(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0144622
(43) 공개일자 2020년12월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/00 (2006.01) *A23L 33/17* (2016.01)
A61K 38/16 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/00 (2013.01)
A23L 33/17 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0072341
(22) 출원일자 2019년06월18일
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 10 항

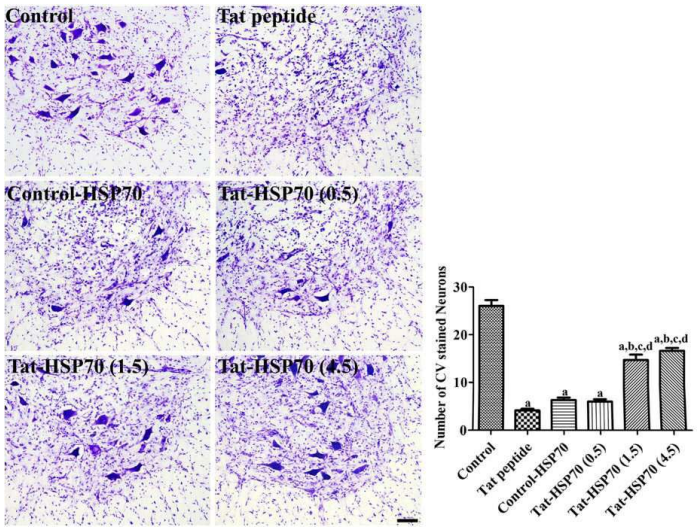
(54) 발명의 명칭 **세포 투과성 HSP70 융합단백질을 포함하는 신경질환 예방 및 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

과제: 부작용이 적거나 없으며, 효과가 우수한 신경질환 예방 및 치료용 약제를 제공하는 것.

해결수단: 본 발명은 세포 투과성 HSP70 융합단백질을 포함하는 신경질환 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3b



(52) CPC특허분류
A61K 38/16 (2013.01)
A61P 25/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
(72) 발명자
한규형
강원도 춘천시 새청말길 26, 107동 1402호 (강변코아루아파트, 우두동)
이근욱
서울특별시 동작구 동작대로39길 22, 113동 805호 (동작동, 이수힐스테이트)
박종국
강원도 춘천시 후석로 325, 104동 802호 (후평동, 춘천더샵아파트)
음원식
강원도 춘천시 후석로 325, 포스코더샵아파트 112동 802호 (후평동)
최연주
충청북도 옥천군 청성면 궁촌길 20-16
여현지
서울특별시 성북구 보문사길 111, 103동 1301호
여은지
서울특별시 성북구 보문사길 111, 103동 1301호
김우석
서울특별시 관악구 관악로 285, 104동 706호 (봉천동, 성현동아아파트)
황인구
서울특별시 관악구 관악로 1 C동 402호 (봉천동, 서울대교수아파트122)
김대원
강원도 강릉시 교동광장로 138-12, 302동 201호
권현정
강원도 강릉시 경강로2015번안길 7

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

명 세 서

청구범위

청구항 1

단백질 수송 도메인과 열충격 단백질 70이 공유결합된 HSP70 융합단백질을 포함하는 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 HIV Tat 도메인 또는 Pep-1 도메인임을 특징으로 하는 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 HSP70 융합단백질은 서열번호 2 또는 4임을 특징으로 하는 척수 허혈증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

신경질환은 척수 허혈에 의한 것임을 특징으로 하는 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

척수 허혈증은 대동맥 보수 수술, 일괄 척추 절제술 또는 산화 스트레스에 의한 것임을 특징으로 하는 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

단백질 수송 도메인과 열충격 단백질 70이 공유결합된 HSP70 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 HSP70 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1 또는 3임을 특징으로 하는 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

청구항 6에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 HIV Tat 도메인 또는 Pep-1 도메인임을 특징으로 하는 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

단백질 수송 도메인과 열충격 단백질 70이 공유결합된 HSP70 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 HSP70 융합단백질 발현 벡터를 함유하는 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

단백질 수송 도메인과 열충격 단백질 70이 공유결합된 HSP70 융합단백질을 포함하는 신경질환 예방 또는 개선용 건강기능성 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포 투과성 HSP70 융합단백질을 포함하는 신경질환 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 클리닉에서 하반신 마비는 하행 및 흉복부 대동맥류 재건수술 후 허혈의 지속 시간과 정도에 따라 수술 후 1일에서 21일 사이에 예측 불가능한 합병증으로 발전한다 (Crawford and Coseelli, 1991; Etz et al., 2006; Kouchoukos, 1991; Panthee and Ono, 2015). 토끼는 흉부 척수에 부수적인 혈관이 없으므로 척수 허혈 연구에 가장 적합한 동물이다 (Mazensky et al., 2011). 신장 아래에서 복부 대동맥의 폐색은 토끼 척수의 복부 돌기에서 거대하지만 지연된 신경 손상을 일으킨다 (Zivin and DeGirolami, 1980). 지연된 신경세포 사멸과 관련하여 가장 널리 채택되는 가설 중 하나는 높은 수준의 불포화 지방산과 뉴런에 의한 높은 산소 소비로 인해 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS) 생성이 증가하고, 뒤이어 DNA 및 세포막이 손상된다는 것이다 (Lin et al., 2003; Song et al., 2013). 허혈/재관류 중에 생성된 자유 라디칼은 뉴런에서 단백질 파괴, 지질 과산화 및 DNA 손상을 일으킨다 (Olmez and Ozyurt, 2012). 항산화제와 같은 내생적인 방어 메커니즘이 활성화되어 과잉 자유 라디칼을 억제하고 세포 손상을 약화시킨다. 몇몇 연구는 항산화제 처리가 척수 허혈에 의해 유도된 신경 손상을 현저히 저하한다고 밝혔다 (Hwang et al., 2015; Kim et al., 2012; Zhu et al., 2012).

[0003] 열충격 단백질 (Heat shock proteins; HSP)은 생리학적 조건에서 매우 낮은 농도로 흔하게 발현되는 스트레스 반응 단백질이다. 그러나, 병리학적 조건에서 열충격 단백질은 단백질의 응집 방지를 위해 단백질 폴딩을 촉진한다 (Kovacs, 2017). HSP는 분자량에 따라 HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP110 등 다양한 하위군으로 나뉜다. 몇몇 보고서는 허혈증을 포함한 산화성 스트레스에 따른 세포 공정에서 HSP가 중요한 역할을 한다는 것을 입증했다 (Hecker and McGarvey, 2011; Kim et al., 2018). 특히 ATP 의존 분자 샤퍼론인 HSP70은 퇴행성 질환 모델 의 운동 신경세포에서 유도되며 (Brown, 2007), 쥐의 척수 허혈 후 유도된다 (Carmel et al., 2004; Cizkova et al., 2004). 이 단백질은 펼쳐지거나 변성된 단백질의 폴딩을 용이하게 한다 (Giffard et al., 2004; Mayer, 2013). 마우스에서 HSP70β의 과발현은 시상 하부에서 허혈성 및 산화성 손상에 대한 신경보호를 유도한다 (Chen et al., 2009). 대조적으로, HSP70 억제제를 투여하면 HEK와 SH-SY5Y 세포에서 세포 손상을 유도하는 것으로 나타났다 (Shabbir et al., 2015). 허혈로 미리 조건을 맞춘 경우 CA1 뉴런에서 HSP70 발현이 현저하게 유도되고 쥐 뇌의 허혈성 손상에 대한 신경보호 효과가 나타난다 (Ge et al., 2008). 그러나 초기 허혈 전제조건의 변화에 따라 흉복부 대동맥 폐색 후 돼지 척수에서 HSP70 발현 수준이 변화한다거나 또는 그렇지 않다는 상충되는 증거가 있다 (Kyrou et al., 2013).

[0004] 허혈성 손상 (Doeppner 등, 2009; Kim 등, 2018; Zhan 등, 2010)에 대한 HSP70의 신경보호 효과는 많은 연구에서 입증되었지만, 혈액-뇌 장벽을 효율적으로 관통할 수 없기 때문에 중추신경계에서 HSP70의 치료적 접근에는 한계가 있다. 본 발명자들은 선행 연구에서 Tat (trans-activating transcriptional activator)과 PEP-1과 같

은 세포 침투성 펩타이드들이 뇌와 척수로 효율적으로 투과된다는 것을 증명하였다 (Eum et al., 2004; Jung et al., 2016). 변형된 항체에 부착된 Hsp70 단백질인 Fv-Hsp70이나 Tat 모티브에 부착된 Hsp70인 Tat-Hsp70의 투여는 혈액-뇌 장벽을 가로질러 단백질의 침투력을 향상시키고 랫트 (Zhan et al., 2010)와 마우스 (Doeppner et al., 2009)에서 허혈성 손상에 대한 신경보호 효과를 보여준다. 그러나, 허혈-재관류 후 척수의 복부 돌기에 HSP70이 미치는 영향에 대해서는 보고된 바 없었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 따라서, 본 발명은 NSC34 세포에서 과산화수소에 의해 유발되는 산화 스트레스 손상을 이용한 시험관 내 연구와 토끼의 대동맥 폐색에 의해 유발되는 허혈/재관류 손상을 이용한 생체 내 연구 등 두 가지 실험으로 신경 손상에 대한 Tat-HSP70 융합단백질의 신경보호 효과를 탐색하여 신경세포 사멸로 인한 신경질환의 효과적인 예방제 또는 치료제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.

[0008] "HSP70 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 HSP70 단백질을 포함하며, 단백질 수송 도메인과 목표 단백질 (즉, 본 발명에서는 HSP70 단백질을 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서에서는 구체적인 실시예로 HIV-Tat 단백질 수송 도메인을 이용하였으므로 "HSP70 융합단백질"을 "Tat-HSP70", "Tat-HSP70 융합단백질" 등과 혼용하였다.

