



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년12월14일
(11) 등록번호 10-2337998
(24) 등록일자 2021년12월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61K 35/74 (2015.01) A61P 1/14 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/205 (2021.05)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2021-0149529
(22) 출원일자 2021년11월03일
심사청구일자 2021년11월03일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020190030687 A
KR1020180012849 A
KR1020210101637 A
US20190247445 A1

(73) 특허권자
주식회사 바이오뱅크힐링
경기도 성남시 분당구 돌마로 172, 3층 제3중앙실
협실 (정자동, 분당서울대학교병원헬스케어혁신과
크)
(72) 발명자
김정현
서울특별시 중랑구 동일로144길 74, 102동 502호
(중화동, 한영아파트)
강기성
경기도 용인시 수지구 용구대로2771번길 34-10,
102동 203호(죽전동, 빌포유)
임나리
경기도 성남시 분당구 운중로267번길 8-13, 301
호(판교동)
(74) 대리인
특허법인더웨이브

전체 청구항 수 : 총 10 항

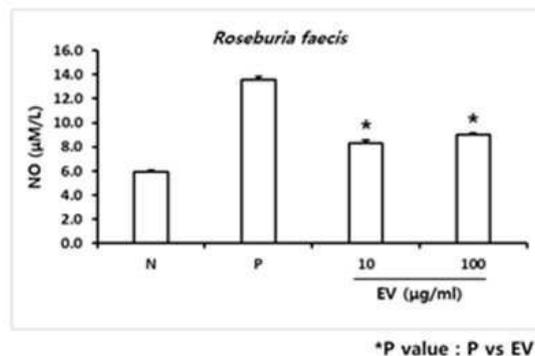
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 로제부리아 파에시스 균주, 및 그의 유래의 소포체 및 그의 항염증 및 항균 용도

(57) 요약

신규한 미생물, 그의 파쇄물, 배양액, 배양액의 추출물, 소포체 및 이들의 항염증 및/또는 항균 용도에 관한 것으로, 일 양상에 따른 신규 균주 및 이의 유래의 소포체에 의하면, 염증 관련 상태, 또는 박테리아 감염의 예방, 개선, 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 35/74 (2013.01)

A61P 1/14 (2018.01)

A61P 31/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/32 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

C12R 2001/01 (2021.05)

명세서

청구범위

청구항 1

수탁번호 KCTC 14582BP로 기탁된, 로제부리아 속(*Roseburia sp.*)에 속하는 로제부리아 파에시스(*Roseburia faecis*) 균주.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 균주는 서열번호 1의 16s rRNA를 포함하는 것인 균주.

청구항 3

청구항 1의 균주 유래의 소포체.

청구항 4

청구항 1의 균주의 파쇄액

청구항 5

청구항 1의 균주의 배양액

청구항 6

청구항 1의 균주, 상기 균주 유래의 소포체, 상기 균주의 파쇄액, 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장 질환(inflammatory bowel diseases, IBD); 과민성 대장증후군(irritable bowel syndrome); 장염(enteritis), 크론병(Crohn's disease); 또는 궤양성 대장염(ulcerative colitis)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

청구항 1의 균주, 상기 균주 유래의 소포체, 상기 균주의 파쇄액, 배양액 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장 질환(inflammatory bowel diseases, IBD); 과민성 대장증후군(irritable bowel syndrome); 장염(enteritis), 크론병(Crohn's disease); 또는 궤양성 대장염(ulcerative colitis)의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 8

청구항 1의 균주, 상기 균주 유래의 소포체, 상기 균주의 파쇄액, 배양액, 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 클로스트리디오이데스 디피실(*Clostridioides difficile*) 억제 또는 염증 억제에 의한 장 건강의 개선용 건강기능식품.

청구항 9

청구항 1의 균주, 상기 균주 유래의 소포체, 상기 균주의 파쇄액, 배양액, 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 클로스트리디오이데스 디피실 감염증(CDI)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

청구항 1의 균주, 상기 균주 유래의 소포체, 상기 균주의 파쇄액, 배양액, 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 클로스트리디오이데스 디피실 감염증(CDI)의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술분야

[0001] 신규한 미생물, 그의 파쇄물, 배양액, 배양액의 추출물, 소포체 및 이들의 항염증 및/또는 항균 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 마이크로바이옴(Microbiome)은 특정 환경에 존재하고 있는 미생물들과 이들의 유전정보 전체를 말하는 것으로, 단일 생명체의 유전정보 전체를 뜻하는 게놈 (Genome) 들의 집합체를 의미한다. 따라서 인체 마이크로바이옴 (Human Microbiome)은 인간 몸체 안팎에 서식하고 있는 미생물들과 그들의 유전정보 전체를 의미한다.

[0003] 인간의 몸은 많은 미생물과 공생관계를 이루며 살아가며 특히 장내에는 미생물이 영양분을 섭취하고 체계적인 군집을 형성하기에 최적의 환경으로 가장 많은 미생물이 존재한다. 장내 미생물은 숙주가 지닌 효소만으로는 생성할 수 없는 영양분을 공급하고 숙주의 대사 및 면역 체계와 깊은 연관을 지니는 한편 과민성대장증후군, 비만, 아토피, 우울증, 류마티스 관절염, 자폐 스펙트럼 장애, 치매 등 다양한 질병의 발생과 관련되어 있다고 보고되고 있다.

[0004] 최근에는 서구적인 식습관과 무분별한 항생제 사용으로 장내 미생물총(Microbiota)의 불균형이 일어나 장 건강이 악화되고 있으며, 장내미생물과 다양한 질병에 대한 연구로 인해 장내 미생물에 대한 중요성이 부각되고 관심이 대두되고 있다.

[0005] 한편 소포체는 세포가 생성하여 배출하는 20 내지 200 nm 정도의 나노사이즈의 물질로, 세포 간 이동이 자유롭다. 또한 소포체는 막지질, 막단백질, DNA나 RNA 등을 포함하고 이러한 유전물질들이 복합체로 작용하여 세포와 세포 사이에 독성 인자를 전달하고 염증과 면역반응 조절 등의 역할을 한다고 알려져 있다. 단세포 생물에서 다세포 생물에 이르기까지 세포 간 정보교환은 생명현상의 필수적인 과정이며, 최근에는 소포체가 세포 간 정보교환의 매개체로 인식되어 있어 소포를 응용하여 약물 운반체로 활용하는 방법들이 개발되고 있다.

