



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0037421
(43) 공개일자 2019년04월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/47 (2006.01) *A23L 33/18* (2016.01)

A61K 38/00 (2006.01) *A61K 47/62* (2017.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/4702 (2013.01)

A23L 33/18 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2017-0126720

(22) 출원일자 2017년09월29일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

최수영

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

김대원

강원도 강릉시 교동광장로 138-12, 302동 201호 (뒷면에 계속)

(74) 대리인

강성혜

전체 청구항 수 : 총 8 항

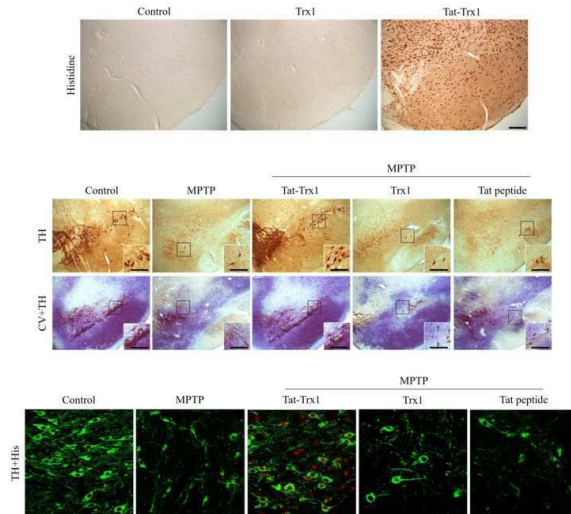
(54) 발명의 명칭 티오레독신 1 융합단백질을 포함하는 파킨슨병 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

과제: 부작용이 적거나 없으며, 효과가 우수한 파킨슨병 예방 또는 치료용 약제를 제공하는 것.

해결수단: 본 발명자들은 티오레독신 1에 단백질 수송 도메인을 함께 융합시켜 세포 또는 조직으로의 침투를 가능하게 하여, 티오레독신 1 융합단백질이 MPP^+ 와 MPTP로 유도한 도파민성 세포사멸과 파킨슨 동물 질환 모델에서 세포 보호효능을 발현하는지를 연구하였다. 그 결과, 세포 투과성 티오레독신 1 융합단백질은 파킨슨병에서 효과적인 단백질 치료제로서의 가능성이 있음을 확인하였다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 38/00 (2013.01)

A61K 47/62 (2017.08)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

C07K 2319/01 (2013.01)

(72) 발명자

음원식

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

신민재

인천광역시 남구 낙섬중로 18, 1-1201 (용현동, 대림아파트)

손오라

경기도 양주시 백석읍 중앙로223번길 123-21

손은정

경기도 남양주시 비룡로116번길 35, 306동 404호 (마석역신도브래뉴 3차 아파트, 묵현리)

박진서

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

한규형

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

김덕수

충청남도 천안시 동남구 다가6길 6, 301호 (그린빌, 다가동)

권오신

대구 수성구 화랑로 26, 101동 1407호(만촌우방하이츠)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093812

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소지원사업

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

기여율 1/3

주관기관 한림대학교

연구기간 2017.09.01 ~ 2018.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016R1A2B4008356

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인연구지원사업(중견연구)

연구과제명 혈액뇌장벽 및 뇌조직 침투성 Glutaredoxin 1 융합단백질을 이용한 퇴행성신경질환 치료제 개발

기여율 1/3

주관기관 한림대학교

연구기간 2017.06.01 ~ 2018.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1D1A3A01015668

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 지역대학우수과학자

연구과제명 도파민 세포 침투성 Antioxidant 1 융합 단백질을 통한 파킨슨병 보호 기전 연구

기여율 1/3

주관기관 강릉원주대학교

연구기간 2017.06.01 ~ 2018.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

9 내지 21개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인이 티오레독신 1 (Thioredoxin 1) 단백질의 최소한 일측 말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 파킨슨병 예방 또는 치료용 티오레독신 1 융합단백질.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 수송도메인은 PEP-1, HIV Tat 49-57 잔기, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고(라이신, 아르기닌) 중의 1종 이상인 것을 특징으로 하는 티오레독신 1 융합단백질.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 티오레독신 1 융합단백질은 그 아미노산 서열이 서열번호 2, 4, 6, 8, 10 또는 12와 같은 것을 특징으로 하는 티오레독신 1 융합단백질.

청구항 4

티오레독신 1 코딩 cDNA의 최소한 일측 말단에 상기 수송 도메인 코딩 올리고뉴클레오타이드 서열이 결합되어 상기 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 티오레독신 1 융합단백질을 코딩하는 파킨슨병 예방 또는 치료용 재조합 폴리뉴클레오타이드.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 재조합 폴리뉴클레오타이드는 그 염기 서열이 서열번호 1, 3, 5, 7, 9 또는 11과 같은 것을 특징으로 하는, 재조합 폴리뉴클레오타이드.

청구항 6

9 내지 21개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인이 티오레독신 1의 최소한 일측 말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 티오레독신 1 융합단백질을 발현시키기 위하여 티오레독신 1 코딩 cDNA의 최소한 일측 말단에 수송 도메인 코딩 올리고뉴클레오타이드 서열이 결합되어 티오레독신 1 융합단백질을 코딩하는 청구항 4 또는 청구항 5의 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 파킨슨병 예방 또는 치료용 티오레독신 1 융합단백질 발현벡터.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 3 중 선택된 어느 한 항의 티오레독신 1 융합단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허

용되는 담체를 포함하는 파킨슨병 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 3 중 선택된 어느 한 항의 티오레독신 1 융합단백질을 유효성분으로 하는 파킨슨병 예방 또는 개선 효과가 있는 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 티오레독신 1 융합단백질의 도파민 뉴런 보호작용에 관한 것으로서, 단백질 수송 도메인과 공유결합된 세포투과성 티오레독신 1 융합단백질은 뇌의 조직 내로 원활히 이동하며, 활성산소종 생성 및 DNA 단편화를 현저히 저해하였으며, 산화 스트레스에 대하여 흑색질 내의 도파민 뉴런을 현저히 보호하는 것으로 나타나 세포투과성 티오레독신 1 융합단백질은 파킨슨병의 예방 또는 치료 용도 약제로 이용 가능하다.

배경 기술

[0002] 파킨슨병(Parkinson's Disease, PD)은 신경퇴행성 장애로서, 흑질(substantia nigra, SN)에서의 도파민 신경의 퇴화로 도파민이 결핍되어 일어난다. 이 병의 증상으로는 신체 움직임이 부자연스럽고 얼굴은 무표정하며 손발이 떨려 근육을 마음대로 움직일 수 없어 행동 장애가 발생한다. 또 일단 걷기 시작하면 점점 걸음이 빨라져 넘어지기 십상이다. 앞으로 구부정한 자세도 이 질환을 겪고 있는 환자의 특징이고, 대부분 65세 이상의 고령자들에게서 발병한다. 발병 원인으로는 뇌 속에 도파민이 부족하거나 아세틸콜린이 지나치게 많으면 발생하고 뇌혈관장애, 뇌종양, 두부 외상일 때도 유사한 증상이 나타난다. 비록 파킨슨병의 세포사멸 기작이 정확히 밝혀지지 않았지만 노화와 염증, 화학적·유전적 요인이 관여한다는 것을 알 수 있다.

