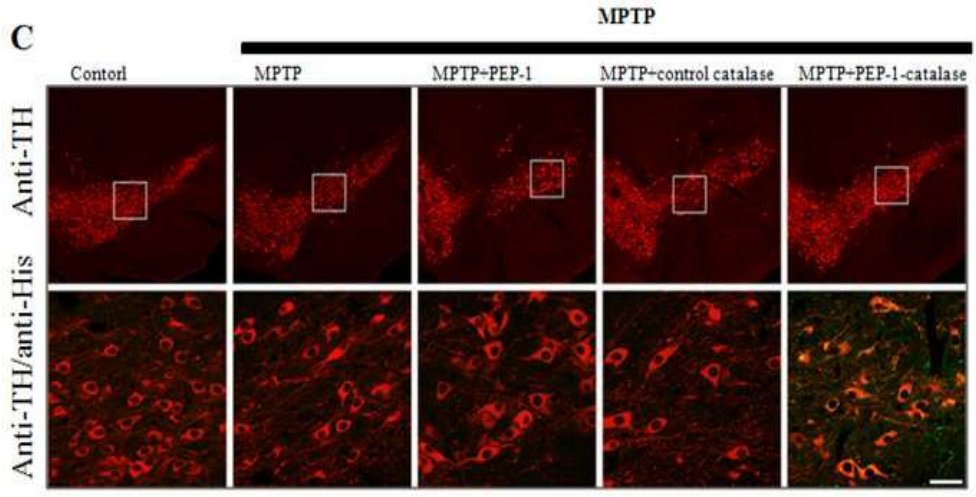
도면4a


A
Control
control-catalase
PEP-1-catalase
Anti-His

도면4b



도면4c



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Pharmaceutical composition for Parkinson's Disease containing Catalase fusion protein

<130> hallym-sychoi-CAT-PD-140624

<160> 18

<170> KopatentIn 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 tgttattaca gtagggcccc gtgggcccct tcttgttcag 240

gatgtggttt tcactgatga aatggctcat tttgaccgag agagaattcc tgagagagtt 300

gtgcatgcta aaggagcagg ggcctttggc tactttgagg tcacacatga cattaccaaa 360

tactccaagg caaaggtatt tgagcatatt ggaaagaaga ctcccatcgc agttcggttc 420

tccactgttg ctggagaatc gggttcagct gacacagttc gggaccctcg tgggtttgca 480

gtgaaatttt acacagaaga tggtaactgg gatctcgttg gaaataacac ccccattttc 540

ttcatcaggg atcccatatt gtttccatct tttatccaca gccaaaagag aaatcctcag 600

acacatctga aggatccgga catggtctgg gacttctgga gcctacgtcc tgagtctctg 660

catcaggttt ctttcttgtt 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

cgccttttg cctatcctga cactcaccgc catcgcctgg gacccaatta tcttcatata 1200

cctgtgaact gtccctaccg tgctcgagtg gccaactacc agcgtgacgg cccgatgtgc 1260

atgcaggaca atcagggtgg tgctccaaat tactacccca 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 aagcggtcaa gaacttcact gaggtccacc ctgactacgg gagccacatc 1560

caggctcttc tggacaagta caatgctgag aagcctaaga atgcgattca caccttgtg 1620

cagtccggat ctcacttggc 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 gcactggaag gagcagcggg ccgcgcagaa 120

agctgatgtc ctgaccactg gagctggtaa cccagtagga gacaaactta atgttattac 180

agtagggccc cgtgggcccc ttcttgttca ggatgtggtt ttcactgatg aaatggctca 240

ttttgaccga gagagaattc ctgagagagt tgtgcatgct aaaggagcag gggcctttgg 300

ctactttgag gtcacacatg acattaccaa atactccaag gcaaaggtat ttgagcatat 360

tggaaagaag actcccatcg cagttcggtt ctccactgtt gctggagaat cgggttcagc 420

tgacacagtt cgggaccctc gtgggtttgc agtgaaattt tacacagaag atggtaactg 480

ggatctcgtt ggaaataaca cccccatttt cttcatcagg gatcccatat tgtttccatc 540

ttttatccac agccaaaaga gaaatcctca gacacatctg aaggatccgg acatggtctg 600

ggacttctgg agcctacgtc ctgagtctct gcatcaggtt 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 gtacccctcc tggacttttt acatccaggt 900