[0009] "목표 단백질"이란 본래 표적 세포로 들어갈 수 없거나, 본래 유용한 속도로 표적 세포로 들어갈 수 없는 수송 도메인 또는 이의 단편이 아닌 분자로서, 수송도메인과 융합되기 전의 분자 그 자체 또는 수송도메인-목표 단백질 복합체의 목표 단백질 부분을 의미한다. 목표 단백질로서는 폴리펩티드, 단백질, 펩타이드를 포함하며, 본 발명에서는 HSP70을 의미한다.

[0010] "융합단백질"이란 수송도메인 및 한 개 이상의 목표 단백질 부분을 포함하며, 수송도메인과 목표 단백질의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 복합체를 의미한다.

[0011] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.

[0012] 또한, "표적 세포"란 수송도메인에 의해 목표 단백질이 전달되는 세포를 의미하는 것으로서, 표적 세포는 체내 또는 체외의 세포를 말한다. 즉, 표적 세포는 체내 세포, 다시 말하여 살아있는 동물 또는 인간의 장기 또는 조직을 구성하는 세포 또는 살아있는 동물 또는 인간에서 발견되는 미생물을 포함하는 의미이다. 또한, 표적 세포는 체외 세포, 즉 배양된 동물세포, 인체 세포 또는 미생물을 포함하는 의미이다

[0013] 본 발명에서의 "단백질 수송 도메인"은 고분자 유기화합물, 예컨대 올리고뉴클레오타이드, 펩타이드, 단백질, 올리고당 또는 다당류 등과 공유결합을 이루어 별도의 수용체나 운반체, 에너지를 필요로 하지 않고 상기 유기화합물들을 세포 내로 도입시킬 수 있는 것을 말한다.

[0014] 또한, 본 명세서에서는 단백질, 펩타이드, 유기화합물을 세포 내로 "도입"하는 것에 대하여 "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.

[0015] 본 발명의 HSP70 융합단백질은 7 내지 21개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인이 HSP70의 최소한 일측 말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 HSP70 융합단백질을 말한다. 또한, 상기 수송도메인은 HIV Tat 49-57 잔기, Pep-1 펩타이드, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고 (라이신,아르기닌) 중의 1종 이상을 말한다.

[0016] 또한, 본 발명의 상기 HSP70 융합단백질 아미노산 서열은 서열번호 2 또는 4 등을 포함한다. HSP70 융합단백질 제조에서 제한부위 서열의 선택 등에 따라 다양한 서열의 융합단백질을 얻을 수 있으며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 사람에게 자명하다. 위 아미노산 서열은 예시적인 것일 뿐 HSP70 융합단백질 아미노산 서열이 위에 나열된 서열로 한정되는 것이 아님은 자명하다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 HSP70 융합단백질을 유효성분으로 하며, 신경질환의 예방 및 개선 효과가 있는 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명은 7~21개의 아미노산으로 구성되고, 라이신 또는 아르기닌을 4개 이상 포함하는 단백질 수송 도메인이 HSP70 단백질의 적어도 일측 말단에 공유결합된 세포 투과성 (cell-transducing) HSP70 융합단백질에 관한 것이다. 또한, HSP70 융합단백질은 silent change에 따라 서열 내에서 하나 이상의 아미노산이 기능적으로 동등하게 작용하는 유사한 극성의 다른 아미노산(들)로 치환될 수 있다. 서열 내 아미노산 치환은 그 아미노산이 속하는 클래스의 다른 구성원들로부터 선택될 수 있다.

[0019] 예컨대, 소수성 아미노산 분류는 알라닌, 발린, 류이신, 이소류이신, 페닐알라닌, 발린, 트립토판, 프롤린 및 메티오닌을 포함한다. 극성 중성 아미노산은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함한다. 양성 염기성 아미노산은 아르기닌, 라이신 및 히스티딘을 포함한다. 음성 전하를 띤 산성 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 또한, 본 발명의 융합단백질과 아미노산 서열 간의 일정 범위의 상동성 예컨대 85-100% 범위 내의 동일 유사한 생물학적 활성을 갖는 절편 또는 이들의 유도체들도 본 발명의 권리범위에 포함된다.

[0020] HSP70 (Heat shock protein 70)은 ATP에 의존하는 분자 샤퍼론이며, 허혈을 비롯한 다양한 유형의 스트레스에 노출된 후 그 수치가 증가하는 것으로 나타났다. 본 발명에서는 NSC34 세포에서 과산화수소에 의해 유발된 신경 스트레스와 토끼의 척수 허혈에 대한 HSP70의 효과를 살펴보았다. Tat-HSP70 융합단백질은 NSC34 세포 내로 HSP70 단백질의 세포 내 전달을 촉진하고, 토끼 척수의 혈액-뇌 장벽을 통과할 수 있게 하였다. Tat-HSP70 융합단백질은 농도 및 시간 의존적으로 NSC34 세포로 효과적으로 투과되었지만, 대조군 HSP70 단백질은 처리 후 농도 또는 시간을 달리 하여도 세포 내로 전달될 수 없었다. Tat-HSP70 융합단백질로 처리하면 과산화수소로 유도된 활성산소종의 생성과 세포 사멸을 감소시키는 반면, 대조군 HSP70 단백질은 과산화수소에 노출된 NSC34 세포에 유의한 효과를 나타내지 않았다. 토끼의 척수에 Tat-HSP70 융합단백질의 투여는 척수 복부 돌기에서 신경학적 결함 및 신경세포 사멸에 대한 유의한 개선을 나타내었다. 또한, Tat-HSP70 융합단백질 처리는 지질 과산화를 유의하게 감소시켰고, 척수에서의 Cu, Zn-수퍼옥사이드 디스뮤테이즈 활성을 증가시켰지만 글루타티온 퍼옥시다아제 및 Mn-슈퍼옥사이드 디스뮤타아제 활성은 변하지 않았다. 이러한 결과는 Tat-HSP70 융합 단백질이 NSC34 세포와 토끼 척수의 산화성 스트레스를 감소시켜 세포 손상을 감소시키고, 척수 허혈 이후 발생하는 신경 손상 감소에 활용할 수 있음을 말해준다.

[0022] 본 발명은 단백질 수송 도메인과 열충격 단백질 70이 공유결합하여 생성되는 HSP70 융합단백질을 포함하는 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송 도메인이 HIV Tat 도메인 또는 Pep-1 도메인임을 특징으로 하는 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 HSP70 융합단백질이 서열번호 2 또는 4임을 특징으로 하는 척수 허혈증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 신경질환이 척수 허혈에 의한 것임을 특징으로 하는 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 척수 허혈증이 대동맥 보수 수술, 일괄 척추 절제술 또는 산화 스트레스에 의한 것임을 특징으로 하는 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0027] 또한, 본 발명은 단백질 수송 도메인과 열충격 단백질 70이 공유결합하여 생성되는 HSP70 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기 HSP70 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 서열이 서열번호 1 또는 3임을 특징으로 하는 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0029] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송 도메인이 HIV Tat 도메인 또는 Pep-1 도메인임을 특징으로 한다.

[0030] 또한, 본 발명은 단백질 수송 도메인과 열충격 단백질 70이 공유결합하여 생성되는 HSP70 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 HSP70 융합단백질 발현 벡터를 함유하는 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0031] 본 발명의 HSP70 융합단백질, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는 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, 덱스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활탁제(예: 실리카, 탤크, 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 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.

[0032] 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.

[0033] 또한, 본 발명은 HSP70 융합단백질, HSP70 융합단백질을 코딩하는 올리고뉴클레오타이드, HSP70 융합단백질을 코딩하는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 벡터, 이 융합단백질을 포함하는 신경질환 예방 또는 개선 용도의 건강기능성 식품조성물에 관한 것이다.

[0034] 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 100㎖를 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 덱스트린, 시클로덱스트린 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 100㎖ 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 중진제(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

[0035] 본 발명에서 세포 내 및 토끼 척수 내로 투과된 Tat-HSP70 융합단백질은 과산화수소로 유도된 산화 스트레스 및 세포 사멸을 감소시켰으며 척수 허혈 이후 발생하는 신경 손상을 완화하였다. 이러한 결과는 Tat-HSP70 융합단백질이 척수 허혈증에 의해 유발되는 신경 손상을 줄이는 효율적인 신경보호제 역할을 할 수 있음을 말해주며, 세포 투과성 Tat-HSP70 융합단백질이 신경질환 예방 및 치료용 약학 조성물로 유용함을 말해준다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 발현된 대조군-HSP70 및 Tat-HSP70 융합단백질의 생성 및 확인 그리고 대조군-HSP70 및 Tat-HSP70 융합단백질의 NSC34 세포로의 농도 및 시간 의존적 세포투과 효율을 나타낸다. (A) 대조군 HSP70 및 Tat-HSP70 벡터의 도식적 표현. (B) 폴리히스티딘 프로브를 이용한 웨스턴 블롯 분석에 의한 대조군 HSP70 및 Tat-HSP70 융합단백질의 발현 확인. (C) 대조군 HSP70 및 Tat-HSP70을 다양한 농도 (0.25-1 μM)로 세포를 처리했을 때의 세포투과 효율은 폴리히스티딘 프로브를 사용한 웨스턴 블롯 프로빙에 의한 처리 1시간 후에 측정하였다. (D) 시간 의존적 세포투과 효율은 1 μM 대조군 HSP70 및 Tat-HSP70 처리 1시간 후에 폴리히스티딘 프로브를 사용하여 웨스턴 블롯 분석으로 평가하였다. (C 및 D) 데이터를 일방향 분석 후 Bonferroni post-hoc test로 분석하였다 (^{a}p <0.05, 대조군과 유의한 차이가 있음;, ^{b}p <0.05, 담체 처리군과 유의한 차이가 있음; ^{c}p < 0.05, 대조군 HSP-70 처리군과 유의한 차이가 있음). 데이터는 평균±표준 편차로 표시되었다. (E) 1 μM의 대조군 HSP70 및 Tat-HSP70로 처리 1시간 후에 폴리히스티딘 프로브를 사용하여 면역조직화학 분석 후 얻은 현미경 사진. 눈금 막대=20 μm.