[0003] 티오레독신 1 (Thioredoxin 1; Trx1)은 생체 내 산화 환원계에 관여하는 것으로 알려진 단백질이다. 또한, 산화방지 기능에 효과가 있다고 알려져 있고, 뇌신경 세포사멸에 대한 보호기작 기능은 알려지지 않았다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 좀 더 효과적인 파킨슨병 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명자들은 티오레독신 1에 단백질 수송 도메인을 융합하여 세포 또는 조직으로의 침투를 가능하게 하여, 티오레독신 1 융합단백질이 MPP⁺와 MPTP로 유도한 도파민성 세포사멸과 파킨슨 동물 질환 모델에서 세포 보호효과를 발현하는지를 연구하였다. 그 결과, 세포 투과성 티오레독신 1 융합단백질이 파킨슨병을 포함하는 다양한 세포사멸성 질환에서 효과적인 단백질 치료제로서의 가능성이 있음을 확인하였다.

[0007] 본 발명자들은 SH-SY5Y 세포와 파킨슨병 동물모델에서 티오레독신 1 융합단백질의 보호 효과를 살펴보았다. 파킨슨병은 뇌의 흑색질 내에서 도파민 뉴런이 점차 상실되는 신경퇴행성 질환이다. 본 발명자들은 티오레독신 1 융합단백질이 SH-SY5Y 신경아세포종 세포 및 파킨슨병 동물모델에서 산화 스트레스로부터 도파민 뉴런을 보호할 수 있음을 밝혀내었다. 티오레독신 1 융합단백질은 SH-SY5Y 세포 내로 그리고 뇌의 흑색질 내로 잘 이동함을 웨스턴블랏 분석으로 확인하였다. 티오레독신 1 융합단백질은 MPP⁺로 유도되는 활성산소종 생성 및 DNA 단편화를 현저히 저해하였으며, 결과적으로 SH-SY5Y 세포의 생존을 유도했다. 신경 보호효과는 티오레독신 1 융합단백질이 친-자기세포사멸 매개자 및 항-자기세포 사멸 매개자의 수준에 영향을 미침으로써 얻어진다. 나아가, TH 항체 및 크레실 바이올렛 염색을 이용한 면역조직화학 분석 데이터는 티오레독신 1 융합단백질이 MPTP와 같은 산화 스트레스에 대하여 흑색질 내의 도파민 세포를 현저히 보호함을 나타낸다. 따라서, 티오레독신 1 융합단백질

은 파킨슨병의 예방 및 치료 용도로 이용 가능하다.

- [0009] 본 발명은 티오레독신 1(Trx1)의 양측 말단 중 어느 한쪽 또는 양쪽에 단백질 수송 도메인이 공유결합된 티오레독신 1 융합단백질을 포함하는 파킨슨병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0010] 본 발명은 상기 단백질 수송 도메인이 HIV Tat 49-57 펩타이드, Pep-1 펩타이드, 올리고아르기닌, 올리고라이신 또는 올리고(아르기닌+라이신)임을 특징으로 하는 Trx1 융합단백질을 포함하는 파킨슨병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0011] 이뿐만 아니라, 본 발명은 상기 Trx1 융합단백질의 아미노산 서열이 서열번호 2, 4, 6, 8, 10 또는 12임을 특징으로 하는 Trx1 융합단백질을 포함하는 파킨슨병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0012] 본 발명의 상기 융합단백질은 또한, silent change에 따라 서열 내에서 하나 이상의 아미노산이 기능적으로 동등하게 작용하는 유사한 극성의 다른 아미노산(들)로 치환될 수 있다. 서열 내 아미노산 치환은 그 아미노산이 속하는 클래스의 다른 구성원들로부터 선택될 수 있다. 예컨대, 소수성 아미노산 분류는 알라닌, 발린, 류이신, 이소류이신, 페닐알라닌, 발린, 트립토판, 프롤린 및 메티오닌을 포함한다. 극성중성 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.
- [0013] 또한, 본 발명은 Trx1 코딩 cDNA의 최소한 일측 말단에 상기 수송 도메인 코딩 올리고뉴클레오타이드 서열이 결합되어 상기 Trx1 융합단백질을 코딩하는 파킨슨병 예방 또는 치료용 재조합 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 재조합 폴리뉴클레오타이드 염기서열이 서열번호 1, 3, 5, 7, 9 또는 11임을 특징으로 하는 재조합 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 수송 도메인이 Trx1의 최소한 일측 말단에 공유결합되어 세포 침투 효율이 향상된 Trx1 융합단백질을 발현시키기 위하여 Trx1 코딩 cDNA의 최소한 일측 말단에 상기 수송 도메인 코딩 올리고뉴클레오타이드 서열이 결합되어 상기 Trx1 융합단백질을 코딩하는 파킨슨병 예방 또는 치료용 Trx1 융합단백질 발현벡터에 관한 것이다.
- [0016] 이뿐만 아니라, 본 발명은 상기 Trx1 융합단백질을 유효성분으로 하는 파킨슨병 예방 또는 개선 효과가 있는 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.
- [0018] 상기 티오레독신 1 융합단백질(이하 "Tat-Trx1", "Trx1 융합단백질", "Tat-Trx1 융합단백질"과 혼용함)을 포함하여 수송도메인 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, 텍스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활탁제(예: 실리카, 탭크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유하고, 정제는 또한 결합제(예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리돈)를 함유하며, 경우에 따라서 붕해제(예: 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염) 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보조제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.
- [0019] 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 0.0001~100mg/kg을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.
- [0020] 나아가, 본 발명은 상기 티오레독신 1 융합단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는

것을 특징으로 하는, 파킨슨병 예방 또는 치료에 유용한 약제학적 조성물을 제공한다.

- [0021] 본 발명은 또한 Trx1 단백질을 세포 내로 효율적으로 전달하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 Trx1 단백질 분자의 세포 내 전달은 HIV Tat 단백질 수송 도메인이 공유결합된 형태의 융합단백질을 구성하여 수행된다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 HIV Tat 펩타이드로만 한정되는 것은 아니고, 아미노산 서열 일부 치환이나 부가, 결여로 Tat 펩타이드와 유사한 기능을 하는 펩타이드를 제조하는 것이 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 당업자에게는 용이하므로, Tat 단백질 수송 도메인과 이로부터 아미노산 일부 치환으로 동일·유사한 단백질 수송기능을 수행하는 단백질 수송 도메인을 이용한 융합단백질도 본 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.
- [0022] 구체적으로, 본 발명은 Tat-Trx1 융합단백질, 이 융합단백질을 제조하기 위한 제조합 뉴클레오타이드와 벡터, 이 융합단백질을 포함하는 파킨슨병 예방 또는 치료 목적의 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명의 상기 세포 투과성 티오레독신 1 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 티오레독신 1 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 건강음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 티오레독신 1 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 포도당, 과당과 같은 단당류, 말토스, 수크로스 및 같은 이당류, 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 다당류, 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리진 등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파탐 등)를 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, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 중요하지는 않으나 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0025] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0026] "Tat-Trx1 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 티오레독신 1을 포함하며, 수송 도메인과 목표 단백질(즉, 본 발명에서는 티오레독신 1을 의미함)의 유전적 융합이나 화학결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서에서는 "Tat-Trx1", "Tat-Trx1 융합단백질", "Trx1 융합단백질", "티오레독신 1 융합단백질"과 혼용하였다.
- [0027] "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 티오레독신 1을 의미한다.
- [0028] "융합단백질"이란 수송도메인 및 한 개 이상의 목표 단백질 부분을 포함하며, 수송도메인과 목표 단백질의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 복합체를 의미한다.
- [0029] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.
- [0030] 또한, "표적 세포"란 수송도메인에 의해 목표 단백질이 전달되는 세포를 의미하는 것으로서, 표적 세포는 체내 또는 체외의 세포를 말한다. 즉, 표적세포는 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.