catgacattt aatcaggcag aaacttttcc atttaatcca ttcgatctca ccaaggtttg 960

gcctcacaag gactaccctc tcatcccagt tggtaaactg gtcttaaacc ggaatccagt 1020

taattacttt gctgaggttg aacagatagc cttcgaccca agcaacatgc cacctggcat 1080

tgaggccagt cctgacaaaa tgcttcaggg ccgccttttt gcctatcctg acactcaccg 1140

ccatcgcctg ggacccaatt atcttcatat acctgtgaac tgtccctacc gtgctcgagt 1200

ggccaactac cagcgtgacg gcccgatgtg catgcaggac aatcagggtg gtgctccaaa 1260

ttactacccc aacagctttg gtgctccgga acaacagcct tctgccctgg agcacagcat 1320

ccaatattct ggagaagtgc ggagattcaa cactgccaat gatgataacg ttactcaggt 1380

gcgggcattc tatgtgaacg tgctgaatga ggaacagagg aaacgtctgt gtgagaacat 1440

tgccggccac ctgaaggatg cacaaatttt catccagaag aaagcggtca agaacttcac 1500

tgaggtccac 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 gatggctgac agccgggatc ccgccagcga ccagatgcag 120

cactggaagg agcagcgggc cgcgcagaaa gctgatgtcc tgaccactgg agctggtaac 180

ccagtaggag acaaacttaa tgttattaca gtagggcccc gtgggcccct tcttgttcag 240

gatgtggttt tcactgatga aatggctcat tttgaccgag agagaattcc tgagagagtt 300

gtgcatgcta aaggagcagg ggcctttggc tactttgagg tcacacatga cattaccaaa 360

tactccaagg caaaggtatt tgagcatatt ggaaagaaga ctcccatcgc agttcggttc 420

tccactgttg ctggagaatc gggttcagct gacacagttc gggaccctcg tgggtttgca 480

gtgaaatttt acacagaaga tggtaactgg gatctcgttg gaaataacac ccccattttc 540

ttcatcaggg atcccatatt gtttccatct tttatccaca gccaaaagag aaatcctcag 600

acacatctga aggatccgga catggtctgg gacttctgga gcctacgtcc tgagtctctg 660

catcaggttt ctttcttgtt 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

cgccttttg cctatcctga cactcaccgc catcgcctgg gacccaatta tcttcatata 1200

cctgtgaact gtccctaccg tgctcgagtg gccaactacc agcgtgacgg cccgatgtgc 1260

atgcaggaca atcagggtgg tgctccaaat tactacccca 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 aagcggtcaa gaacttcact gaggtccacc ctgactacgg gagccacatc 1560

caggctcttc tggacaagta caatgctgag aagcctaaga atgcgattca caccttgtg 1620

cagtccggat ctcacttggc ggcaagggag aaggcaaatc tgggatccta 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 tggtggaccg aatggtctca gccgaaaaaa aaacgtaaag tgctcgagat 120

