

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0002269

(43) 공개일자 2021년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/00 (2006.01) A23L 33/17 (2016.01)

A61K 38/17 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/00 (2013.01)

A23L 33/17 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0078098

(22) 출원일자 2019년06월28일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

최수영

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

조용준

강원도 춘천시 우석로101번길 86, 110동 802호 (석사동, 대우아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강성혜

전체 청구항 수 : 총 8 항

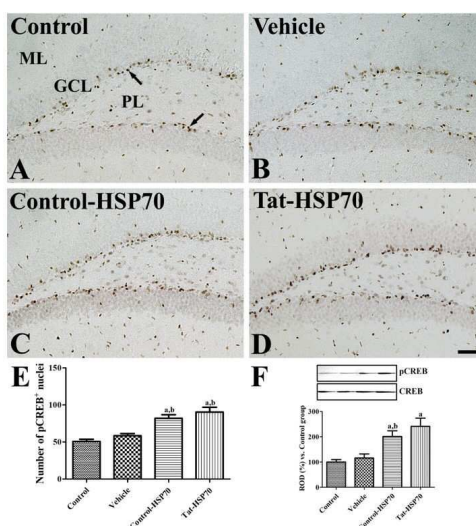
(54) 발명의 명칭 세포 투과성 HSP70 융합단백질을 포함하는 신경 재생용 약학 조성물

## (57) 요약

과제: 부작용이 적거나 없으며, 효과가 우수한 신경재생용 약제를 제공하는 것.

해결수단: 본 발명은 세포 투과성 HSP70 융합단백질을 포함하는 신경재생용 약학 조성물에 관한 것으로서, 본 발명에서는 열충격 단백질 70 (HSP70) 융합단백질이 해마에서 새로운 대상 인식 기억, 세포 증식 및 신경 아세포 분화를 증대하였다. 이러한 결과는 HSP70 융합단백질을 신경발생 촉진 및 신경 퇴행성 질환 예방 용도의 약학 조성물로 이용할 수 있음을 의미한다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

**A61K 38/1703** (2020.05)  
**A61K 47/645** (2017.08)  
**A61P 25/00** (2018.01)  
**A61P 25/16** (2018.01)  
**A61P 25/28** (2018.01)  
**A23V 2002/00** (2013.01)  
**A23V 2200/322** (2013.01)

(72) 발명자

**음원식**

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

**신민재**

인천광역시 남구 낙섬중로 18, 1-1201 (용현동, 대  
 립아파트)

**최연주**

충청북도 옥천군 청성면 궁촌길 20-16

**여현지**

서울특별시 성북구 보문사길 111, 103동 1301호

**여은지**

서울특별시 성북구 보문사길 111, 103동 1301호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                      |
|-------------|--------------------------------------|
| 과제고유번호      | 2019R1A6A1A11036849                  |
| 부처명         | 교육부                                  |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                               |
| 연구사업명       | 대학중점연구소 지원사업                         |
| 연구과제명       | 단백질 침투기술 기반 퇴행성 뇌질환 치료용 융합단백질 실용화 연구 |
| 기 여 율       | 1/1                                  |
| 과제수행기관명     | 한림대학교                                |
| 연구기간        | 2019.06.01 ~ 2020.02.28              |

**황인구**

서울특별시 관악구 관악로 1 C동 402호 (봉천동,  
 서울대학교수아파트122)

**김우석**

서울특별시 관악구 관악로 285, 104동 706호 (봉천  
 동, 성현동아아파트)

**권현정**

강원도 강릉시 경강로2015번안길 7

**김대원**

강원도 강릉시 교동광장로 138-12, 302동 201호

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

단백질 수송 도메인과 열충격 단백질 70이 공유결합된 HSP70 융합단백질을 포함하는 신경 재생용 약학 조성물.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 HIV Tat 도메인 또는 Pep-1 도메인임을 특징으로 하는 신경 재생용 약학 조성물.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 HSP70 융합단백질은 서열번호 2 또는 4임을 특징으로 하는 신경 재생용 약학 조성물.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서,

신경 재생용 약학 조성물은 알츠하이머 병 또는 파킨슨 병으로 인한 신경 퇴행성 질환 예방 또는 치료용으로 사용되는 것임을 특징으로 하는 신경 재생용 약학 조성물.

#### 청구항 5

단백질 수송 도메인과 열충격 단백질 70이 공유결합된 HSP70 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 신경 재생용 약학 조성물.

#### 청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 HSP70 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1 또는 3임을 특징으로 하는 신경 재생용 약학 조성물.

#### 청구항 7

단백질 수송 도메인과 열충격 단백질 70이 공유결합된 HSP70 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 HSP70 융합단백질 발현 벡터를 함유하는 신경 재생용 약학 조성물.

#### 청구항 8

단백질 수송 도메인과 열충격 단백질 70이 공유결합된 HSP70 융합단백질을 포함하는 신경 재생 촉진용 건강기능성 식품 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 세포 투과성 HSP70 융합단백질을 포함하는 신경 재생 및 신경 퇴행성 질환 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 신경 줄기세포 (Neural stem cells; NSCs)는 측뇌실의 뇌실하 영역과 치아 이랑의 과립하 영역에 위치하며, 후각 신경구와 치아 이랑에서 새로운 뉴런으로 분화된다 [1-3]. 이 세포들은 평생 동안 유지되며, 해마는 허혈 및 알츠하이머 병을 비롯한 신경 질환에 가장 민감한 영역이기 때문에 치아 이랑에서의 신경 발생은 매우 중요하다 [4-7]. 치아 이랑에서 신경 줄기세포는 과립하 영역에 위치하고, 신경아세포로 분화되며, 과립 세포층으로 이동하여 성숙한 뉴런이 된다 [2]. 새로 생성된 뉴런은 해마가 새로운 환경의 요구에 적응하고 인지능력 요구에 반응하는 것을 도와 새로운 기술, 운동 조정 및 감정적 통제의 획득을 향상시킨다 [8, 9]. 신경 줄기세포의 수는 나이, 스트레스 및 화학 독소에 따라 감소하지만 운동, 풍요한 환경 및 항우울제와 같은 신경 정신병 약에 의해 증가할 수 있다 [10-14]. 신경 줄기세포 수의 변화는 신경 치료에 중요하며 신경 줄기세포는 신경 질환에 대한 잠재적 치료 방법으로 여겨지고 있다.

[0003] 열 충격 단백질 (heat shock protein; HSP)의 발현은 다양한 세포 구조의 비정상 조건에 의해 유도되며, HSP는 분자량에 따라 명명된다 [15]. HSP70은 세포질, 핵, 소포체 및 미토콘드리아에서 발견되는 분자 보호자 (chaperone)이다. HSP70은 단백질 폴딩, 세포막을 가로지르는 단백질 이동, 다양한 사건에 대한 비특이적인 세포 보호와 같은 다양한 기능을 가지고 있다 [16-18]. 신경계에서 HSP70 및 이의 조절자들은 알츠하이머 병, 파킨슨 병, 헌팅턴 병 및 뇌졸중과 같은 신경 질환에 대한 신경 보호효과를 나타낸다 [19-21]. 외생 HSP70의 지속적 투여는 늙은 마우스의 학습 및 기억을 향상시키고, 대조군과 비교하여 뇌에서 시냅토피신 (synaptophysin) 면역 반응성을 증가시킨다 [22]. HSP70은 CRE (cAMP 26 responsive element) 결합 단백질 (CREB)에 의해 활성화될 수 있는 프로모터 영역에 cAMP 26 응답 요소 (CRE) 모티프를 갖는데 [23, 24], 이것은 장기기억 형성에 가장 중요한 경로 중 하나이다 [25, 26]. 그러나 해마에서 신경 발생에 미치는 HSP70의 영향에 대한 증거는 없다.

[0004] 혈액-뇌 장벽과 원형질막은 독성 물질로부터 뇌와 세포를 보호하는 독특한 구조로 인해 펩타이드, 단백질, 올리고 뉴클레오타이드와 같은 생체 활성 분자에 대해 대부분 불투과성이다. 반대로, 혈액-뇌 장벽 및 원형질막 내에 표적이 위치하는 경우 치료제는 대개 효과가 낮다 [27]. 인간 면역 결핍 바이러스-1 (HIV-1)의 Tat 펩타이드는 그 이동성을 담당하는 양이온성의, 아르기닌이 풍부한 짧은 서열을 가지고 있다 [28]. 최근 HIV-1과 그 Tat 단백질은 인지 기능과 성인 해마 신경발생을 저해하는 주된 인자 중 하나로 생각되고 있다. Tat 펩타이드는 마우스 뇌에서 해마의 신경 발생을 억제하고 배양된 신경 전구 세포의 증식, 이동 및 분화를 유의하게 감소시킨다 [29-31]. 그러나 이전 연구에서 본 발명자들은 Tat 펩타이드와 융합한 단백질이 척수와 뇌의 혈액-뇌 장벽을 효과적으로 통과하여 세포 내로 들어가 기능적 활성을 나타냄을 증명했다 [32, 33]. 또한, Tat-HSP70 융합단백질은 마우스의 허혈 손상에 대하여 신경 보호 효과를 나타내었고 [34], 허혈로 인하여 유도된 염증 반응을 억제하였다 [35].

### 선행기술문헌

#### 비특허문헌

- [0005] (비특허문헌 0001) van Praag H et al., (2002) Nature 415:1030-1034
- (비특허문헌 0002) Rikani AA et al., (2013) Ann Neurosci 20:67-70
- (비특허문헌 0003) Frann̄a TFA (2018) Neurobiol Learn Mem 155:136-142
- (비특허문헌 0004) Nikonenko AG et al., (2009) Anat Rec (Hoboken) 292:1914-1921
- (비특허문헌 0005) Fjell AM et al., (2014) Prog Neurobiol 117:20-40
- (비특허문헌 0006) Walker MC (2015) Semin Neurol 35:193-200
- (비특허문헌 0007) Castilla-Ortega E et al., (2016) Neurosci Biobehav Rev 66:15-32