- [0031] 본 발명에서의 "단백질 수송 도메인"은 고분자 유기화합물, 예컨대 펩타이드, 단백질 등과 공유결합을 이루어 별도의 수용체나 운반체, 에너지를 필요로 하지 않고 상기 유기화합물들을 세포 내로 도입시킬 수 있는 것을 말한다.
- [0032] 또한, 본 명세서에서는 단백질, 펩타이드, 유기화합물을 세포 내로 "도입"하는 것에 대하여 "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.

발명의 효과

- [0033] 본 발명의 티오레독신 1 융합단백질은 SH-SY5Y 세포 내로 시간 의존적, 투여량 의존적으로 세포 내로 투과되었고, 나아가 세포 내 티오레독신 1 융합단백질 수준이 상당 시간 동안 유지되었다.
- [0034] 또한, 본 발명의 티오레독신 1 융합단백질은 MPP^+ 에 대한 반응인 활성산소종 생성을 현저히 억제하였다.
- [0035] 본 발명의 티오레독신 1 융합단백질은 MPP^+ 로 유도되는 산화 스트레스로부터 세포를 보호할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 티오레독신 1 융합단백질은 뇌혈관장벽을 효과적으로 가로질러 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

- [0037] 도 1은 Tat-Trx1 융합단백질 구축과 정제를 나타낸다(A). Tat-Trx1 융합단백질은 여섯 개의 히스티딘 잔기로 이루어진 His tag를 포함한다. 정제한 융합단백질을 12% SDS-PAGE로 분리하여 항 토끼 폴리히스티딘 항체로 웨스턴 블랏 분석하였다(B).
- 도 2a, 2b, 2c는 SH-SY5Y 세포 내로 Tat-Trx1 융합단백질의 도입을 나타낸다. 세포를 60mm 배양접시에서 배양한 다음 Tat-Trx1 융합단백질($0.5\sim5\mu M$)과 대조군 Trx1 단백질 ($0.5\sim5\mu M$)을 배양배지에 1시간 동안 처리했다(A). Tat-Trx1 융합단백질($3\mu M$)과 대조군 Trx1 단백질($3\mu M$)을 배양배지에 10 내지 60분간 처리했다(B). 그 후 웨스턴블랏으로 분석했다. 세포 내로 투과된 Tat-Trx1 융합단백질의 세포내 분포는 공초점현미경으로 관찰했다(C). 크기 막대 = $50\mu m$.
- 도 3은 산화 스트레스에 의해 생성되는 세포 내 활성산소종 수준에 미치는 Tat-Trx1 융합단백질의 효과에 관한 것이다. $5mM MPP^+$ 를 배양 배지에 첨가하기 전에 SH-SY5Y 세포를 Tat-Trx1 융합단백질로 전처리하였다. DCF-형광은 DCF-DA의 산화를 통한 세포 내 활성산소종 수준에 의해 증가되었다. 형광 현미경을 이용하여 이미지를 촬영하였고, 형광 강도는 ELISA 플레이트 판독기로 측정하였다. $P < 0.01$ 은 MPP^+ 처리된 세포와 비교한 값이다. 크기 막대 = $50\mu m$.
- 도 4는 세포로 투과된 Tat-Trx1 융합단백질이 도파민 뉴런 세포 생존율에 미치는 영향(맨 위쪽 사진)과 Tat-Trx1 융합단백질이 혈관 뇌 장벽을 가로질러 투과됨을 나타낸다. 마우스 뇌로 Tat-Trx1 융합단백질의 투과는 항히스티딘 항체를 이용한 면역조직화학으로 분석하였다. 동물은 Tat-Trx1 융합단백질을 1회 주사하여 처리한 다음 8시간 후 희생하였다(도 4의 맨 위쪽 사진). Tat 펩타이드, Trx1 단백질 및 Tat-Trx1 융합단백질은 각각 $5mg/kg$ 으로 피하주사한 다음 MPTP를 주사하였다. 일주일 후 뇌를 하비스트했다. 흑질(substantia nigra; SN)에서 세포 생존율은 TH 면역활성 및 이중염색(크레실 바이올렛과 TH 면역조직화학)으로 확인하였다. 크기 막대는 도 4의 가운데 사진 중 고배상도 사진에서만 $50\mu m$ 이고, 다른 사진(맨 위의 사진들과 중간의 사진들)에서는 $100\mu m$ 이다. Tat 펩타이드, Trx1 단백질 및 Tat-Trx1 융합단백질을 각각 처리한 후 TH와 히스티딘 항체를 이용하여 흑질에서 이중염색한 결과는 도 4의 맨 아래쪽 사진에 나타났다. Tat 펩타이드, Trx1 단백질 및 Tat-Trx1 융합단백질을 각각 $5mg/kg$ 으로 피하주사하고 MPTP를 주사한 다음 12시간 후에 쥐를 희생시켰다. Tat 펩타이드, Trx1 단백질 및 Tat-Trx1 융합단백질을 각각 히스티딘 항체 및 FITC-표지된 이차항체를 이용하여 탐지하였고, 도파민 뉴런은 TH와 TRITC(tetramethyl rhodamine isothiocyanate) 이차 항체를 이용하여 탐지하였다. 도파민 뉴런 (항-TH), 녹색; Trx1 단백질 또는 Tat-Trx1 융합단백질 (항히스티딘), 적색.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0038] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에 의하여 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게

자명하다.

[0040] **재료**

[0041] 제한효소와 T4 DNA 연결효소는 promega (USA)에서 구입하였고, Tat-올리고뉴클레오타이드는 Gibco BRL (USA)에서 합성하였다. IPTG는 Duchefa(Netherland)에서 구입하였다. pET15b 벡터와 BL21 (DE3) 플라스미드는 Novagen(USA)에서 구입하였으며, Ni^{2+} -니트릴로삼초산 세파로즈 수퍼플로 컬럼은 Qiagen(Germany)에서 구입하였다. 항-히스티딘 항체 및 항-Trx1 항체는 Santa Cruz(CA, USA)에서 구입하였다. 다른 기본 항체 및 이차 항토끼 항체는 Santa Cruz Biotechnology(CA, USA)에서 구입하였다. Tat-펩타이드는 PEPTRON(Deajeon, Korea)에서 주문 제작하였다. 이외의 모든 시약은 특급 제품을 이용하였다. 명시되지 않은 다른 화학 물질과 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 최상급으로 구입하였다.

[0043] **Tat-Trx1 융합단백질 발현 및 정제**

[0044] 세포 투과성 HIV-1 Tat 발현 벡터는 종래 기술에 따라 본 연구실에서 제조하였다 (Kwon et al., 2000). 인간 Trx1 단백질은 PCR로 증폭하였다. PCR 산물은 절단하여 용출하고 TA-클로닝 벡터에 연결하였다. 인간 Trx1 cDNA를 포함하는 정제된 TA 벡터는 여섯 개의 히스티딘 오픈리딩 프레임과 함께 발현 벡터 내로 연결되어 발현벡터를 제조하였고, 이. 콜라이 DH5 α 세포 내로 클론되었다. 유사한 방법으로 Tat 펩타이드를 융합하지 않은 대조군 Trx1 단백질을 구축하고 발현하였다.