[0006] 이에, 인간의 장내 유래 신규 미생물, 및 이의 유래의 소포체를 이용한 질병의 개선, 예방, 또는 치료를 위한 물질의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 10-2018-0012849

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 일 양상은 수탁번호 KCTC 14582BP로 기탁된, 로제부리아 속(*Roseburia sp.*)에 속하는 로제부리아 파에시스 (*Roseburia faecis*) 균주를 제공하는 것이다.

[0009] 다른 양상은 상기 균주 유래의 소포체, 상기 균주의 파쇄액, 또는 배양액을 제공하는 것이다.

[0010] 또 다른 양상은 상기 균주, 상기 균주 유래의 소포체, 상기 균주의 파쇄액, 배양액, 또는 이들의 혼합물을 유효 성분으로 포함하는 염증성 장 질환(inflammatory bowel diseases, IBD); 과민성 대장증후군(irritable bowel syndrome); 장염(enteritis), 크론병(Crohn's disease);또는 궤양성 대장염(ulcerative colitis)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 또 다른 양상은 상기 균주, 상기 균주 유래의 소포체, 상기 균주의 파쇄액, 배양액, 또는 이들의 혼합물을 유효 성분으로 포함하는 염증성 장 질환; 과민성 대장증후군; 장염, 크론병;또는 궤양성 대장염의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0012] 또 다른 양상은 상기 균주, 상기 균주 유래의 소포체, 상기 균주의 파쇄액, 배양액, 또는 이들의 혼합물을 유효 성분으로 포함하는 클로스트리디움 디피실(*Clostridioides difficile*) 억제 또는 염증 억제에 의한 장 건강의 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0013] 또 다른 양상은 상기 균주, 상기 균주 유래의 소포체, 상기 균주의 파쇄액, 배양액, 또는 이들의 혼합물을 유효

성분으로 포함하는 클로스트리디오이데스 디피실 감염증(CDI)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 또 다른 양상은 상기 균주, 상기 균주 유래의 소포체, 상기 균주의 파쇄액, 배양액, 또는 이들의 혼합물을 유효 성분으로 포함하는 클로스트리디오이데스 디피실 감염증의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 일 양상은 로제부리아 속(*Roseburia sp.*)에 속하는 로제부리아 파에시스(*Roseburia faecis*) 균주를 제공한다.

[0016] 상기 로제부리아 파에시스 균주는 수탁번호 KCTC 14582BP로 기탁된 균주일 수 있다.

[0017] 상기 로제부리아 파에시스 균주는 서열번호 1의 16S rRNA를 포함하는 균주일 수 있다.

[0018] 상기 균주는 항염증 및/또는 항균 활성을 갖는 것일 수 있다.

[0019] 상기 균주는 염증 유발된 세포에서 산화 질소의 생성을 억제하거나, 염증성 사이토카인(예를 들면, TNF- α 또는 IL-6)의 발현을 억제하거나, 박테리아의 증식(예를 들면, *C.difficile*)을 억제하는 것일 수 있다. 또한, 상기 균주는 *C.difficile*에 의해 유도된 염증 인자, 예를 들면, 전염증성 사이토카인(예를 들면, TNF, 또는 CCL2)를 감소시키거나, 항염증성 사이토카인(예를 들면, IL-10)을 증가시키는 것일 수 있다.

[0021] 다른 양상은 상기 로제부리아 속(*Roseburia sp.*)에 속하는 로제부리아 파에시스(*Roseburia faecis*) 균주 유래의 소포체, 상기 균주의 파쇄물, 배양액, 배양액의 추출물, 또는 이들의 혼합물을 제공한다.

[0022] 상기 균주에 대해서는 상기한 바와 같다.

[0023] 본 명세서에서 용어 "소포체(vesicle)"는 세포에서 분비되어 세포 외 공간으로 방출된 입자를 의미하는 것으로서, 엑소솜(exosome), 액토솜(ectosome), 마이크로소낭(microvesicle), 마이크로입자(microparticle), 엑소솜 유사 소포체 (exosome like vesicle) 등의 다수의 상이한 종을 포함할 수 있다. 세포막 소포체는 분비하는 기원 세포(공여 세포)의 상태를 반영할 수 있으며, 어떤 세포에서 분비되었는가에 따라 다양한 생물학적 활성을 나타내고, 세포들 사이에 유전 물질과 단백질을 옮기면서 세포 간 상호작용에 중요한 역할을 할 수 있다. 또한, 상기 소포체를 포함하는 세포 유래 물질들은 질병을 일으키거나 또는 면역세포를 자극하여 질병에 대항하게 하며, 미생물의 대사과정을 통해 사람이 소화시키지 못하는 물질들을 분해하여 흡수할 수 있도록 도와주는 효과가 있다. 상기 소포체는 막 구조 소포체로 내부와 외부가 구분되며, 세포의 세포막 지질(plasma membrane lipid)과 세포막 단백질(plasma membrane protein), 핵산(nucleic acid), 및 세포질 성분 등을 가지고 있고, 원래 세포 보다 크기가 작은 것일 수 있다.

[0024] 일 구체예에 있어서, 상기 소포체는 로제부리아 파에시스 균주의 배양액의 세포 파쇄물로부터 분리된 것일 수 있다.

[0025] 일 구체예에 있어서, 상기 세포 외 소포체는 10 nm 내지 400 nm의 직경을 갖는 것일 수 있다. 예를 들어, 10 nm 내지 400 nm, 10 nm 내지 350 nm, 10 nm 내지 300 nm, 10 nm 내지 250 nm 일 수 있다.

[0026] 본 명세서에서 용어"배양액"은 "배양 상층액", "조건 배양액" 또는 "조정 배지"와 호환적으로 사용될 수 있고, 로제부리아 파에시스가 시험관 내에서 성장 및 생존할 수 있도록 영양분을 공급할 수 있는 배지에 상기 균주를 일정기간 배양하여 얻는 상기 균주, 이의 대사물, 여분의 영양분 등을 포함하는 전체 배지를 의미할 수 있다. 또한, 상기 배양액은 균주를 배양하여 얻은 균체 배양액에서 균체를 제거한 배양액을 의미할 수 있다. 한편, 상기 배양액 중 균체를 제거한 액체를 "상등액"이라고도 하며, 배양액을 일정시간 가만히 두어 하층에 가라앉은 부분을 제외한 상층의 액체만을 취하거나, 여과를 통해 균체를 제거하거나, 배양액을 원심분리하여 하부의 침전을 제거하고 상부의 액체만을 취하여 획득할 수 있다. 상기 "균체"는 본 발명의 균주 자체를 의미하는 것으로 피부 샘플 등으로부터 분리하여 선별한 균주 자체 또는 상기 균주를 배양하여 배양액으로부터 분리한 균주를 포함한다. 상기 균체는 배양액을 원심분리하여 하층에 가라앉은 부분을 취하여 획득할 수 있고, 또는 중력에 의해 배양액의 하층으로 가라앉으므로 일정 시간 동안 가만히 두었다가 상부의 액체를 제거함으로써 획득할 수 있다.