ggctgacagc cgggatcccg ccagcgacca gatgcagcac tggaaggagc agcgggccgc 180

gcagaaagct gatgtcctga ccactggagc tggtaaccca gtaggagaca aacttaatgt 240

tattacagta gggccccgtg ggccccttct tgttcaggat gtggttttca ctgatgaaat 300

ggctcatttt gaccgagaga gaattcctga gagagttgtg catgctaaag gagcaggggc 360

ctttggctac tttgaggtca cacatgacat taccaaatac tccaaggcaa aggtatttga 420

gcatattgga aagaagactc ccatcgcagt tcggttctcc actgttgctg gagaatcggg 480

ttcagctgac acagttcggg accctcgtgg gtttgcagtg aaattttaca cagaagatgg 540

taactgggat ctcgttggaa ataacacccc cattttcttc atcagggatc ccatattgtt 600

tccatctttt atccacagcc aaaagagaaa tcctcagaca catctgaagg atccggacat 660

ggtctgggac ttctggagcc tacgtcctga gtctctgcat caggtttctt tcttgttcag 720

tgatcggggg attccagatg gacatcgcca catgaatgga tatggatcac atactttcaa 780

gctggttaat gcaaatgggg aggcagttta ttgcaaattc cattataaga ctgaccaggg 840

catcaaaaac ctttctgttg aagatgcggc gagactttcc caggaagatc ctgactatgg 900

catccgggat ctttttaacg ccattgccac aggaaagtac ccctcctgga ctttttacat 960

ccaggtcatg acatttaatc aggcagaaac ttttccattt aatccattcg atctcaccaa 1020

ggtttggcct cacaaggact accctctcat cccagttggt aaactggtct taaaccggaa 1080

tccagttaat tactttgctg aggttgaaca gatagccttc gacccaagca acatgccacc 1140

tggcattgag gccagtcctg acaaaatgct tcagggccgc ctttttgcct atcctgacac 1200

tcaccgccat cgcctgggac ccaattatct tcatatacct gtgaactgtc cctaccgtgc 1260

tcgagtggcc aactaccagc gtgacggccc gatgtgcatg caggacaatc agggtggtgc 1320

tccaaattac taccccaaca gctttggtgc tccggaacaa cagccttctg ccctggagca 1380

cagcatccaa tattctggag aagtgcggag attcaacact gccaatgatg ataacgttac 1440

tcaggtgcgg gcattctatg tgaacgtgct gaatgaggaa cagaggaaac gtctgtgtga 1500

gaacattgcc ggccacctga aggatgcaca aattttcatc cagaagaaag cggtcaagaa 1560

cttcactgag gtccaccctg actacgggag ccacatccag gctcttctgg acaagtacaa 1620

tgctgagaag cctaagaatg cgattcacac ctttgtgcag tccggatctc acttggcggc 1680

aagggagaag 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 cgtgggcccc ttcttgttca ggatgtggtt ttcactgatg aaatggctca 240

ttttgaccga gagagaattc ctgagagagt tgtgcatgct aaaggagcag gggcctttgg 300

ctactttgag gtcacacatg acattaccaa atactccaag gcaaaggtat ttgagcatat 360

tggaaagaag actcccatcg cagttcggtt ctccactgtt gctggagaat cgggttcagc 420

tgacacagtt cgggaccctc gtgggtttgc agtgaaattt tacacagaag atggtaactg 480

ggatctcgtt ggaaataaca cccccatttt cttcatcagg gatcccatat tgtttccatc 540

ttttatccac agccaaaaga gaaatcctca gacacatctg aaggatccgg acatggtctg 600

ggacttctgg agcctacgtc ctgagtctct gcatcaggtt 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 gtacccctcc tggacttttt acatccaggt 900

catgacattt aatcaggcag aaacttttcc atttaatcca ttcgatctca ccaaggtttg 960

gcctcacaag gactaccctc tcatcccagt tggtaaactg gtcttaaacc ggaatccagt 1020

taattacttt gctgaggttg aacagatagc cttcgaccca agcaacatgc cacctggcat 1080

tgaggccagt cctgacaaaa tgcttcaggg ccgccttttt gcctatcctg acactcaccg 1140

ccatcgcctg ggacccaatt atcttcatat acctgtgaac tgtccctacc gtgctcgagt 1200

ggccaactac cagcgtgacg gcccgatgtg catgcaggac aatcagggtg gtgctccaaa 1260

ttactacccc aacagctttg gtgctccgga acaacagcct tctgccctgg agcacagcat 1320

ccaatattct ggagaagtgc ggagattcaa cactgccaat gatgataacg ttactcaggt 1380

gcgggcattc tatgtgaacg tgctgaatga ggaacagagg aaacgtctgt gtgagaacat 1440

tgccggccac ctgaaggatg cacaaatttt catccagaag aaagcggtca agaacttcac 1500

tgaggtccac cctgactacg ggagccacat ccaggctctt ctggacaagt acaatgctga 1560

gaagcctaag aatgcgattc acacctttgt gcagtccgga tctcacttgg cggcaaggga 1620

gaaggcaaat ctgggatcct aaaagaaacc tggtgggaaa cctggtggac cgaatggtct 1680

cagccgaaaa aaaaacgtaa agtgtag 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
450 455 460