도 2는 NSC34 세포에서 100 μM H_2O_2에 의해 유도된 산화 손상에 대한 대조군 HSP70 및 Tat-HSP70 단백질의 신경보호 효과를 나타낸다. (A) 100 μM H_2O_2에 노출된 대조군 HSP70 및 Tat-HSP70 단백질의 농도-의존적 (0.25-1.0 μM) 세포 생존율은 NSC34 세포에서 MTT 분석에 의해 평가된다. (B와 C) 1 μM의 대조군 HSP70 및 Tat-HSP70 처리 후 100 μM H_2O_2에 노출된 NSC34 세포에서 활성산소종 생성 및 DNA 단편화를 측정하기 위한 DCF-DA 및 TUNEL의 면역 형광 염색. 눈금 막대=50 μm (B 및 C). 데이터를 일방향 분석 후 Bonferroni의 post-hoc 테스트로 분석하였다 (^{a}p <0.05, 대조군과 유의한 차이가 있음;, ^{b}p <0.05, 담체 처리군과 유의한 차이가 있음; ^{c}p < 0.05, 대조군 HSP-70 처리군과 유의한 차이가 있음). 데이터는 평균±표준 편차로 표시된다.

도 3은 대조군 HSP70 및 Tat-HSP70이 척수 허혈 후 토끼의 행동 및 형태에 미치는 영향을 나타낸다. (A) 행동 및 자세 결함을 기반으로 한 신경 점수는 허혈/재관류 24시간 및 72시간 후 Tarlov의 기준에 따라 평가된다 [군당 10마리; ^{a}p <0.05, 대조군과 유의한 차이가 있음;, ^{b}p <0.05, 담체 처리군과 유의한 차이가 있음; ^{c}p < 0.05, 대조군 HSP-70 처리군과 유의한 차이가 있음]. 막대는 평균±표준 편차를 나타낸다. (B) 허혈/재관류 72시간 후 척수의 복부 돌기에 크레실 바이올렛으로 염색한 뉴런을 보여주는 현미경 사진. 크레실 바이올렛 면역 반응성 뉴런의 수는 모든 군에서 대조군과 비교하여 나타났다 [군당 5마리; ^{a}p <0.05, 대조군과 유의한 차이가 있음;, ^{b}p <0.05, 담체 처리군과 유의한 차이가 있음; ^{c}p < 0.05, 대조군 HSP-70 처리군과 유의한 차이가 있음]. 데이터는 평균±표준 편차로 표시된다.

도 4는 토끼 허혈 후 척수에서 말론디알데히드 (MDA), 글루타티온 퍼옥시데이즈 (GPx), Cu, Zn-수퍼옥사이드 디스뮤테이즈 (SOD1) 및 Mn-슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 (SOD2)의 수준에 미치는 대조군 HSP70 및 Tat-HSP70의 영향을 나타낸다. 데이터는 일방향 분석을 실시한 후 Bonferroni의 post-hoc 테스트로 분석하였다 (^{a}p <0.05, 대조군과 유의한 차이가 있음;, ^{b}p <0.05, 담체 처리군과 유의한 차이가 있음; ^{c}p < 0.05, 대조군 HSP-70 처리군과 유의한 차이가 있음) 데이터는 평균±표준 편차로 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 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, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 융합단백질을 구성하는 단백질 수송 도메인으로서 HIV Tat 도메인을 이용하였으나, 실제로는 Pep-1 펩타이드, 올리고라이신, 올리고아르기닌 등의 다양한 단백질 수송 도메인을 이용하는 경우에도 유사한 세포 투과 결과를 얻을 수 있음을 밝혀둔다. 따라서, 본 발명의 범위가 반드시 세포 투과성 펩타이드로 HIV Tat 펩타이드를 사용한 경우에만 한정되는 것이 아님은 통상의 기술자에게 자명하다.

[0039] **<방법>**

[0040] **1. NSC34 세포 배양**

[0041] Bio-Medical Science Co., Ltd (Bio-Medical Science Co., Seoul, South Korea)에서 구입한 NSC34 세포는 3~5일마다 유지하고 계대 배양하였다 (Yoo et al., 2017). 배지를 2일마다 교체하고, 세포는 최대 7일 동안 성장시켜, 신경 돌기 형성이 증가한 운동 뉴런-유사 세포로 분화되도록 하였다 (Eggett et al., 2000).

[0043] **2. 발현 벡터 구축**

[0044] 세포 침투성 Tat 발현 벡터는 종래 기술에 따라 제조하였다 (Shin et al., 2014]). 인간 HSP70은 다음의 프라이머 서열을 이용하여 PCR로 증폭하였다. 인간 HSP70의 cDNA 서열은 정방향 프라이머 5'-CTC GAG ATG GCC AAA GCC-3' 및 역방향 프라이머; 5'-GGA TCC CTA ATC TAC CTC CTC-3'이다. PCR 산물은 제조자의 지시에 따라 자르고 용출하고 (Expin Gel, GeneAll Biotechnology Co., Ltd., Seoul, Korea), TA 클로닝 벡터 (pGEM®-T easy 벡터; Promega Corporation, Madison, WI, USA)에 연결하였다. 인간 HSP70 cDNA를 포함하는 정제된 TA 벡터를 Tat 발현 벡터에 연결하여 Tat-HSP70 융합단백질을 제조하였다. 유사한 방법으로 Tat 펩타이드를 융합하지 않은 대조군 HSP70 단백질을 구축하고 발현하였다. 재조합된 Tat-HSP70 융합단백질 및 대조군 HSP70 단백질 플라스미드를 *Escherichia coli* 균주 BL21에 형질전환하였다.

[0045] 형질전환된 박테리아 세포를 100ml LB 배지에서 37℃로 OD_{600} 값이 0.4~0.5가 되도록 배양한 후, 0.5mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside)를 첨가하여 37℃에서 6시간 동안 배양하였다. 회수한 세포를 초음파 처리하고 원심분리하여 상층액만 분리하고, Ni^{2+}-니트릴로트리아세트산 (Ni-NTA) 세파로즈 친화 크로마토그래피 컬럼 (Qiagen, Inc.) 및 PD-10 칼럼 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA)을 사용하여 정제하였다. 정제된 단백질의 농도는 Bradford 분석법 (Bradford, 1976)으로 측정하였다.

[0046] 동량의 단백질을 10% SDS PAGE로 분석하였다. 분석된 단백질은 PVDF (polyvinylidene difluoride) 막으로 전기이동한 다음, 막은 TBS-T 완충액 (25mM Tris-HCl, 140mM NaCl, 0.1% Twin 20, pH 7.5)에 녹인 5% 탈지분유로 블로킹하였다. 막은 폴리히스티딘 태그에 대한 항체 (1:2,000, His-probe, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 사용하여 탐지하였다. 단백질은 제조자 (Amersham, Franklin Lakes, NJ, USA)가 권장하는 화학 발광 시약을 사용하여 확인하였다.

[0048] **3. NSC34 세포 내로 Tat-HSP70 융합단백질의 도입**

[0049] Tat-HSP70 융합단백질의 NSC34 세포로의 도입은 종래 기술에서 약간 변형하였다 (Yoo et al., 2017). 세포는 Tat-HSP70 융합단백질 (0 μM, 0.25 μM, 0.5 μM, 0.75 μM, 1.0 μM) 또는 대조군 HSP7 단백질 (0 μM, 0.25 μM, 0.5 μM, 0.75 μM, 1.0 μM)로 1시간 처리하여 농도별 세포 내 투과를 관찰하였고, 또 시간별 투과를 관찰하기 위하여 1μM의 Tat-HSP70 융합단백질 및 대조군 HSP7 단백질을 0분, 15분, 30분, 45분 및 60분간 배지에 처리하였다. 처리 후 세포를 1분 동안 트립신-EDTA (Gibco Grand Island, NY, USA)로 처리하고 PBS (phosphate buffered saline)로 충분히 세척하여 세포막에 부착된 단백질을 제거하였다. 세포를 차가운 RIPA 완충제 (Thermo Scientific, IL, USA)로 용해시키고, 용해물을 13,000 x g으로 10분 동안 4℃에서 원심분리하였다. 상등액의 단백질 농도는 브래드포드법으로 정량하였다. 동량의 단백질을 SDS-PAGE로 분리하고 토끼 항-폴리히스티딘 항체 (1:1,000, His-probe, Santa Cruz Biotechnology)와 염소 항-토끼 2차 항체 (1:10,000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 사용하여 웨스턴 블롯 분석하였다.

[0050] NSC34 세포에서 도입된 Tat-HSP70 융합단백질의 형태를 입증하기 위해, 종래 기술과 같이 폴리히스티딘 프로브를 사용하여 면역조직화학법을 수행하였다 (Yoo et al., 2017). 세포를 커버 슬립에서 배양하고 1μM Tat-HSP70 융합단백질 또는 대조군 HSP70 단백질을 처리하였다. 37℃로 1시간 동안 배양하고, PBS를 이용하여 2번 정도 씻어주고, 4% 파라포름알데히드로 5분간 처리하여 세포를 고정하였다. 3% 우혈청 알부민, 0.1% Triton X-100 함유 PBS (PBS-BT)로 25℃에서 30분간 처리한 후 PBS-BT로 세척하였다. 세포는 토끼 항-폴리히스티딘 항체 (1:2,000)로 25℃에서 1시간 동안 배양한 다음 Alexa Fluor 488 결합된 항-토끼 IgG (1:15,000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 25℃에서 1시간 동안 배양하였다. 세포핵은 1㎍/㎖의 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)로 2분간 염색하였다. 염색된 세포는 공초점 레이저 스캐닝 시스템 (Bio-Rad MRC-1024ES, 4BIOROD, CA, USA)으로 공초점 형광 현미경을 이용하여 분석하였다.

