(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년09월02일
(11) 등록번호 10-2297619
(24) 등록일자 2021년08월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) *A61K 35/744* (2014.01)
C07K 14/52 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/746 (2013.01)
A61K 35/744 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7004865(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년12월23일
심사청구일자 2020년12월03일
(85) 번역문제출일자 2020년02월19일
(65) 공개번호 10-2020-0020994
(43) 공개일자 2020년02월26일
(62) 원출원 특허 10-2017-7020505
원출원일자(국제) 2015년12월23일
심사청구일자 2017년07월21일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2015/081146
(87) 국제공개번호 WO 2016/102660
국제공개일자 2016년06월30일
(30) 우선권주장
1451658-7 2014년12월23일 스웨덴(SE)
(56) 선행기술조사문헌
WO1997014806 A2
Medical Hypotheses. Vol. 73, No. 5, 페이지 860 (2009.11.)

(73) 특허권자
일리야 팔마 에이비
스웨덴 웁살라 753 26, 스트리트 고란스가탄 23, 에블리나 바게스조 내
(72) 발명자
바게스조, 에블리나
스웨덴 웁살라 753 30 56비 스트리트 올로프스가탄
(74) 대리인
특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 23 항 심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **상처 치유 방법**

(57) 요 약

본 발명은 유산균 세포로 형질전환 시 면역 세포를 표적하는 단백질을 발현할 수 있는 플라스미드에 관한 것으로, 여기에서 상기 단백질은 쥐(murine)와 인간 CXCL12 1α; CXCL17 및 Ym1로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질이다. 추가로, 본 발명은 상기 플라스미드로 형질전환된 유산균 및 인간과 동물에서 상처 치유를 위한 상기 유산균의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류
C07K 14/521 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

CXCL12, CXCL17 및 Ym1로 이루어진 군에서 선택된 상처 치유 단백질을 유산균 내에서 발현할 수 있는 플라스미드로 형질 전환된 유산균으로서,

상기 유산균은 *Lactobacillus reuteri*인 것을 특징으로 하는,

유산균(lactic acid bacteria).

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 플라스미드는,

(i) 서열 번호: 3 또는 2에 기재된 아미노산 서열 또는 상기 서열에 대해 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 쥐(murine) CXCL12-1α;

(ii) 서열 번호: 6 또는 5에 기재된 아미노산 서열 또는 상기 서열에 대해 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 인간 CXCL12-1α;

(iii) 서열 번호: 9 또는 8에 기재된 아미노산 서열 또는 상기 서열에 대해 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 쥐(murine) CXCL17;

(iv) 서열 번호: 12 또는 11에 기재된 아미노산 서열 또는 상기 서열에 대해 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 인간 CXCL17;

(v) 서열 번호: 15 또는 14에 기재된 아미노산 서열 또는 상기 서열에 대해 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 쥐(murine) Ym1; 및

(vi) 서열 번호: 18 또는 17에 기재된 아미노산 서열 또는 상기 서열에 대해 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 인간 Ym1;

에서 선택된 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는,

유산균.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 플라스미드는 유산균에서 발현되게 하는 하나 이상의 조절 서열을 포함하고, 여기에서 상기 조절 서열은 유산균에서 수득되거나 이로부터 유래되는 것을 특징으로 하는,

유산균.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 단백질의 발현은 조절 가능한 것을 특징으로 하는,

유산균.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 플라스미드는 유도성 프로모터의 제어 하에 하나 이상의 상기 단백질을 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는,

유산균.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 플라스미드는 유산균의 니신 레귤론(nisin regulon), 사카신 A(sakacin A) 레귤론 또는 사카신 P(sakacin P) 레귤론 유래 유도성 프로모터 및 조절 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는,

유산균.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 유도성 프로모터는 상기 사카신 P 레귤론 유래 PorfX 프로모터인 것을 특징으로 하는,

유산균.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 플라스미드는 서열 번호: 20의 서열을 갖는 pSIP411로 명명된 플라스미드에서 유래된 것임을 특징으로 하는,

유산균.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 유산균에서의 발현을 위해 코돈 최적화된 것을 특징으로 하는,

유산균.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

상기 플라스미드는 서열 번호: 1, 서열 번호: 4, 서열 번호: 7, 서열 번호: 10, 서열 번호: 13 및 서열 번호: 16의 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열 또는 상기 임의의 서열에 대해 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는,

유산균.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에서 정의된 상기 유산균을 포함하는 상처 드레싱(dressing).

청구항 12

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에서 정의된 상기 유산균을 포함하는 조성물.

청구항 13

인간 또는 동물 개체에서 상처 치유에 사용하기 위한 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에서 정의된 상기 유산균을 포함하는 약학 조성물.

청구항 14

제 13 항에 따라 사용하기 위한 약학 조성물으로서,

상기 유산균은 상처 부위에 직접 투여되는 것을 특징으로 하는,

약학 조성물.

청구항 15

제 13 항에 따라 사용하기 위한 약학 조성물로서,

상기 상처는 점막 상처인 것을 특징으로 하는,

약학 조성물.

청구항 16

키트로서,

(i) 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 정의된 유산균 - 여기에서 상기 플라스미드는 유산균에서 상기 단백질을 발현할 수 있는 유도성 프로모터의 제어 하에 상기 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함함 -; 및

(ii) 상기 프로모터를 위한 유도인자;

를 포함하는 것을 특징으로 하는,

키트.

청구항 17

제 16 항에 있어서,

상처 치유용 키트.

청구항 18

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 상기 유산균을 포함하는, 의료 장치.

청구항 19

제 16 항에 있어서,

상기 유산균은 동결 건조된 것을 특징으로 하는,

키트.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

상기 키트는 상기 동결 건조된 유산균을 재현탁하기 위한 액체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는,

키트.

청구항 21

제 20 항에 있어서,

상기 액체는 상기 유도인자를 포함하는 것을 특징으로 하는,

키트.

청구항 22

제 16 항에 있어서,

상기 키트는 상기 유산균을 포함하는 상처 드레싱을 포함하는 것을 특징으로 하는,

키트.

청구항 23

제 16 항에 있어서,

상기 키트는 상처 드레싱을 더 포함하는 것을 특징으로 하는,

키트.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 일반적으로 재조합 플라스미드, 및 특히 유산균 세포로 형질전환시 면역 세포를 표적하는 재조합 단백질을 발현할 수 있는 플라스미드에 관한 것으로, 상기 단백질은 쥐와 인간의 CXCL12 1α, CXCL17 및 Ym1로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 추가로, 본 발명은 상기 플라스미드로 형질전환된 유산균 및 인간과 동물에서 상처치료를 위한 상기 유산균의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 상처 치유의 과정은 국소 미세환경의 성분이 시간에 따라 변하고 서로 다른 세포 유형이 다른 역할을 하는 중복된 단계 (응고단계, 염증단계 및 증식/재형성 단계)를 갖는다. 치료 과정에서 주요 역할을 하는 세포는 혈소판, 케라티노사이트/상피세포, 섬유아세포/근섬유아세포, 다른 면역세포 및 내피세포이다. 체내 모든 조직은 손상될 수 있고 치료 과정은 장기에 특이적이지만, 손상된 세포에 의해 유도된 초기 신호는 유사하다. 상처 치유의 가장 많은 연구 형태가 피부에 있다.