- (비특허문헌 0008) Opendak M et al., (2015) Trends Cogn Sci 19:151-161
- (비특허문헌 0009) Anacker C et al., (2017) Nat Rev Neurosci 18:335-346
- (비특허문헌 0010) Heberden C (2016) Nutr Res Rev 29:163-171
- (비특허문헌 0011) Bettio LEB et al., (2017) Neurosci Biobehav Rev 79:66-86
- (비특허문헌 0012) Kang E et al., (2017) Neurotoxicol Teratol 60:33-39
- (비특허문헌 0013) Tang FR et al., (2017) Brain Dev 39:277-293
- (비특허문헌 0014) Liu PZ et al., (2018) Front Neurosci 12:52
- (비특허문헌 0015) Charveron M et al., (1995) Cell Biol Toxicol 11:161-165
- (비특허문헌 0016) Kelly S, Yenari MA (2002) Curr Med Res Opin 18 Suppl 2:s55-s60
- (비특허문헌 0017) Franklin TB et al., (2005) Int J Hyperthermia 21:379-392
- (비특허문헌 0018) Fu ES, Tummala RP (2005) Curr Opin Anaesthesiol 18:181-187
- (비특허문헌 0019) Shevtsov MA et al., (2014) Drug Des Devel Ther 8:639-650
- (비특허문헌 0020) Pratt WB et al., (2015) Annu Rev Pharmacol Toxicol 55:353-371
- (비특허문헌 0021) Repalli J, Meruelo D (2015) Drug Des Devel Ther 9:321-331
- (비특허문헌 0022) Bobkova NV et al., (2015) Proc Natl Acad Sci USA 112:16006-16011
- (비특허문헌 0023) Choi HS et al., (1991) J Biol Chem 266:11858-11865
- (비특허문헌 0024) Murshid A et al., (2010) PLoS One 5:e13830
- (비특허문헌 0025) Izquierdo I et al., (2006) Trends Neurosci 29:496-505
- (비특허문헌 0026) Suzuki A et al., (2011) J Neurosci 31:8786-8802
- (비특허문헌 0027) Daneman R et al., (2015) Cold Spring Harb Perspect Biol 7:a020412
- (비특허문헌 0028) Frankel AD et al., (1988) Cell 55:1189-1193
- (비특허문헌 0029) Ferrell D, Giunta B (2014) Cell Mol Life Sci 71:4387-4392
- (비특허문헌 0030) Fan Y et al., (2016) J Neurosci 36:11362-11373
- (비특허문헌 0031) Harricharan R et al., (2015) Behav Brain Funct 11:3
- (비특허문헌 0032) Yoo DY et al., (2017) Cell Death Dis 8:e3075
- (비특허문헌 0033) Jung HY et al., (2019) Neurochem Res 44:323-332
- (비특허문헌 0034) Doeppner TR et al., (2009) J Cereb Blood Flow Metab 29:1187-1196
- (비특허문헌 0035) Doeppner TR et al., (2013) J Cereb Blood Flow Metab 33:1778-1788
- (비특허문헌 0036) Kilkenny C et al., (2010) PLoS Biol 8:e1000412
- (비특허문헌 0037) Shin MJ et al., (2014) Free Radic Biol Med 67:195-210
- (비특허문헌 0038) Bradford MM (1976) Anal Biochem 72:248-254
- (비특허문헌 0039) Nagel F et al., (2008) J Neurochem 105:853-864
- (비특허문헌 0040) Jung HY et al., (2017) Biochim Biophys Acta 1861:3142-3153
- (비특허문헌 0041) Paxinos G et al., (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego
- (비특허문헌 0042) Yoo DY et al., (2012) J Pineal Res 52:21-28

- (비특허문헌 0043) Morimoto RI (1993) Science 259:1409-1410
- (비특허문헌 0044) Plumier JC et al., (1995) J Clin Invest 95:1854-1860
- (비특허문헌 0045) Robinson MB et al., (2005) J Neurosci 25:9735-9745
- (비특허문헌 0046) Bobkova NV et al., (2014) J Alzheimers Dis 38:425-435
- (비특허문헌 0047) Ekimova IV et al., (2010) J Neurochem 115:1035-1044
- (비특허문헌 0048) Zhao Z et al., (2013) J Cereb Blood Flow Metab 33:1897-1908
- (비특허문헌 0049) Porto RR et al., (2018) Neuroscience 375:108-118
- (비특허문헌 0050) Miyakoshi LM et al., (2017) Front Cell Neurosci 11:138
- (비특허문헌 0051) Hashikawa N et al., (2017) Sci Adv 3:e1603014
- (비특허문헌 0052) Doeppner TR et al., (2012) Stem Cells 30:1297-1310
- (비특허문헌 0053) Evgen'ev MB et al., (2017) J Alzheimers Dis 59:1415-1426
- (비특허문헌 0054) Bourtchuladze R et al., (1994) Cell 79:59-68
- (비특허문헌 0055) Bernabeu R et al., (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94:7041-7046
- (비특허문헌 0056) Tully T et al., (2003) Nat Rev Drug Discov 2:267-277
- (비특허문헌 0057) Hwang IK et al., (2011) Cell Mol Neurobiol 31:669-674

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0006] 따라서, 본 발명은 해마에서 신경세포 증식, 신경모세포 분화 등에 미치는 Tat-HSP70 융합단백질의 효과를 탐색하여 신경 재생 및 신경의 퇴행성 질환 예방을 위한 효과적인 예방제 또는 치료제를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0007] 본 발명에서, 우리는 Tat-HSP70 융합 단백질을 생성하고 해마 치아 이랑에서 세포 증식 및 신경 아세포 분화뿐만 아니라 새로운 대상 인식 기억에 Tat-HSP70 융합단백질의 효과를 관찰했다.

### 과제의 해결 수단

- [0008] HSP70은 음성 피드백을 통해 발현을 조절할 수 있으며 [43, 44], HSPA1A의 과발현은 HSP70 유도를 억제한다. 외생성 HSP70이 뇌 혈관 장벽을 통과할 수 있고 에너지 부족으로 인한 손상 [45], 알츠하이머 병 [46], 간질 [47]로부터 뉴런을 보호할 수 있음을 증명하는 몇 가지 증거가 있다. 그러나, 이러한 연구는 비생리적인 병적 조건에서 수행되었다. 본 발명에서는 HSP70을 뉴런에 전달하기 위해 Tat-HSP70 융합단백질과 대조군-HSP70 단백질을 만들고 대조군-HSP70 단백질과 Tat-HSP70 융합단백질이 새로운 대상 인식 메모리와 치아 이랑에서의 세포 증식 및 신경아세포 분화에 미치는 영향을 비교했다.
- [0009] 본 발명자들은 대조군-HSP70 단백질과 Tat-HSP70 융합단백질을 성공적으로 구축하였고, 웨스턴 블롯으로 확인하였다. 웨스턴 블롯 결과, 양 단백질은 Tat 펩타이드 분자량에 해당하는 1.56 kDa 만큼 차이를 보였다. HSP70 단백질이 해마 내로 효율적으로 전달되었는지를 평가하기 위하여 대조군-HSP70 단백질과 Tat-HSP70 융합단백질을 21일간 마우스에 투여하고 무처리 대조군 또는 담체 처리군과 비교하여 양 군의 폴리히스티딘 발현이 증가하였음을 관찰하였다. 그러나, 폴리히스티딘 단백질 수준은 대조군-HSP70 단백질에 비하여 Tat-HSP70 융합단백질 처리군의 해마 균질액에서 좀 더 많이 발견되었다. 또한, 본 발명자들은 HSP70이 해마 내로 직접 전달됨을 밝히기 위해서 HSP70에 대한 면역조직화학 염색을 수행하였다. 대조군-HSP70 단백질과 Tat-HSP70 융합단백질 처리는 무처리 대조군 및 담체 처리군과 비교하여 HSP70 면역 반응성 구조가 현저히 증가함을 보였다. 그러나, 대조군-HSP70 단백질 처리군에 비하여 Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서 HSP70 단백질 수준이 더 높았다. 이 결과는 HSP70 단백질이 감염되지 않은 마우스의 뇌-혈관 장벽을 가로지를 수 있고, Tat-HSP70 융합단백질이 마우스 해

마로 효율적으로 전달되었음을 제시한다.

- [0010] 본 발명에서, 대조군-HSP70 단백질 또는 Tat-HSP70 융합단백질을 3주 동안 투여하면 쥐에서 새로운 대상 인식이 상당히 향상되었다. 이 결과는 외인성 HSP70 또는 HSP70이 학습 및 기억 형성의 개선을 유도한다는 것을 보여주는 이전의 연구와 일치했다 [22, 48, 49]. 5개월과 9개월 동안 외인성 HSP70을 비강 내 투여하면 늙은 마우스의 학습과 기억이 향상되었다 [22]. 또한, 등쪽 해마에 재조합 HSP70 (hspa1a)을 주입하면 훈련 직후 기억 병합이 촉진되고 HSP70 항체 투여 후에는 훈련 직후 기억 병합이 차단된다 [49]. HSP70 유도제인 GGA (Geranylgeranylacetone)는 모리스 수중 미로에서 인지/정서 기능의 회복을 촉진하고 외상성 뇌 손상 마우스 모델에서 새로운 물체 인식을 향상시킨다 [48]. HSP70은 신경아세포 막의 외부 엽상부에서 발견되었으며 뇌실하 영역 (subventricular zone)에서 신경 모세포 이동을 조절한다 [50]. 대조군-HSP70 단백질 또는 Tat-HSP70 융합단백질을 3주 동안 투여하면 치아 이랑에서의 세포 증식과 신경아세포 분화가 현저히 증가하였다. 그러나, 스트레스가 없는 (대조군) 마우스에 GGA를 8주간 투여하면 DCX (doublecortin) 면역 반응성 신경아세포에는 유의한 변화가 없었으나, 스트레스를 준 마우스에서는 DCX 면역 반응성 신경아세포가 유의하게 증가하였다 [51]. 허혈 동물에서 Tat-HSP70 융합단백질로 형질전환된 신경 전구세포는 뇌 유래 신경 영양인자를 포함하는 지속적인 고농도 성장 인자로 신경 발생을 촉진할 뿐만 아니라 이차 신경 퇴행을 예방함으로써 기능적 결과를 향상시켰다 [52]. 알츠하이머 동물 모델에서, 외인성 HSP70의 비강 내 투여는 신경 세포의 활동 및 신경 발생과 관련된 유전자를 증가시킨다 [53].
- [0011] 치아 이랑에서 세포 증식과 신경아세포의 분화를 용이하게 하는 HSP70의 가능한 기전을 밝히기 위해 CREB의 활성화가 장기 기억 형성과 기억 병합을 위한 가장 중요한 경로 중 하나이기 때문에 우리는 CREB 경로에 초점을 맞추었다 [25, 26]. 대조군-HSP70 단백질 또는 Tat-HSP70 융합단백질을 3주간 투여한 결과, 치아 이랑 과립하 지역에서 pCREB 면역 반응성 핵의 숫자가 현저히 증가하였다. 이 결과는 대조군-HSP70 단백질 및 Tat-HSP70 융합단백질이 CREB의 인산화를 용이하게 함으로써 치아 이랑에서 세포 증식과 신경아세포 분화를 촉진함을 제시한다. CREB는 마우스에서 시냅스 형성, 장기 기억 강화 및 기억 형성을 유도하는 필수 요소이다 [54-56]. 또한 치아 이랑의 과립하 지역에서의 pCREB 발현은 주로 마우스의 DCX 면역 반응성 신경아세포에서 발견되었다 [57]. CREB는 ERK (extracellular signal-regulated kinases) 캐스케이드의 하류 조절자이기 때문에, Tat-HSP70 융합단백질을 등쪽 해마에 직접 주입하는 것은 노화된 마우스 해마에서 훈련 직후 ERK 활성을 증가시켰다 [49].
- [0012] 결론적으로, Tat-HSP70 융합단백질의 투여는 CREB의 강화된 인산화를 통해 치아 이랑에서 세포 증식 및 신경아세포 분화를 증가시킴으로써 새로운 대상 인식을 상당히 개선시켰다.
- [0013] 본 발명에서는 열충격 단백질 70 (HSP70)이 해마에서 새로운 대상 인식, 세포 증식 및 신경 아세포 분화에 미치는 영향을 조사하였다. 혈액 뇌 장벽과 신경 원형질 막으로의 침투를 촉진하기 위해 Tat-HSP70 융합 단백질을 제조하였다. 8주령 마우스에 담체 (10% 글리세롤), 대조군-HSP70 단백질 또는 Tat-HSP70 융합단백질을 21일 동안 하루에 한 번 복강 내 주사하였다. 해마에 HSP70의 전달 효율을 밝히기 위해 폴리히스티딘에 대한 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 폴리히스티딘 단백질 수준은 대조군 또는 담체 처리군과 비교하여 대조군 HSP70 및 Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서 유의하게 증가하였다. 그러나, 폴리히스티딘 단백질 수준은 Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서 대조군 HSP70 처리군보다 유의하게 높았다. 또한, HSP70에 대한 면역조직화학적 연구는 대조군 HSP70 및 Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서 HSP70 면역 반응의 유도에 대한 직접적인 증거를 나타내었다. Tat-HSP70 융합단백질 투여는 무처리 마우스 또는 담체로 처리한 마우스에 비해 새로운 대상 인식 메모리를 증가시켰다. 또한, Tat-HSP70 융합단백질 투여는 Ki67 및 DCX 면역 염색법에 기초하여 대조군 또는 담체 처리군과 비교하여 치아 이랑에서 증식하는 세포 및 분화된 신경아세포의 개체군을 유의하게 증가시켰다. 또한, cAMP 반응 요소 결합 단백질 (pCREB)의 인산화는 대조군 또는 담체 처리군과 비교하여 Tat-HSP70 융합단백질 처리군의 치아 이랑에서 유의하게 향상되었다. 웨스턴 블롯 연구를 통해 Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서 대조군이나 담체 처리군과 비교하여 DCX와 pCREB 단백질 수준이 증가하였음을 입증했다. 이와 대조적으로 대조군-HSP70의 투여는 대조군 또는 담체 처리군과 비교하여 치아 이랑에서 새로운 대상 인식 기억, 세포 증식 및 신경 아세포 분화를 약간 증가시켰다. 이러한 결과는 Tat-HSP70 융합단백질이 해마에서 pCREB를 증가시킴으로써 해마 기능을 촉진한다는 것을 시사한다.
- [0014] 본 발명은 단백질 수송 도메인과 열충격 단백질 70이 공유결합된 HSP70 융합단백질을 포함하는 신경 재생용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송 도메인이 HIV Tat 도메인 또는 Pep-1 도메인임을 특징으로 하는 신경 재생용 약학 조성물에 관한 것이다.