[0052] **4. 세포 생존능력 분석 및 DNA 손상**

[0053] 과산화수소로 처리한 세포에 미치는 Tat-HSP70 융합단백질 또는 대조군 HSP70 단백질의 세포 보호 효과를 MTT 분석 키트 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)를 사용하여 세포 생존율을 측정함으로써 평가하였다. NSC34 세포를 96-웰 플레이트에서 90% 성장하도록 하고, 다양한 농도 (0.25~1μM)의 Tat-HSP70 융합단백질 또는 대조군 HSP70 단백질에 노출하였다. Tat-HSP70 융합단백질 또는 대조군 HSP70 단백질과 함께 1시간 동안 배양한 후, 세포를 100μM 과산화수소에 1시간 동안 노출하였다. 세포 생존력은 ELISA 마이크로플레이트 판독기 (Labsystems Multiskan MCC / 340)를 사용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포 생존율은 무처리 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

[0054] Tat-HSP70 융합단백질이 DNA 손상에 미치는 영향을 조사하기 위해 1μM의 Tat-HSP70 융합단백질 및 대조군 HSP70 단백질을 1시간 동안 처리하고 100μM 과산화수소에 3시간 동안 노출하였다 (Yoo et al., 2017). 세포사멸은 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated dUTP nick end labeling staining) 방법으로 세포사멸 탐지 킷트 (Roche Applied Science)를 사용하여 확인하였다. 형광현미경 (Nikon eclipse 80i, Tokyo, Japan)을 사용하여 사진을 촬영했고, 형광 강도는 Fluoroskan ELISA plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland)를 이용하여 485nm 여기파장 (exitation), 538nm 방출파장 (emission)의 형광을 측정하였다.

[0056] **5. 세포 내 활성산소종 측정**

[0057] 세포 내 활성산소종 형성은 앞에서 설명한 바와 같이 활성산소종 노출 후 DCF-DA)로 형성된 2',7'-DCF (2′,7′ '-dichlorofluorescein) 수준을 측정하여 결정하였다 (Yoo et al., 2017). NSC34 세포에 아무것도 처리하지 않았을 때, 과산화수소 (100μM)를 처리하였을 때, Tat-HSP70 융합단백질 또는 대조군 HSP70 단백질을 전처리 (1μM)하였을 때 활성산소종 수준을 비교해 보았다. Tat-HSP70 또는 대조군 HSP70 단백질로 1시간 전 처리한 후, 세포를 과산화수소를 100μM의 농도로 10분 동안 처리하였다. PBS 세척한 후, DCF-DA를 20μM의 농도로 30분 처리하였다. 형광 강도는 Fluoroskan ELISA plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland)를 이용하여 485nm 여기파장 (exitation), 538nm 방출파장 (emission)을 측정하였다.

[0059] **6. 토끼 척수에서의 허혈성 손상에 대한 Tat-HSP70 융합단백질의 신경보호 효과**

[0060] **실험동물**

[0061] 수컷 뉴질랜드 흰 토끼 (1.2~1.5kg)는 실험동물센터 (Cheonan Yonam College, Cheonan, South Korea)에서 구입했다. 동물은 서울대학교 수의과 대학의 동물 시설 사육실에 보관되었다. 이 실험의 프로토콜은 ARRIVE 지침 (Kilkenny et al., 2010)에 따라 작성되었으며 서울대학교의 연구 동물 케어 및 사용위원회의 승인을 받았다 (승인 번호: SNU-170807-10).

[0063] **실험 설계**

[0064] 신경보호 효과를 관찰하고 척수에서 Tat-HSP70 융합단백질의 허혈성 손상에 대한 최적 투여량을 결정하기 위해, 동물을 6개 군으로 나누었다 : 샴 수술군 (대조군), 담체 (10% 글리세롤) 처리된 허혈군, 4.5mg/kg 대조군 HSP70 단백질 처리된 허혈군, 0.5, 1.5 또는 4.5mg/kg Tat-HSP70 융합단백질 처리된 허혈군. 모든 물질은 재관류 직후 토끼에게 복강 내 투여하였다.

[0066] **실험동물에서 척수 허혈 유도**

[0067] 척수 허혈 수술은 종래 기술과 같이 수행하였다 (Kiyoshita et al., 2003; Yoo et al., 2017). 요약하면, 동물을 33% 산소 및 67% 아산화질소 하에서 2.5% 이소플루란의 혼합물 (Baxter, Deerfield, IL, USA)로 마취시켰다. 비 외상성 동맥류 클립을 사용하여 30분 동안 복부 대동맥을 신장 아래 부분에서 폐색하였으며, 재관류는 수술용 입체경으로 확인하였다. 수술 동안 및 수술 후 동물의 체온은 체온계 담요와 온열 배양기 (Mirae Medical Industry, Seoul, Korea)로 조절하였다. 대조군 동물은 복부 대동맥을 폐색하지 않고, 샴 수술 공정을

적용하였다.

[0069] **신경학적 평가**

[0070] 허혈/재관류 후 행동 장애를 평가하기 위해 종래 기술 (Yoo et al., 2017; Jung et al., 2016)과 같이 두 명의 맹목 관찰자는 객관성을 보장하기 위해 수정된 Tarlov 기준 (Tarlov, 1957)에 따라 다음과 같이 행동을 확인했다: 0, 자발적인 뒷다리 기능 없음; 1, 지각 가능한 관절 운동만 가능; 2, 능동적인 운동, 그러나 서있을 수 없음; 3, 서있을 수는 있지만 걸을 수 없음; 또는 4, 완전히 정상적인 뒷다리 움직임 기능. 동물들은 재관류 12~24시간 후 신경 장애를 보였고, 48시간 이내에 완전한 마비가 나타났기 때문에 행동 결함은 재관류 24시간과 72시간 후에 평가하였다 (Moore and Hollier, 1991; Wisselink et al., 1998).

[0072] **척수의 크레실 바이올렛 염색**

[0073] 형태학적 분석의 경우 신경학적 평가 (각 군당 n=5)에 사용된 동물을 2g/kg 우레탄 (Sigma)으로 마취하고, 먼저 0.1M PBS (pH 7.4)로, 이후 종래 기술과 같이 4% 파라포름알데히드를 포함한 0.1 M 인산 완충액 (pH 7.4)으로 경심관류하였다 (Yoo et al. 2017). 동물의 척수를 제거하고 척수의 5~6번째 허리 부분 (L5-L6)을 동일한 고정액으로 12시간 동안 사후 고정하였다. 척수 조직을 30% 자당으로 하룻밤 동안 침투시켜 동결 보존하고, 30-μm 두께의 척수 절편을 결장 고정 장치 (Leica, Wetzlar, Germany)를 사용하여 관상면에서 연속적으로 절단하였다.

[0074] 종래 기술과 같이 크레실 바이올렛 염색을 수행하였다 (Yoo et al., 2015). 동물당 5개의 섹션을 실란 코팅 슬라이드 (Muto-Glass, Tokyo, Japan)에 올려놓고 빙초산 (Sigma)을 함유한 1% 크레졸 바이올렛 아세테이트 용액으로 헹구었다. 25℃에서 5분 동안 염색하기 전후에, 절편을 증류수로 2회 세척하였다. 그런 다음 Canada Balsam (Kanto, Tokyo, Japan)을 사용하여 탈수 및 커버 슬립하였다. 모든 군의 크레실 바이올렛 양성 세포는 컴퓨터 기반 CCD 카메라가 장착된 이미지 분석 시스템 (소프트웨어 : Optimas 6.5®, CyberMetrics, Scottsdale, AZ, USA)을 사용하여 조직 영역을 100배의 배율로 관찰하였다. 간단히는 척수의 복부 돌기 중앙에 있는 크레실 바이올렛-양성 뉴런을 계수하였다. 이미지는 흑백으로 변환되었고 크레실 바이올렛-양성 뉴런은 크레실 바이올렛 면역 염색의 강도에 따라 자동으로 선택되었다. 각 군의 5개 섹션에서 계수를 평균하여 각 동물에 대해 세포 수를 평가하였고, 세포 수는 대조군에서 얻은 계수의 백분율로 평가하였다.

[0076] **척수 조직의 생화학적 평가**

[0077] 척수 조직에서 MDA (malondialdehyde), GPx (glutathione peroxidase), Cu, SOD1 (Zn-superoxide dismutase) 및 SOD2 (Mn-SOD) 활성의 생화학적 평가를 위해 대조군, 담체 처리 허혈군, HSP70 단백질 처리 허혈군 및 1.5mg/kg Tat-HSP70 융합단백질 처리 허혈군 (각 군에서 n = 10)을 2g/kg 우레탄 (Sigma)으로 마취하였다. 그런 다음, 허혈/재관류 24시간 후 및 72시간 후, 척수 조직을 L5-L6에서 수득하였다. 종래 연구와 같이, 척수 조직 시료는 추가 분석까지 -80℃에 저장하였다 (Yoo et al., 2017). 척수 시료는 냉각된 PBS에서 균질화한 다음 4℃에서 10분간 10,000×g로 원심분리하였다. 조직 단백질 농도는 표준 상업용 키트 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 조직 MDA (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Mi, USA), GPx (Cayman Chemical Company), SOD1 (Cusabio, Hubei, China) 및 SOD2 (Cusabio) 활성은 시중에서 구입할 수 있는 키트로 측정하였다.