[0003] 조직 손상은 항상성을 방해하여 응고과정을 개시하고 교감신경계를 활성화시킨다. 혈전을 형성하는 혈소판은 주로 PDGF(혈소판 유래 성장인자) 및 TGF(형질전환 성장인자)로 신호를 방출하여 국소환경을 변화시킨다 (참고문헌 1). 손상되고 스트레스 받은 세포는 호중구 및 단핵구와 같은 면역세포의 모집을 개시하는 경고신호를 방출한다. 상처난 조직 내에서, 면역세포는 다양한 사이토카인, VEGF-A, FGF, 및 EGF (혈관내피성장인자 A, 섬유아세포성장인자, 표피성장인자)와 같은 성장인자, ROS (활성산소종) 및 매트릭스 소화효소를 분비하여, 미세환경을 변화시키고, 치료 과정이, 손상되고 죽은 조직이 대식세포에 의해 제거되는 증식단계로 진입할 수 있도록 한다. 섬유아세포 및 케라티노사이트와 같은 상처 가장자리의 세포는 상처 중심 안쪽으로 이동하여 세포외 기질 및 콜라겐 층으로 상처 표면을 덮는다. 이후 상처 내 섬유아세포는 수축성 α-SMA (α-평활근 액틴)를 발현하는 근섬유아세포로 변환되어 상처가 수축되고 마침내 봉합될 수 있게 한다. 섬유아세포에서 근섬유아세포로의 변환은 미세환경으로부터의 신호에 따라 달라지고, 이중 일부는 면역세포, 주로 대식세포로부터 유래된다. 이 과정에서, 혈관은 새로 형성된 조직인 육아조직으로 성장한다. 인접한 영역으로의 혈류는 보통 이 단계에서 증가되어 면역세포 모집 및 괴사된 부위로 이동을 증가시키고, 이외에도 산소와 영양의 이용가능성을 증가시킨다.

[0004] 상처 봉합 후, 괴사된 부위는 케라티노사이트/상피세포에 의해 재상피화되어 장기 장벽의 완전한 상태가 회복된다. 상처 봉합 후에도, 일부 조직 재형성이 일어나 매트릭스 구조가 정상화되고 관련된 면역세포의 대부분이 죽거나 그 부위를 떠난다. 또한 이 단계에서 죽은 또는 죽어가는 세포는 남아있는 조직 대식세포에 의해 섭취되고 제거 (식균)된다 (참고문헌 1). 신속한 상처 치유는 환자에게 합병증과 불편함을 줄여준다.

[0005] 손상되거나 지연된 피부 또는 점막 상처 치유는 통증, 병원균에 대한 직접적인 노출, 조직 기능의 상실 및 온도와 체액 균형 조절의 상실을 야기하는 전세계적인 임상적 문제이다. 철저하게 조절된 상처 치유 과정이 손상되고 피부 또는 점막 상처가 보통보다 오랜 기간 동안 치료되지 않은 상태로 남아있는 몇 가지 조건이 있으며, 이

는 최악의 경우 만성이 된다.

[0006] 피부, 특히 사지로의 감소된 혈류는 치료 과정의 효율성을 현저하게 감소시킨다. 피부 관류가 감소되거나, PAD (말초동맥질환), 간헐성파행, 정맥 기능부전, 동맥경화성 플라크에 의한 혈관폐색과 같이 맥관구조의 기능이 손상되는 몇 가지 임상적인 증상이 있다. 상처 부위로의 혈류 장애로 인해 산소와 영양소가 부족해지고 조직 재형성을 돕는 세포가 괴사로 죽거나 현장에서 그들의 임무를 수행할 수 없게 한다. 또한, 주변 조직은 충분히 공급되지 않는 경우 기능을 상실하고 궁극적으로 죽기 시작한다. 조직은 재형성 단계 동안 대사적으로 매우 활동적이고 산소 소비가 높다.

[0007] 피부 상처 치유를 악화시키는 또 다른 요인은 고혈당증과 당뇨병이다. 고혈당 상태에서 세포 신호와 면역계 기능은 손상을 받는다. 당뇨병으로 인한 합병증은 미세혈관 변화 및 말초신경세포 손상을 포함한다. 결과적으로, 당뇨병 환자는 보통 당뇨병성 발(diabetic foot)이라고 불리는 발의 만성 상처를 발생시킨다. 오늘날 이들 환자를 위한 가능한 치료법은 전신적 항생체 치료 및 봉합된 상처 드레싱과 함께 외과적인 괴사조직 제거 또는 콜라겐분해효소를 이용하여 죽은 조직을 제거하는 것이다. 성장인자와 생체적합물질을 만성 상처에 적용시킨 실험적인 연구들이 있다 (참고문헌 2)

[0008] C-X-C 모티프 케모카인 12 (CXCL12)로도 알려진 간질세포-유래 인자 1(SDF-1)은 인간에서 CXCL12 유전자에 의해 코딩되는 케모카인 단백질이다. WO 2009/079451는 개체의 상처 치유를 촉진하는데 효과적인 양의 SDF-1을 상처 또는 상처 부근의 영역에 직접 투여하는 것을 포함하는, 개체의 상처 치유를 촉진하는 방법을 개시한다.

[0009] 특정 프로바이오틱스 (락토바실러스 루테리 ATCC PTA 6475)는 치료 과정 동안 식수에 보충되는 경우, 즉, 박테리아가 섭취되는 경우, 상처 치유를 촉진하는 것으로 나타났다 (참고문헌 9). 추가로, 락토바실러스 플란타럼 (*Lactobacillus plantarum*)의 배양으로부터의 상층액은 보통 만성 상처를 감염시키는 녹농균 (*Pseudomonas aeruginosa*)에 의한 생물막 형성을 억제하는 것으로 입증되었다 (참고문헌 10).

[0010] 놀랍게도, 사이토카인과 같은 특이적인 단백질을 발현하도록 변형된 본 발명에 따른 유산균은 상처 치유를 촉진하는데 유용한 것으로 밝혀졌다. 유산균은 사람 피부에 드물게 존재하며 (참고문헌 13) 피부에 어떠한 개입을 위해 사용하는 예상된 선택의 박테리아는 아니다. 락토바실리 (*Lactobacilli*)는 대장균 (*E. coli*) 및 황색포도상구균 (*S. aureus*)과 같이 통상적으로 자주 사용되는 박테리아와 비교하여 상대적으로 느리게 성장하고 특별한 배지와 조건이 필요하기 때문에 함께 작용하기 어렵다. 또한, 락토바실리 (*Lactobacilli*)는 전사, 번역 및 단백질 폴딩을 위한 세포내 수단 (machinery)을 제한한다. 이러한 이유로, 이종 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 특정 박테리아 균주에 적합하도록 최적화되어야 한다.

[0011] 상처 치유의 다른 단계는 치료 과정을 변화시키기 위해 변경될 수 있는 별개의 주요 사건을 포함한다. 치료 과정에서 혈관 재형성은 VEGF-A (혈관내피 성장인자 A) 및 CXCL12 (SDF-1로도 알려짐; SEQ ID NO: 3 및 6)와 같은 다양한 케모카인의 발현을 조절하는 저산소성 유도인자 1α (HIF-1α)의 유도에 따라 크게 달라진다. CXCL12는 조직에서 구성적으로 발현되며 다중 세포 작용을 유도하는 내피세포 및 백혈구에서 발견되는 수용체 CXCR4를 통해 작용한다. 다중 세포 작용을 유도한다 (참고문헌 3). CXCL12는 조직 재형성에 특화된 대식세포에서 높은 수준으로 발견된다 (참고문헌 4). 렌티바이러스 벡터를 이용한 CXCL12의 피부 과발현은 당뇨병 마우스에서 상처 치유를 개선시킨다 (참고문헌 5).

[0012] 최근 발견된 또 다른 케모카인은 CXCL17 (SEQ ID NO: 9 및 12)이며, 이는 CXCL12와 같이 조직 대식세포의 표현형에 유사한 영향을 미친다. CXCL12와 유사하게, CXCL17은 세포 배양에서 측정된 VEGF-A와 함께 공동-조절된다 (참고문헌 6). CXCL17은 주로 점막 조직에서 발견되며 락토바실러스 카제이 (*Lactobacillus casei*)의 생존에 영향을 미치지 않으면서 피부에서도 발견되는 병원성 박테리아에 직접적으로 항균성을 나타내는 것으로 보고된바 있다 (참고문헌 7).