- [0016] 또한, 본 발명은 상기 HSP70 융합단백질이 서열번호 2 또는 4임을 특징으로 하는 신경 재생용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0017] 또한, 본 발명은 신경 재생용 약학 조성물이 알츠하이머 병 또는 파킨슨 병으로 인한 신경 퇴행성 질환 예방 또는 치료용으로 사용되는 것임을 특징으로 하는 신경 재생용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0018] 또한, 본 발명은 단백질 수송 도메인과 열충격 단백질 70이 공유결합된 HSP70 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 신경 재생용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 HSP70 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 서열이 서열번호 1 또는 3임을 특징으로 하는 신경 재생용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0020] 또한, 본 발명은 단백질 수송 도메인과 열충격 단백질 70이 공유결합된 HSP70 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 HSP70 융합단백질 발현 벡터를 함유하는 신경 재생용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0021] 이뿐만 아니라, 본 발명은 단백질 수송 도메인과 열충격 단백질 70이 공유결합된 HSP70 융합단백질을 포함하는 신경 재생 촉진용 건강기능성 식품 조성물에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명의 HSP70 융합단백질, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는 신경재생용 약학 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 피부 외용제, 경구, 스프레이, 패치 또는 주사 등 다양한 형태로 제형화할 수 있다. 예를 들면 경구용 조성물로는 정제 및 젤라틴 캡슐이 있으며, 이들은 활성 성분 이외에도 희석제(예: 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로스 및/또는 글리신), 활탁제(예: 실리카, 텔크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 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 보존제(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.
- [0023] 본 발명은 또한 HSP70 단백질을 세포 내로 효율적으로 전달하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 HSP70 단백질 분자의 세포 내 전달은 HIV Tat 펩타이드와 같은 단백질 수송 도메인이 공유결합된 형태의 융합단백질을 구성하여 수행된다. 본 발명의 상기 단백질 수송 도메인의 일례로는 HIV Tat 펩타이드를 들 수 있다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 HIV Tat 펩타이드로만 한정되는 것은 아니고, HIV Tat 펩타이드의 아미노산 서열 일부 치환이나 부가, 결여로 HIV Tat 펩타이드와 유사한 기능을 하는 펩타이드를 제조하는 것이 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 당업자에게는 용이하므로, 7~21개의 아미노산으로 구성되고, 라이신 또는 아르기닌을 4개 이상 다수 포함하는 단백질 수송 도메인과 이로부터 아미노산 일부 치환으로 동일·유사한 단백질 수송기능을 수행하는 단백질 수송 도메인을 이용한 융합단백질도 본 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.
- [0024] 또한, 본 발명은 HSP70 융합단백질, HSP70 융합단백질을 코딩하는 올리고뉴클레오타이드, HSP70 융합단백질을 코딩하는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 벡터, 이 융합단백질을 포함하는 신경재생 촉진 용도의 건강기능성 식품조성물에 관한 것이다.
- [0025] 본 발명의 상기 세포 투과성 HSP70 융합단백질을 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 HSP70 융합단백질의 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 본 발명의 건강음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 HSP70 융합단백질을 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 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리진등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를



유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다. 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, 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

[0026]

본 발명에서는 열충격 단백질 70 (HSP70) 융합단백질이 해마에서 새로운 대상 인식 기억, 세포 증식 및 신경 아세포 분화를 증대하였다. 이러한 결과는 HSP70 융합단백질을 신경발생 촉진 및 신경 퇴행성 질환 예방 용도의 약학 조성물로 이용할 수 있음을 의미한다.

### 도면의 간단한 설명

[0027]

도 1은 Tat-HSP70 융합단백질의 정제와 마우스 해마 내로 투과를 나타낸다. (A) Tat-HSP70 융합단백질 모식도. (B) 항-폴리히스티딘 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석으로 대조군 HSP70 및 Tat-HSP70 융합단백질의 발현과 정제 확인. (C) 무처리 대조군, 담체 처리군 (10% 글리세롤), 대조군-HSP70 단백질 처리군, Tat-HSP70 융합단백질 처리군의 해마 균질물을 폴리히스티딘 프로브로 웨스턴 블롯 분석한 결과 (각 군당  $n = 5$ ;  $^aP < 0.05$ , 무처리 대조군과 비교한 값;  $^bP < 0.05$ , 담체 처리군과 비교한 값;  $^cP < 0.05$ , 대조군-HSP70 처리군과 비교한 값). (D) 무처리 대조군, 담체 처리군 (10% 글리세롤), 대조군-HSP70 단백질 처리군, Tat-HSP70 융합단백질 처리군 마우스의 치아 이랑에 대한 HSP70 면역조직화학 결과. HSP70 면역 반응성 조직은 Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서 가장 많이 발견되었다. GCL, 과립 세포층 (granule cell layer); ML, 분자층 (molecular layer); PL, 다형층 (polymorphic layer). 크기 막대 = 50  $\mu\text{m}$ .

도 2는 무처리 대조군, 담체 처리군 (10% 글리세롤), 대조군-HSP70 단백질 처리군, Tat-HSP70 융합단백질 처리군 마우스에 대하여 새로운 대상 인식 시험 중 친근한 대상과 새로운 대상에 대한 탐구 시간 (각 군당  $n = 10$ ;  $*p < 0.05$ , 친근한 대상과 새로운 대상 간에 유의한 차이가 있음) 및 구별 지수이다 (각 군당  $n = 5$ ;  $^aP < 0.05$ , 무처리 대조군과 비교한 값;  $^bP < 0.05$ , 담체 처리군과 비교한 값;  $^cP < 0.05$ , 대조군-HSP70 처리군과 비교한 값). 각 대상 (동일 물건, 한 물건은 시험일에 새 물건으로 교체되었다)에 대한 탐구시간 데이터는 총 탐구시간의 백분율로 나타내었다. 모든 데이터는 % 탐구 시간  $\pm$  표준편차로 나타내었다.

도 3은 무처리 대조군 (A), 담체 처리군 (B), 대조군-HSP70 단백질 처리군 (C), Tat-HSP70 융합단백질 처리군 (D) 마우스 치아 이랑의 Ki67에 대한 면역조직화학 결과이다. 모든 군에서 Ki67-양성 핵 (화살표)은 치아 이랑의 과립하 지역 (subgranular zone)에서 발견되었다. 대조군-HSP70 단백질 처리군과 Tat-HSP70 융합단백질 처리군 마우스의 치아 이랑에서 Ki67-양성 핵이 많이 발견되었다. GCL, 과립 세포층 (granule cell layer); ML, 분자층 (molecular layer); PL, 다형층 (polymorphic layer). 크기 막대 = 50  $\mu\text{m}$ . (E) 각 군의 절편 당 치아 이랑의 Ki67-양성 핵 갯수를 나타내었다 (각 군당  $n = 5$ ;  $^aP < 0.05$ , 무처리 대조군과 비교한 값;  $^bP < 0.05$ , 담체 처리군과 비교한 값). 데이터는 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다.

도 4는 무처리 대조군 (A), 담체 처리군 (B), 대조군-HSP70 단백질 처리군 (C), Tat-HSP70 융합단백질 처리군 (D) 마우스 치아 이랑의 DCX에 대한 면역조직화학 결과이다. 모든 군에서 DCX-면역 반응성 신경아세포 (화살표)는 수상돌기가 있는 치아 이랑에서 발견되었다. DCX-면역 반응성 신경아세포는 대조군 HSP70 단백질 처리군 및 Tat-HSP70 융합단백질 처리군 마우스의 치아 이랑에서 미세한 돌기 트리 분기를 나타낸다는 것을 유의해야 한다. GCL, 과립 세포층 (granule cell layer); ML, 분자층 (molecular layer); PL, 다형층 (polymorphic layer). 크기 막대 = 50  $\mu\text{m}$ . (E) 상대적 광학 밀도 (RODs)는 무처리 대조군 치아 이랑의 DCX 면역 반응성을 나타내는 값의 백분율로 나타내었다. (F) 웨스턴 블롯 분석 값은 무처리 대조군에서 DCX 및  $\beta$ -액틴 면역블롯 밴드의 비율로 나타낸다 (각 군당  $n = 5$ ;  $^aP < 0.05$ , 무처리 대조군과 비교한 값;  $^bP < 0.05$ , 담체 처리군과 비교한 값). 데이터는 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다.

도 5는 무처리 대조군 (A), 담체 처리군 (B), 대조군-HSP70 단백질 처리군 (C), Tat-HSP70 융합단백질 처리군

(D) 마우스 치아 이랑의 pCREB 면역조직화학 결과이다. 모든 군에서, pCREB-양성 핵 (화살표)은 주로 치아 이랑의 과립하 부위에서 발견된다. Note that pCREB-양성 핵은 Tat-HSP70 융합단백질 처리군 마우스의 치아 이랑에서 강하게 관찰되었다. GCL, 과립 세포층 (granule cell layer); ML, 분자층 (molecular layer); PL, 다형층 (polymorphic layer). 크기 막대 = 50  $\mu$ m. (E) 각 군의 절편 당 치아 이랑의 pCREB-양성 핵 갯수 및 (F) 웨스턴 블롯 분석 값은 무처리 대조군에서 pCREB 및 CREB 면역 반응성 밴드의 비율로 나타내었다 (각 군당  $n = 5$ ; <sup>a</sup> $P < 0.05$ , 무처리 대조군과 비교한 값; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , 담체 처리군과 비교한 값). 데이터는 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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.