[0079] **통계 분석**

[0080] 데이터는 각 실험의 평균값으로 표현되었다. 토끼에서 과산화수소에 의해 유도된 산화 스트레스 및 허혈성 손상에 대한 Tat-HSP70 융합단백질 또는 대조군 HSP70 단백질의 보호 효과를 측정하기 위해 GraphPad Prism 5.01 소프트웨어를 사용하여 Bonferroni의 사후 검증 시험 (post-hoc test) 후 ANOVA (one-way analysis of variance)로 평균 차이를 통계적으로 분석하였다.

[0082] **<결과>**

[0083] **Tat-HSP70 융합단백질의 발현**

[0084] 폴리히스티딘 프로브를 이용한 웨스턴 블롯 분석으로 HSP70 융합단백질의 정제 및 발현을 확인하였다. 웨스턴 블롯 분석 결과, Tat-HSP70 융합단백질과 대조군 HSP70 단백질은 각각 약 72kDa와 70kDa를 보였다 (도 1b).

[0086] **NSC34 세포로의 Tat-HSP70 융합단백질의 투과**

[0087] Tat-HSP70 융합단백질의 NSC34 세포 내 투과 정도를 시간 및 농도별로 측정하였다. Tat-HSP70 융합단백질 또는 HSP70 단백질을 다양한 농도로 처리한 후에 폴리히스티딘 프로브를 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 0.25~1㎛M의 HSP70 단백질을 처리한 경우 처리 후 1시간 동안 폴리히스티딘 발현을 보이지 않았으며, 0.5㎛M Tat-HSP70 융합단백질을 처리한 경우에는 폴리히스티딘 발현을 볼 수 있었고, 1㎛M Tat-HSP70 융합단백질로 처리한 경우에는 처리 후 1시간이 되었을 때 용량 의존적으로 증가하였다 (도 1c).

[0088] 0.75㎛M Tat-HSP70 융합단백질 처리 후 30분에 약한 발현이 발견되었으며, 그 후 히스티딘의 발현은 처리 후 60분까지 점차 증가하였다. 그러나, 0.75㎛M 대조군 HSP70 단백질로 처리한 결과, 처리 60분 후에도 폴리히스티딘 발현이 나타나지 않았다 (도 1d).

[0089] Tat-HSP70 융합단백질 또는 대조군 HSP70 단백질은 폴리히스티딘 면역조직화학 염색으로 확인하였다. 처리 후 1시간 동안 대조군 또는 1㎛M 대조군 HSP70 단백질 처리군에서 폴리히스티딘 양성 구조가 검출되지 않았다. 그러나, Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서, 세포 내 폴리히스티딘 발현은 처리 1시간 후 주로 세포질에서 발견되었다 (도 1e).

[0091] **NSC34 세포에서 과산화수소에 의한 산화 손상에 대한 Tat-HSP70 융합단백질의 세포 보호효과**

[0092] Tat-HSP70 융합단백질 또는 HSP70 단백질의 신경보호 효과는 1시간 동안 100㎛M 과산화수소에 노출한 후 MTT 분석으로 세포 생존율을 관찰하여 평가하였다. 1시간 동안 100㎛M 과산화수소로 처리하면 세포 생존율이 대조군 생존율의 44.9%로 유의하게 감소하였다. 대조군 HSP70 단백질로 전처리한 후 100 ㎛M 과산화수소에 노출시킨 결과, 100㎛M 과산화수소 처리군과 유사한 세포 생존율 (대조군 대비 39.3~41.7%)을 보였다. 세포 생존율은 100㎛M 과산화수소 투여군과 비교하여 0.5㎛M Tat-HSP70 융합단백질 처리군 (대조군 대비 75.4%)에서 유의하게 증가하였다. 세포 생존율은 1㎛M Tat-HSP70 융합단백질 처리에 의해 유지되었다 (도 2a).

[0093] DNA 손상에 의해 유도된 세포사멸은 NSC34 세포를 과산화수소에 노출한 다음 3시간 후 TUNEL 염색으로 분석되었다. 100㎛M 과산화수소 처리군에서는 NSC34 세포에서 강한 TUNEL 양성 세포가 발견되었으며, 반응성 형광 강도는 대조군의 4.4배까지 크게 높아졌다. 100㎛M 과산화수소에 노출되기 1시간 전 HSP70 단백질 처리군에서 TUNEL 양성 세포가 많이 관찰되었으며, 형광 강도는 100㎛M 과산화수소 처리군과 유사하였다. 100㎛M 과산화수소에 노출되기 1시간 전에 Tat-HSP70 융합단백질로 처리한 군에서는 다만 몇 개의 TUNEL 양성 세포만 관찰되었고, 형광 강도는 100㎛M 과산화수소 처리군에서 관찰된 강도의 49.7%로 급격히 감소하였다 (도 2b).

[0094] NSC34 세포에서 활성산소종 수준은 DCF-DA에서 DCF로 전환되며 생성된 형광에 의해 측정되었다. 대조군에서는 NSC34 세포에서 형광이 매우 약하거나 전혀 형광성 세포가 발견되지 않았다. 100㎛M 과산화수소 처리군에서 NSC34 세포에는 강한 형광이 관찰되었고, NSC34 세포에서 대조군에 비해 형광 강도가 현저하게 증가하였다. HSP70 단백질 처리군에서는 100㎛M 과산화수소 처리군과 비교하여 NSC34 세포에서 유사한 수준의 형광 강도가 관찰되었다. Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서 형광 세포는 거의 사라졌고, 형광 강도는 100㎛M 과산화수소 처리군에 비해 현저히 감소하였다 (도 2c).

[0096] **척수에서 허혈성 손상에 대한 Tat-HSP70 융합단백질의 신경보호 효과**

[0097] **신경학적 점수의 변화**

[0098] 신경학적 점수는 허혈/재관류 후 24시간과 72시간에 Tarlov의 기준에 따라 결정하였다. 대조군에서 동물들은 신경학적 점수가 4인 정상적인 행동과 움직임을 보였다. 담체 처리군에서, 동물들은 연장된 뒷다리로 걷기 장애를 보였고, 허혈/재관류 후 24시간 및 72시간에 각각 1 및 0.5의 신경 점수를 나타내었다. 대조군 HSP70 단백질 및 0.5mg/kg Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서, 뒷다리 확장으로 인해 동물이 일어날 수 없었고 담체 처리군과 유

사한 신경학적 점수를 나타냈다. Tat-HSP70 융합단백질 1.5mg/kg 및 4.5mg/kg으로 처리한 동물은 서서히 걸을 수 있었고, 허혈/재관류 후 24시간 및 72시간에 담체 처리군과 비교하여 신경 점수가 2.7~3.3으로 유의하게 증가한 것으로 나타났다. Tat-HSP70 융합단백질 1.5 mg/kg과 Tat-HSP70 융합단백질 4.5mg/kg 처리군 사이의 신경학적 점수는 유의한 차이가 없었다 (도 3a).

[0100] **크레실 바이올렛 양성 세포의 변화**

[0101] 대조군에서는 척수 복부 돌기에서 풍부한 크레실 바이올렛 양성 뉴런이 발견되었으며, 단면 당 약 26.04개의 크레졸 바이올렛 양성 뉴런이 관찰되었다. 담체 처리 군에서는 복부 돌기에서 약간의 크레실 바이올렛 양성 뉴런이 검출되었으며, 허혈/재관류 72시간 후 대조군에 비해 섹션 당 4.12로 현저히 낮았다. HSP70 단백질 및 0.5mg/kg Tat-HSP70 융합단백질 처리군은 크레실 바이올렛 양성 뉴런의 수가 담체 처리군의 수와 유사하였다. 1.5mg/kg 및 4.5mg/kg Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서 복부 돌기에서 약간의 크레실 바이올렛 양성 뉴런이 관찰되었다. 이들 1.5mg/kg 및 4.5mg/kg Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서는 담체 처리군의 크레실 바이올렛 양성 뉴런 수에 비해 유의하게 증가하였고, 섹션 당 각각 14.68 및 16.6이었다 (도 3b).

[0103] **척수에서 허혈성 손상에 대한 Tat-HSP70 융합단백질의 신경보호 기작**

[0104] 척수에서 허혈성 손상에 대한 Tat-HSP70 융합단백질의 보호 효과를 연구하기 위해, 허혈/재관류 후 24시간 및 72시간에 척수 균질액을 사용하여 MDA, GPx, SOD1 및 SOD2의 활성을 측정하였다. MDA 수준은 허혈/재관류 후 24시간 및 72시간에 대조군과 비교하여 담체 처리군에서 유의하게 증가하였다. 대조군 HSP70 단백질의 처리는 허혈/재관류 후 24시간 및 72시간에 MDA 수준의 현저한 변화를 나타내지 않았고 1.5mg/kg Tat-HSP70 융합단백질 처리는 허혈/재관류 후 24시간 및 72시간에서 MDA 수치의 현저한 감소를 나타내었다 (도 4).