[0013] 관심의 대상이 되는 다른 단백질은 키틴분해효소-유사 단백질인 Ym1 (SEQ ID NO: 15 및 18)이다. 키틴은 박테리아성 생물막의 공통적인 다당류이다. Ym1은 생물막 생성을 방해하고 조직 재형성 및 상처 치유를 위해 중요한 대식세포 기능을 유도하며 혈관세포 또는 상피세포에 의해 흡수되지 않기 때문에 대식세포에 특이적이다 (참고문헌 8).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 결과적으로, 제1 측면에서 본 발명은 유산균에서 (즉, 유산균 세포에 형질전환 시) 단백질을 발현할 수 있는 재조합 플라스미드를 제공하고, 여기서, 상기 단백질은 인간 또는 동물 개체에서 피부 또는 점막 상처 치유와 같은 상처 치유를 개선시키는데 유용하다. 바람직하게는, 상기 단백질은 대식세포 및 이들의 전구체와 같은 면역세포를 표적할 수 있기 때문에 상처 치유에 유용하다. 바람직하게는, 상기 단백질은 사이토카인 또는 케모카인이다. 가장 바람직하게는, 상기 단백질은 쥐(murine) CXCL12, 특히 쥐 CXCL12-1α (SEQ ID NO: 3); 인간 CXCL12, 특히 인간 CXCL12-1α (SEQ ID NO: 6); 쥐 CXCL17 (SEQ ID NO: 9); 인간 CXCL17 (SEQ ID NO: 12); 쥐 Ym1 (SEQ ID NO: 15); 및 인간 Ym1 (SEQ ID NO: 18)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

과제의 해결 수단

[0015] 보다 구체적으로, 본 발명의 제1 측면은 유산균에서 (즉, 유산균 세포로 형질전환 시) 재조합 단백질을 발현할 수 있는 플라스미드를 제공하며, 여기서, 상기 플라스미드는 CXCL12, CXCL17 및 Ym1로부터 선택된 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0016] 보다 구체적으로, 뉴클레오티드 서열은 쥐 CXCL12, 특히 쥐 CXCL12-1α; 인간 CXCL12, 특히 인간 CXCL12-1α; 쥐 CXCL17; 인간 CXCL17; 쥐 Ym1; 또는 인간 Ym1을 코딩할 수 있다.

[0017] 일 실시예에서, 플라스미드는 SEQ ID NO: 3 또는 2에 기재된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 쥐 CXCL12-1α; SEQ ID NO: 6 또는 5에 기재된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 인간 CXCL12-1α; SEQ ID NO: 9 또는 8에 기재된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 쥐 CXCL17; SEQ ID NO: 12 또는 11에 기재된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 인간 CXCL17; SEQ ID NO: 15 또는 14에 기재된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 쥐 Ym1; 및 SEQ ID NO: 18 또는 17, 또는 이와 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열에 기재된 인간 Ym1로부터 선택한 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0018] 보다 구체적으로, 플라스미드는 유산균에서 단백질을 발현시키는데 사용하기 위한 것이고, 따라서 그러한 용도로 제공되거나 개조된다 (예를 들어, 유산균에서 특이적 또는 특정 용도로 고안, 선택, 개조 또는 변형됨). 따라서, 일 실시예에서, 플라스미드는 일반적으로 박테리아 또는 미생물에 비해 유산균에서 특이적 발현을 위한 것이다. 플라스미드는 예를 들어, 유산균에서 발현을 위해 선택 또는 변형된 코딩 서열 및/또는 이의 조절요소 (조절 서열)에 의해 유산균에서의 발현을 위해 개조될 수 있다.

[0019] 따라서, 보다 구체적인 측면에서 플라스미드는 유산균에서 발현을 허용하거나 발현을 위한 특이적인 하나 이상의 조절 (즉, 발현 조절) 서열을 포함한다. 따라서, 플라스미드는 유산균에서 유래된 또는 유산균에서 발현에 적합하거나 특이적인 발현 조절 서열을 함유할 수 있다. 적절한 발현 조절은, 예를 들어 번역 (예를 들어, 개시 코돈 및 종결코돈, 리보소말 결합 부위) 및 발현되는 단백질(들)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 일치하는 해독틀에 연결된 전사 조절 요소 (예를 들어, 프로모터-작동 영역, 종결 정지 서열)를 포함한다. 조절 서열(들)은 상기 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결되어, 작동, 또는 조절, 단백질을 발현시킨다. 플라스미드는 유산균 세포에 도입될 수 있다. 적합한 형질전환 기술은 문헌에 잘 기술되어 있다. 박테리아 세포는 플라스미드로부터 상기 단백질의 발현을 허용하는 조건 하에서 배양되거나 그렇지 않으면 유지될 수 있다. 이는 개체의 상처에서의 상태를 포함할 수 있다.

[0020] 일 실시예에서, 단백질의 발현을 조절하는 플라스미드의 프로모터는 유산균에서 발현을 허용하거나, 발현에 특이적인 프로모터이다. 따라서, 플라스미드는 유산균에서 단백질을 발현할 수 있는 프로모터의 조절 (프로모터에 작동가능하게 결합된) 하에 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 특정 바람직한 실시예에서, 플라스미드는 단백질(들)의 발현을 조절하는 프로모터이고 유산균 유래 프로모터이거나, 더욱 구체적으로는 유산균에서 발현된 유전자로부터 유래되거나 수득된 유산균 프로모터를 포함한다.

[0021] 일부 실시예에서, 유산균 프로모터 외에도, 플라스미드는 또한 단백질(들)의 발현을 조절하기 위한 유산균 유래 또는 이로부터 수득된 다른 조절요소 또는 서열을 함유할 수 있다. 따라서, 예를 들어 그러한 다른 유산균 발현 조절요소 또는 서열은 상기 언급된 인핸서, 종결자 및/또는 번역 조절요소 또는 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 플라스미드는 또한, 예를 들어 작동서열 등의 프로모터 또는 하나 이상의 조절 유전자로부터의 발현을 제어 또는 조절하는, 하기에 추가로 언급되는 조절요소 또는 서열을 함유할 수 있다.

[0022] 선택적으로 또는 부가적으로, 플라스미드는 유산균에서의 발현을 위해 코돈-최적화된 단백질(들)을 코딩하는 뉴

클레오티드 서열에 의해 유산균에서 사용하기 위해 개조 (또는 변형 등)될 수 있다.

[0023] 바람직한 일 실시예에서, 단백질의 발현을 위한 프로모터는 조절 (조절가능한) 또는 유도성 프로모터이다. 따라서, 단백질의 발현은 박테리아를 제공하거나 박테리아를 프로모터를 활성화시키거나 켜는 (유도하는) 조절분자 또는 유도인자와 접촉시킴으로써 제어되거나 조절될 수 있다 (예를 들어, 바람직하거나 적절한 시간에 개시됨). 이는 상처에 단백질을 전달하는데 유리하다.

[0024] 따라서, 본 발명의 추가의 측면은 유산균에서 단백질을 발현하는데 사용하기 위한 발현 시스템을 제공하고, 상기 발현 시스템은 (i) 본원에 정의된 바와 같은 플라스미드, 여기서 상기 플라스미드는 유산균에서 단백질을 발현할 수 있는 유도성 프로모터의 조절 하에 상기 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고; 및 (ii) 프로모터를 위한 유도인자 (또는 조절분자)를 포함한다. 발현 시스템은 편리하게는 상기 구성요소 (i) 및 (ii)를 포함하는 키트의 형태로 제공될 수 있다.

[0025] 본 발명의 또 다른 측면은 본원에 정의된 바와 같은, 본 발명의 플라스미드로 형질전환된 (즉, 포함하는) 박테리아 또는 박테리아들 (즉, 박테리아 세포 또는 균주)이다. 구체적으로, 박테리아는 유산균이고, 이에 따라 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은, 본 발명의 플라스미드를 포함하는 유산균들 (또는 유산균)을 제공한다. 다르게 표현하면, 이러한 본 발명의 측면은 본 발명의 플라스미드가 도입된 박테리아 (또는 박테리아 세포)를 제공한다.

[0026] 본원에 추가로 기재된 바와 같이, 본 발명의 플라스미드 및 박테리아는 치료를 촉진하는데 유용하고, 따라서 손상된 조직을 일반적으로 포함하는 것으로 본원에 정의된 상처의 치료를 촉진하는데 특히 유용하다 (추가로 하기를 참조한다). 따라서, 본 발명의 추가의 측면은 치료에 사용하기 위한, 보다 구체적으로는 상처 치유에 사용하기 위한 상기 플라스미드 및 박테리아를 제공한다.