### 실험 동물

40마리의 수컷 C57BL/6J 마우스 (7주령)를 Jackson Laboratory Co. Ltd (Bar Harbor, ME, USA)에서 구입하였다. 음식과 물에 자유롭게 접근할 수 있는 조건에서 12:12시간의 명암 사이클, 주위 온도 ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) 및 습도 ( $60 \pm 5\%$ )의 표준 조건 하에서 케이지 당 5마리의 동물을 수용하였다. 동물 취급 및 관리는 현 국제법 및 정책 지침 (실험 동물의 관리 및 사용에 관한 NIH 지침, 공고번호. 85-23, 1985, 1996년 개정)에 부합하며 서울대학교 시설동물 보호 및 이용 위원회의 승인을 받았다 (SNU-170807-10). 모든 실험은 사용된 동물의 수와 수행된 절차에 의한 생리적 스트레스를 최소화하기 위한 노력으로 수행되었다. 모든 실험절차는 ARRIVE 지침에 따라 수행되었다.

### 발현벡터 구축

세포 침투성 TAT 발현벡터는 종래 기술과 같이 제조하였다 [37]. 사람 HSP70 cDNA 서열을 다음의 프라이머 서열을 이용하여 PCR로 증폭하였다: 정방향 프라이머서열, 5'-CTC GAG ATG GCC AAA GCC-3', 역방향 프라이머서열, 5'-GGA TCC CTA ATC TAC CTC CTC-3'. 제조자의 지시에 따라 PCR 산물을 자르고, 용출하고 (Expin Gel; GeneAll Biotechnology Co., Ltd., Seoul, Korea), TA 클로닝 벡터 (pGEM<sup>®</sup>-T easy vector; Promega Corporation, Madison, WI, USA)에 연결하였다. 정제된 사람 HSP70 cDNA 함유 TA 벡터를 TAT 발현벡터에 연결하여 TAT-HSP70 융합단백질을 제조하였다. 유사하게, TAT이 없는 상태로 HSP70을 발현하여 대조군 HSP70 단백질을 구축하였다. TAT-HSP70 융합단백질과 대조군 HSP70 단백질을 생산하기 위하여, 플라스미드를 *Escherichia coli* BL21 세포 내로 형질전환하였다. 형질전환된 세균을 100mL의 용균 브로쓰 배지에 넣고  $37^\circ\text{C}$ 로 D600 값이 0.5~1.0이 되도록 배양한 다음, 0.5 mM IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside)로  $37^\circ\text{C}$ 에서 6시간 동안 배양하여 유도하였다. 회수한 세포는 초음파 처리로 용균하고,  $\text{Ni}^{2+}$ -나이트릴로아세트산 세파로즈 친화 컬럼 (Qiagen, Inc.) 및 PD-10 컬럼 크로마토그래피 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA)를 이용하여 정제하였다. 정제된 단백질의 농도는 브래드포드 분석법으로 측정하였다.

동량의 단백질은 10% SDS-PAGE로 분석하였다. 분석된 단백질은 폴리비닐리덴 다이폴루오라이드 막으로 전기이동한 다음, 막을 5% 탈지유 함유 TBS 완충액 (25 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5)으로 블로킹하였다. 막은 폴리히스티딘 항체 (1:2,000, His-probe, SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 이용하여 탐지하였다. 단백질은 제조자의 추천에 따라 화학발광시약 (Amersham, Franklin Lakes, NJ, USA)을 이용하여 확인하였다.

### Tat-HSP70 융합단백질 투여

마우스는 네 개의 군으로 나누었다. 네 개의 군은 각각 무처리 대조군, 담체 처리군 (10% 글리세롤), 대조군-HSP70 단백질 처리군, Tat-HSP70 융합단백질 처리군이다. 담체, 5 nmol 대조군-HSP70 단백질 또는 5 nmol Tat-HSP70 융합단백질을 8주령 마우스에 3주 동안 매일 한 번씩 피하주사하였다. Tat-HSP70 융합단백질이 마우스에서 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘 처리에 의해 유도된 파킨슨병에 대하여 이 투여량에서 신경

보호효과를 나타내었기 때문에 이 투여량을 적용한 것이다 [39].

[0040] **새로운 대상 인식 시험**

[0041] 시험 장치는 종래 기술과 같이 검정 아크릴로 만들어진 개방된 상자 (25 cm X 25 cm X 25 cm)로 구성된다 [40]. 바닥은 특정 장소에서 악취가 쌓이는 것을 막기 위해 나무 칩을 깔았다. 구별 대상은 경질 금속으로 제조되었고 중량이 있어서 마우스가 이 대상을 옮길 수는 없었다. 이 대상은 표백제로 씻어 잔류 냄새를 제거했다.

[0042] 담체, 대조군-HSP70 단백질 또는 Tat-HSP70 융합단백질로 처리한 지 20일째에 처리 1시간 후 각 군 (각 군당  $n = 10$ )의 마우스가 2분간 장치를 탐색하도록 하였다. 시험일 (처리 21일째)에, 마지막 처리 후 1시간이 지난 다음 2분간의 탐색을 두 번 하도록 하였다. "샘플"시험 (T1)에서 두 개의 동일한 물체가 장치의 두 대각선 모서리에 배치되었다. 마우스를 장치에 넣고 이 두 개의 동일한 물체를 탐색하도록 두었다. T1 이후, 마우스를 1시간 간격으로 원래의 케이지에 다시 넣었다. 이어서 "선택" 시험 (T2)을 수행하였다. T2에서는, T1에 있던 하나의 물체를 새로운 것으로 바꾸었다. 마우스는 두 개의 다른 (친숙한 것과 새로운 것) 물체에 다시 노출되었다. 탐색은 2cm 이하의 거리에서 물체 쪽으로 코를 향하거나 물체를 코에 접촉시키는 것으로 정의된다. 이 측정으로부터 일련의 변수, 즉 T1에서 두 개의 동일한 대상을 탐색하는 데 소요된 총 시간과 T2에서 두 개의 다른 대상을 탐색하는 데 소요된 시간이 계산되었다.

[0043] T2에서 익숙한 대상과 새로운 대상의 구별은 익숙한 대상을 탐색하는 데 소요된 시간과 새 대상을 탐색하는 데 소요된 시간을 비교하여 결정되었다. 구별 지수는 T2에서 탐색 시간의 차이를 두 대상을 탐색하는 데 소요된 총 시간에 대한 비율로 나타낸다.

[0045] **웨스턴 블롯**

[0046] 새로운 대상 인식 시험 후 무처리 대조군, 담체 처리군, 대조군-HSP70 단백질 처리군 및 Tat-HSP70 융합단백질 처리군의 동물들 (각 군당  $n=5$ )은 희생되어 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다 [32, 40]. 2g/kg 우레탄 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 깊이 마취한 후 vibratome (Leica Microsystems GmbH)에서 해마 조직을 500  $\mu$ m 두께의 절편으로 자르고 수술용 날을 사용하여 해마를 절개했다. 해마 조직은 0.1 mM 에틸렌 글라이콜-비스 ( $\beta$ -아미노에틸에테르)-N,N',N'-테트라아세트산 (pH 8.0), 0.2% Nonidet P-40, 10 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (pH 8.0), 15 mM 소듐 피로인산, 100 mM  $\beta$ -글리세로인산, 50 mM 불화 나트륨, 150 mM 염화 나트륨, 2 mM 소듐 오르소바나테이트, 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 및 1 mM DTT (dithiothreitol)가 함유된 50 mM PBS (pH 7.4)에서 균질화하였다. 이어서 16,000 Xg로 4℃에서 5분간 원심분리하고, 소 혈청 알부민을 표준 시료로 하는 Micro BCA 단백질 분석 키트 (Pierce; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 상층액의 단백질을 정량하였다. 총 단백질 20  $\mu$ g을 함유하는 분취액을 로딩 완충액 (150 mM Tris (pH 6.8), 3 mM DTT, 6% SDS, 0.3% 브로모페놀 블루 및 30% 글리세롤 함유)에서 끓였다. 각 분취액은 폴리아크릴아마이드 겔에 로딩하였다. 전기영동 후 겔에 있는 단백질은 나이트로셀룰로스 막 (Pall Life Sciences, Port Washington, NY, USA)으로 옮겼다. 배경 염색을 줄이기 위해 막은 0.1% Tween-20 함유 PBS에 5% 탈지유를 넣어 45분간 25℃로 배양하였고, 이후 토끼 항-폴리히스티딘 1차 항체 (1:2,000, His-probe, SantaCruz Biotechnology), 토끼 항-DCX 항체 (1:10,000; Abcam, Cambridge, UK), Ser133에서 인산화된 CREB에 대한 토끼 항체 (pCREB; 1:1,000; Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA) 또는 토끼 항-CREB 항체 (1:1,000; Cell Signaling Technology, Inc.)와 함께 배양하고, 또 퍼옥시데이즈-결합 염소 항-토끼 IgG (1:5000, SantaCruz Biotechnology)를 넣고 배양하고, ECL 화학발광 키트 (Pierce; Thermo Fisher Scientific, Inc.)로 분석하였다.

[0048] **조직 처리**

[0049] 새로운 대상 인식 시험 이후 동물 (각 군당  $n=5$ )을 1g/kg의 우레탄 (Sigma-Aldrich)으로 깊이 마취하고 0.1M PBS (pH 7.4)로 경심 관류한 후 4% 파라포름알데하이드함유 0.1 M PBS (pH 7.4)로 처리하였다 [32, 40]. 뇌를 해부하고 12시간 동안 동일한 고정액으로 고정하였다. 조직을 30% 수크로스로 밤새 포화시켜 동결보존 하였다. 순차적 뇌 절편을 저온유지장치 (Leica, Wetzlar, Germany)를 사용하여 30  $\mu$ m의 두께로 관상으로 잘라내고, 추가 처리를 위해 PBS가 들어있는 6- 웰 플레이트에 수집했다.

[0051] **면역조직화학**

[0052] 모든 절편은 면역조직화학 데이터가 군 간에 비교될 수 있도록 동일한 조건에서 처리되었다. Ki67, DCX 및 pCREB 면역조직화학에 대한 마우스 지도 [41]에 의해 정의된 바와 같이, 서로 90 $\mu$ m의 거리에 위치한 조직 절편은 브레그마 (bregma) 후방 1.82에서 2.30mm 사이의 영역에서 선택되었다. 절편들은 0.3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함유 PBS로 30분간, 이후 10% 정상 염소 혈청 함유 0.05 M PBS로 30분간 25℃에서 순차적으로 처리하였다. 절편은 먼저 마우스 항-HSP70 항체 (1:500; Calbiochem, EMD Milipore, Temecula, CA, USA), 토끼 항-Ki67 항체 (1:1,000; Abcam), 토끼 항-DCX 항체 (1:5,000; Abcam) 또는 토끼 항-pCREB 항체 (1:400; Cell Signaling Technology, Inc.)와 함께 25℃에서 밤새 배양하였다. 이후, 절편을 바이오틴 결합된 염소 항-마우스 또는 항-토끼 IgG 및 스트렙타비딘-퍼옥시데이즈 복합체 (1:200; Vector, Burlingame, CA, USA)로 25℃에서 두 시간 동안 처리하였다. 절편은 DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrachloride, Sigma) 함유 0.1M Tris-HCl 완충액 (pH 7.2)과 반응시켜 시각화하고 젤라틴 코팅된 슬라이드에 올려놓았다. 절편을 탈수하고 캐나다 발삼과 함께 올려놓았다 (Kanto Chemical, Tokyo, Japan).