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 gtgccgcgcg gcagccataa aagaaacctg 60

gtgggaaacc tggtggaccg aatggtctca gccgaaaaaa aaacgtaaag tgctcgagat 120

ggctgacagc cgggatcccg ccagcgacca gatgcagcac tggaaggagc agcgggccgc 180

gcagaaagct gatgtcctga ccactggagc tggtaaccca gtaggagaca aacttaatgt 240

tattacagta gggccccgtg ggccccttct tgttcaggat gtggttttca ctgatgaaat 300

ggctcatttt gaccgagaga gaattcctga gagagttgtg catgctaaag gagcaggggc 360

ctttggctac tttgaggtca cacatgacat taccaaatac tccaaggcaa aggtatttga 420

gcatattgga aagaagactc ccatcgcagt tcggttctcc actgttgctg gagaatcggg 480

ttcagctgac acagttcggg accctcgtgg gtttgcagtg aaattttaca cagaagatgg 540

taactgggat ctcgttggaa ataacacccc cattttcttc atcagggatc ccatattgtt 600

tccatctttt atccacagcc aaaagagaaa tcctcagaca catctgaagg atccggacat 660

ggtctgggac ttctggagcc tacgtcctga gtctctgcat caggtttctt tcttgttcag 720

tgatcggggg attccagatg gacatcgcca catgaatgga tatggatcac atactttcaa 780

gctggttaat gcaaatgggg aggcagttta ttgcaaattc cattataaga ctgaccaggg 840

catcaaaaac ctttctgttg aagatgcggc gagactttcc caggaagatc ctgactatgg 900

catccgggat ctttttaacg ccattgccac aggaaagtac ccctcctgga ctttttacat 960

ccaggtcatg acatttaatc aggcagaaac ttttccattt aatccattcg atctcaccaa 1020

ggtttggcct cacaaggact accctctcat cccagttggt aaactggtct taaaccggaa 1080

tccagttaat tactttgctg aggttgaaca gatagccttc gacccaagca acatgccacc 1140

tggcattgag gccagtcctg acaaaatgct tcagggccgc cttttgcct atcctgacac 1200

tcaccgccat cgcctgggac ccaattatct tcatatacct gtgaactgtc cctaccgtgc 1260

tcgagtggcc aactaccagc gtgacggccc gatgtgcatg caggacaatc agggtggtgc 1320

tccaaattac taccccaaca gctttggtgc tccggaacaa cagccttctg ccctggagca 1380

cagcatccaa tattctggag aagtgcggag attcaacact gccaatgatg ataacgttac 1440

tcaggtgcgg gcattctatg tgaacgtgct gaatgaggaa cagaggaaac gtctgtgtga 1500

gaacattgcc ggccacctga aggatgcaca aattttcatc cagaagaaag cggtcaagaa 1560

cttcactgag gtccaccctg actacgggag ccacatccag gctcttctgg acaagtacaa 1620

tgctgagaag cctaagaatg cgattcacac ctttgtgcag tccggatctc acttggcggc 1680

aagggagaag gcaaatctgg gatcctaaaa gaaacctggt gggaaacctg gtggaccgaa 1740

tggtctcagc cgaaaaaaaa acgtaaagtg 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 tagggccccg tgggcccctt cttgttcagg 240