[0027] 박테리아는 약학적 조성물의 형태로 치료될 개체의 상처에 투여하기 위해 제공될 수 있다. 따라서, 본 발명의 또 다른 측면은 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제와 함께, 본원에 정의된 바와 같은, 본 발명의 박테리아를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0028] 보다 일반적으로, 본 발명은 본 발명의 박테리아를 포함하는 프로바이오틱 제품을 제공한다.

[0029] 이러한 제품, 또는 약학적 조성물은 편리하게는 본 발명의 박테리아를 포함하는 상처 드레싱의 형태를 취할 수 있다. 따라서, 추가의 측면에서, 본 발명은 적어도 하나의 드레싱 재료와 함께, 상기 본원에 정의된 바와 같은, 본 발명의 박테리아를 포함하는 상처 드레싱을 제공한다.

[0030] 본 발명의 또 다른 측면은 상처 치유에 사용하기 위한 약제 (또는 프로바이오틱 제품)의 제조를 위한, 본원에 정의된 바와 같은 본 발명의 플라스미드 또는 박테리아의 용도를 제공한다.

[0031] 또한, 상처를 치료하기 위해 개체를 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 개체, 또는 상기 개체의 상처에, 본원에 정의된 바와 같은 본 발명의 박테리아를 상처의 치료를 촉진하는데 유효한 양으로 투여하는 것을 포함한다.

[0032] 본 발명의 다른 측면은 상처를 치료하기 위한 키트를 제공하며, 상기 키트는 다음을 포함한다:

[0033] (i) 본원에 정의된 바와 같은 본 발명의 플라스미드를 포함하는 유산균, 여기서 상기 플라스미드는 유산균에서 단백질을 발현할 수 있는 유도성 프로모터의 조절 하에 상기 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함함; 및

[0034] (ii) 프로모터를 위한 유도인자 (또는 조절분자).

[0035] 본 발명의 또 다른 측면은 다음을 포함하는, 상처 치유 시 개별적으로, 순차적으로 또는 동시에 사용하기 위한 복합 조제품으로서의 의약품 (예를 들어, 키트 또는 조합 제품)을 포함한다:

[0036] (i) 본원에 정의된 바와 같은 본 발명의 플라스미드를 포함하는 유산균, 여기서 상기 플라스미드는 유산균에서 단백질을 발현할 수 있는 유도성 프로모터의 조절 하에 상기 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함함; 및

[0037] (ii) 프로모터를 위한 유도인자 (또는 조절분자).

[0038] 본 명세서에서 용어 "상처 치유"는 상처의 치료를 촉진 또는 개선시키는 모든 측면을 포함하는 것으로 폭넓게 사용된다. 따라서, 상기 제시된 본 발명의 다양한 측면은 상처 치유를 촉진 또는 향상 또는 개선시키거나 단순

하게 치료를 촉진 또는 향상시키는데 있어서 플라스미드 또는 박테리아의 유용성에 대해 선택적으로 정의될 수 있다.

[0039] 따라서, 상처 치유는 더 빠른 상처 치유, 또는 보다 완전한 상처의 치유 또는 실제로 상처 치유의 모든 향상 또는 개선, 예를 들어 감소된 치료 시간, 예를 들어 부분적인 또는 완전한 상처의 봉합을 이루기 위한 감소된 시간, 개선된 상처 외관 (예를 들어, 치료된 또는 치료되고 있는 상처의 외관), 감소된 또는 개선된 흉터 형성, 만성 또는 저항성 상처 등의 치료 촉진 (즉, 본 발명의 박테리아의 상처로의 적용은 지금까지 치유되지 않거나 어떠한 치유의 징후도 보이지 않았던 상처의 치료를 유도, 또는 야기, 또는 개시한다)을 포함하거나 포괄할 수 있다. 상처는 하기에서 보다 상세하게 설명된다.

[0040] 치료될 상처를 갖는 개체는, 모든 인간 또는 예를 들어 가축 (domestic animals), 축류 (livestock animals), 실험동물, 스포츠 동물 또는 동물원의 동물을 포함하는 동물 개체일 수 있다. 동물은 바람직하게는 포유동물이지만, 다른 동물, 예를 들어 새를 포함한다. 따라서, 동물은 영장류, 설치류 (예를 들어, 마우스 또는 래트), 또는 말, 개 또는 고양이일 수 있다. 가장 바람직하게는 개체는 인간이다.

[0041] 유산균 (LAB) 또는 유산균목 (*Lactobacillales*)은 그람 양성, 낮은 GC, 내산성, 일반적으로 비포자성, 비호흡성 (nonrespiring), 간상형 (바실러스), 또는 구형 (코커스) 박테리아의 클레이드로, 공통의 대사 및 생리학적 특성을 공유한다. 이러한 박테리아는 탄수화물 발효의 주요 대사 최종 산물로서 젖산을 생산하고 산도 (낮은 pH 범위)에 대해 증가된 저항성을 특징으로 한다. 이러한 LAB의 특성은 이들이 유기산 생산 (예를 들어, 젖산)으로 인해 증가된 산도를 견딜 수 있기 때문에 천연 발효에서 다른 박테리아와 경쟁할 수 있도록 한다. 따라서, 산성화가 부패인자의 성장을 억제하기 때문에 LAB가 식품 발효에서 중요한 역할을 한다. 여러 LAB 균주는 또한 병원성 미생물의 부패와 성장을 추가로 억제하는 단백질성 박테리오신을 생산한다. LAB은 일반적으로 안전한 (GRAS) 상태로 인식되며 식품 산업에서 사용되는 가장 중요한 미생물 그룹 중 하나이다.

[0042] 유산균 클레이드를 포함하는 핵심 속(genera)은 락토바실러스속 (*Lactobacillus*), 류코노스톡속 (*Leuconostoc*), 페디오코커스속 (*Pediococcus*), 락토코커스속 (*Lactococcus*), 및 스트렙토코커스속 (*Streptococcus*) 뿐만 아니라 보다 지엽적인 에어로코커스 (*Aerococcus*), 카르노박테리움 (*Carnobacterium*), 엔테로코커스 (*Enterococcus*), 오에노코커스 (*Oenococcus*), 스포로락토바실러스 (*Sporolactobacillus*), 테트라제노코커스 (*Tetragenococcus*), 바고코커스(*Vagococcus*), 및 바이셀라 (*Weissella*)이다. 이러한 속으로부터의 임의의 유산균은 본 발명의 범위 내에 포함되나, 특히 락토바실러스속 (*Lactobacillus*) 또는 락토코커스속 (*Lactococcus*)의 박테리아이다.

[0043] 플라스미드는 하나 이상의 상기 단백질을 코딩할 수 있다. 따라서, 플라스미드는 CXCL12, CXCL17 및/또는 Ym1 단백질의 조합 (예를 들어, 2 또는 그 이상의 CXCL12, CXCL17 또는 Ym1)을 코딩할 수 있다. 선택적으로, 플라스미드는 2종 또는 그 이상의 종류의 CXCL12, CXCL17 및/또는 Ym1 단백질 (예를 들어, 쥐 및 인간 CXCL12 등)을 코딩할 수 있다. 하나 이상의 단백질을 코딩하는 경우, 단백질은 단일 프로모터의 제어 하에 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열로부터 발현될 수 있거나, 하나 이상의 프로모터가 사용될 수 있다. 예를 들어, 각 단백질은 개별적인 프로모터로부터 발현될 수 있고, 프로모터는 동일하거나 다를 수 있다. 동일한 플라스미드로부터 2종 이상의 단백질을 함께 발현하기 위한 기술은 당해 기술분야에 잘 알려져 있고, 예를 들어 번역 공역 기술 (translational coupling techniques)을 포함하고, 이를 달성하기 위한 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있고 이용가능하다. 예를 들어, 다중 전이유전자는 P2A 및 T2A 서열을 사용하여 하나의 프로모터 하에 동시에 발현될 수 있다.