[0054] **데이터 분석**

[0055] 이미지 분석 시스템과 ImageJ 소프트웨어 버전 1.50 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 사용하여 DCX에 대한 해마 치아 이랑을 분석하였다. 데이터 분석은 이전 연구 [40]에서 설명한 대로 맹검 조건에서 객관성을 보장하기 위해 각 실험에 대해 두 명의 관찰자가 동일한 조건 하에서 수행했다. 서로 90 $\mu$ m의 거리에 있는 조직 절편은 마우스 지도 [41]에서 정의한 대로 브레그마보다 1.82 ~ 2.30 mm 뒤쪽 영역에서 선택했다. 전체 치아 이랑의 디지털 이미지는 컴퓨터 모니터에 연결된 디지털 카메라 (DP72, Olympus)가 장착된 BX51 광학 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)으로 촬영했다. 이미지는 1200 $\mu$ m X 900 $\mu$ m (100 X 일차 배율)의 조직 면적에 해당하는 512 x 512 픽셀의 배열로 보정되었다. 각 픽셀 해상도는 256 그레이 레벨이었고 DCX 면역 반응의 강도는 ROD = log (256/평균 그레이 레벨)을 사용하여 평균 그레이 레벨의 변환 후 얻어진 상대 광학 밀도 (ROD)로 평가되었다. 배경 염색의 상대 광학 밀도는 Photoshop CC 2018 소프트웨어 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA)를 사용하여 절편의 표지되지 않은 부분에서 결정하였고, 이 값을 ImageJ 버전 1.50 소프트웨어 (National Institutes of Health)를 사용하여 비특이적인 염색을 보정하기 위해 뺐다. 데이터는 무처리 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 무처리 대조군을 100%로 본다.

[0056] 전체 치아 이랑에서 Ki67- 및 pCREB-면역 반응성 핵은 선행 연구 [40]에 기재된 것과 같이 컴퓨터 기반 CCD 카메라 (OPTIMAS software version 6.5; CyberMetrics<sup>®</sup> Corporation, Phoenix, AZ, USA; magnification, 100 X)가 장착된 분석 시스템을 이용하여 계수하였다. 영상을 흑백 영상으로 전환한 후, Ki67 및 pCREB 면역 반응성 핵은 Ki67 및 pCREB 면역 조직 화학 염색 강도에 따라 각각 자동 선택하였다.

[0058] **통계 분석**

[0059] 데이터는 각각의 실험 조사에 대해 수행된 실험의 평균값으로 표현되었다.

[0060] 세포 수와 ROD의 변화를 결정하기 위해 Grapher Prism 5.01 소프트웨어 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)를 사용하여 Bonferroni의 사후 검증 (post-hoc test) 한 후 편차 분석을 통해 통계적으로 군 간의 평균 차이를 분석했다. 결과는 p < 0.05이면 통계적으로 유의하다고 간주되었다.

[0062] **결과 1: 대조군-HSP 단백질 및 Tat-HSP70 융합단백질 구축**

[0063] 대조군-HSP70 단백질 및 Tat-HSP70 융합단백질을 제조하기 위하여 인간 HSP70 유전자를 Tat 펩타이드 발현 벡터와 융합하였고, 대조군-HSP70 단백질은 Tat 도메인 없이 제조하였다 (도 1A). 벡터 과발현 이후 대조군-HSP70 단백질 및 Tat-HSP70 융합단백질은 Ni<sup>bt</sup>-니트릴로아세트산 세파로즈 친화 컬럼 → Ni<sup>2+</sup>- 니트릴로아세트산 세파로즈 친화 컬럼 및 PD-10 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. 웨스턴 블롯 분석 결과, 진한 대조군-HSP70 단백질 및 Tat-HSP70 융합단백질 띠가 얻어졌다 (도 1B).



[0065] **결과 2: 해마 내로 Tat-HSP70 융합단백질 투과 확인**

[0066] Tat-HSP70 융합단백질의 전달은 폴리히스티딘에 대한 웨스턴 블롯 분석과 HSP70에 대한 면역조직화학으로 확인하였다. 폴리히스티딘 단백질 수준은 무처리 대조군 및 담체 처리군과 비교하여 대조군-HSP70 단백질 처리군 및 Tat-HSP70 융합단백질 처리군의 해마 균질액에서 현저히 증가하였다. 또한, 폴리히스티딘 단백질 수준은 대조군-HSP70 단백질 처리군에 비하여 Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서 현저히 높았다 (도 1C). HSP70 면역 반응성은 무처리 대조군과 담체 처리군의 치아 이랑에서 희미하게 관찰되었지만, 대조군-HSP70 단백질 처리군 또는 Tat-HSP70 융합단백질 처리군의 치아 이랑에서 많이 관찰되었다. 또한, HSP70 면역 반응성 구조는 대조군-HSP70 단백질 처리군에 비해 Tat-HSP70 융합단백질 처리군의 치아 이랑에서 더 풍부하였다 (도 1D).

[0068] **결과 3: 새로운 대상 인식 메모리에 대한 Tat-HSP70 융합단백질의 효과**

[0069] 훈련 기간 동안 군 간에 동일한 두 대상을 탐색하는 데 소요되는 시간에는 큰 차이가 없었다. 시험 기간 동안 모든 군의 마우스는 친숙한 대상과 비교하여 새로운 대상을 탐색하는 데 더 많은 시간을 보냈다. 그러나, 대조군-HSP70 단백질 처리군 및 Tat-HSP70 융합단백질 처리군의 마우스는 무처리 대조군 또는 담체 처리군의 마우스에 비해 새로운 대상을 탐색하는 데 훨씬 더 많은 시간을 보냈다. 구별 지수 또한 무처리 대조군 또는 담체 처리군과 비교하여 대조군-HSP70 단백질 처리군 및 Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서 유의하게 높았다. 구별 지수는 대조군-HSP70 단백질 처리군과 비교하여 Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서 유의하게 높았다 (도 2).

[0071] **결과 4: 치아 이랑에서 세포 증식에 대한 Tat-HSP70 융합단백질의 효과**

[0072] 모든 군에서 Ki67 양성 핵은 치아 이랑의 과립하 지역에서 주로 발견되었으나, Ki67-양성 핵의 수는 군 간에 유의한 차이가 있었다. 무처리 대조군과 담체 처리군에서 몇몇 Ki67 핵이 치아 이랑에서 관찰되었으며 (도 3A 및 3B), 담체 처리군에서 Ki67-양성 핵의 수가 무처리 대조군과 비교하여 약간 증가하였으나, 무처리 대조군과 담체 처리군 간에 통계적 유의성은 발견되지 않았다 (도 3E). 대조군-HSP70 단백질 처리군과 비교하여 Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서는 무처리 대조군과 비교하여 Ki67-양성 핵의 수가 많았다 (도 3C 및 3D). 대조군-HSP70 단백질 처리군 및 Tat-HSP70 융합단백질 처리군의 Ki67-양성 핵 수는 무처리 대조군과 비교하여 각각 181.9% 및 197.1%로 현저히 증가하였다 (도 3E).

[0074] **결과 5: 치아 이랑에서 신경아세포 분화에 대한 Tat-HSP70 융합단백질의 영향**

[0075] 모든 군의 치아 이랑에서 DCX 면역 반응성 신경아세포가 발견되었다. 그들의 세포체는 치아 이랑의 과립하 지역에 위치하고 있었고, 그들의 수상 돌기는 치아 이랑의 분자 층으로 확장되어 있었다. 그러나 DCX 면역 반응성은 군 간에 현저한 차이가 있었다. 무처리 대조군과 담체 처리군에서 DCX 면역 반응성 신경아세포는 치아 이랑에서 드문드문 발견되었고 (도 4A 및 4B), DCX 면역 반응은 군 간의 치아 이랑에서 유사했다 (도 4E). 대조군-HSP70 단백질 처리군 및 Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서는 치아 이랑에서 DCX 면역 반응성 신경아세포가 많이 발견되었고, 대조군-HSP70 단백질 처리군 및 Tat-HSP70 융합단백질 처리군의 DCX 면역 반응성은 무처리 대조군에 비해 각각 171.5% 및 194.2% 증가하였다. 대조군-HSP70 단백질 처리군 및 Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서는 무처리 대조군과 비교하여 DCX 단백질 수준이 현저히 증가하였고, Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서 가장 높았다 (도 4F).

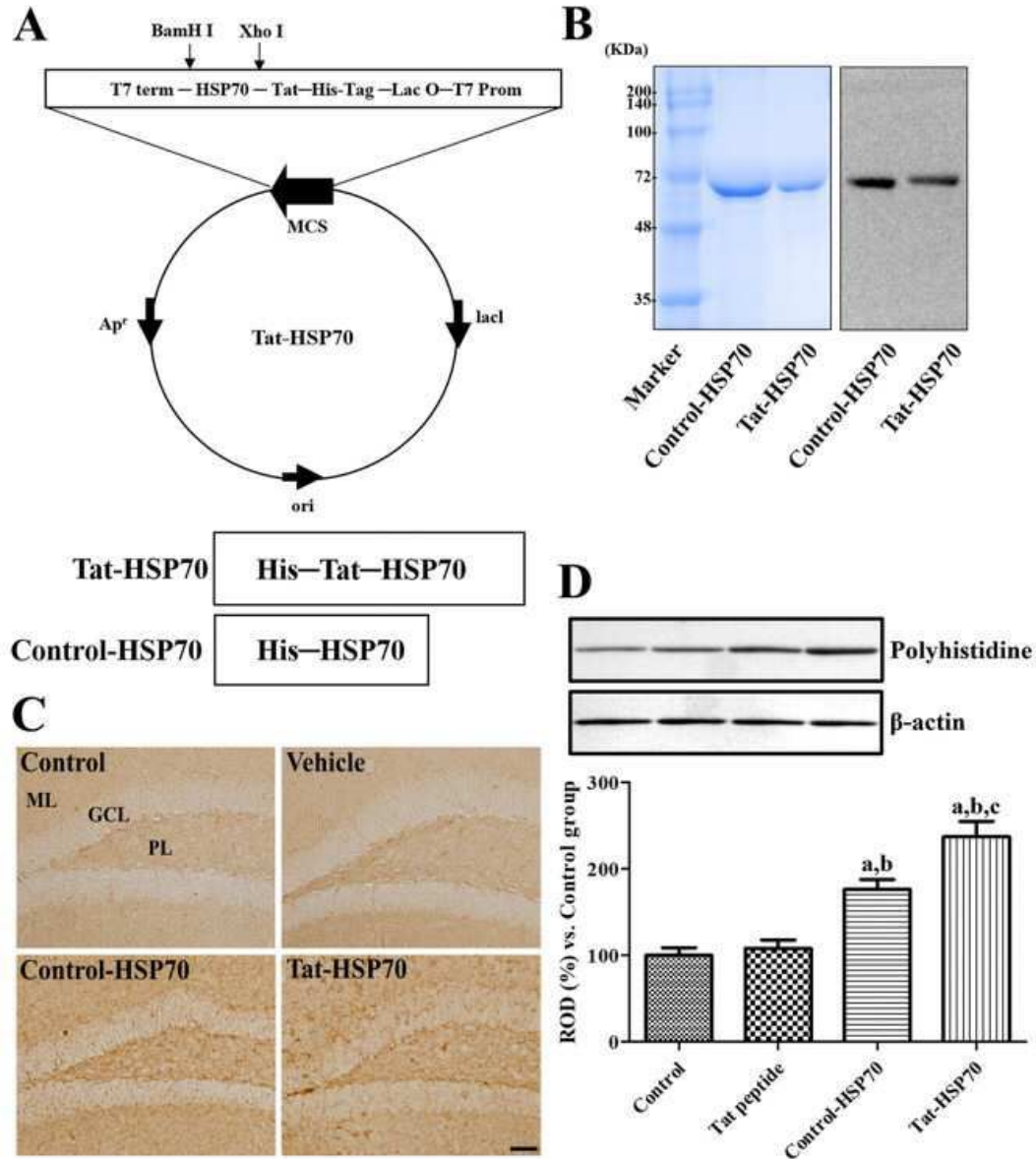
[0077] **결과 6: 치아 이랑에서 CREB 인산화에 미치는 Tat-HSP70 융합단백질의 영향**