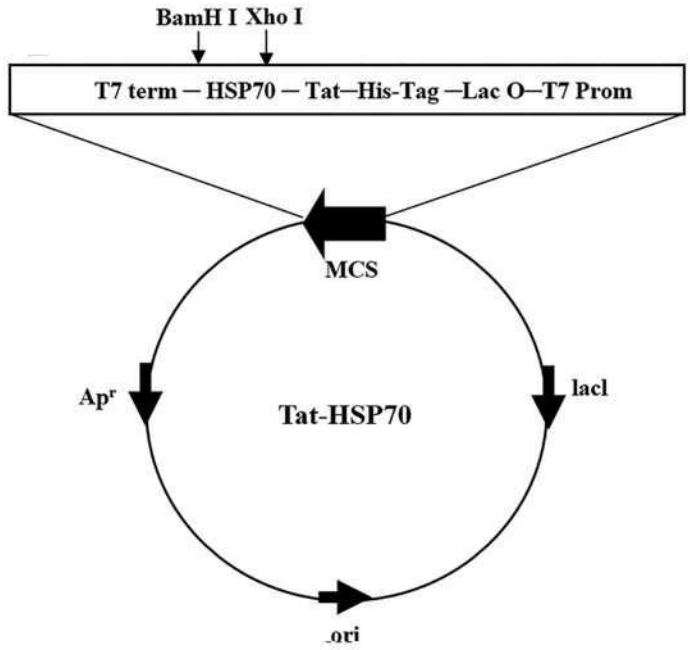
[0105] 척수 허혈은 허혈/재관류 후 24시간 및 72시간에 대조군과 비교하여 척수 균질액에서 GPx 활성을 현저히 감소시켰다. 또한, 허혈 후 72시간 GPx 활성도가 허혈 후 24시간에 비해 더 감소하였다. HSP70 단백질 및 Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서, 허혈 후 24시간 및 72시간에 담체 처리군의 척수 균질액에서와 유사한 GPx 활성이 검출되었다 (도 4).

[0106] 담체 처리군의 SOD1 활성은 허혈/재관류 24시간 후의 대조군과 비교하여 척수 균질액에서 유의하게 증가하였고, 허혈/재관류 72시간 후에도 유사한 SOD1 활성이 관찰되었다. HSP70 단백질 처리군에서 허혈/재관류 후 24시간 및 72시간에 SOD1 활성도는 담체 처리군과 비교하여 유사하였다. Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서 SOD1 활성은 허혈/재관류 24시간 후 담체 처리군과 유사하였고, 허혈/재관류 72시간 후 담체 처리군보다 유의하게 높았다 (도 4). 척수 허혈은 척수 허혈의 SOD2 활동에 큰 변화를 일으키지 않았다. 또한, HSP70 단백질 또는 Tat-HSP70 융합단백질의 처리는 허혈/재관류 24시간 및 72시간 후의 대조군 또는 담체 처리군과 비교하여 SOD2 활성에 현저한 변화를 나타내지 않았다 (도 4).

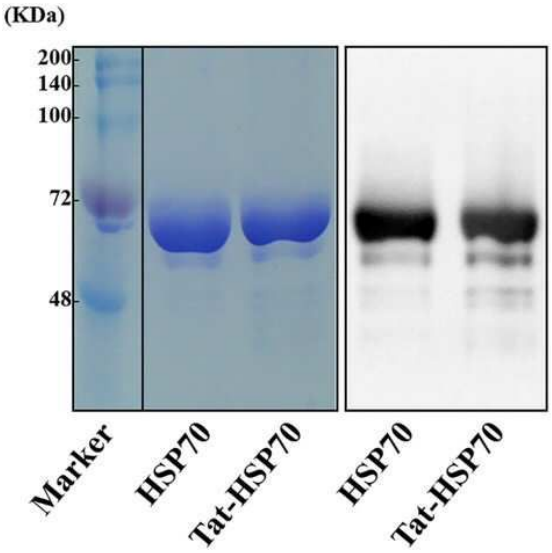
[0108] 본 발명에서는 Tat-HSP70 융합단백질 및 HSP70 단백질을 발현하여 NSC34 세포로의 전달 효율을 비교하였으며, Tat-HSP70 융합단백질 처리군에서 담체 처리군 또는 HSP70 단백질 처리군과 비교하여 과산화수소 유도 산화 스트레스 및 세포 사멸을 관찰하였다. 이러한 결과는 Tat-HSP70 융합단백질이 대동맥 보수 수술과 일괄 척추 절제술에서 발생하는 척수 허혈증에 의해 유발되는 신경 손상을 줄이는 효율적인 신경보호제 역할을 할 수 있음을 시사한다.

도면

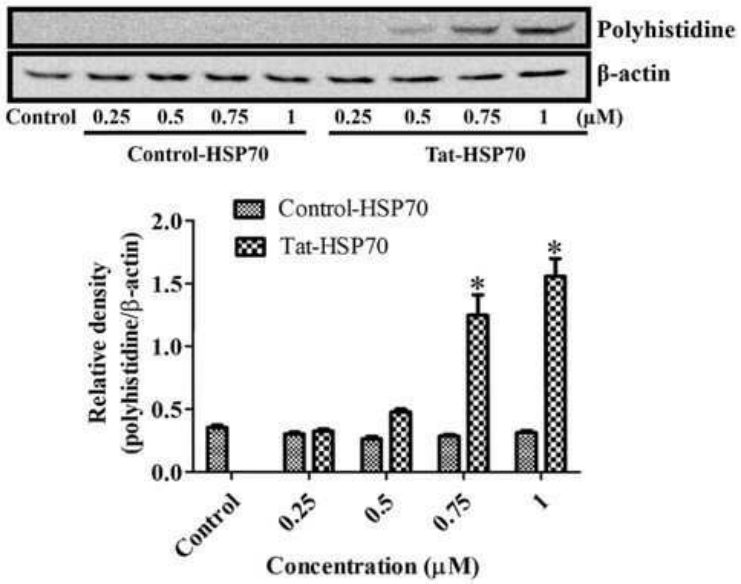
도면1a


BamH I Xho I
T7 term — HSP70 — Tat—His-Tag —Lac O—T7 Prom
MCS
Ap^r
Tat-HSP70
lacI
ori

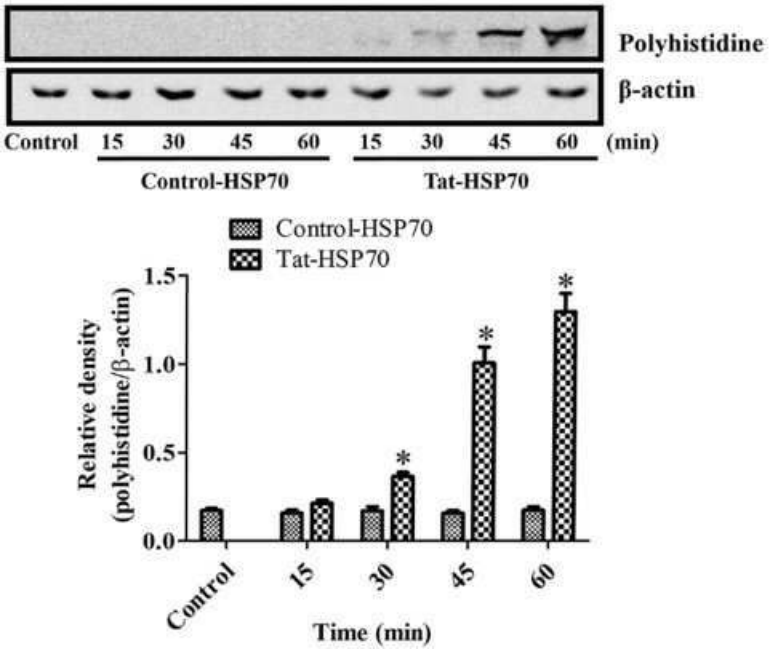
도면1b


(KDa)
200
140
100
72
48
Marker
HSP70
Tat-HSP70
HSP70
Tat-HSP70

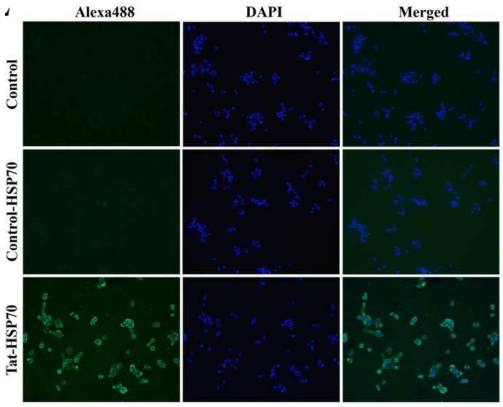
도면1c


Polyhistidine
β-actin
Control 0.25 0.5 0.75 1 0.25 0.5 0.75 1 (μM)
Control-HSP70
Tat-HSP70
Control-HSP70
Tat-HSP70
Relative density (polyhistidine/β-actin)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
Control
0.25
0.5
0.75
1
Concentration (μM)

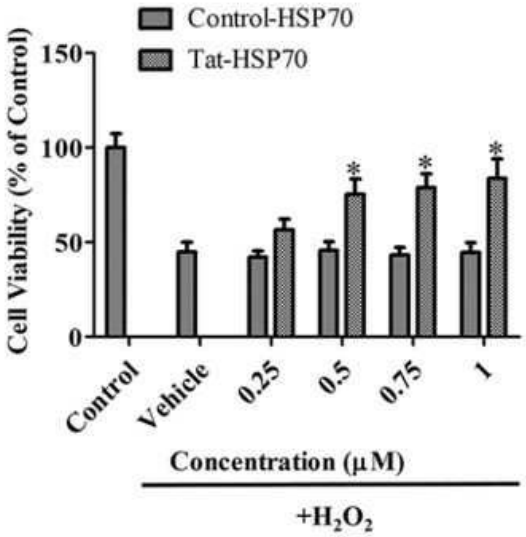
도면1d


Polyhistidine
β-actin
Control 15 30 45 60 15 30 45 60 (min)
Control-HSP70
Tat-HSP70
Control-HSP70
Tat-HSP70
Relative density (polyhistidine/β-actin)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
*
Control
15
30
45
60
Time (min)