[0044] CXCL12, CXCL17 또는 Ym1 단백질은 자연적 또는 천연 단백질 (즉, 뉴클레오티드는 자연에서 발견되는 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩할 수 있다)일 수 있고, 이러한 단백질이 발생하는 모든 종으로부터 유래될 수 있다. 일반적으로, 단백질은 포유류 단백질일 것이고, 상기에 기재된 바와 같이 인간 및 쥐 단백질이 바람직하다. 그러나, 천연 뉴클레오티드 서열 또는 단백질 서열은 단백질의 기능 또는 활성이 실질적으로 또는 현저하게 변하지 않는 한, 예를 들어, 단백질의 활성이 실질적으로 유지되는 한, 예를 들어 하나 이상의 아미노산 추가, 삽입, 결실 및/또는 치환에 의해 변형될 수 있다. 상기 단백질은 천연 단백질의 단편 또는 절단된 변이체일 수 있다. 예를 들어, 서열 변형 변이체 단백질은 그것이 유래된 모단백질의 적어도 80, 85, 90 또는 95%의 활성을 나타낼 수 있다. 이는 해당 단백질의 활성에 대해 당업계에 공지된 테스트에 따라 평가될 수 있다. 예를 들어, 활성은 단백질로 처리된 배양 세포에서 결찰에 따른 수용체 인산화 또는 칼슘 유동 시스템, 시험관 내 (*in vitro*) 세포 주화성 시스템, 생체 내(*in vivo*) 감염 단백질에 대한 세포 회복 모델에서 측정될 수 있다. 주화성을 바탕으로 한 시험관 내 (*in vitro*) 검정은 참고문헌 22와 32에 기재되어 있다. 참고문헌 33은 사용될 수 있

는 추가의 시험관 내 (*in vitro*) 케모카인 활성 테스트를 기재한다. 따라서, 용어 "CXCL12", "CXCL17" 또는 "Ym1"은 천연 단백질뿐만 아니라 기능적으로 동일한 이의 변이체 또는 유도체를 포함한다. 따라서, 단백질은 합성 또는 서열-변형 변이체일 수 있거나, 하나 이상의 다른 변형, 예를 들어 번역후 변형 등을 포함할 수 있다.

[0045] 상기 기재된 바와 같이, 코딩된 단백질은 천연 인간 또는 쥐 단백질에 대해 상기 기재된 아미노산 서열, 즉, 쥐 및 인간 CXCL12에 대해 각각 SEQ ID NOS. 3 및 6, 쥐 및 인간 CXCL17에 대해 각각 SEQ ID NOS. 9 및 12, 쥐 및 인간 Ym1에 대해 각각 SEQ ID NOS. 15 및 18, 또는 전술한 모든 서열과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 유리하게는, 상기 추가로 기재된 바와 같이, 이러한 천연 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 유산균에서의 발현을 위해 코돈-최적화될 수 있다. 이것은 코딩된 단백질의 변형된 아미노산 서열을 야기할 수 있다. 예를 들어 코돈 최적화된 서열은 유산균에 적합한 (또는 더 적합한) 분비 서열과 같은 서열을 코딩할 수 있다. 따라서, 코돈-최적화된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 "최적화된" 단백질은 천연 단백질과 비교하여 변경된 또는 치환된 선도서열 또는 신호서열 (예를 들어, 분비서열)을 포함할 수 있다. 바람직한 일 실시예에서, 코돈 최적화된 서열에 의해 코딩된 단백질의 성숙 또는 절단된 형태는 천연 단백질과 동일하다. 코돈-최적화된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 단백질은 하기 표 4에 나열된 SEQ ID NOS. 2, 5, 8, 11, 14, 또는 17에 기재된 아미노산 서열을 가질 수 있다. 따라서, 플라스미드에 의해 코딩된 단백질은 쥐 및 인간 CXCL12에 대해 각각 SEQ ID NOS. 2 및 5, 쥐 및 인간 CXCL17에 대해 각각 SEQ ID NOS. 8 및 11, 쥐 및 인간 Ym1에 대해 각각 SEQ ID NOS. 14 및 17, 또는 전술한 모든 서열과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0046] 다른 실시예에서, 코딩된 단백질(들)은 상기 임의의 아미노산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 90%, 91% 92% 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0047] 서열 동일성은 당해 기술분야에 공지되어 있고 용이하게 이용할 수 있는 방법 및 소프트웨어에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 따라서, 서열 동일성은 임의의 편리한 방법으로 평가될 수 있다. 그러나, 서열 사이의 서열 동일성 정도를 결정하기 위해, 서열의 다중 정렬을 만드는 컴퓨터 프로그램, 예를 들어 Clustal W가 유용하다 (참고문헌 24). ALIGN (참고문헌 25), FASTA (참고문헌 26 및 참고문헌 27), BLAST 및 갭핑 BLAST (참고문헌 28)와 같이 서열 쌍을 비교하고 정렬하는 프로그램도 이러한 목적으로 유용하며, 기본설정을 이용하여 사용될 수 있다. 또한, 유럽생물정보연구소 (European Bioinformatics institute)의 Dali 서버는 단백질 서열의 구조-기반 정렬을 제공한다 (참고문헌 29, 참고문헌 30 및 참고문헌 31). 다중 서열 정렬 및 백분율 동일성 계산은 표준 BLAST 파라미터 (예를 들어, 이용가능한 모든 생물체로부터의 서열을 이용함, 매트릭스 Blosum 62, 갭 코스트: 존재 11, 연장 1)를 사용하여 결정될 수 있다. 선택적으로, 다음의 프로그램 및 파라미터를 사용할 수 있다: 프로그램: Align Plus 4, 버전 4.10 (Sci Ed Central Clone Manager Professional Suite). DNA 비교: 전체 비교, 표준 1차 스코어링 매트릭스, 미스매치 페널티 = 2, 오픈 갭 페널티 = 4, 신장 갭 페널티 = 1. 아미노산 비교: 전체 비교, BLOSUM 62 스코어링 매트릭스.

[0048] 본원에 정의된 자연발생 폴리펩티드 서열의 변이체는, 예를 들어 당해 기술분야에 공지된 표준 분자 생물학적 기술, 예를 들어, 부위-특이적 또는 무작위 돌연변이 (예를 들어, 유전자 셔플링 또는 오류 발생이 쉬운 PCR을 이용함)와 같은 표준 돌연변이 기술을 이용하여 합성적으로 생성될 수 있다.

[0049] 본원에 정의된 단백질의 유도체는 또한 코딩될 수 있다. 유도체는 상기 기재된 단백질 또는 예를 들어, 아미노산이 글리코실화 등에 의해 화학적으로 변형된 이의 변이체를 의미한다.

[0050] 단백질이 천연 단백질의 서열에 대해 아미노산 치환을 포함하는 경우, 치환은 바람직하게는 보존적 치환일 수 있다. 용어 "보존적 아미노산 치환"은 아미노산이 유사한 물리화학적 특성을 갖는 아미노산, 즉 동일한 클래스/그룹의 아미노산으로 대체된 (치환된) 임의의 아미노산 치환을 말한다. 예를 들어, 작은 잔기 글리신 (G), 알라닌 (A) 세린 (S) 또는 트레오닌 (T); 소수성 또는 지방족 잔기 류신 (L), 이소류신 (I); 발린 (V) 또는 메티오닌 (M); 친수성 잔기 아스파라긴 (N) 및 글루타민 (Q); 산성 잔기 아스파르트산 (D) 및 글루탐산 (E); 양전하 (염기성) 잔기 아르기닌 (R), 리신 (K) 또는 히스티딘 (H); 또는 방향족 잔기 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y) 및 트립토판 (W)은 단백질 기능 또는 활성을 실질적으로 변경하지 않고 교체가능하게 치환될 수 있다.

[0051] 상기 기재된 바와 같이, 단백질의 발현을 위한 유도성 프로모터를 사용하는 것이 바람직하다. "유도성"은 기능 (즉, 코딩 뉴클레오티드 서열의 전사를 가능하게 하는 또는 야기하는 활성, 또는 효과)이 조절 또는 제어될 수 있는 임의의 프로모터를 의미한다. 따라서, 용어 "유도성"은 "조절가능한" (또는 "조절된")과 동의어이며, 이와 교환가능하게 사용될 수 있다. 따라서, 단백질의 구성적 발현은 존재하지 않는다. 이에 따라, 단백질의 발현은

유도되거나, 켜질 수 있다 (보다 구체적으로 켜지고 꺼질 수 있음). 보다 구체적으로, 발현은 제한된 시간 또는 소정의 시간 동안 유도되거나 켜질 수 있다. 이것은 발현이 일정 기간 후에 중단되고/중단되거나 박테리아 세포가 죽기 때문이다.