[0078] 모든 군에서, pCREB 면역 반응성 핵은 치아 이랑의 과립하 지역에서 주로 발견되었다. 그러나, pCREB 면역 반응성 핵의 수는 군 간에 유의한 차이가 있었다. 무처리 대조군과 담체 처리군에서는 pCREB 면역 반응성 핵의 분포 패턴과 수가 유사하였다 (도 5A, 5B 및 5E). 대조군-HSP 단백질 처리군에서는 무처리 대조군에 비하여 pCREB 면역 반응성 핵이 풍부하였으나, 두 군 간에 통계학적으로 유의한 차이는 발견되지 않았다 (도 5C 및 5E). Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서는 치아 이랑 과립하 지역에서 pCREB 면역 반응성 핵이 강하게 관찰되었고, pCREB 면역 반응성 핵의 수는 치아 이랑에서 무처리 대조군과 비교하여 각각 161.5% 및 178.3% 증가하였다 (도 5D 및

5E). 웨스턴 블롯 분석 결과, 무처리 대조군이나 담체 처리군에 비하여 대조군-HSP70 단백질 처리군 및 Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서 pCREB/CREB 비가 현저히 증가함을 보였다. 그러나, 대조군-HSP70 단백질 처리군과 Tat-HSP70 융합단백질 처리군 간의 pCREB/CREB 비는 유의한 차이가 없었다 (도 5F).