[0045] 제조한 Tat-Trx1 플라스미드는 이.콜라이 BL21 세포 (Novagen)로 형질변환되어 0.1mM의 IPTG (Duchefa, HaTrx1lem, Netherlands)로 18℃에서 18시간 동안 발현을 유도하였다. 하비스트한 세포는 초음파 처리로 용균하고, Tat-Trx1 융합단백질은 Ni^{2+} -나이트릴로삼초산 세파로즈 친화 크로마토그래피로 정제하였다. 염은 PD-10 컬럼 크로마토그래피 (Amersham, Braunschweig, Germany)로 제거하였다. 단백질 농도는 소 혈청 알부민을 표준물질로 이용하여 브래드포드법으로 측정하였다(Bradford, 1976).

[0047] **Tat-Trx1 융합단백질의 SH-SY5Y 신경아세포종 세포 투과**

[0048] SH-SY5Y 사람 신경아세포종 세포는 가열 불활성화 우태혈청(10% FBS) 및 항생제(100 μ g/ml 스트렙토마이신, 100U/ml 페니실린)을 함유한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지 내에서 37℃, 95% 공기 및 5% CO₂의 습한 환경 하에서 배양하였다.

[0049] Tat-Trx1 융합단백질의 세포 내 투과를 관찰하기 위해 배양세포를 6-웰 플레이트에서 4~6시간 정도 자라도록 하였고, FBS가 포함되지 않은 1ml의 신선한 미디어로 교체하고 여러 농도의 Tat-Trx1 융합단백질을 배지에 처리하여 농도별 세포 내 투과를 관찰하였고, 또 시간별 투과를 관찰하기 위하여 3uM의 Tat-Trx1 융합단백질을 10분 내지 60분간 배지에 처리하였다. 처리 후 일정 시간이 경과한 뒤에 세포를 트립신-EDTA(Gibco Grand Island, NY, USA)로 처리하고 PBS(phosphate buffered saline)로 충분히 세척한 다음 세포 내로 투과된 융합단백질의 양과 활성은 웨스턴 블랏을 통해 분석하고 측정하였다.

[0051] **형광현미경 분석**

[0052] 커버슬립 상에서 SH-SY5Y 사람 신경아세포종 세포를 배양하고 3uM Tat-Trx1 융합 단백질을 처리하였다. 그 후에 37℃로 2시간 동안 배양하고 PBS를 이용하여 2번 정도 씻어주고, 4% 파라포름알데하이드를 5분간 처리하여 세포를 상온에서 고정하였다. 세포는 투과 가능하도록 만든 후 3% 우혈청 알부민, 0.1% Triton X-100 함유 PBS (PBS-BT)로 40분간 블로킹한 다음 PBS-BT로 세척하였다. 일차 항체(His-probe, Santa Cruze Biotechnology)는 1:2000으로 희석하고, 4℃에서 밤새 배양하였다. 2차 항체 (Alexa 488, Invitrogen)는 1:15000으로 희석하고 어두운 곳에서 상온으로 한 시간 배양하였다. 핵은 1 μ g/ml DAPI (Roche)로 2분간 염색하였다. 형광 분포는 공초점 레이저 스캐닝 시스템 (Bio-Rad MRC-1024ES)으로 분석하였다.

[0054] **세포 내 활성산소종 측정**

[0055] DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)를 이용하여 세포 안의 활성산소종 수준을 측정하였다. DCF-DA는 활성산소종에 의해 세포 안에서 DCF로 전환되어 녹색 형광을 발한다. SH-SY5Y 사람 신경아세포종 세포에 Tat-Trx1 융합단백질을 처리하였을 때와 처리하지 않았을 때의 활성산소종 수준을 비교해 보았다. Tat-Trx1 융합단백질은 1시간 동안 처리하였고 후에 과산화수소를 0.8mM의 농도로 2시간 동안 처리해 주었다. 그리고 PBS로 두 번 씻어주고 DCF-DA를 20 μ M의 농도로 1시간 처리해 주었다. 형광 영상은 형광현미경 (Nikon eclipse 80i, Japan)을 이용하여 얻었다.

[0057] **웨스턴블랏 분석**

[0058] 웨스턴블랏 분석을 위해, 세포 분쇄액 내의 단백질을 12% SDS 폴리아크릴아마이드 겔로 분리한 다음 겔에 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, β -액틴 항체, 캐스페이즈-3 항체, 절단된 캐스페이즈-3 항체, Bax 항체, Bcl-2 항체(1:10,000 희석) 및 호스래디쉬 퍼옥시데이즈가 결합된 2차 항체(1:10,000 희석)와 함께 배양하였다. 결합된 항체 복합체는 제조자의 지시에 따라 화학발광탐지 키트를 사용하여 탐지하였다 (Amersham, Piscataway, NJ, USA).

[0060] **공초점 현미경 관찰**

[0061] SH-SY5Y 세포 내의 Tat-Trx1 융합단백질과 Trx1 단백질을 탐지하기 위해 세포를 유리 커버슬립 상에 시드하고 Tat-Trx1 융합단백질과 Trx1 단백질을 각각 3 μ M 농도로 3시간 동안 처리하였다. 세포를 PBS로 두 번 세척한 다음 실온에서 5분간 4% 파라포름알데하이드로 고정하고 항히스티딘 1차 항체 및 알렉사 플루오르 488 결합된 2차 항체 (Invitrogen, CTrx11sbad, CA, USA)로 차례대로 배양하였다. 핵은 1 μ g/ml의 DAPI (4'-diamidino-2-phenylindole; Roche Applied Science, Basel, Switzerland)로 5분간 염색하였다. 형광은 올림푸스 FV-300 공초점 형광현미경으로 분석하였다 (Olympus, Tokyo, Japan).

[0063] **TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling) 분석**

[0064] 유리 커버슬립 상의 SH-SY5Y 세포에 각각 Tat-Trx1 융합단백질과 Trx1 단백질 3 μ M씩을 가하여 37°C로 3시간 배양한 다음 MPP⁺(5.0mM)에 14시간 30분 동안 노출하였다. TUNEL 염색은 세포 사멸 탐지키트 (Roche Applied Science, Basel, Switzerland)를 이용하여 수행하였다. 형광현미경 사진은 Eclipse 80i 형광현미경(Nikon, Tokyo, Japan)으로 찍었다. DAPI ((4',6-diamidino-2-phenylindole) 염색도 진행하였다.

[0066] **실험 동물**

[0067] 수컷, 6주령, C57BL/6 마우스를 한림대 실험동물센터에서 구입하였다. 마우스는 일정 온도 (23°C)와 일정 상대 습도 (60%)에서 12시간 사이클로 명암조절하여 사육하였다. 물과 사료에는 자유롭게 접근 가능하였다. 동물과 관련된 모든 실험 절차와 관리는 국립수의과학검역원 (National Veterinary ReseTrx1ch &QuTrx1antine 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. 마우스에는 MPTP를 20mg/kg 투여량으로 두 시간 간격으로 주사하였다. Tat-Trx1 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⁺와 Tat-Trx1 융합단백질 처리군, 4) MPTP⁺와 Tat 펩타이드 처리군, 및 5) MPTP⁺와 Trx1 단백질 처리군. 마우스는 마지막 주사로부터 일주일 후 희생시켰다.