[0052] 일부 실시예에서, 프로모터가 유도될 때까지 (또는 선택적으로 활성화되는 것으로 칭함) 프로모터로부터의 발현 (전사)가 없을 수 있다. 그러나, 임의의 생물학적 시스템과 같이, 활성의 결핍은 절대적이지 않을 수 있으며, 프로모터 활성 또는 유도가 부재된 일부 기본 프로모터 활성일 수 있다. 그러나, 바람직한 일 실시예에서 유도되지 않은 프로모터의 임의의 기본 발현은 낮거나, 최소이거나, 중요하지 않거나, 더욱 바람직하게는 최소허용 정도 또는 무시할 수 있는 정도이다. 따라서, 유도성 프로모터로부터의 발현은, 프로모터가 유도되지 않을 때에 비해, 프로모터가 유도될 때 유리하게 측정가능하게 증가하거나 명백하게 증가한다.

[0053] 유산균에서 사용하기 위한 유도성 프로모터를 포함하는 유도성 프로모터는 당해 기술분야에 잘 알려져 있으며, 유산균에서의 발현에 적합한 임의의 적절한 유도성 프로모터가 사용될 수 있다.

[0054] 유도성 프로모터는 유도인자 또는 활성인자 분자의 존재 하에 유도될 수 있고 (또는 활성화됨), 이는 프로모터에 직접 또는 간접적으로 작용할 수 있고, 프로모터를 유도하기 위해, 또는 보다 일반적으로 프로모터의 유도 또는 활성화를 야기하거나 가능하게 하기 위해 추가될 수 있으며, 단백질의 발현을 허용하고, 또는 플라스미드를 함유하는 박테리아의 조건의 변화, 예를 들어, 유산균에 대한 변화 조건, 예를 들어, 특정 영양분의 결핍 또는 고갈을 유도하여 도입될 수 있다 (또는 활성화될 수 있음), 프로모터의 유도인자는 조절 유전자에 의해 코딩될 수 있고, 일 실시예에서는 스스로 유도되거나 활성화될 수 있다. 따라서, 용어 "유도인자"는 본원에서 임의의 조절 분자, 또는 실제로 유도성 프로모터를 활성화하거나 작동시킬 수 있고, 또는 유도성 프로모터가 유도되도록 하거나 이를 야기할 수 있는 임의의 허용조건을 포함하는 것으로 폭넓게 사용된다. 유도성 프로모터의 유도는 (예를 들어, 플라스미드를 함유하는 유산균과 접촉하는) 조절 분자 또는 프로모터 유도 (활성화)를 허용하는 조건의 도입을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 유도인자는 활성 펩티드일 수 있다. 이것은, 예를 들어 하기에 추가로 기재된 바와 같이 프로모터를 직접 또는 간접적으로 유도하는데 작용할 수 있다.

[0055] 상기한 바와 같이, 유산균으로부터 수득된 또는 유래된 프로모터가 바람직하다. 이들은 천연 프로모터이거나 변형된 또는 돌연변이 프로모터일 수 있다. 적합한 프로모터는, 예를 들어 상처에서 유산균을 성장시킴으로써, 또는 상처의 박테리아에서 어떤 유전자가 발현되는지 또는 상승조절되는지 결정함으로써 확인될 수 있다. 이후 이러한 유전자로부터의 프로모터가 확인될 수 있다. 선택적으로, 실험실에서 사용하기 위한 상기 프로모터 또는 발현 시스템을 함유하는 발현 플라스미드를 포함하여, 유산균에서의 또는 유산균에서 사용하기 위한 수많은 상이한 프로모터 및 발현 시스템이 확인 및 설명되었으며, 또는 당해 기술분야에서 이용가능하다. 임의의 상기 공지된 플라스미드 또는 발현 시스템은 본 발명의 재조합 플라스미드를 위한 기초로 사용될 수 있다.

[0056] 다양한 유도성 발현 시스템이 당해 기술분야에 락토바실리 (*Lactobacilli*)와 같은 LAB와 함께 사용하기 위한 것으로 공지되어 있다. 일례로는 참고문헌 19에 기재된 락토바실러스 플란타럼 (*L. plantarum*) NC8의 망간 운반체의 망간 고갈-유도성 프로모터를 기반으로 하는 자가-유도 시스템을 포함한다. 이러한 시스템은 재조합 단백질 생산을 위한 외부 유도인자의 추가를 필요로 하지 않는다.

[0057] 참고문헌 20 (Duong *et al*)은 넓은 범위의 pWV01 레플리콘을 기반으로 하며, 프락토올리고당 (FOS), 락토오스 또는 트레할로오스 대사 또는 수송, 또는 해당작용과 연관된 오페론으로부터의 프로모터를 함유하는 락토바실리 (*lactobacilli*)와 함께 사용하기 위한 발현 벡터를 기술한다. 그러한 프로모터는 이들의 특정 탄수화물에 의해 유도될 수 있고 글루코스에 의해 억제될 수 있다.

[0058] 보다 구체적으로, 유도성 발현 시스템은 LAB 단백질, 특히 박테리오신 생산과 관련된 유도성 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 프로모터의 활성은 박테리오신 레귤론을 기반으로 한 같은 종류의 조절 시스템, 예를 들어 외부적으로 첨가된 활성인자 펩티드 (즉, 펩티드 형태의 유도인자/조절분자)와 활성인자 펩티드에 의한 유도 시 이 프로모터를 활성화하는데 필요한 반응 조절인자 및 히스티딘 단백질 키나아제를 코딩하는 유전자에 반응하는 두 가지 구성요소의 조절 (신호 전달) 시스템에 의해 제어될 수 있다.

[0059] 일 실시예에서, 발현 시스템은 *nis*A 프로모터와 *nis*RK 조절 유전자의 조합을 기반으로 한, 니신-제어 발현 (NICE) 시스템을 기초로 할 수 있다. 이 시스템은 락토코커스 락티스 (*Lactococcus lactis*) 니신 유전자 클러스터로부터 유래된 프로모터와 조절 유전자를 기반으로 하며, 락토코키 (*lactococci*), 락토바실리 (*lactobacilli*) 및 다른 그람 양성 박테리아에 대한 조절된 유전자 발현 시스템을 개발하기 위해 사용되어 왔다 (참고문헌 15 및 참고문헌 21에서 간략하게 검토됨). NICE 시스템은 락토코키 (*Lactococci*)에서 효율적이고 잘 조절되면서,

이들 시스템은 중요한 기저 활성을 나타낼 수 있다. 이것은 히스티딘 키나아제와 반응 조절 유전자를 염색체에 통합하여 발현 시스템을 특별히 고안한 숙주 균주로 제한함으로써 회피할 수 있다.

[0060] 또 다른 일 실시예에서, 발현 시스템은 사카신 A 레귤론에 의한 클래스 II q박테리오신 사카신 A (*spp* 유전자) 또는 사카신 P 레귤론에 의한 사카신 P (*spp* 유전자)의 생성과 관련된 유전자 및 프로모터를 기반으로 할 수 있다. 그러한 벡터는 pSIP 벡터로 공지되어 있고, 번역 융합 클로닝에 대한 유전자 조작된 *Nco*I 부위를 갖는 사카신 A 또는 사카신 P 구조 유전자로부터 유래된 프로모터 요소를 포함한다. 레귤론 및/또는 상이한 레플리콘으로부터의 상이한 프로모터를 함유하는 다양한 상기 벡터들이 참고문헌 21 및 참고문헌 15에 기재되어 있고, 임의의 이러한 벡터들은 본 발명의 재조합 플라스미드를 위한 기초로 사용될 수 있다.

[0061] 대표적인 일 실시예에서, 프로모터는 이의 관련된 또는 동족 조절 유전자와 함께, 사카신 A 또는 P 레귤론 유래 P_{sapA}, P_{sppA} or P_{orfX} 프로모터일 수 있다.