[0027] 상기 배양액은 균주를 배양하여 수득된 배양액 자체, 그의 농축물, 또는 동결건조물 또는 배양액로부터 균주를 제거하여 수득된 배양 상층액, 그의 농축물 또는 동결건조물을 포함할 수 있다.

[0028] 상기 배양액은 로제부리아 파에시스를 적절한 배지(예를 들면, R2A 배지 또는 TSA 배지) 에서 10 ℃초과 또는

40 ℃미만 중 어느 온도에서 일정 시간, 예를 들면, 4 내지 50시간 동안 배양하여 수득된 것일 수 있다.

- [0029] 일 구체예에서, 균주의 배양 상층액은 균주 배양액을 원심분리나 여과시켜 균주를 제거하는 단계에 의해 수득될 수 있다.
- [0030] 다른 구체예에서, 농축물은 상기 균주 배양액 자체, 또는 상기 배양액을 원심분리나 필터를 이용하여 여과한 후 수득된 상층액을 농축하는 단계에 의해 수득될 수 있다.
- [0031] 상기 로제부리아 파에시스를 배양하기 위한 배양용 배지 및 배양 조건은 통상의 지식을 가진 자가 적절하게 선택하거나 변형하여 이용할 수 있다.
- [0032] 본 명세서에서 용어 "파쇄액"은 균주 자체를 화학적 또는 물리적 힘에 의하여 균주의 세포벽을 파쇄하여 얻은 산물을 의미할 수 있다.
- [0033] 본 명세서에서 용어 "배양액 추출물"은 상기 배양액 또는 그의 농축액로부터 추출한 것을 의미하며, 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 이들 조정제물 또는 정제물, 이를 분획한 분획물을 포함할 수 있다.
- [0035] 또 다른 양상은 로제부리아 파에시스 균주, 상기 균주 유래의 세포체, 상기 균주의 파쇄액, 배양액, 또는 배양액의 추출물의 질병 개선, 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [0036] 본 명세서에서 용어 "치료 (treat)"는 자연 치유에 비하여 단축된 시간에 염증 또는 박테리아 감염증 등이 치유되는 것을 의미할 수 있다. 상기 치료는 염증 또는 박테리아 감염증의 개선 및/또는 완화를 포함할 수 있다. 또한, 상기 치료는 염증 또는 박테리아 감염증으로부터 유발되는 증상의 치유 및/또는 회복을 의미할 수 있다.
- [0037] 본 명세서에서 용어 "예방(prevention)"은 질환, 장애, 또는 그의 부수적 증상의 발병 또는 재발을 부분적으로 또는 완전히 지연시키거나 방지하거나, 질환 또는 장애의 획득 또는 재획득을 막거나, 질환 또는 장애의 획득의 위험을 감소시키는 방법을 말한다. 예를 들어, 상기 예방은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 염증 또는 박테리아 감염증의 발생을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.
- [0038] 상기 균주의 용도는 염증성 질환의 예방, 개선, 또는 치료(항 염증 활성), 박테리아 감염증의 예방, 개선, 또는 치료(항균 활성), 또는 장 건강의 예방 또는 개선을 포함할 수 있다.
- [0039] 상기 염증성 질환은 소화기계(위장관 등)의 염증, 안 내 염증, 구강 내 염증, 폐를 포함하는 호흡계의 염증, 피부의 염증, 심장혈관계 내 염증, 뇌의 염증, 귀 내 염증 등을 포함할 수 있다.
- [0040] 더욱 상세하게는 상기 염증성 질환은 염증성 장 질환(inflammatory bowel diseases, IBD); 과민성 대장증후군(irritable bowel syndrome); 베체트 병(Behcet's disease); 장염(enteritis), 크론병(Crohn's disease); 궤양성 대장염(ulcerative colitis); 혈관염(vasculitis); 점막염(mucositis); 구내염(stomatitis); 임플란트 주위염(peri-implantitis); 치주염(periodontitis); 치수염(pulpitis); 치은염(gingivitis); 폐렴; 피부염(dermatitis); 아토피 피부염(atopic dermatitis); 접촉성 피부염(contact dermatitis); CREST 증후군; 포진성 피부염(dermatitis herpetiformis); 피부근염(dermatomyositis); 전신성 공피증(systemic scleroderma); 결절성 홍반(erythema nodosum); 헤노흐-쇤라인 자반병(Henoch-Schonlein purpura); 화농성 한선염(Hidradenitis suppurativa); 편평태선(Lichen planus); 마지드 증후군(Majeed syndrome); 슈니츨러 증후군(Schnitzler syndrome); 건선(psoriasis); 습진(eczema); 여드름(acne); 구강염(mouth ulcers); 포도막염(uveitis); 인두염(pharyngitis); 편도염(tonsillitis); 중이염을 포함하는 이염(otitis); 관절염(psoriatic arthritis); 활액막염(synovitis); 수막염(meningitis); 뇌염(encephalitis); 비커스토프 뇌염(Bickerstaff's encephalitis) 뇌척수염(encephalomyelitis); 척추염(spondylitis); 골수염(osteomyelitis); 길리안 바레 증후군(Guillain-barre syndrome); 척수염(myelitis); 시속신경수염(neuromyelitis optica); 방광염(cystitis); 감염 또는 상처 부위에 급성 염증; 신염(nephritis); 및 사구체신염(glomerulonephritis)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것일 수 있다.
- [0041] 또한, 상기 장 건강의 개선은 장내 유익증식 및 유해균 억제에의 도움, 면역을 조절하여 장 건강에의 도움, 또는 배변활동 원활에의 도움인 것일 수 있다.
- [0042] 용어 "항균제"는 본원에서 사용될 때, (i) 박테리아의 성장을 억제, 감소 또는 방지하거나; (ii) 박테리아가 대사에서 감염을 발생시키는 능력을 억제 또는 감소시키거나; 또는 (iii) 박테리아가 환경에서 증식하거나 감염성을 유지하는 능력을 억제 또는 감소시키는 것이 가능한 물질을 가리킨다.