[0069] **면역조직화학**

[0070] 면역염색은 이전의 연구와 같이 수행하였다. 3% 우혈청 알부민이 함유된 PBS로 실온에서 30분간 조직 절편을 처리하여 블로킹시키고 Tat-Trx1 융합단백질과 Trx1 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 endoplasmic reticulum)로 생각되는 니슬소체 (Nissl bodies)를 염색하기 위해 크레실 바이올렛 염색을 수행하였다. 절편은 DAB (3,3'-diaminobenzidine) 함유 0.1M 트리스 완충액으로 시각화하여 젤라틴 코팅된 슬라이드에 올려놓았다. 영상은 올림푸스 DP72 디지털 카메라 및 DP2-BSW 현미경 디지털 카메라 소프트웨어로 촬영 및 분석하였다. 도면은 Adobe Photoshop 7.0 (San Jose, CA, USA)을 이용하였다.

[0072] 통계 분석

[0073] 데이터는 각각의 독립된 실험에서 얻은 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 평균값 간의 차이는 일방 ANOVA를 이용하여 분석하였다. Newman-Keuls post hoc 분석은 ANOVA 시험에서 차이가 관찰된 때 채용하였다 ($p < 0.01$).

[0075] 결과 1: Tat-Trx1 융합단백질의 정제 및 세포 투과

[0076] 침투성 Tat-Trx1 융합단백질을 제조하기 위해 단백질 수송 도메인(Protein Transduction Domain)의 일종인 HIV-1 Tat 펩타이드가 포함된 Tat 벡터와 Trx1 유전자를 재조합하여(도 1의 A), 대장균에서 과발현하여 Ni^{2+} -나이트로삼초산 세파로즈 친화 크로마토그래피 컬럼과 PD-10 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하였고, SDS-PAGE와 웨스턴 블랏팅으로 확인하였다(도 1의 B).

[0077] Tat-Trx1 융합단백질이 세포 내로 침투하는지 시간 및 농도별로 단백질을 도파민 뉴런 세포인 SH-SY5Y 세포에 처리하였다. 그 결과 Tat-Trx1 융합단백질은 시간 및 농도 의존적으로 세포 내 투과가 효과적으로 일어났으며, Tat이 없는 Trx1 단백질은 투과가 일어나지 않았다(도 2a, 2b). 그리고, 공촛점 현미경을 이용하여 DAPI로 세포 핵을 염색하고, Tat-Trx1 융합단백질을 녹색 형광으로 염색하여 효과적으로 세포 내로 투과되는 것을 확인하였다(도 2c).

[0079] 결과 2: MPP^{+} 를 가한 후 세포 생존율, 활성산소종 수준 그리고 DNA 단편화에 미치는 Tat-Trx1 융합단백질의 보호 효과

[0080] 세포에 Tat-Trx1 융합단백질을 농도별로 전처리 후 MPP^{+} 로 세포에 손상을 주었다. MPP^{+} 로 인하여 신경독소가 유발되어 증가하는 활성산소종에 대하여 Tat-Trx1 융합단백질이 세포를 효과적으로 억제하는지 확인하기 위하여, 세포 내에 생성된 활성산소종과 $H_2DCFDA(2',7'$ -dichlorofluorescein diacetate)가 세포 내에서 가수분해되어 불투과성의 $2',7'$ - $H_2DCF(dichlorofluorescein)$ 가 반응하여 산화되면서 DCF($2',7'$ -dichloro-fluorescein)을 형성해 녹색 형광을 나타내는 원리의 DCF-DA 염색법을 수행했다. MPP^{+} 를 처리한 세포에서 녹색 형광은 대조군 Trx1 단백질에 비해 MPP^{+} 에 의해 강하게 염색된 반면, 투과된 Tat-Trx1 융합단백질은 형광신호를 감소시켰다 (도 3).

[0082] 결과 3: 파킨슨병 동물모델에서의 Tat-Trx1 융합단백질의 침투 효율과 신경세포 생존 기여도

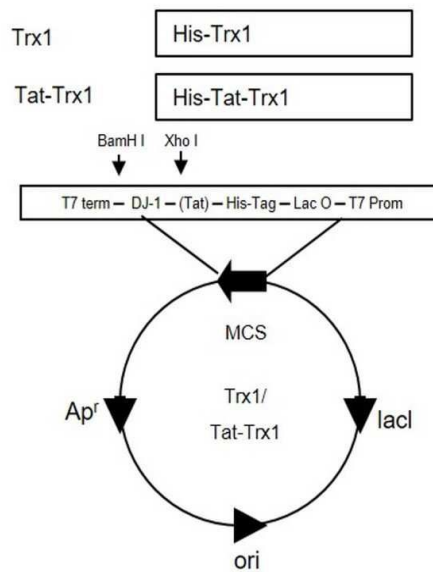
[0083] 생체 내 혈관 뇌 장벽(Blood brain barrier)에 대한 Tat-Trx1 융합단백질의 투과 효율을 확인하기 위해 Tat-Trx1 융합단백질과 대조군 Trx1 단백질을 각각 5.0mg/kg씩 랫트에 주사하였다. 뇌에서 Tat-Trx1 융합단백질과 Trx1 단백질의 위치를 보기 위해 히스티딘 항체를 이용하여 확인하였다. 면역조직화학 데이터는 오직 Tat-Trx1 융합단백질을 주사한 실험군에서 혈관 뇌 장벽을 통과하여 뇌의 흑질(Substantia nigra) 부분까지 투과하는 것을 보여준다(도 4의 맨 윗줄). 또한, Tat-Trx1 융합단백질이 뇌 조직까지 투과하여 MPTP에 의해 사멸한 뇌 신경세포의 생존에 기여한다는 것을 면역조직 염색 방법을 통하여 보여주고 있다. Tat-Trx1 융합단백질을 투여한 군과 Trx1 단백질을 투여한 군에서 TH(tyrosine hydroxylase) 항체와 크레실 바이올렛 염색방법을 이용하여 TH 면역반응성 뉴런을 확인하였다. 도 4의 가운데 사진을 보면 Tat-Trx1 융합단백질을 투여한 군은 아무것도 처리하지 않은 대조군과 비슷한 정도로 신경 세포가 염색된 것을 볼 수 있다. 이런 결과를 통하여 Tat-Trx1 융합단백

질이 뇌 신경 세포 사멸에 반하여 뇌 신경 세포의 생존에 기여한다는 것을 확인하였다. 반면, Tat 펩타이드 또는 대조군 Trx1 단백질을 투여한 군에서는 뇌 신경 세포의 사멸에 대해 보호효과가 없었다. 그리고 Tat-Trx1 융합단백질이 혈관 뇌 장벽을 통과하여 흑질 지역의 뇌신경 세포의 사멸로 인해 발생하는 파킨슨병에 예방제 또는 치료제로서 효과가 있다는 것을 확인하는 실험을 진행하였다. Tat-Trx1 융합단백질, 대조군 Trx1 단백질, Tat 펩타이드를 각각 마우스에 투여한 후 12시간 경과 후 MPTP(20mg/kg)를 두 시간마다 총 네 번 투여하여 뇌 신경 세포의 사멸을 유도하였다. Tat-Trx1 융합단백질, Trx1 단백질, Tat 펩타이드 투여군으로부터 얻은 뇌를 하비스트해서 TH 항체(녹색)와 히스티딘 항체(적색)를 이중 염색하였다. 도 4의 맨 아래 사진에서 Tat-Trx1 융합단백질 투여군에서만 붉은색으로 형광염색된 것이 관찰되었다. 이는 Tat-Trx1 융합단백질 투여군만이 흑질 부분까지 투과되어 존재함으로써 뇌 신경 세포 사멸에 반하는 보호기능을 수행함을 보여주는 결과이다.