[0062] 특히 바람직한 일 실시예에서, 플라스미드는, 도 12에 도시되고 참고문헌 21에 기재된 벡터 pSIP411을 기반으로 하여, pSH71 레플리콘, 사카신 P 레귤론 유래 P_{orfX} 프로모터 및 같은 종류의 조절 유전자를 포함한다. 플라스미드 pSIP411은 본원에서 pLAB112로 명명된다. 바람직하게는, 상기와 같은 실시예에서 사용하기 위한 유도인자는 펩티드 SppIP를 기초로 한 활성 펩티드, 예를 들어 SEQ ID NO.19의 서열, 또는 이와 적어도 80% (또는 더욱 특히 적어도 85, 90 또는 95) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 활성 펩티드이다. 바람직한 일 실시예에서, 상기 재조합 플라스미드는 SEQ ID NO: 20에 기재된 뉴클레오티드 서열을 갖는 pLAB112로 명명된 플라스미드로부터 유래된다.

[0063] 유도성 프로모터 (또는 유도성 발현 시스템)의 사용은 보다 제어된 이점, 특히 상처 세팅에서, 즉 박테리아가 개체 또는 상처에 투여될 때, 단백질의 연장된 발현의 이점을 제공할 수 있다. 상처 치유를 촉진하는데 더 나은 효과를 위해, 상처 부위 (예를 들어, 상처 표면)에서 일정시간 동안, 예를 들어 40, 45, 50, 55 또는 60 분, 특히 적어도 한 시간 또는 그 이상 동안 박테리아에 의해 단백질이 발현되는 것이 유리하다. 따라서, 단백질은 한정된 시간, 소정의 시간 또는 연장된 기간 동안 발현될 수 있다. 하기 실시예에 나타난 결과는 본 발명에 따른 플라스미드와 박테리아를 사용하여 상처 표면에서 약 한 시간 동안 단백질을 발현시킬 수 있다는 것을 보여준다. 상기 플라스미드와 박테리아는 일부 실시예에서 2, 3, 또는 4시간 또는 그 이상의 시간 동안 (예를 들어, 상처에서) 단백질의 발현이 가능하도록 최적화될 수 있다.

[0064] 따라서, 단백질의 지속적인 발현 및 전달이 바람직하며, 이는 본 발명의 형질전환된 박테리아를 사용함으로써 제공될 수 있다. "지속적인" 또는 "연장된"은 일정 시간, 예를 들어 적어도 한시간 동안 (또는 상기 논의된 바와 같음) 단백질의 발현이 있고, 이후 단백질의 전달이 있음을 의미한다. 특히, 이것은 단백질을 직접적으로 투여하는 것과 비교하여 (즉, 박테리아에 의해 발현되는 것 보다는 단백질 생산물로서) 증가된 기간 동안 단백질이 효과를 나타낼 수 있도록 한다.

[0065] 상기 논의된 바와 같이, 단백질(들)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 실험실에서의 발현을 위해 코돈 최적화될 수 있다. 따라서, 바람직한 실시예에서, 단백질을 코딩하는 재조합 플라스미드에서 뉴클레오티드 서열 (또는 인서트)은 쥐 CXCL12, 인간 CXCL12, 쥐 CXCL17, 인간 CXCL17, 쥐 Ym1 및 인간 Ym1을 각각 코딩하는 SEQ ID NOS. 1, 4, 7, 10, 13 및 16에 기재된 코돈-최적화된 뉴클레오티드 서열 또는 이와 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열로부터 선택될 수 있다.

[0066] 따라서, 대표 실시예에서, 재조합 플라스미드는 SEQ ID NO: 1에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는, mLrCK1로 명명된 플라스미드; SEQ ID NO: 1에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는, mLrCK1.4로 명명된 플라스미드; SEQ ID NO: 1에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는, mLrCK1.7로 명명된 플라스미드; SEQ ID NO: 4에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는, hLrCK1로 명명된 플라스미드; SEQ ID NO: 7에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는, mLrCK2로 명명된 플라스미드; SEQ ID NO: 10에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는, hLrCK2로 명명된 플라스미드; SEQ ID NO: 13에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는, hLrMP1로 명명된 플라스미드; 및 SEQ ID NO: 16에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는, mLrMP2로 명명된 플라스미드로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0067] 일부 실시예에서, 본 발명의 플라스미드는 다음의 코돈 최적화된 인서트 mLrCK1 (즉, SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 서열), mLrCK1.4 (즉, SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 서열), mLrCK1.7 (즉, SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 서열), hLrCK1 (즉, SEQ ID NO: 4의 뉴클레오티드 서열), mLrCK2 (즉, SEQ ID NO: 7의 뉴클레오티드 서열), hLrCK2 (즉, SEQ ID NO: 10의 뉴클레오티드 서열), hLrMP1 (즉, SEQ ID NO: 13의 뉴클레오티드 서열), 및

mLrMP2 (즉, SEQ ID NO: 16의 뉴클레오티드 서열)의 뉴클레오티드 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 90%, 91% 92% 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0068] 뉴클레오티드 분자의 서열 동일성은 당해 기술분야에 공지된 방법 및 소프트웨어에 의해 결정될 수 있고 예를 들어, 디폴트 값 및 변수 팸팩터를 포함하는, GCG 패키지를 이용한 FASTA Search, 및 6개 뉴클레오티드의 윈도우를 포함하는 12.0의 갭 크리에이션 페널티 세트와 4.0의 갭 신장 페널티 세트로 당해 기술분야에서 이용가능하다.

[0069] 뉴클레오티드 서열과 관련된 상기 서열 동일성은 SEQ ID NO: 1, 4, 10, 13 또는 16에 기재된 뉴클레오티드 서열과 기능적으로 동일할 수 있다. 상기 뉴클레오티드 서열은 CXCL12, CXCL17 또는 Ym1 단백질 각각에 대해 기능적 등가물로 여겨질 수 있는 폴리펩티드를 코딩하는 경우, 기능적으로 동등한 것으로 간주될 수 있다. 바람직한 기능적 등가물은 상기 기재된 바람직한 단백질을 코딩하는 것이다.

[0070] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 기재된 재조합 플라스미드로 형질전환된 박테리아 균주를 제공한다. 바람직하게는, 상기 박테리아 균주는 락토바실러스 (*Lactobacillus*) 균주 또는 락토코커스 (*Lactococcus*) (예를 들어, 락토코커스 락티스 (*Lactococcus lactis*)) 균주와 같은 유산균 균주이다. 더욱 바람직하게는, 박테리아 균주는 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC 또는 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) DSM20016과 같은 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) 균주이다. 상기 균주 (락토바실러스 루테리 R2LC/DSM20016 및 락토코커스 락티스)는 6종의 개체의 팔뚝 피부 생물군의 계통발생적 분석으로 측정된 바와 같이 인간 피부에서 발견되지 않는다 (참고문헌 13).

[0071] 플라스미드, 발현 시스템, 박테리아 및 키트 뿐만 아니라, 본 발명의 추가의 생산품은 박테리아를 함유하는 약학적 조성물 및 의료장치를 포함한다. 이러한 조성물 및 장치는, 특히 상처 드레싱, 포장재, 면봉, 이식체 등을 포함하거나, 실제로 상처 부위 (예를 들어, 수술 상처 부위)에 도입하거나 존재할 수 있는 전체 또는 부분적으로 내재된 의료장치, 예를 들어 줄 (line) 또는 카테터 또는 이식물을 포함할 수 있다. 또한, 프로바이오틱 제품, 즉 개체에게 투여하기 위한, 예를 들어 경구 투여용, 예를 들어 소비 또는 섭취용, 또는 예를 들어 수술하는 동안 상처에 국소 적용하거나 상처 부위에 직접 투여, 또는 직장 내, 질내 등으로 투여하기 위한 박테리아 함유 제품을 포함한다.