- [0043] 상기 박테리아 감염증의 예시는 그람 양성균 또는 그람 음성균에 의한 감염증을 포함할 수 있다. 상세하게는, 상기 박테리아 감염증은 클로스트리디오이데스(*Clostridioides*), 헬리코박터(*Helicobacter*), 에스케리키아(*Escherichia*), 살모넬라(*Salmonella*), 스태필로코커스(*Staphylococcus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 헤모필루스(*Haemophilus*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 모락셀라(*Moraxella*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 프로테우스(*Proteus*), 세라티아(*Serratia*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 아시네토박터(*Acinetobacter*), 시트로박터(*Citrobacter*), 스테노프로포모나스(*Stenotrophomonas*), 박테로이드(*Bacteroides*), 프레보텔라(*Prevotella*), 푸소박테리움(*Fusobacterium*) 속에 속하는 박테리아에 의한 감염증을 포함할 수 있다. 더욱 상세하게는 상기 박테리아 감염증은 클로스트리디오이데스 디피실 감염증(CDI), 또는 클로스트리디오이데스 디피실 관련 질환(CDAD: *Clostridioides difficile* associated disease), 예를 들면, 클로스트리디오이데스 디피실 관련 설사(*Clostridioides difficile* associated diarrhea)를 포함할 수 있다.
- [0044] 상기 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 0.00001 중량% 내지 80 중량%, 예를 들면, 0.00001 중량% 내지 60 중량%, 0.00001 중량% 내지 40 중량%, 0.00001 중량% 내지 30 중량%, 0.00001 중량% 내지 20 중량%, 0.00001 중량% 내지 10 중량%, 0.00001 중량% 내지 5 중량%, 0.05 중량% 내지 60 중량%, 0.05 중량% 내지 40 중량%, 0.05 중량% 내지 30 중량%, 0.05 중량% 내지 20 중량%, 0.05 중량% 내지 10 중량%, 0.05 중량% 내지 5 중량%, 0.1 중량% 내지 60 중량%, 0.1 중량% 내지 40 중량%, 0.1 중량% 내지 30 중량%, 0.1 중량% 내지 20 중량%, 0.1 중량% 내지 10 중량%, 또는 0.1 중량% 내지 5 중량%의 균주, 이의 파쇄액, 배양액, 또는 이의 배양액의 추출물을 포함할 수 있다.
- [0045] 용어, "유효성분으로 포함"은 상기에서 언급한 효과를 나타낼 수 있는 정도로 본 명세서의 균주, 상기 균주 유래의 세포체, 상기 균주의 파쇄액, 배양액, 또는 이의 배양액의 추출물이 첨가되는 것을 의미하고, 약물전달 및 안정화 등을 위하여 다양한 성분을 부성분으로 첨가하여 다양한 형태로 포물레이션 (formulation)되는 것을 포함하는 의미이다.
- [0047] 다른 구체예에 있어서, 상기 조성물은 약학적 조성물일 수 있다.
- [0048] 상기 활성 성분을 개체 내로 전달할 수 있는 약학적 활성 성분의 종류는 항암제, 조영제(염료), 호르몬제, 항호르몬제, 비타민제, 칼슘제, 무기질 제제, 당류제, 유기산 제제, 단백질 아미노산 제제, 해독제, 효소 제제, 대사성 제제, 당뇨 병용제, 조직 부활 용약, 클로로필 제제, 색소제제, 종양 용약, 종양 치료제, 방사성 의약품, 조직 세포 진단제, 조직 세포 치료제, 항생 물질 제제, 항바이러스제, 복합항생물질제제, 화학요법제, 백신, 독소, 특소이드, 항독소, 랩토스피라혈청, 혈액 제제, 생물학적 제제, 진통제, 면역원성 분자, 항히스타민제, 알레르기 용약, 비특이성 면역원 제제, 마취제, 각성제, 정신 신경 용제, 저분자 화합물, 핵산, 엡타머, 안티센스 핵산, 올리고뉴클레오타이드, 펩타이드, siRNA 및 마이크로 RNA 등을 포함할 수 있다.
- [0049] 상기 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 희석제 또는 담체를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 희석제는 유당, 옥수수 전분, 대두유, 미정질 셀룰로오스, 또는 만니톨, 활택제로는 스테아린산 마그네슘, 탈크, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 담체는 부형제, 봉해제, 결합제, 활택제, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 부형제는 미결정 셀룰로오스, 유당, 저치환도 히드록시셀룰로오스, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 봉해제는 카복시메틸셀룰로오스 칼슘, 전분글리콜산 나트륨, 무수인산일수소 칼슘, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 결합제는 폴리비닐피롤리돈, 저치환도 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 활택제는 스테아린산 마그네슘, 이산화규소, 탈크, 또는 그 조합일 수 있다.
- [0050] 상기 약학 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(Witepsol), 마크로글, 트윈(Tween) 61, 카카오지, 리우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0051] 상기 약학 조성물은 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 텍스트란과 같은 탄수화물, 아스코르브산(Ascorbic acid) 또는 글루타치온(Glutathione)과 같은 항산화제(Antioxidants), 킬레이트화제(Chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(Stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.
- [0052] 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여 제형으로 제형화될 수 있다. 경구 투여 제형은 과립제, 산제, 액제, 정제, 캡셀제, 건조시럽제, 또는 그 조합일 수 있다. 비경구 투여 제형은 주사제일 수 있다.