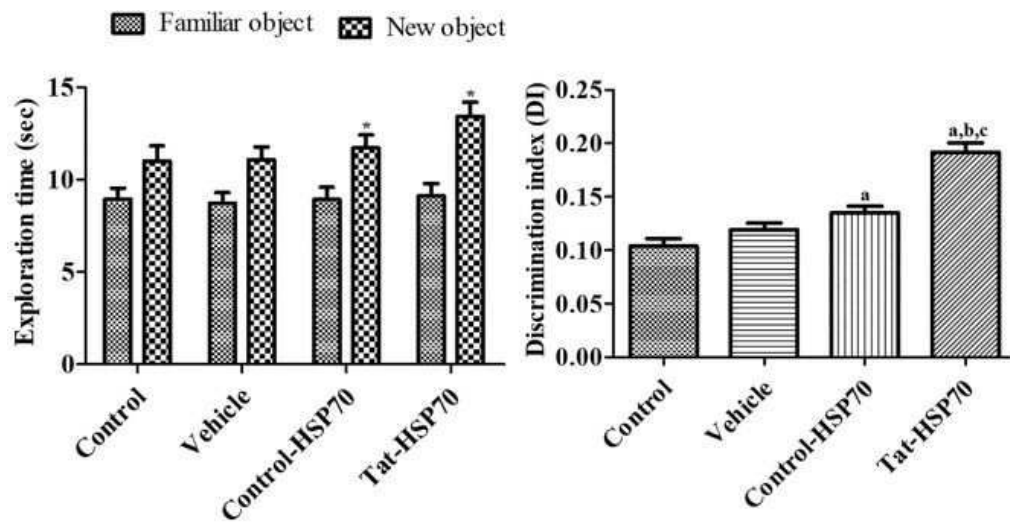
도면

도면1

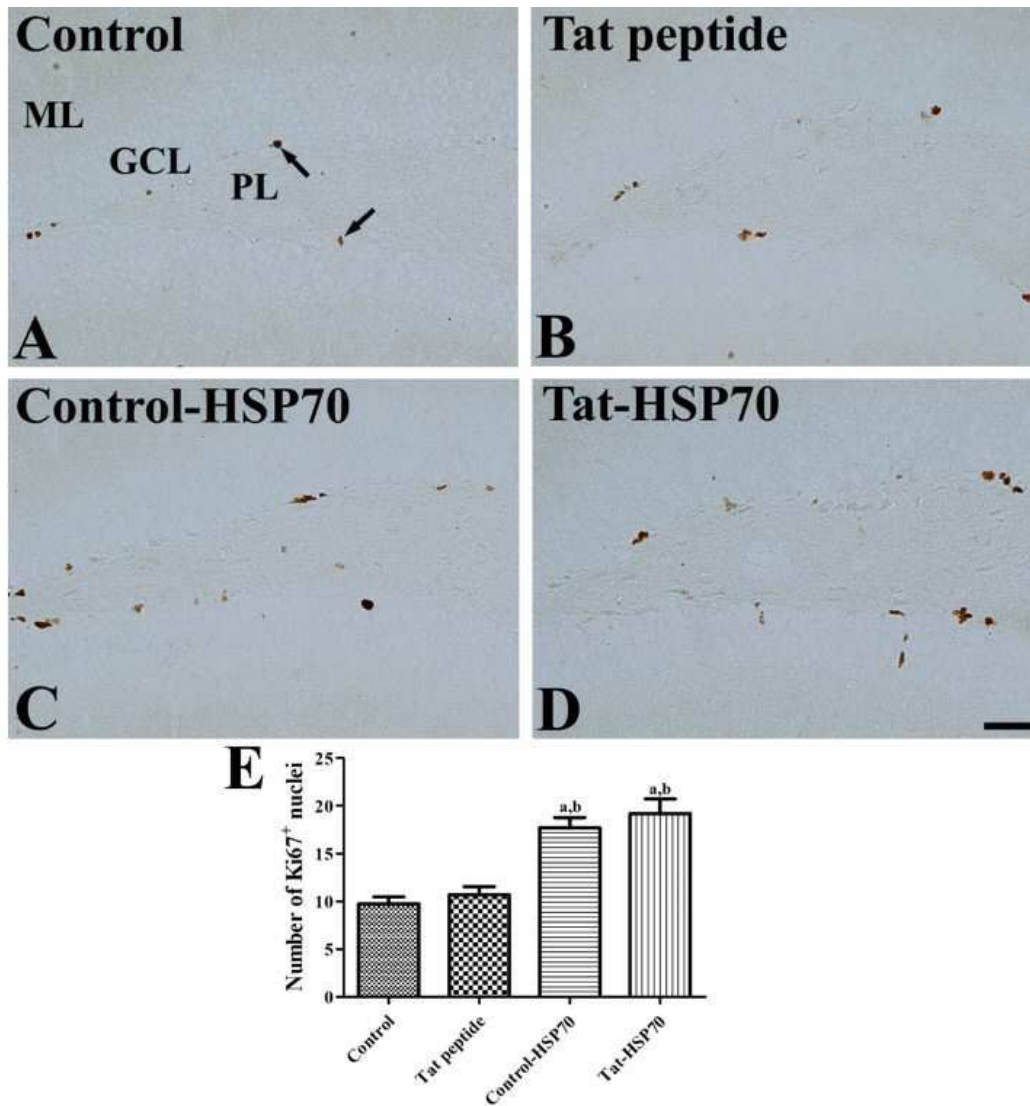




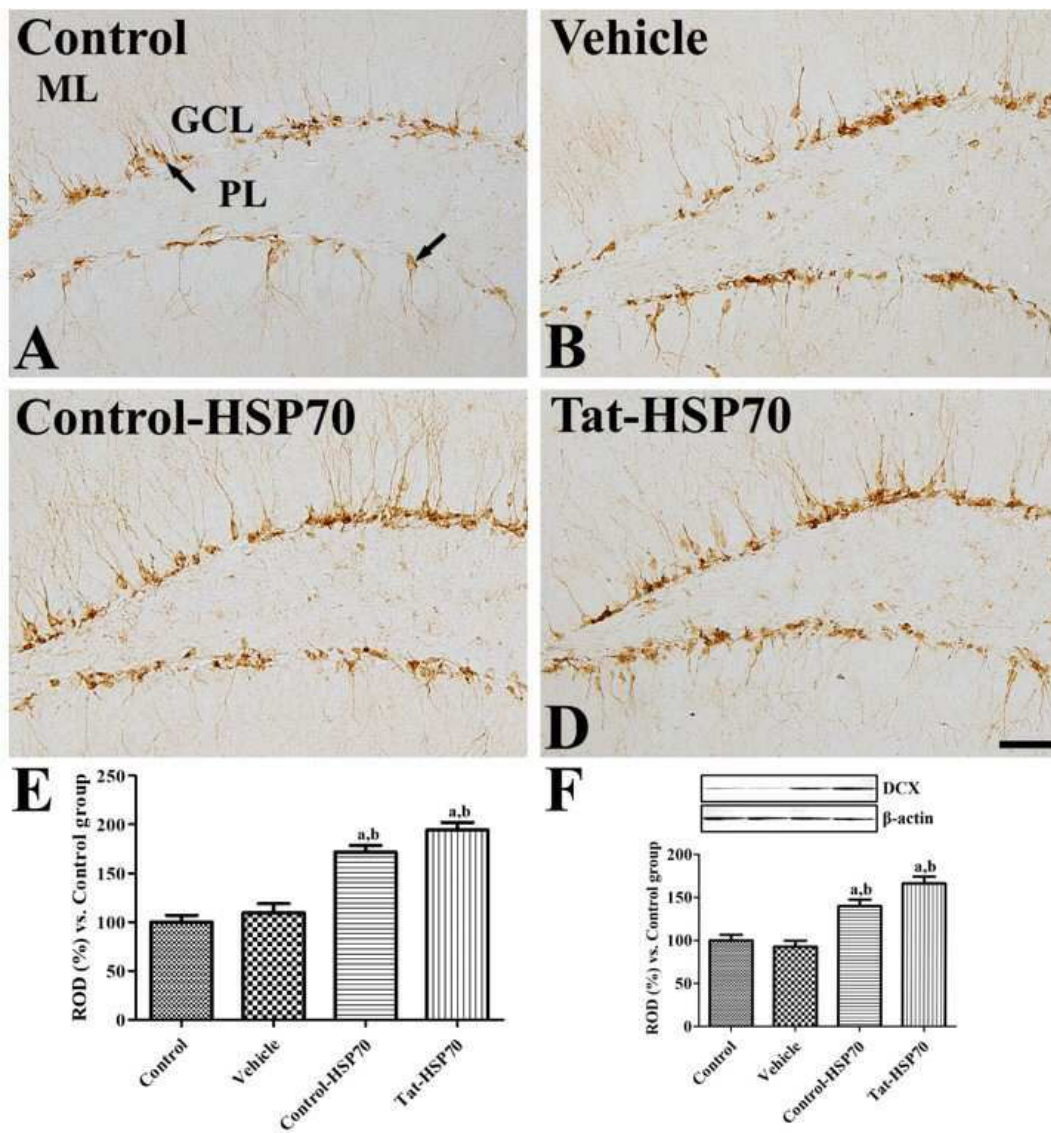
도면2



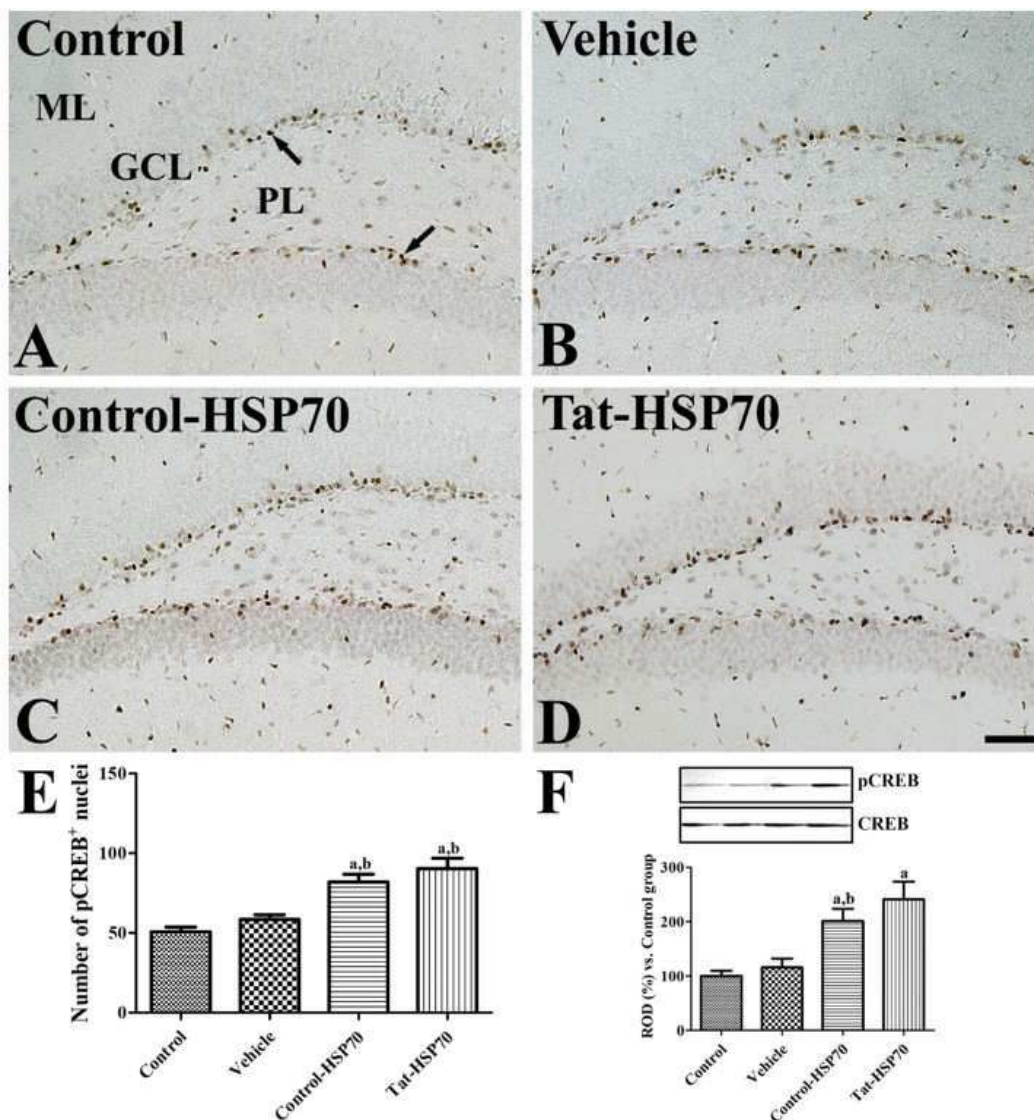
도면3



도면4



도면5



## 서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> A pharmaceutical composition containing cell-transducing HSP70 fusion protein for stimulating neurogeneration
- <130> HallymU-SYCHOI-HSP70\_190624
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1953
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide coding Tat-HSP70 fusion protein

<400> 1

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| aggaagaagc ggagacagcg acgaagaatg gccaaagccg cggcgatcgg catcgacctg  | 60   |
| ggcaccacct actcctgcgt ggggggtgttc caacacggca aggtggagat catcgccaac | 120  |
| gaccagggca accgcaccac ccccagctac gtggccttca cggacaccga gcggctcatc  | 180  |
| ggggatgcgg ccaagaacca ggtggcgcgtg aaccgcgaga acaccgtgtt tgacgcgaag | 240  |
| cggctgattg gccgcaagtt cggcgacccg gtggtgcagt cggacatgaa gcactggcct  | 300  |
| ttccaggatga tcaacgacgg agacaagccc aaggtgcagg tgagctacaa gggggagacc | 360  |
| aaggcattct accccgagga gatctcgtcc atggtgtctga ccaagatgaa ggagatcgcc | 420  |
| gaggcgtacc tgggctacc ggtgaccaac gcggtgatca ccgtgccggc ctacttcaac   | 480  |
| gactcgagc gccaggccac caaggatgcg ggtgtgatcg cggggctcaa cgtgctgcgg   | 540  |
| atcatcaacg agcccacggc cgccgccatc gcctacggcc tggacagAAC gggcaagggg  | 600  |
| gagcgcaacg tgctcatctt tgacctgggc gggggcacct tcgacgtgtc catcctgacg  | 660  |
| atcgacgacg gcatcttca ggtgaaggcc acggccgggg acaccacct gggtagggag    | 720  |
| gactttgaca acaggctggt gaaccacttc gtggaggagt tcaagagaaa acacaagaag  | 780  |
| gacatcagcc agaacaagcg agccgtgagg cgctgcgca ccgcctgcga gaggccaag    | 840  |
| aggaccctgt cgtccagcac ccaggccagc ctggagatcg actccctgtt tgagggcac   | 900  |
| gacttctaca cgtccatcac cagggcgagg ttcgaggagc tgtgtctcga cctgttccga  | 960  |
| agcaccttgg agcccggtga gaaggctctg cgcgacgcca agctggacaa ggcccagatt  | 1020 |
| cacgacctgg tcttggtcgg gggctccacc cgcacccca aggtgcagaa gctgctgcag   | 1080 |
| gacttcttca acgggcgcga cctgaacaag agcatcaacc ccgacgagc tgtggcctac   | 1140 |
| ggggcggcgg tgcaggcggc catcctgatg ggggacaagt ccgagaacgt gcaggacctg  | 1200 |
| ctgctgctgg acgtggctcc cctgtcgtg gggctggaga cggccggagg cgtgatgact   | 1260 |
| gccctgatea agcgcaactc caccatcccc accaagcaga cgcagatctt caccacctac  | 1320 |
| tccgacaacc aaccgggggt gctgatccag gtgtacgagg gcgagagggc catgacgaaa  | 1380 |
| gacaacaatc tgttggggcg cttcgagctg agcggcatcc ctccggcccc caggggcgtg  | 1440 |
| ccccagatcg aggtgacctt cgacatcgat gccaacggca tcctgaacgt cacggccacg  | 1500 |
| gacaagagca ccggcaaggc caacaagatc accatcacca acgacaaggg ccgcctgagc  | 1560 |
| aaggaggaga tcgagcgcat ggtgcaggag gcggagaagt acaaagcgga ggacgaggtg  | 1620 |
| cagcgcgaga ggggtgtcagc caagaacgcc ctggagtcct acgccttcaa catgaagagc | 1680 |
| gccgtggagg atgaggggct caagggaag atcagcgagg cggacaagaa gaagggtctg   | 1740 |

gacaagtgtc aagaggtcat ctctgggctg gacgccaaca ccttggccga gaaggacgag 1800

tttgagcaca agaggaagga gctggagcag gtgtgtaacc ccatcatcag cggactgtac 1860

cagggtgccg gtggtcccg gcctgggggc ttcggggctc aggttccaa gggagggtct 1920

gggtcaggcc ccaccattga ggaggtagat tag 1953

<210> 2

<211> 652

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-HSP70 fusion protein

<400> 2

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

1 5 10 15

Ala Ile Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Tyr Ser Cys Val Gly Val Phe

20 25 30

Gln His Gly Lys Val Glu Ile Ile Ala Asn Asp Gln Gly Asn Arg Thr

35 40 45

Thr Pro Ser Tyr Val Ala Phe Thr Asp Thr Glu Arg Leu Ile Gly Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Lys Arg Leu Ile Gly Arg Lys Phe Gly Asp Pro Val Val Gln Ser

85 90 95

Asp Met Lys His Trp Pro Phe Gln Val Ile Asn Asp Gly Asp Lys Pro

100 105 110

Lys Val Gln Val Ser Tyr Lys Gly Glu Thr Lys Ala Phe Tyr Pro Glu

115 120 125

Glu Ile Ser Ser Met Val Leu Thr Lys Met Lys Glu Ile Ala Glu Ala

130 135 140

Tyr Leu Gly Tyr Pro Val Thr Asn Ala Val Ile Thr Val Pro Ala Tyr

145 150 155 160

Phe Asn Asp Ser Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp Ala Gly Val Ile Ala



|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Gly Leu Asn Val Leu Arg Ile Ile Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala Ile |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Ala Tyr Gly Leu Asp Arg Thr Gly Lys Gly Glu Arg Asn Val Leu Ile |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Phe Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe Asp Val Ser Ile Leu Thr Ile Asp |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Asp Gly Ile Phe Glu Val Lys Ala Thr Ala Gly Asp Thr His Leu Gly |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
|                                                                 |     | 240 |
|                                                                 |     |     |
| Gly Glu Asp Phe Asp Asn Arg Leu Val Asn His Phe Val Glu Glu Phe |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Lys Arg Lys His Lys Lys Asp Ile Ser Gln Asn Lys Arg Ala Val Arg |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Arg Leu Arg Thr Ala Cys Glu Arg Ala Lys Arg Thr Leu Ser Ser Ser |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Thr Gln Ala Ser Leu Glu Ile Asp Ser Leu Phe Glu Gly Ile Asp Phe |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Tyr Thr Ser Ile Thr Arg Ala Arg Phe Glu Glu Leu Cys Ser Asp Leu |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Phe Arg Ser Thr Leu Glu Pro Val Glu Lys Ala Leu Arg Asp Ala Lys |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Leu Asp Lys Ala Gln Ile His Asp Leu Val Leu Val Gly Gly Ser Thr |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Arg Ile Pro Lys Val Gln Lys Leu Leu Gln Asp Phe Phe Asn Gly Arg |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Asp Leu Asn Lys Ser Ile Asn Pro Asp Glu Ala Val Ala Tyr Gly Ala |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
|                                                                 |     |     |
| Ala Val Gln Ala Ala Ile Leu Met Gly Asp Lys Ser Glu Asn Val Gln |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Asp Leu Leu Leu Leu Asp Val Ala Pro Leu Ser Leu Gly Leu Glu Thr |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |
| Ala Gly Gly Val Met Thr Ala Leu Ile Lys Arg Asn Ser Thr Ile Pro |     |     |