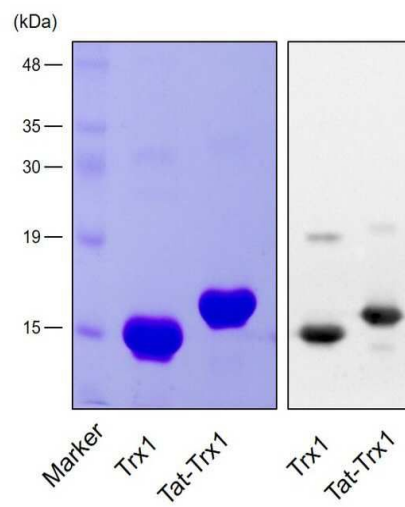
도면

도면1

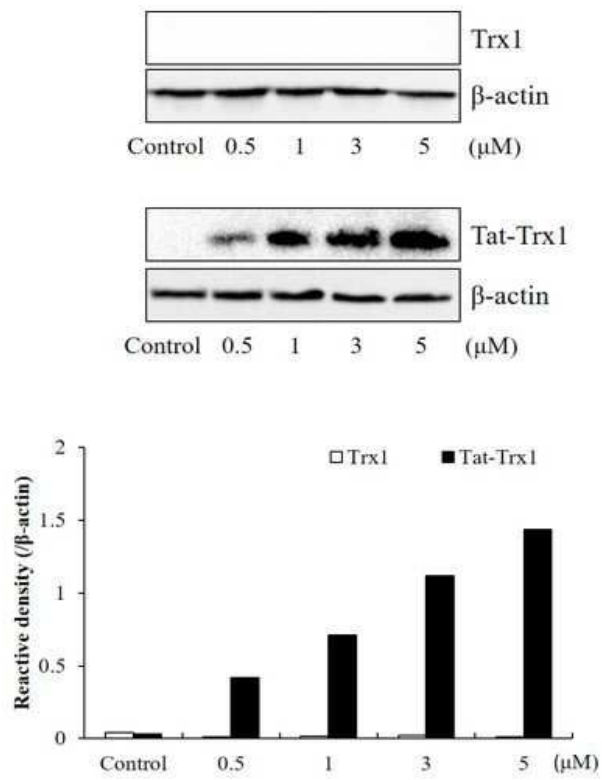
A



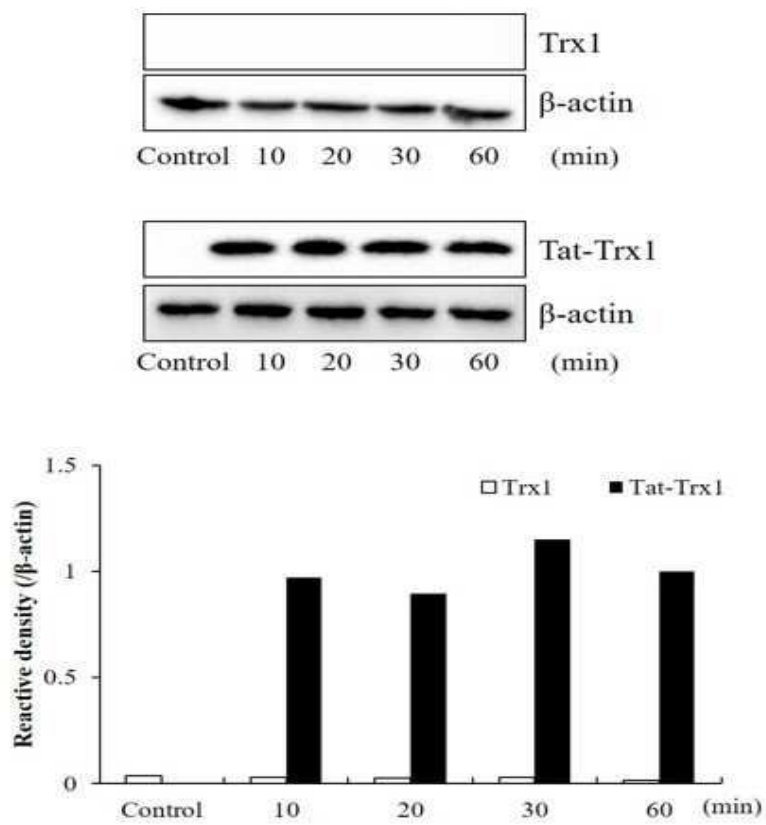
B



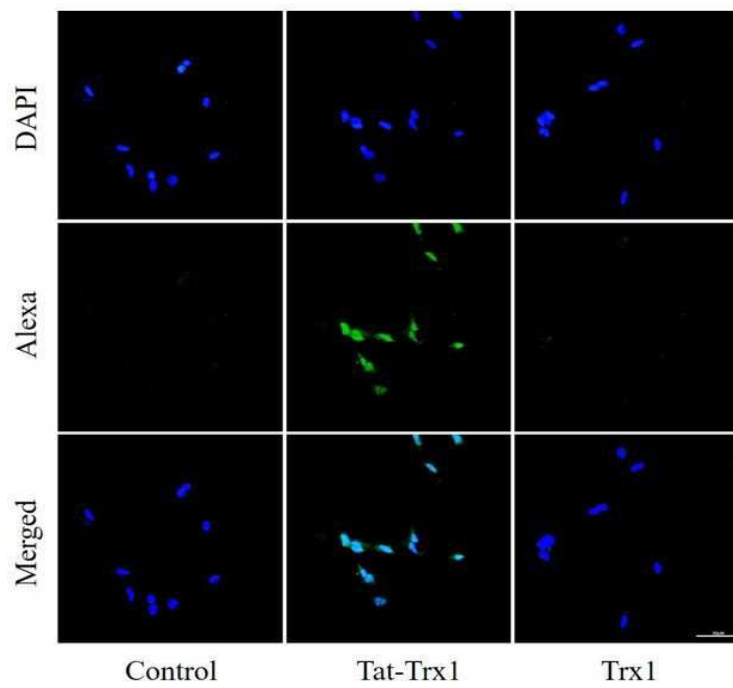
도면2a



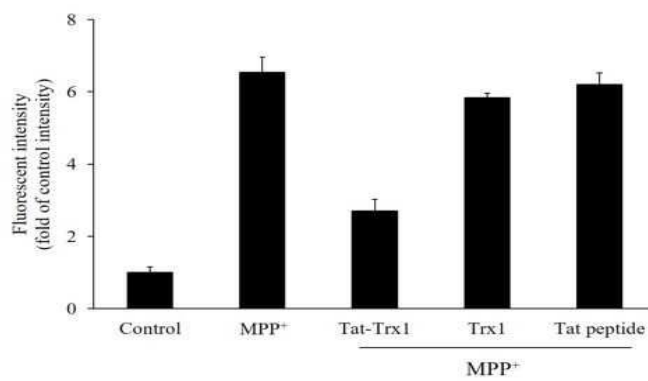
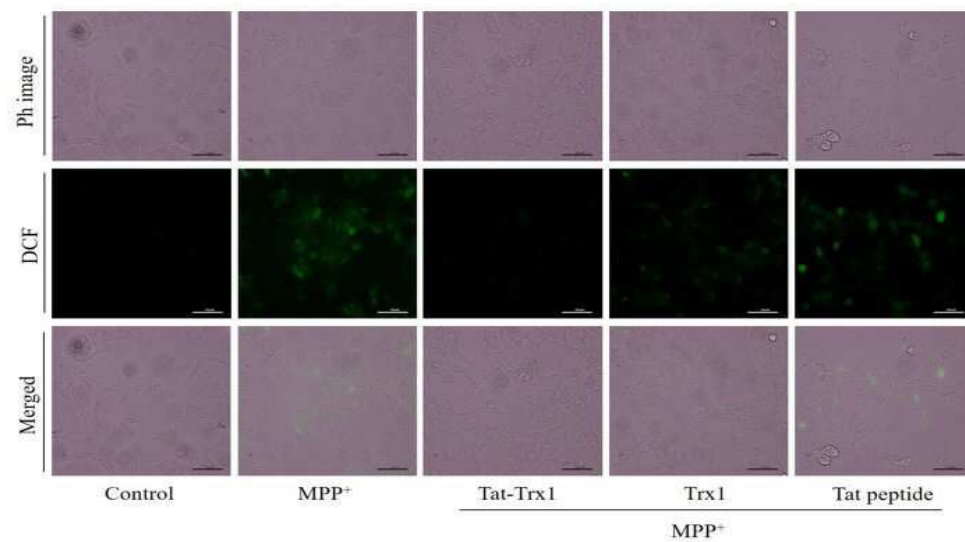
도면2b



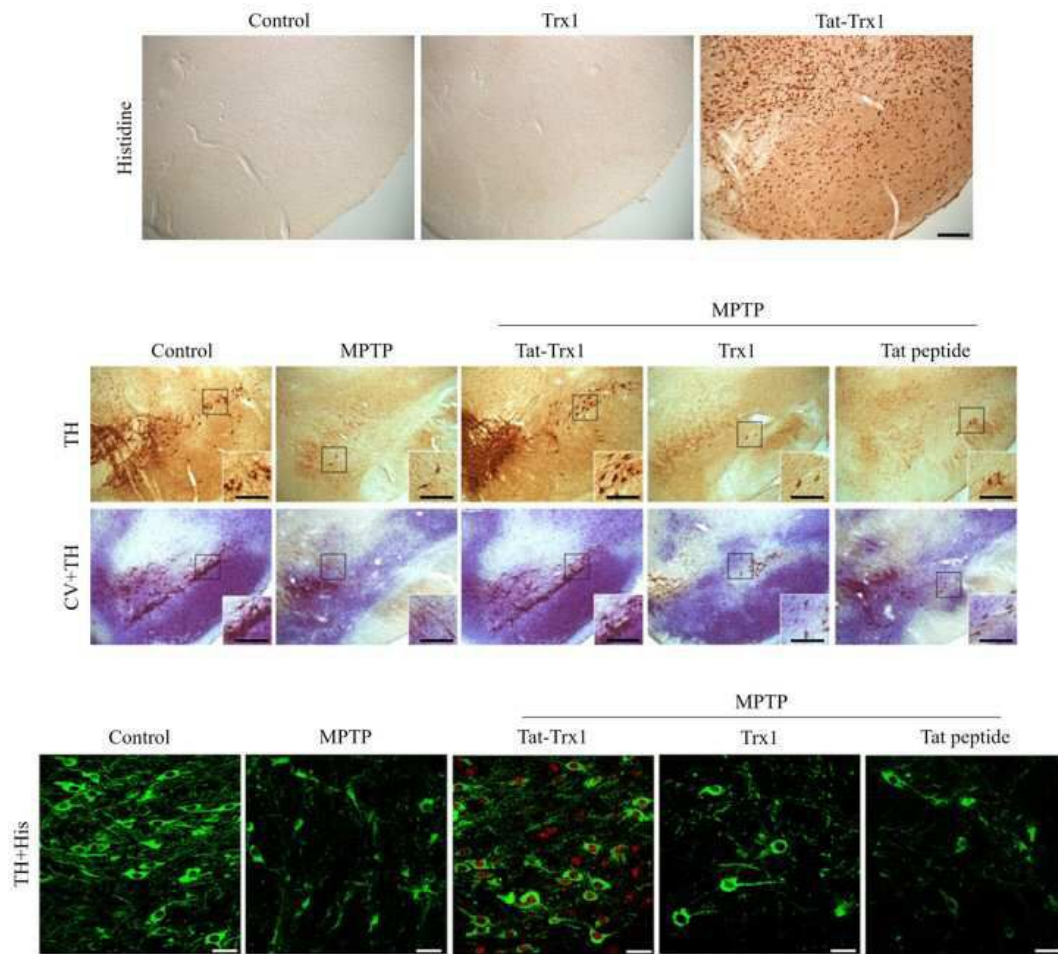
도면2c



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Industry Academic Corporation Foundation, Hallym University
- <120> Pharmaceutical composition for treating Parkinson's disease
containing Thioredoxin 1 fusion protein
- <130> hallymU-sychoi-trx1-PD
- <160> 12
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 345
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> polynucleotide coding Tat-Thioredoxin fusion protein
- <400> 1

aggaagaagc ggagacagcg acgaagaatg gtgaagcaga tcgagagcaa gactgctttt

60

caggaagcct tggacgtgc aggtgataaa cttgtagtag ttgacttctc agccacgtgg 120

tgtgggcctt gcaaatgat caagccttc tttcattccc tctctgaaaa gtattccaac 180

gtgatattcc ttgaagtaga tgtggatgac tgcaggatg ttgcttcaga gtgtgaagtc 240

aaatgcatgc caacattcca gttttttaag aaggacaaa aggtgggtga atttctgga 300

gccataagg aaaagcttga agccaccatt aatgaattag tctaa 345