- [0054] 상기 조성물은 건강기능식품 조성물일 수 있다.
- [0055] 상기 건강기능식품 조성물은 상기 균주 또는 이의 배양액 단독 또는 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 명세서의 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 건강기능식품의 종류 중 음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스, 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 건강식품 조성물은 또한 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제, 또는 그 조합을 함유할 수 있다. 상기 건강기능식품 조성물은 또한, 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육, 또는 그 조합을 함유할 수 있다.
- [0057] 상기 조성물은 화장료 조성물일 수 있다.
- [0058] 상기 화장료 조성물은 예를 들면, 유연화장수, 영양화장수, 마사지크림, 영양크림, 에센스, 팩, 젤, 앰플 또는 피부 점착 타입의 화장료 제형을 갖는 것일 수 있다.
- [0059] 상기 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서 상기 조성물 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함할 수 있다.
- [0061] 또한, 상기 조성물은 피부외용제용 조성물일 수 있다.
- [0062] 본 명세서에서, 상기 피부외용제는 크림, 젤, 연고, 피부 유화제, 피부 현탁액, 경피전달성 패치, 약물 함유 붕대, 로션, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 피부외용제는 통상 화장품이나 의약품 등의 피부외용제에 사용되는 성분, 예를 들면 수성성분, 유성성분, 분말성분, 알코올류, 보습제, 증점제, 자외선흡수제, 미백제, 방부제, 산화방지제, 계면활성제, 향료, 색제, 각종 피부 영양제, 또는 이들의 조합과 필요에 따라서 적절하게 배합될 수 있다. 상기 피부외용제는, 에데트산이나트륨, 에데트산삼나트륨, 시트르산나트륨, 폴리인산나트륨, 메타인산나트륨, 글루콘산 등의 금속붕쇄제, 카페인, 탄닌, 벨라파밀, 감초추출물, 글라블리딘, 칼린의 과실의 열수추출물, 각종생약, 아세트산토코페롤, 글리틸리틴산, 트라넥삼산 및 그 유도체 또는 그 염등의 약제, 비타민 C, 아스코르브산인산마그네슘, 아스코르브산글루코시드, 알부틴, 코지산, 글루코스, 프룩토스, 트레할로스 등의 당류등도 적절하게 배합할 수 있다.
- [0064] 또한, 다른 양상은 유효한 양의 상기한 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 처리 또는 투여하는 단계를 포함하는 개체의 상태를 예방, 개선, 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0065] 상기 개체의 상태는 염증과 관련된 상태, 또는 박테리아 감염과 관련된 상태일 수 있다.
- [0066] 투여는 당업계에 알려진 방법에 의하여 투여될 수 있다. 투여는 예를 들면, 정맥내, 근육내, 경구, 경피 (transdermal), 점막, 코안 (intranasal), 기관내 (intratracheal) 또는 피하 투여와 같은 경로로, 임의의 수단에 의하여 개체로 직접적으로 투여될 수 있다. 상기 투여는 전신적으로 또는 국부적으로 투여될 수 있다.
- [0067] 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 사람, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소, 또는 고양이일 수 있다. 상기 개체는 염증과 관련된 상태, 또는 박테리아 감염과 관련된 상태의 개선 효과를 필요로 하는 개체일 수 있다.
- [0068] 상기 투여는 일 구체예에 따른 조성물을 개체당 일당 0.00001 mg 내지 1,000 mg, 예를 들면, 0.00001 mg 내지 500 mg, 0.00001 mg 내지 100 mg, 0.00001 mg 내지 50 mg, 0.00001 mg 내지 25 mg, 1 mg 내지 1,000 mg, 1 mg 내지 500 mg, 1 mg 내지 100 mg, 1 mg 내지 50 mg, 1 mg 내지 25 mg, 5mg 내지 1,000 mg, 5 mg 내지 500 mg, 5 mg 내지 100 mg, 5 mg 내지 50 mg, 5 mg 내지 25 mg, 10mg 내지 1,000 mg, 10 mg 내지 500 mg, 10 mg 내지 100 mg, 10 mg 내지 50 mg, 또는 10 mg 내지 25 mg을 투여하는 것일 수 있다. 다만, 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있고, 당업자라면 이러한 요인들을 고려하여 투여량을 적절히 조절할 수 있다. 투여 횟수는 1일 1회 또는 임상적으로 용인 가능한 부작용의 범위 내에서 2회 이상이 가능하고, 투여 부위에 대해서도 1개소 또는 2개소 이상에 투여할 수 있으며, 매일 또는 2 내지 5일 간격으로 총 투여 일수는 한번 치료

시 1일에서 30일까지 투여될 수 있다. 필요한 경우, 적정 시기 이후에 동일한 치료를 반복할 수 있다. 인간 이외의 동물에 대해서도, kg당 인간과 동일한 투여량으로 하거나, 또는 예를 들면 목적의 동물과 인간과의 기관(심장 등)의 용적비(예를 들면, 평균값) 등으로 상기의 투여량을 환산한 양을 투여할 수 있다.

발명의 효과

[0069] 일 양상에 따른 신규 균주 및 이의 유래의 소포체에 의하면, 염증 관련 상태, 또는 박테리아 감염의 예방, 개선, 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0070] 도 1은 일 구체예에 따른 균주의 소포체의 세포 처리에 따른 산화질소의 생성량을 나타낸 그래프이다; N: 음성 대조군, P: 무처리 대조군, EV: 실시예 2의 소포체.

도 2는 일 구체예에 따른 균주의 소포체의 세포 처리에 전염증성 사이토카인(TNF, IL-6 및 CCL2) 및 항염증성 사이토카인(IL-10)의 단백질 발현양을 나타낸 그래프이다; N: 음성 대조군, P: 무처리 대조군, EV: 실시예 2의 소포체.

도 3은 일 구체예에 따른 균주의 소포체의 세포 독성 결과를 나타낸 그래프이다; N: 음성 대조군, P: 무처리 대조군, EV: 실시예 2의 소포체.

도 4는 일 구체예에 따른 균주의 소포체와 클로스트리디오이데스 디피실의 소포체를 함께 처리한 경우의 세포독성 결과를 나타낸 그래프이다; CdEV: 클로스트리디오이데스 디피실 소포체, BBH024: 실시예 1 균주의 소포체, Type strain: 로제부리아 파에시스 표준 균주의 소포체.

도 5는 일 구체예에 따른 균주의 소포체의 클로스트리디오이데스 디피실에 의해 유도된 염증의 감소 활성을 나타낸 그래프이다; CdEV: 클로스트리디오이데스 디피실 소포체, BBH024: 실시예 1 균주의 소포체, Type strain: 로제부리아 파에시스 표준 균주의 소포체.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0071] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0073] **실시예 1. 균주의 분리 및 동정**

[0074] 건강한 사람의 분변으로부터 균주를 분리 및 동정하기 위해 다음과 같이 수행하였다.