atgtggtttt cactgatgaa atggctcatt ttgaccgaga gagaattcct gagagagttg 300

tgcatgctaa aggagcaggg gcctttggct actttgaggt cacacatgac attaccaaat 360

actccaaggc aaaggtattt gagcatattg gaaagaagac tcccatcgca gttcggttct 420

ccactgttgc tggagaatcg ggttcagctg acacagttcg ggaccctcgt gggtttgcag 480

tgaaatttta cacagaagat ggtaactggg atctcgttgg aaataacacc cccattttct 540

tcatcaggga tcccatattg tttccatctt ttatccacag ccaaaagaga aatcctcaga 600

cacatctgaa ggatccggac atggtctggg acttctggag cctacgtcct gagtctctgc 660

atcaggtttc tttcttgttc agtgatcggg ggattccaga tggacatcgc cacatgaatg 720

gatatggatc acatactttc aagctggtta atgcaaatgg ggaggcagtt tattgcaaat 780

tccattataa gactgaccag ggcatcaaaa acctttctgt tgaagatgcg gcgagacttt 840

cccaggaaga tcctgactat ggcatccggg atctttttaa cgccattgcc acaggaaagt 900

acccctcctg gacttttac atccaggtca tgacatttaa tcaggcagaa acttttccat 960

ttaatccatt cgatctcacc aaggtttggc ctcacaagga ctaccctctc atcccagttg 1020

gtaaactggt cttaaaccgg aatccagtta attactttgc tgaggttgaa cagatagcct 1080

tcgacccaag caacatgcca cctggcattg aggccagtcc tgacaaaatg cttcagggcc 1140

gccttttgc ctatcctgac actcaccgcc atcgcctggg acccaattat cttcatatac 1200

ctgtgaactg tccctaccgt gctcgagtgg ccaactacca gcgtgacggc ccgatgtgca 1260

tgcaggacaa tcagggtggt gctccaaatt actaccccaa cagctttggt gctccggaac 1320

aacagccttc tgccctggag cacagcatcc aatattctgg agaagtgcgg agattcaaca 1380

ctgccaatga tgataacgtt actcaggtgc gggcattcta tgtgaacgtg ctgaatgagg 1440

aacagaggaa acgtctgtgt gagaacattg ccggccacct gaaggatgca caaattttca 1500

tccagaagaa agcggtcaag aacttcactg aggtccaccc tgactacggg agccacatcc 1560

aggctcttct 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 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 cagcggcctg gtgccgcgcg gcagccaaga agaagaagaa 60

gaagaagaag aagactcgag atggctgaca gccgggatcc cgccagcgac cagatgcagc 120

actggaagga gcagcgggcc gcgcagaaag ctgatgtcct gaccactgga gctggtaacc 180

cagtaggaga caaacttaat gttattacag tagggccccg tgggcccctt cttgttcagg 240

atgtggtttt cactgatgaa atggctcatt ttgaccgaga gagaattcct gagagagttg 300

tgcatgctaa aggagcaggg gcctttggct actttgaggt cacacatgac attaccaaat 360

actccaaggc aaaggtattt gagcatattg gaaagaagac tcccatcgca gttcggttct 420

ccactgttgc tggagaatcg ggttcagctg acacagttcg ggaccctcgt gggtttgcag 480

tgaaatttta cacagaagat ggtaactggg atctcgttgg aaataacacc cccattttct 540

tcatcaggga tcccatattg tttccatctt ttatccacag ccaaaagaga aatcctcaga 600

cacatctgaa ggatccggac atggtctggg acttctggag cctacgtcct gagtctctgc 660

atcaggtttc tttcttgttc agtgatcggg ggattccaga tggacatcgc cacatgaatg 720

gatatggatc acatactttc aagctggtta atgcaaatgg ggaggcagtt tattgcaaat 780

tccattataa gactgaccag ggcatcaaaa acctttctgt tgaagatgcg gcgagacttt 840

cccaggaaga tcctgactat ggcatccggg atctttttaa cgccattgcc acaggaaagt 900

acccctcctg gacttttttac atccaggtca tgacatttaa tcaggcagaa acttttccat 960

ttaatccatt cgatctcacc aaggtttggc ctcacaagga ctaccctctc atcccagttg 1020

gtaaactggt cttaaaccgg aatccagtta attactttgc tgaggttgaa cagatagcct 1080

tcgacccaag caacatgcca cctggcattg aggccagtcc tgacaaaatg cttcagggcc 1140

gccttttgc ctatcctgac actcaccgcc atcgcctggg acccaattat cttcatatac 1200

ctgtgaactg tccctaccgt gctcgagtgg ccaactacca gcgtgacggc ccgatgtgca 1260

tgcaggacaa tcagggtggt gctccaaatt actaccccaa cagctttggt gctccggaac 1320

aacagccttc tgccctggag cacagcatcc aatattctgg agaagtgcgg agattcaaca 1380

ctgccaatga tgataacgtt actcaggtgc gggcattcta tgtgaacgtg ctgaatgagg 1440

aacagaggaa acgtctgtgt gagaacattg ccggccacct gaaggatgca caaattttca 1500

tccagaagaa agcggtcaag aacttcactg aggtccaccc tgactacggg agccacatcc 1560

aggctcttct ggacaagtac aatgctgaga agcctaagaa tgcgattcac acctttgtgc 1620

agtccggatc tcacttggcg 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