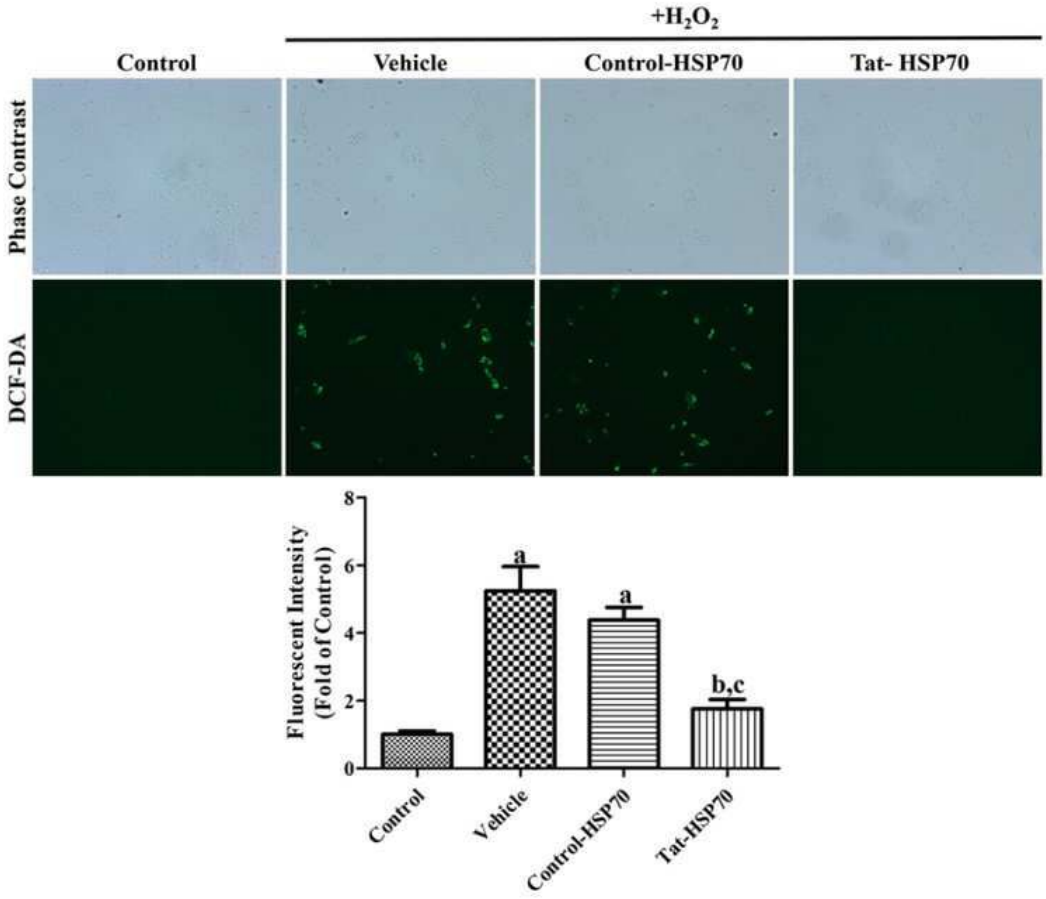
도면1e


Alexa488
DAPI
Merged
Control
Control-HSP70
Tat-HSP70

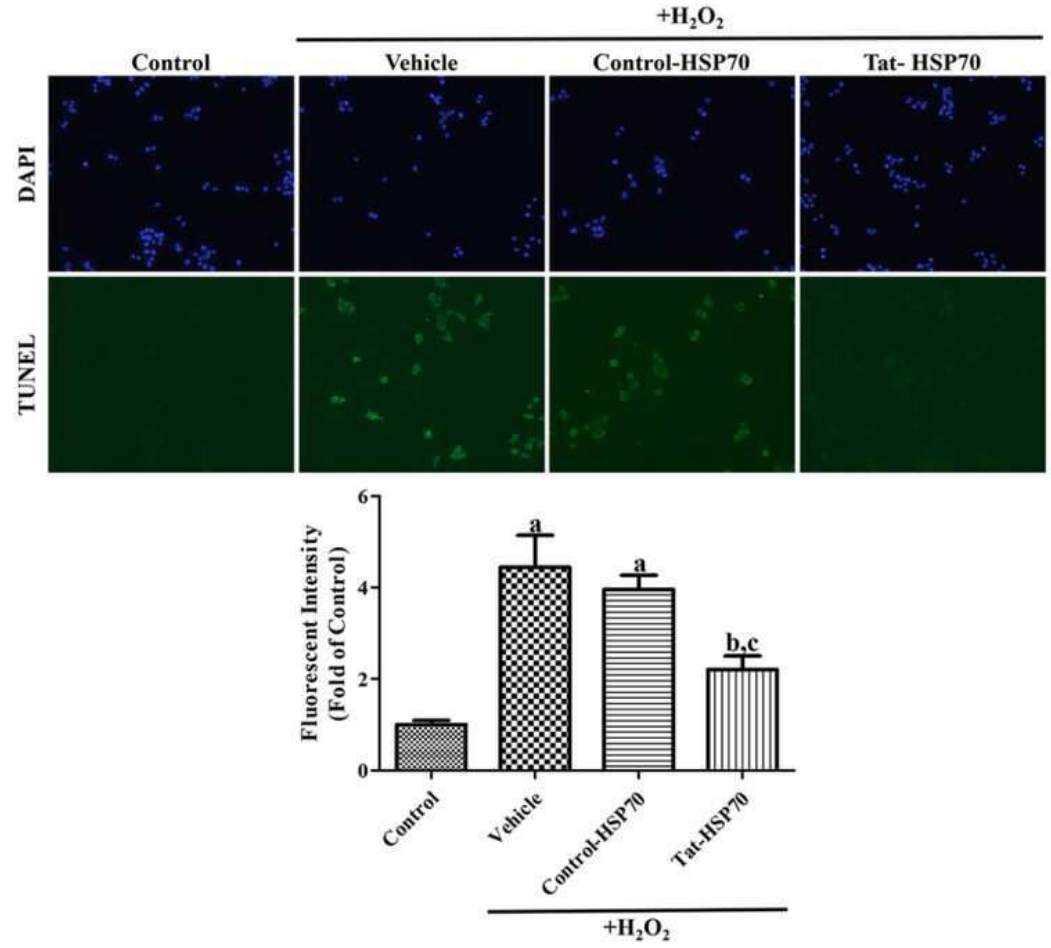
도면2a


Control-HSP70
Tat-HSP70
Cell Viability (% of Control)
150
100
50
0
Control
Vehicle
0.25
0.5
0.75
1
Concentration (μM)
+H2O2

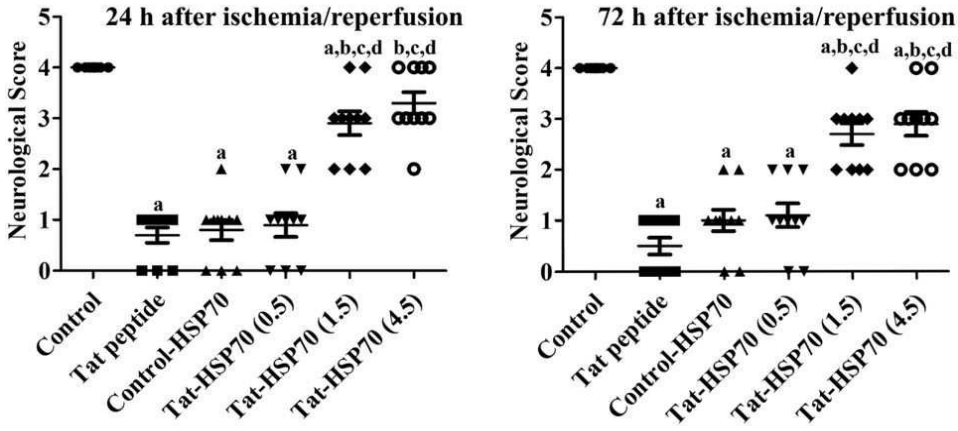
도면2b


+H2O2
Control
Vehicle
Control-HSP70
Tat- HSP70
Phase Contrast
DCF-DA
Fluorescent Intensity
(Fold of Control)
8
6
4
2
0
a
a
b,c
Control
Vehicle
Control-HSP70
Tat-HSP70

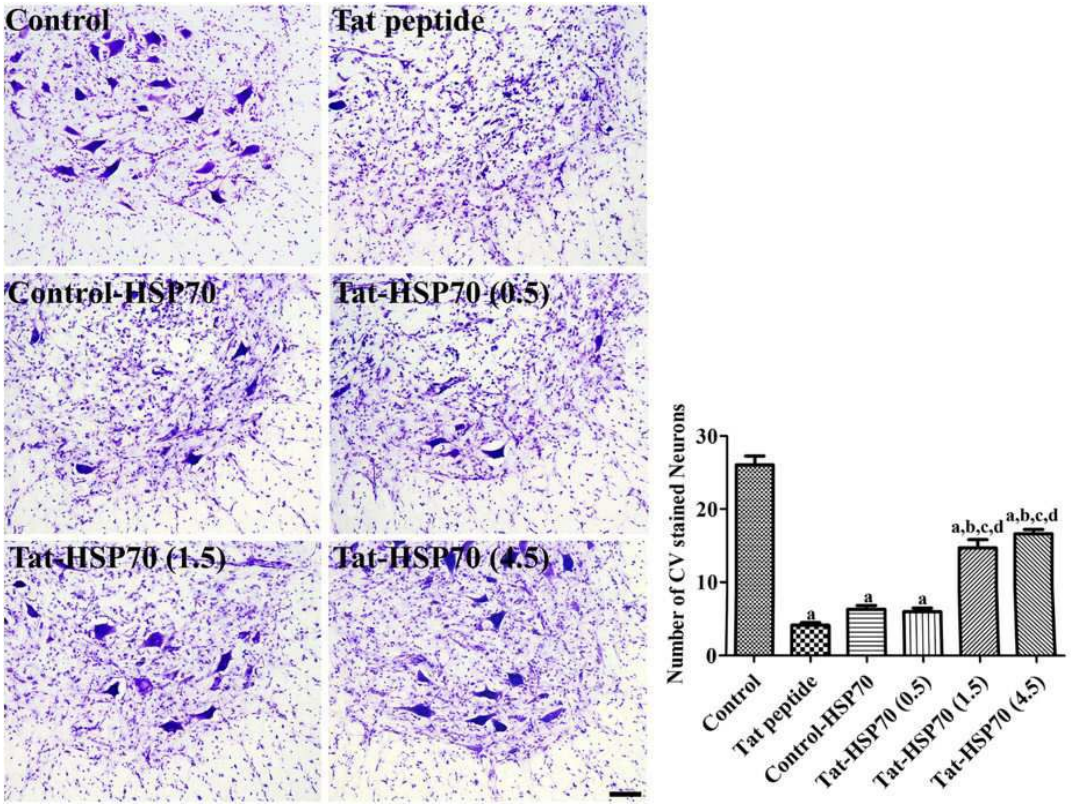
도면2c


+H2O2
Control
Vehicle
Control-HSP70
Tat- HSP70
DAPI
TUNEL
Fluorescent Intensity (Fold of Control)
a
a
b,c
Control
Vehicle
Control-HSP70
Tat-HSP70
+H2O2