[0075] 먼저, 건강한 사람에게서 수집한 분변 1g과 1 x PBS(Phosphate buffer saline) 10 ml을 혼합 후 Vortexing 하여 분변을 현탁하였다. 그런 뒤 소화되지 않은 음식 및 작은 입자 물질 등을 제거하기 위하여 Cell strainer로 여과하였다. 여과된 분변 현탁액을 연속희석(Serial dilution)하여 FAB(Fastidious Anaerobe Broth) + 5% Sheep blood medium Plate 에 10^{-6} ~ 10^{-8} 으로 Spreading하였고 37℃에 3일 이상 배양 후 균을 선별하였다. 배양이 완료된 집락에 대해 PCR 증폭을 수행하였고, 분리 배양된 미생물 집락 중 결정된 16S rRNA부위의 염기서열을 미국 국립생물정보센터(NCBI, National Center for Biotechnology Information) 홈페이지에서 제공되는 BLAST 프로그램으로 등록된 다른 균주들과 비교 분석하였다. 비교 분석 결과 상동성 99%의 *Roseburia faecis* BBH 024을 분리하였다. 선별된 *Roseburia faecis* BBH 024 균주를 2021년 05월 25일자로 한국생물자원센터에 기탁하여 수탁번호 KCTC14582BP를 부여받았고, *Roseburia faecis* BBH 024 균주는 서열번호 1(complementary DNA)의 16S rRNA 서열을 갖는다.

[0077] **실시예 2. 소포체의 분리**

[0078] 상기 실시예에서 분리된 균주의 소포체를 분리하였다.

[0079] 구체적으로, 소포체를 제조하기 위해, 상기 분리된 균주를 PYG broth(DSMZ 104)에서 37℃, 혐기 조건에서 2일간 배양하였다. 이후에 배양액을 5000 x g으로 20분 동안 원심분리하여 균의 잔해를 제거하였다. 이후에, 0.45 μm 필터로 여과한 뒤 다시 0.22 μm 필터로 여과하고 필터(Sartorius, Cassete Sartocoon Slice Hydrosart filter)를 이용한 UF 시스템(Ultrafiltration system, CNS)을 사용하여 30 kda 이상의 물질을 농축하였고 상기 분리된 균주의 소포체를 분리하였다.

[0081] **실험예 1. 항염증 활성 분석**

[0082] 상기 실시예 2.에서 분리된 균주의 소포체의 항염증 활성을 분석하였다.

[0083] 먼저, 항염증 활성을 평가하기 위해, 산화 질소(NO) 생성량 감소를 측정하였다. 마우스 대식세포 Raw264.7 세포를 10% 소태아혈청 (FBS: fetal bovine serum), 1% 항생제 (100 U/mL 페니실린 및 100 µg/mL 스트렙토마이신)를 포함하는 DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium)으로 5% CO₂ 존재 하에서 37°C로 배양하였다. 이후에, 상기 Raw 264.7 세포를 48웰 플레이트에 5X10⁴ 세포/웰의 농도로 300 µL씩 분주하고, CO₂ 배양기에서 37°C 및 24 시간 동안 배양하였다. 웰 상층액을 버리고 염증 유발을 위해 lipopolysaccharide(LPS) 10 µg/ml가 첨가된 배지를 분주한 후 4 시간 동안 추가 배양하였다. LPS가 들어있는 상층액을 버리고 상기 소포체를 10 또는 100 µg/ml의 농도로 배지에 첨가하여 처리한 다음 37°C에서 16시간 배양하였다. 이후에, 웰 상층액 중 50 µL와 Griess 시약 50 µL를 섞어서 실온에서 10분간 반응시킨 후 플레이트 리더기로 540 nm에서 흡광도 측정하여 산화 질소의 생성량을 측정하였고, 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0084] 도 1은 일 구체예에 따른 균주의 소포체의 세포 처리에 따른 산화질소의 생성량을 나타낸 그래프이다; N: 음성 대조군, P: 무처리 대조군, EV: 실시예 2의 소포체.

[0085] 도 1에 나타낸 바와 같이, 일 구체예에 따른 균주의 소포체는 염증 유발된 세포의 NO 생성량을 무처리 대조군 대비 현저하게 감소시킨 것을 알 수 있었다.

[0086] 다음으로, 상기 균주의 소포체의 전염증성 사이토카인 억제 활성 및 항염증성 사이토카인 촉진 활성을 측정하였다. 구체적으로, 상기와 동일한 방법으로 LPS 처리된 Raw264.7 세포에 상기 소포체를 10 또는 100 µg/ml의 농도로 처리한 다음 37°C에서 16시간 배양하였다. 이후에, 상기 세포의 전염증성 사이토카인인 TNF, IL-6 및 CCL2의 단백질 발현 및 항염증성 사이토카인인 IL-10의 단백질 발현을 ELISA kit (BD bioscience, 미국)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, 그 결과를 각각 도 2에 나타내었다.

[0087] 도 2는 일 구체예에 따른 균주의 소포체의 세포 처리에 전염증성 사이토카인(TNF, IL-6 및 CCL2) 및 항염증성 사이토카인(IL-10)의 단백질 발현양을 나타낸 그래프이다; N: 음성 대조군, P: 무처리 대조군, EV: 실시예 2의 소포체.

[0088] 도 2에 나타낸 바와 같이, 일 구체예에 따른 균주의 소포체는 전염증성 사이토카인을 무처리 대조군 대비 현저하게 감소시키고, 항염증성 사이토카인을 무처리 대조군 대비 현저하게 증가시킴을 알 수 있었다.

[0089] 이상의 결과는 일 구체예에 따른 균주가 염증성 질환, 특히 염증성 장질환 또는 과민성대장증후군의 예방, 개선, 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 의미한다.

[0091] **실험예 2. 세포 독성 실험**

[0092] 상기 실시예 2.에서 분리된 균주의 소포체의 세포 독성 실험을 위해 Cell Counting Kit-8(CCK-8, Abbkine, 중국)을 이용하였다.

[0093] 구체적으로, Raw264.7 세포를 48웰 플레이트에 5X10⁴ 세포/웰의 농도로 300 µL씩 분주하고, CO₂ 배양기에서 37°C 및 24 시간 동안 배양하였다. 웰 상층액을 버리고 염증 유발을 위해 lipopolysaccharide(LPS) 10 µg/ml가 첨가된 배지를 분주한 후 4 시간 동안 추가 배양하였다. LPS가 들어있는 상층액을 버리고 상기 소포체를 10 또는 100 µg/ml의 농도로 배지에 첨가하여 처리한 다음 37°C에서 16시간 배양하였다. 이후에, 상층액을 제거하고 CCK-8 용액이 10% 포함된 배지를 각 웰에 300 µL씩 처리하고 4시간 동안 반응시켰다. 4시간 후, 살아있는 세포의 미토콘드리아에 존재하는 숙신산 탈수소효소 (succinate dehydrogenase)에 의하여 생성된 수용성 포르마잔 (formazan)의 농도를 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 측정하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0094] 도 3은 일 구체예에 따른 균주의 소포체의 세포 독성 결과를 나타낸 그래프이다; N: 음성 대조군, P: 무처리 대조군, EV: 실시예 2의 소포체.