<210> 2

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-Thioredoxin fusion protein

<400> 2

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Met Val Lys Gln Ile Glu Ser

1 5 10 15
Lys Thr Ala Phe Gln Glu Ala Leu Asp Ala Ala Gly Asp Lys Leu Val

20 25 30
Val Val Asp Phe Ser Ala Thr Trp Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Lys

35 40 45
Pro Phe Phe His Ser Leu Ser Glu Lys Tyr Ser Asn Val Ile Phe Leu

50 55 60
Glu Val Asp Val Asp Asp Cys Gln Asp Val Ala Ser Glu Cys Glu Val

65 70 75 80

Lys Cys Met Pro Thr Phe Gln Phe Phe Lys Lys Gly Gln Lys Val Gly
85 90 95

Glu Phe Ser Gly Ala Asn Lys Glu Lys Leu Glu Ala Thr Ile Asn Glu
100 105 110

Leu Val

<210> 3

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 3
atggtgaagc agatcgagag caagactgct tttcaggaag ccttggacgc tgcaggtgat 60
aaacttgtag tagttgactt ctcagccacg tgggtgtgggc cttgcaaaat gatcaagcct 120

ttctttcatt ccctctctga aaagtattcc aacgtgatat tccttgaagt agatgtggat 180
gactgtcagg atgttgcttc agagtgtgaa gtcaaatgca tgccaacatt ccagtttttt 240
aagaaggacg aaaaggtggg tgaattttct ggagccaata aggaaaagct tgaagccacc 300
attaatgaat tagtctaaag gaagaagcgg agacagcgac gaaga 345