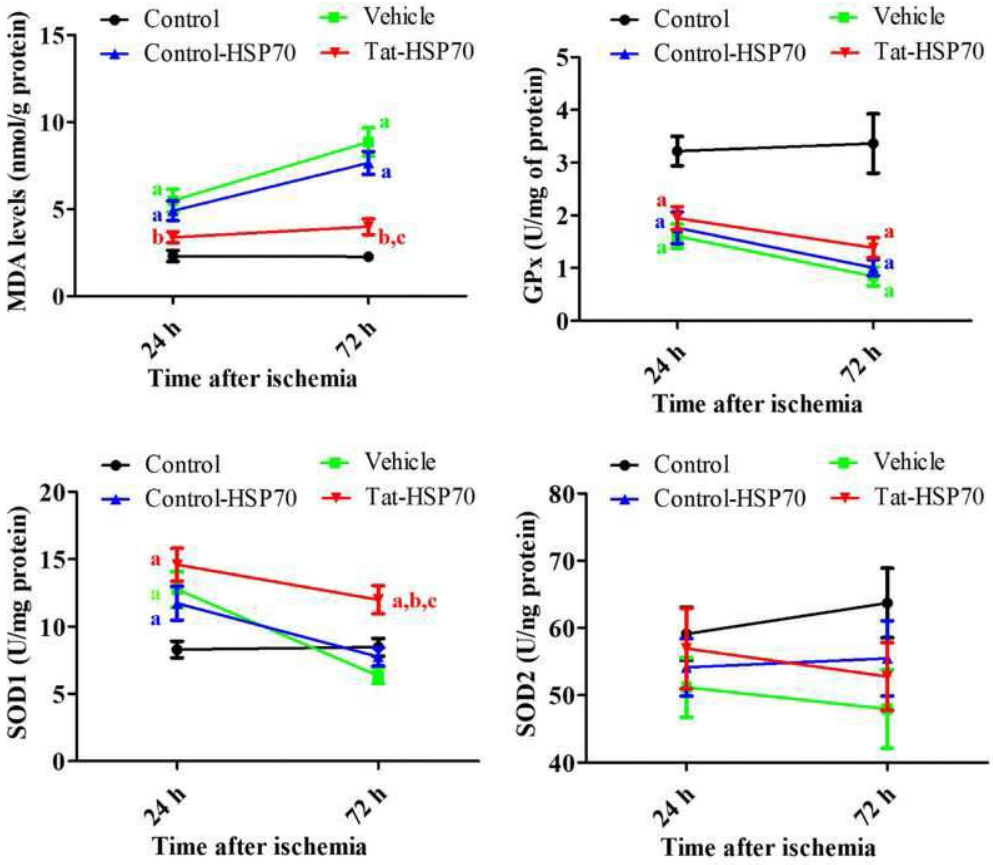
도면3a


24 h after ischemia/reperfusion
72 h after ischemia/reperfusion
Neurological Score
a,b,c,d
b,c,d
a
Control
Tat peptide
Control-HSP70
Tat-HSP70 (0.5)
Tat-HSP70 (1.5)
Tat-HSP70 (4.5)

도면3b


Control
Tat peptide
Control-HSP70
Tat-HSP70 (0.5)
Tat-HSP70 (1.5)
Tat-HSP70 (4.5)
Number of CV stained Neurons
30
20
10
0
a
a
a
a,b,c,d
a,b,c,d
Control
Tat peptide
Control-HSP70
Tat-HSP70 (0.5)
Tat-HSP70 (1.5)
Tat-HSP70 (4.5)

도면4



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> A pharmaceutical composition containing cell-transducing HSP70 fusion protein for preventing and treating neuronal disorder

<130> HallymU-SYCHOI-HSP70_190611

<160> 4

<170> KoPatentIn 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 gggggtgttc caacacggca aggtggagat catcgccaac 120

gaccagggca accgcaccac ccccagctac gtggccttca cggacaccga gcggctcatc 180

ggggatgcgg ccaagaacca ggtggcgctg aacccgcaga acaccgtgtt tgacgcgaag 240

cggctgattg gccgcaagtt cggcgacccg gtggtgcagt cggacatgaa gcactggcct 300

ttccaggtga tcaacgacgg agacaagccc aaggtgcagg tgagctacaa gggggagacc 360

aaggcattct accccgagga gatctcgtcc atggtgctga ccaagatgaa ggagatcgcc 420

gaggcgtacc tgggctaccc ggtgaccaac gcggtgatca ccgtgccggc ctacttcaac 480

gactcgcagc gccaggccac caaggatgcg ggtgtgatcg cggggctcaa cgtgctgcgg 540

atcatcaacg agcccacggc cgccgccatc gcctacggcc tggacagaac gggcaagggg 600

gagcgcaacg tgctcatctt tgacctgggc gggggcacct tcgacgtgtc catcctgacg 660

atcgacgacg gcatcttcga ggtgaaggcc acggccgggg acacccacct gggtggggag 720

gactttgaca acaggctggt gaaccacttc gtggaggagt tcaagagaaa acacaagaag 780

gacatcagcc agaacaagcg agccgtgagg cggctgcgca ccgcctgcga gagggccaag 840

aggaccctgt cgtccagcac ccaggccagc ctggagatcg actccctgtt tgagggcatc 900

gacttctaca cgtccatcac cagggcgagg ttcgaggagc tgtgctccga cctgttccga 960

agcaccctgg agcccgtgga gaaggctctg cgcgacgcca agctggacaa ggcccagatt 1020

cacgacctgg tcctggtcgg gggctccacc cgcatcccca aggtgcagaa gctgctgcag 1080

gacttcttca acgggcgcga cctgaacaag agcatcaacc ccgacgaggc tgtggcctac 1140

ggggcggcgg tgcaggcggc catcctgatg ggggacaagt ccgagaacgt gcaggacctg 1200

ctgctgctgg acgtggctcc cctgtcgctg gggctggaga cggccggagg cgtgatgact 1260

gccctgatca agcgcaactc caccatcccc accaagcaga cgcagatctt caccacctac 1320

tccgacaacc aacccggggt 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 gggtgtcagc caagaacgcc ctggagtcct acgccttcaa catgaagagc 1680

gccgtggagg atgaggggct caagggcaag atcagcgagg cggacaagaa gaaggtgctg 1740

gacaagtgtc aagaggtcat ctcgtggctg gacgccaaca ccttggccga gaaggacgag 1800

tttgagcaca agaggaagga gctggagcag gtgtgtaacc ccatcatcag cggactgtac 1860

cagggtgccg gtggtcccgg gcctgggggc ttcggggctc agggtcccaa 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

305 310 315 320

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

385 390 395 400

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 ggtgggaaac 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 gcgctgaacc 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 tgatcaccgt gccggcctac ttcaacgact cgcagcgcca 540

ggccaccaag gatgcgggtg tgatcgcggg gctcaacgtg ctgcggatca tcaacgagcc 600

cacggccgcc gccatcgcct acggcctgga cagaacgggc aaggggagc gcaacgtgct 660

catctttgac ctgggcgggg gcaccttcga cgtgtccatc ctgacgatcg acgacggcat 720

cttcgaggtg aaggccacgg ccggggacac ccacctgggt ggggaggact ttgacaacag 780

gctggtgaac cacttcgtgg aggagttcaa gagaaaacac aagaaggaca tcagccagaa 840

caagcgagcc gtgaggcggc tgcgcaccgc ctgcgagagg gccaagagga ccctgtcgtc 900

cagcacccag gccagcctgg agatcgactc cctgtttgag ggcatcgact tctacacgtc 960

catcaccagg gcgaggttcg aggagctgtg ctccgacctg ttccgaagca ccctggagcc 1020

cgtggagaag gctctgcgcg acgccaagct ggacaaggcc cagattcacg acctggtcct 1080

ggtcgggggc tccacccgca tccccaaggt gcagaagctg ctgcaggact tcttcaacgg 1140

gcgcgacctg aacaagagca tcaaccccga cgaggctgtg gcctacgggg cggcggtgca 1200

ggcggccatc ctgatggggg acaagtccga gaacgtgcag gacctgctgc tgctggacgt 1260

ggctcccctg tcgctggggc tggagacggc cggaggcgtg atgactgccc tgatcaagcg 1320

caactccacc atccccacca agcagacgca gatcttcacc acctactccg acaaccaacc 1380

cggggtgctg atccaggtgt acgagggcga gagggccatg acgaaagaca acaatctgtt 1440

ggggcgcttc gagctgagcg gcatccctcc ggcccccagg ggcgtgcccc 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 gagcaggtgt gtaaccccat catcagcgga ctgtaccagg gtgccggtgg 1920

tcccgggcct gggggcttcg gggctcaggg tcccaaggga gggtctgggt 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