420 425 430  
 Thr Lys Gln Thr Gln Ile Phe Thr Thr Tyr Ser Asp Asn Gln Pro Gly  
 435 440 445  
 Val Leu Ile Gln Val Tyr Glu Gly Glu Arg Ala Met Thr Lys Asp Asn

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

Met Val Gln Glu Ala Glu Lys Tyr Lys Ala Glu Asp Glu Val Gln Arg  
 530 535 540  
 Glu Arg Val Ser Ala Lys Asn Ala Leu Glu Ser Tyr Ala Phe Asn Met  
 545 550 555 560  
 Lys Ser Ala Val Glu Asp Glu Gly Leu Lys Gly Lys Ile Ser Glu Ala  
 565 570 575  
 Asp Lys Lys Lys Val Leu Asp Lys Cys Gln Glu Val Ile Ser Trp Leu  
 580 585 590  
 Asp Ala Asn Thr Leu Ala Glu Lys Asp Glu Phe Glu His Lys Arg Lys

595 600 605  
 Glu Leu Glu Gln Val Cys Asn Pro Ile Ile Ser Gly Leu Tyr Gln Gly  
 610 615 620  
 Ala Gly Gly Pro Gly Pro Gly Gly Phe Gly Ala Gln Gly Pro Lys Gly  
 625 630 635 640  
 Gly Ser Gly Ser Gly Pro Thr Ile Glu Glu Val Asp  
 645 650

<210> 3  
 <211> 1999  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide coding Pep-1-HSP70 fusion protein

<400> 3

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| aaagaaacct ggtaggaac ctggtggacc gaatggtctc agccgaaaaa aaaacgtaaa  | 60   |
| gtgtatatgc tcgatggcca aagccgcggc gatcggcatc gacctgggca ccacctactc | 120  |
| ctgcgtgggg gtgttccaac acggcaaggt ggagatcatc gccaacgacc agggcaaccg | 180  |
| caccaccccc agctacgtgg ccttcacgga caccgagcgg ctcatcgggg atgcggccaa | 240  |
| gaaccaggtg gcgtgaacc cgcagaacac cgtgtttgac gcgaagcggc tgattggccg  | 300  |
| caagttcggc gacccggtgg tgcagtcgga catgaagcac tggcctttcc aggtgatcaa | 360  |
| cgacggagac aagcccaagg tgcaggtgag ctacaagggg gagaccaagg cattctaccc | 420  |
| cgaggagatc tcgtccatgg tgctgaccaa gatgaaggag atcgccgagg cgtacctggg | 480  |
| ctacccggtg accaacgcgg tgatcacctg gccggcctac ttcaacgact cgcagcgcca | 540  |
| ggccaccaag gatgcgggtg tgatcgcggg gctcaacgtg ctgcggatca tcaacgagcc | 600  |
| cacggccgcc gccatgcctt acggcctgga cagaacgggc aagggggagc gcaacgtgct | 660  |
| catctttgac ctgggcgggg gcaccttga cgtgtccatc ctgacgatcg acgacggcat  | 720  |
| cttcgaggtg aaggccacgg ccggggacac ccacctgggt ggggaggact ttgacaacag | 780  |
| gctggtgaac cacttcgtgg aggagttaa gagaaaacac aagaaggaca tcagccagaa  | 840  |
| caagcgagcc gtgaggcggc tgcgcaccgc ctgcgagagg gccaaagga ccctgtcgtc  | 900  |
| cagcaccag gccagcctgg agatcgactc cctgtttgag ggcatcgact tctacacgtc  | 960  |
| catcaccagg gcgaggttcg aggagctgtg ctccgacctg ttccgaagca ccctggagcc | 1020 |
| cgtggagaag gctctgcgcg acgccaagct ggacaaggcc cagattcacg acctggtcct | 1080 |
| ggtcgggggc tccaccgcga tcccaaggt gcagaagctg ctgcaggact tcttcaacgg  | 1140 |
| gcgcgacctg aacaagagca tcaacccga cagggtgtg gcctacgggg cggcggtgca   | 1200 |
| ggcggccatc ctgatggggg acaagtccga gaacgtgcag gacctgctgc tgctggacgt | 1260 |
| ggctcccctg tcgtggggc tggagacggc cggaggcgtg atgactgccc tgatcaagcg  | 1320 |
| caactccacc atccccacca agcagacgca gatcttcacc acctactccg acaaccaacc | 1380 |
| cggggtgctg atccaggtgt acgagggcga gagggccatg acgaaagaca acaatctgtt | 1440 |
| ggggcgcttc gagctgagcg gcatccctcc ggccccagg ggctgcccc agatcgaggt   | 1500 |
| gaccttcgac atcgatgcca acggcatcct gaacgtcacg gccacggaca agagcaccgg | 1560 |
| caaggccaac aagatcacca tcaccaacga caagggccgc ctgagcaagg aggagatcga | 1620 |

gcgcatggtg caggaggcgg agaagtacaa agcggaggac gaggtgcagc gcgagagggt 1680

gtcagccaag aacgccctgg agtcctacgc cttcaacatg aagagcgccg tggaggatga 1740

ggggctcaag ggcaagatca gcgaggcgga caagaagaag gtgctggaca agtgtcaaga 1800

ggtcatctcg tggctggacg ccaacacctt ggccgagaag gacgagtttg agcacaagag 1860

gaaggagctg gacgagtggt gtaaccccat catcagcgga ctgtaccagg gtgccggtgg 1920

tcccgggcct gggggtctcg gggctcaggg tccaaggga gggctcgggt caggccccac 1980

cattgaggag gtagattag 1999

<210> 4

<211> 666

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pep-1-HSP70 fusion protein

<400> 4

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 Tyr Met Leu Glu Met Ala Lys Ala Ala Ala Ile

20 25 30

Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Tyr Ser Cys Val Gly Val Phe Gln His

35 40 45

Gly Lys Val Glu Ile Ile Ala Asn Asp Gln Gly Asn Arg Thr Thr Pro

50 55 60

Ser Tyr Val Ala Phe Thr Asp Thr Glu Arg Leu Ile Gly Asp Ala Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Leu Ile Gly Arg Lys Phe Gly Asp Pro Val Val Gln Ser Asp Met

100 105 110

Lys His Trp Pro Phe Gln Val Ile Asn Asp Gly Asp Lys Pro Lys Val

115 120 125

Gln Val Ser Tyr Lys Gly Glu Thr Lys Ala Phe Tyr Pro Glu Glu Ile

130 135 140

Ser Ser Met Val Leu Thr Lys Met Lys Glu Ile Ala Glu Ala Tyr Leu  
 145 150 155 160  
 Gly Tyr Pro Val Thr Asn Ala Val Ile Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asn  
 165 170 175  
 Asp Ser Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp Ala Gly Val Ile Ala Gly Leu  
 180 185 190  
 Asn Val Leu Arg Ile Ile Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala Ile Ala Tyr  
 195 200 205  
 Gly Leu Asp Arg Thr Gly Lys Gly Glu Arg Asn Val Leu Ile Phe Asp  
 210 215 220  
 Leu Gly Gly Gly Thr Phe Asp Val Ser Ile Leu Thr Ile Asp Asp Gly  
 225 230 235 240  
 Ile Phe Glu Val Lys Ala Thr Ala Gly Asp Thr His Leu Gly Gly Glu  
 245 250 255  
 Asp Phe Asp Asn Arg Leu Val Asn His Phe Val Glu Glu Phe Lys Arg  
 260 265 270  
 Lys His Lys Lys Asp Ile Ser Gln Asn Lys Arg Ala Val Arg Arg Leu  
 275 280 285  
 Arg Thr Ala Cys Glu Arg Ala Lys Arg Thr Leu Ser Ser Ser Thr Gln  
 290 295 300  
 Ala Ser Leu Glu Ile Asp Ser Leu Phe Glu Gly Ile Asp Phe Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Ser Ile Thr Arg Ala Arg Phe Glu Glu Leu Cys Ser Asp Leu Phe Arg  
 325 330 335  
 Ser Thr Leu Glu Pro Val Glu Lys Ala Leu Arg Asp Ala Lys Leu Asp  
 340 345 350  
 Lys Ala Gln Ile His Asp Leu Val Leu Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile  
 355 360 365  
 Pro Lys Val Gln Lys Leu Leu Gln Asp Phe Phe Asn Gly Arg Asp Leu  
 370 375 380  
 Asn Lys Ser Ile Asn Pro Asp Glu Ala Val Ala Tyr Gly Ala Ala Val  
 385 390 395 400



Gln Ala Ala Ile Leu Met Gly Asp Lys Ser Glu Asn Val Gln Asp Leu  
405 410 415

Leu Leu Leu Asp Val Ala Pro Leu Ser Leu Gly Leu Glu Thr Ala Gly  
420 425 430

Gly Val Met Thr Ala Leu Ile Lys Arg Asn Ser Thr Ile Pro Thr Lys  
435 440 445

Gln Thr Gln Ile Phe Thr Thr Tyr Ser Asp Asn Gln Pro Gly Val Leu  
450 455 460

Ile Gln Val Tyr Glu Gly Glu Arg Ala Met Thr Lys Asp Asn Asn Leu  
465 470 475 480

Leu Gly Arg Phe Glu Leu Ser Gly Ile Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val  
485 490 495

Pro Gln Ile Glu Val Thr Phe Asp Ile Asp Ala Asn Gly Ile Leu Asn  
500 505 510

Val Thr Ala Thr Asp Lys Ser Thr Gly Lys Ala Asn Lys Ile Thr Ile  
515 520 525

Thr Asn Asp Lys Gly Arg Leu Ser Lys Glu Glu Ile Glu Arg Met Val  
530 535 540

Gln Glu Ala Glu Lys Tyr Lys Ala Glu Asp Glu Val Gln Arg Glu Arg  
545 550 555 560

Val Ser Ala Lys Asn Ala Leu Glu Ser Tyr Ala Phe Asn Met Lys Ser  
565 570 575

Ala Val Glu Asp Glu Gly Leu Lys Gly Lys Ile Ser Glu Ala Asp Lys  
580 585 590

Lys Lys Val Leu Asp Lys Cys Gln Glu Val Ile Ser Trp Leu Asp Ala  
595 600 605

Asn Thr Leu Ala Glu Lys Asp Glu Phe Glu His Lys Arg Lys Glu Leu  
610 615 620

Glu Gln Val Cys Asn Pro Ile Ile Ser Gly Leu Tyr Gln Gly Ala Gly  
625 630 635 640

Gly Pro Gly Pro Gly Gly Phe Gly Ala Gln Gly Pro Lys Gly Gly Ser

|                                         |     |     |
|-----------------------------------------|-----|-----|
| 645                                     | 650 | 655 |
| Gly Ser Gly Pro Thr Ile Glu Glu Val Asp |     |     |
| 660                                     | 665 |     |