<210> 4
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Thioredoxin-Tat fusion protein

<400> 4
Met Val Lys Gln Ile Glu Ser Lys Thr Ala Phe Gln Glu Ala Leu Asp

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

<210> 5
<211> 372
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 5

aggaagaagc ggagacagcg acgaagaatg gtgaagcaga tcgagagcaa gactgctttt 60

caggaagcct tggacgctgc aggtgataaa cttgtagtag ttgacttctc agccacgtgg 120

tgtgggcctt gcaaaatgat caagcctttc ttccattccc tctctgaaaa gtattccaac 180

gtgatattcc ttgaagtaga tgtggatgac tgcaggatg ttgcttcaga gtgtgaagtc 240

aatgcatgc caacattcca gttttttaag aaggacaaaa aggtgggtga atttcttgga 300

gccaataagg aaaagcttga agccaccatt aatgaattag tctaaaggaa gaagcggaga 360

cagcgacgaa ga 372

<210> 6

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 6

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Met Val Lys Gln Ile Glu Ser

1 5 10 15

Lys Thr Ala Phe Gln Glu Ala Leu Asp Ala Ala Gly Asp Lys Leu Val

20 25 30

Val Val Asp Phe Ser Ala Thr Trp Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Lys

35 40 45

Pro Phe Phe His Ser Leu Ser Glu Lys Tyr Ser Asn Val Ile Phe Leu

50 55 60

Glu Val Asp Val Asp Asp Cys Gln Asp Val Ala Ser Glu Cys Glu Val

65 70 75 80

Lys Cys Met Pro Thr Phe Gln Phe Phe Lys Lys Gly Gln Lys Val Gly

85 90 95

Glu Phe Ser Gly Ala Asn Lys Glu Lys Leu Glu Ala Thr Ile Asn Glu

100 105 110

Leu Val Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

115 120

<210> 7
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> polynucleotide coding Pep-1-Thioredoxin fusion protein

<400> 7
 aaagaaacct ggtgggaac ctggtggacc gaatggtctc agccgaaaaa aaaacgtaaa 60
 gtgatggtga agcagatcga gagcaagact gcttttcagg aagccttgga cgctgcaggt 120
 gataaacttg tagtagttga cttctcagcc acgtgggtgtg ggccttgcaa aatgatcaag 180
 cttttctttc attcctctc tgaaaagtat tccaacgtga tttccttga agtagatgtg 240
 gatgactgtc aggatgttgc ttcagagtgt gaagtcaaat gcatgccaac attccagttt 300
 tttaagaagg gacaaaaggt gggatgaattt tctggagcca ataaggaaaa gcttgaagcc 360
 accattaatg aattagtcta a 381

<210> 8
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pep-1-Thioredoxin fusion protein
 <400> 8
 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 Met Val Lys Gln Ile Glu Ser Lys Thr Ala Phe
 20 25 30
 Gln Glu Ala Leu Asp Ala Ala Gly Asp Lys Leu Val Val Val Asp Phe
 35 40 45
 Ser Ala Thr Trp Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Lys Pro Phe Phe His
 50 55 60
 Ser Leu Ser Glu Lys Tyr Ser Asn Val Ile Phe Leu Glu Val Asp Val
 65 70 75 80
 Asp Asp Cys Gln Asp Val Ala Ser Glu Cys Glu Val Lys Cys Met Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gln Phe Phe Lys Lys Gly Gln Lys Val Gly Glu Phe Ser Gly

100	105	110	
Ala Asn Lys Glu Lys Leu Glu Ala Thr Ile Asn Glu Leu Val			
115	120	125	
<210>	9		
<211>	381		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	polynucleotide coding Thioredoxin-Pep-1 fusion protein		
<400>	9		
atggtgaagc agatcgagag caagactgct tttcaggaag ccttggacgc tgcaggtgat		60	
aaacttgtag tagttgactt ctcagccacg tgggtgtgggc cttgcaaaat gatcaagcct		120	
ttctttcatt ccctctctga aaagtattcc aacgtgatat tccttgaagt agatgtggat		180	
gactgtcagg atgttgcttc agagtgtgaa gtcaaatgca tgccaacatt ccagtttttt		240	
aagaagggac aaaaggtggg tgaattttct ggagccaata aggaaaagct tgaagccacc		300	
attaatgaat tagtctaaaa agaaacctgg tgggaaacct ggtggaccga atggtctcag		360	
ccgaaaaaaaa aacgtaaagt g		381	
<210>	10		
<211>	126		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Thioredoxin-Pep-1 fusion protein		
<400>	10		
Met Val Lys Gln Ile Glu Ser Lys Thr Ala Phe Gln Glu Ala Leu Asp			
1 5 10 15			
Ala Ala Gly Asp Lys Leu Val Val Val Asp Phe Ser Ala Thr Trp Cys			
20 25 30			
Gly Pro Cys Lys Met Ile Lys Pro Phe Phe His Ser Leu Ser Glu Lys			
35 40 45			
Tyr Ser Asn Val Ile Phe Leu Glu Val Asp Val Asp Asp Cys Gln Asp			
50 55 60			
Val Ala Ser Glu Cys Glu Val Lys Cys Met Pro Thr Phe Gln Phe Phe			
65 70 75 80			

Lys Lys Gly Gln Lys Val Gly Glu Phe Ser Gly Ala Asn Lys Glu Lys
85 90 95

Leu Glu Ala Thr Ile Asn Glu Leu Val Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr

100 105 110
Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

115 120 125

<210> 11

<211> 444

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 11

aaagaaacct ggtgggaaac ctggtggacc gaatggtctc agccgaaaaa aaaacgtaaa 60

gtgatggtga agcagatcga gagcaagact gcttttcagg aagccttgga cgctgcaggt 120

gataaacttg tagtagttga cttctcagcc acgtgggtgtg ggccttgcaa aatgatcaag 180

cctttctttc attccctctc tgaagatgat tccaacgtga tttccttga agtagatgtg 240

gatgactgtc aggatgttgc ttcagagtgt gaagtcaaat gcatgccaac attccagttt 300

tttaagaagg gacaaaaggt gggatgaattt tctggagcca ataaggaaaa gcttgaagcc 360

accattaatg aattagtcta aaaagaaacc tggatgggaaa cctggtggac cgaatggtct 420

cagccgaaaa aaaaacgtaa agtg 444

<210> 12

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 12

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 Met Val Lys Gln Ile Glu Ser Lys Thr Ala Phe

20 25 30

Gln Glu Ala Leu Asp Ala Ala Gly Asp Lys Leu Val Val Val Asp Phe

35 40 45

Ser Ala Thr Trp Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Lys Pro Phe Phe His

50

55

60

Ser Leu Ser Glu Lys Tyr Ser Asn Val Ile Phe Leu Glu Val Asp Val

65

70

75

80

Asp Asp Cys Gln Asp Val Ala Ser Glu Cys Glu Val Lys Cys Met Pro

85

90

95

Thr Phe Gln Phe Phe Lys Lys Gly Gln Lys Val Gly Glu Phe Ser Gly

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

Arg Lys Val

145