[0095] 도 3에 나타낸 바와 같이, 일 구체예에 따른 균주의 소포체는 10 또는 100 µg/ml의 농도에서 세포 독성이 관찰되지 않음을 알 수 있었다.

[0097] **실험예 3. 클로스트리디옌테스 디피실에 의해 유도된 염증의 감소 활성 분석**

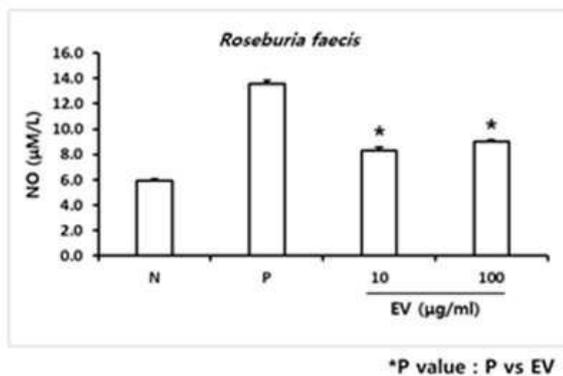
- [0098] 상기 실시예 1에서 분리된 균주의 소포체의 클로스트리디오이데스 디피실에 의해 유도된 전염증성 사이토카인의 감소 효과를 확인하였다.
- [0099] 먼저, 상기 실험에 1과 동일한 방법으로 마우스 대식세포 Raw264.7 세포에 클로스트리디오이데스 디피실의 소포체(CdEV)를 100 gu/ml의 양으로 처리한 다음 37℃의 조건에서 4시간 동안 배양하였다. 이후에, 로제부리아 파에시스 표준 균주(KCTC15739)와 실시예 1의 균주의 소포체를 10 μg/ml 또는 100 μg/ml의 양으로 처리한 후, 37℃의 조건에서 16시간 동안 배양하였고, 세포 생존율을 상기 실험에 2와 동일한 방법으로 측정하여 그 결과들도 4에 나타내었다.
- [0100] 또한, 상기 세포에서 전염증성 사이토카인인 IL-6 및 CCL2의 상대적 농도를 ELISA kit (BD bioscience, 미국)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, 그 결과들도 5에 나타내었다.
- [0101] 도 4는 일 구체예에 따른 균주의 소포체와 클로스트리디오이데스 디피실의 소포체를 함께 처리한 경우의 세포독성 결과를 나타낸 그래프이다; CdEV: 클로스트리디오이데스 디피실 소포체, BBH024: 실시예 1 균주의 소포체, Type strain: 로제부리아 파에시스 표준 균주의 소포체.
- [0102] 도 5는 일 구체예에 따른 균주의 소포체의 클로스트리디오이데스 디피실에 의해 유도된 염증의 감소 활성을 나타낸 그래프이다; CdEV: 클로스트리디오이데스 디피실 소포체, BBH024: 실시예 1 균주의 소포체, Type strain: 로제부리아 파에시스 표준 균주의 소포체.
- [0103] 도 4에 나타낸 바와 같이, 일 구체예에 따른 균주와 표준 균주의 소포체 모두에서 세포독성은 확인되지 않았다.
- [0104] 또한, 도 5에 나타낸 바와 같이, 일 구체예에 따른 균주의 소포체는 클로스트리디오이데스 디피실의 소포체에 의해 증가한 전염증성 사이토카인 IL-6 및 CCL2의 양을 표준 균주 대비 유의하게 감소시켰음을 알 수 있었다. 특히, 표준 균주는 IL-6 감소 효과를 거의 보이지 않음을 확인하였다.
- [0105] 이러한 결과는 일 구체예에 따른 균주 및/또는 그의 유래의 소포체는 현저한 항염 활성을 가져, 클로스트리디오이데스 디피실 감염증(*Clostridioides difficile* infection, CDI), 또는 그로 인해 나타나는 과민성 대장증후군의 예방, 개선, 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 의미한다.

수탁번호

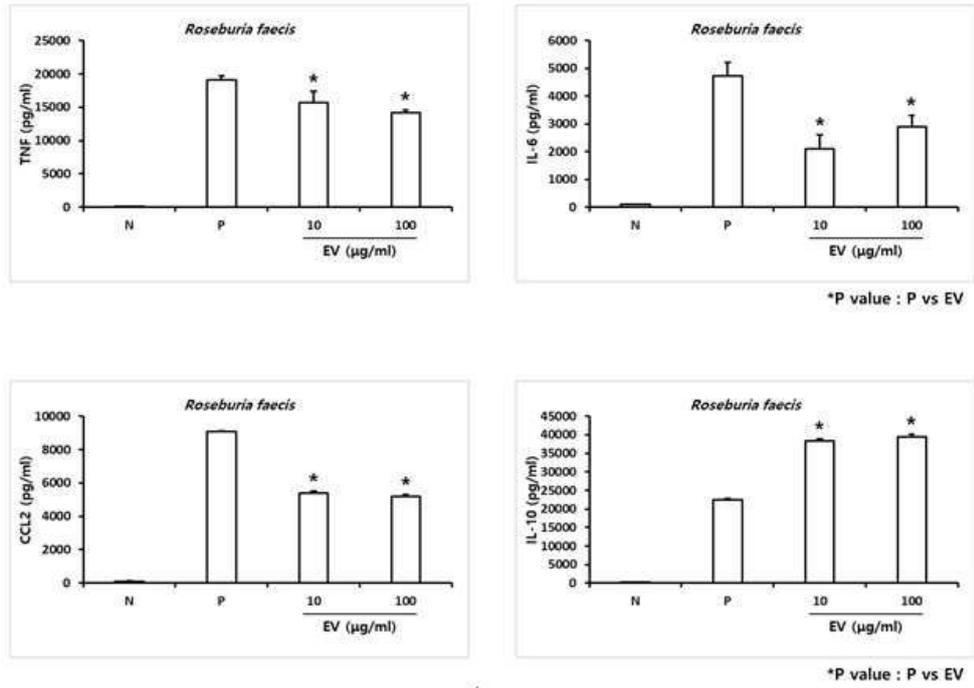
- [0106] 기탁기관명 : 한국생물자원센터(국외)
- 수탁번호 : KCTC14582BP
- 수탁일자 : 20210525

도면

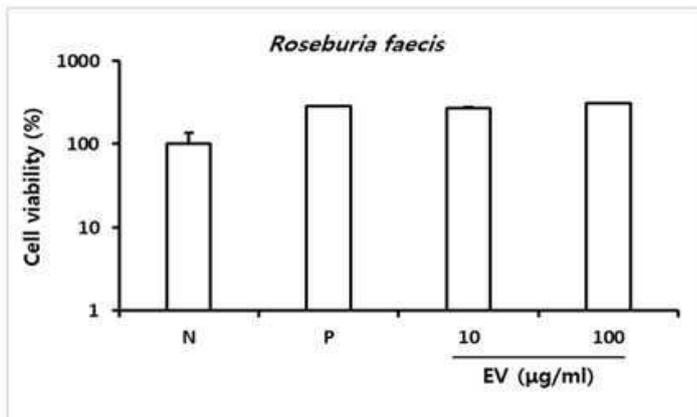
도면1



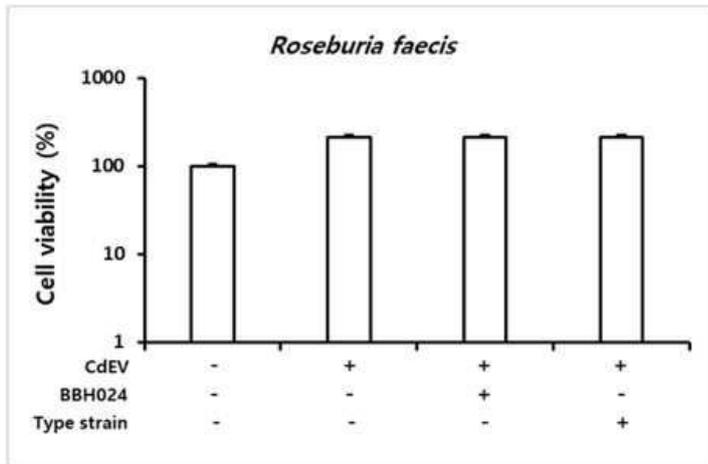
도면2



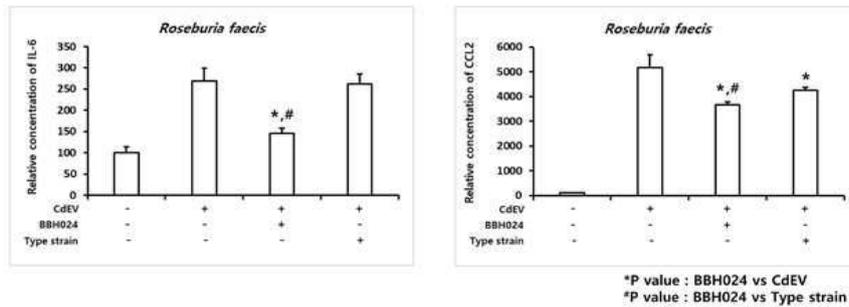
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> BioBankHealing
 - <120> Roseburia faecis strain, and vesicles from thereof and anti-inflammation and anti-bacteria uses of thereof
 - <130> PN210690KR
 - <160> 1
 - <170> KoPatentIn 3.0
 - <210> 1
 - <211> 1466
 - <212> DNA
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> 16S rRNA for Roseburia faecis
 - <400> 1
- tagacttcac cccagttatc gaacctgctc tcggcagctc cctccttgcg gttgggtcac 60
- tgacttcggg catttcaac tcccatggtg tgacgggagg tgtgtacaag acccggaac 120

gtattcaccg cagcattctg atctgcgatt actagcgatt ccagcttcgt gtagtcgggt 180

tgcagactac agtccgaact gagacgttat ttttgagatt tgctcggcct cacggctttg 240

cttccctttg ttiacgcat tgtagcacgt gtgtagccca agtcataagg ggcatgatga 300

tttgactca tccccgctt cctccaggtt atccctggca gtctccctag agtgcccggc 360

cgaaccgctg gctactaagg acaggggttg cgtcgttgc gggacttaac ccaacatctc 420

acgacacgag ctgacgacaa ccatgcacca cctgtcaccg atgctccgaa gagaaagtac 480

attacatacc ctgtcatcgg gatgtcaaga ctgggtaagg ttcttcgctg tgcttcgaat 540

taaaccacat gctccaccgc ttgtcgggtt ccccgtaaat tctttgagt ttcattctgg 600

cgaacgtact ccccagggtg aatacttatt gcgtttgctg cggcaccgaa gagcaatgct 660

ccccgacacc tagtattcat cgtttacgcc gtggactacc agggatatcta atcctgtttg 720

ctccccacgc tttcgagcct cagcgtcagt taccgtccag taagccgctt tcgccactgg 780

tgttcctcct aatatctacg catttcaccg ctacactagg aattccactt acccctccga 840

cactctagta cgacagtttc caatgcagta ccggggttga gccccgggct ttcacatcag 900

acttgccgca ccgctgcgc tccctttaca cccagtaaat ccggataacg cttgcacat 960

acgtattacc gcggctgctg gcacgtattt agccgggtgct tcttagtcag gtaccgtcat 1020

tcttttccc tgetgataga gctttacata ccgaaatact tcttcgctca cgcggcgtcg 1080

ctgcatcagg gtttccccca ttgtgcaata ttccccactg ctgcctcccg taggagtttg 1140

ggccgtgtct cagtccaat gtggccggtc accctctcag gtcggctact gatcgtcgt 1200

ttggtaggcc gttaccctgc caactggcta atcagacgcg ggtccatccc ataccaccgg 1260

agtttttcac accggaccat gcgatcctgt gcgcttatgc ggtattagca gtcgtttcca 1320

actgttatcc cctgtatga ggcaggttac ccacgcgtta ctcaccgctc cgccactcag 1380

tcacaaaatc ttcatttcgg aagaaaatca aatagagtgc ttcgttcgac ttgcatgtgt 1440

taagcacgcc gcccgcttc atccga 1466