[0072] 따라서, 본 발명에 따른 제품 (예를 들어, 플라스미드, 박테리아 균주, 프로바이오틱스 및 상처 드레싱 등)은 의학적 치료, 특히 인간 또는 동물 개체에서 상처 치유를 촉진하는데 유용하다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "상처 치유 촉진"은 봉합을 증대, 개선, 증가, 또는 유도하고, 상처를 치유, 또는 회복하는 것을 의미한다. 본 발명의 바람직한 측면에서, 인간 또는 동물 개체는 감소된 말초혈액관류 (말초동맥질환), 고혈당증 또는 신경병증과 같이 상처 치유를 악화시키는 근본적인 질환으로 인해 상처 치유를 필요로 하거나, 또는 개체는, 예를 들어 (후천적이거나 유전적인) 근본적인 질환으로 인한 어떠한 이유로 또는 의학적 치료 효과로 면역력이 약화될 수 있다. 특히 개체는 당뇨병을 앓고 있을 수 있다.

[0073] 치유될 상처는 개체의 신체 임의의 부위에 대한 임의의 부상, 외상 또는 손상을 포함할 수 있다. 상기 방법으로 치료될 수 있는 상처의 예로는 급성 질환 또는 상처; 예를 들어, 열화상 (고온 또는 저온), 화학적 화상, 방사선 화상, 전기 화상, 자외선에 과도한 노출로 인한 화상 (예를 들어, 일광화상); 노동 및 출산의 결과로 회음부와 같은 신체 조직 손상; 의료시술 과정에서 지속되는 부상, 예를 들어 외음절개술, 자상, 절개, 찰과상을 포함하는 외상으로 유도된 부상; 사고로 지속되는 부상; 만성 질환뿐만 아니라 수술 후 부상; 예를 들어 욕창, 와창, 궤양, 당뇨병과 관련된 질환, 원활하지 못한 혈액 순환, 및 모든 종류의 여드름을 포함한다. 또한, 상처는 피부염, 치과 수술 후의 상처; 치주질환; 외상 후 상처; 및 종양 관련 상처를 포함할 수 있다. 추가의 예로, 예를 들어 위염 또는 염증성 장질환에서 발생하는 위장의 상처가 있다.

[0074] 따라서, 용어 "상처"는 본원에서 조직의 완전한 상태에 대한 임의의 파괴 또는 조직에 대한 임의의 손상 또는 부상을 포함하는 것으로 폭넓게 사용된다. 따라서, 상기 용어는 (예를 들어, 사고 부상 또는 외상, 수술 또는 다른 의도되거나 고의의 부상 또는 질환으로 인해) 야기된다고 하더라도, 조직에 대한 임의의 손상, 외상 또는 부상 또는 임의의 병변을 포함한다. 외상은 임의의 물리적 또는 기계적 부상 또는 병원균 또는 생물학적 또는 화학적 제제를 포함하는 외용 제제에 의해 야기되는 임의의 손상을 포함할 수 있다. 조직 손상은 또한 저산소증, 허혈 또는 재관류로 인해 야기될 수 있다. 상처는 모든 종류의 화상을 포함할 수 있다. 상처는 급성 또는 만성일 수 있다. 만성 상처는, 치료 단계, 예를 들어 염증 단계에서 지연된 임의의 상처, 또는 30, 40, 50 또는 60일 또는 그 이상 동안 치료되지 않은 임의의 상처로 기술될 수 있다. 상처는 신체의 내부 또는 외부 표

면 또는 조직 내에 또는 위에 존재할 수 있다.

[0075] 일 구체예에서, 상처는 신체의 외부 표면 또는 조직 상에 있고, 예를 들어 이것은 가죽 (즉, 피부) 상처 또는 점막 상처, 특히 외부 점막 조직 또는 신체 표면 (예를 들어, 눈, 귀 또는 코내 등)의 상처이다. 또 다른 일 실시예에서, 상처는 위장의 상처이다. 다른 일 실시예에서, 상처는 위장 상처가 아니다 (즉, 위장 상처 이외의 다른 상처이다).

[0076] 박테리아는 임의의 편리한 방법 또는 바람직한 방법, 예를 들어 경구, 또는 국소적, 또는 상처 부위에 직접 투여, 예를 들어 박테리아를 함유하는 약학적 조성물 또는 드레싱 또는 장치의 직접 주사 또는 투입 또는 적용 또는 도입에 의해 투여될 수 있다. 다른 실시예에서, 구강 내, 또는 비강 내 또는 흡입, 직장 내 또는 질내로 투여될 수 있다. 따라서, 박테리아는 신체 임의의 구멍에, 구멍을 통해 투여될 수 있다. 위장 상처에 투여하기 위해, 박테리아는 경구로 투여될 수 있다.

[0077] 박테리아는 절차에 따라, 당해 기술분야에 공지된 통상적인 수단을 이용하여 상기 임의의 경로에 의해 투여하기 위해 임의의 편리한 방법 또는 바람직한 방법으로 제형화되거나 제조될 수 있다. 따라서, 약학적 조성물, 의료 장치 및 드레싱 등 뿐만 아니라, 본 발명의 프로바이오틱 제품은, 영양 보충제 또는 식품, 예를 들어 기능성 식품으로 제형화되어 제공될 수 있다.

[0078] 경구 투여 형태는 분말, 정제, 캡슐 및 액체 등을 포함한다. 국소 투여를 위해, 제품은 액체, 예를 들어 현탁액, 또는 스프레이, 에어로졸 (분말 또는 액체), 겔, 크림, 로션, 페이스트, 연고 또는 고약 등으로 제형화되거나, 또는 임의의 드레싱 형태, 예를 들어 고체 지지체 또는 기질을 포함하거나 미포함하는 붕대, 석고, 패드, 스트립, 면봉, 스폰지, 매트 등으로 제형화될 수 있다. 또한, 박테리아는 이식물 (예를 들어 보철물), 튜브, 줄, 카테터 등과 같은 의료장치의 표면 (예를 들어 코딩됨)에 제공될 수 있다.

[0079] 박테리아는 임의의 편리한 형태 또는 바람직한 형태, 예를 들어 활성 또는 성장 배양물 또는 냉동건조 또는 동결건조 형태로 제공될 수 있다.

[0080] 본 발명에 따른 박테리아 균주는 피부 또는 점막의 상처 표면을 치료하기 위해 국소 또는 경구 투여용으로 제형화될 수 있다. 결과적으로, 본 발명은 추가로 본 발명에 따른 박테리아 균주를 포함하는 프로바이오틱 제품을 제공한다. 상기 프로바이오틱 제품은, 예를 들어 약학적 조성물, 바람직하게는 경구 투여용이다. 선택적으로, 국소 적용을 위한 프로바이오틱 제품은, 예를 들어 로션 또는 로션-소독 상처 드레싱이고, 본 발명에 따른 박테리아 균주를 포함한다.

[0081] 본 발명의 제품 (즉, 약학적 조성물 또는 장치 또는 드레싱 등)은 또한 유도인자 (유도성 프로모터가 사용되는 경우)을 함유할 수 있다. 이는 제품의 일부 (예를 들어, 드레싱에 삽입되거나 포함됨) 또는 별도로, 예를 들어 상기 정의된 바와 같이 키트 또는 조합품의 일부로 제공될 수 있다.

[0082] 제품 (예를 들어, 드레싱 또는 장치)에 함께 공동으로 제형화되는 경우, 박테리아와 유도인자는 박테리아가 유도인자와 분리되어 있는 구성으로 제공될 수 있고, 사용 시 함께 합쳐진다 (또는 접촉된다). 예를 들어, 박테리아와 유도인자는 서로 결합되는 (예를 들어, 접촉 또는 혼합됨) 분리된 칸에 있거나, 또는 사용 시 깨지거나 붕괴되거나 개방될 수 있는 벽 (예를 들어, 멤브레인 또는 다른 칸막이)으로 분리될 수 있다.

[0083] 선택적으로, 유도인자는 (예를 들어, 박테리아를 함유하는 키트에서도, 또는 박테리아를 함유하는 제품에서) 별도로 제형화되어 제공될 수 있고, 유도인자와 박테리아 (또는 박테리아를 함유하는 제품)은 사용하는 동안 함께 합쳐질 수 있다. 이는 개체에게 투여 전, 투여 동안 또는 투여 이후일 수 있다. 예를 들어, 박테리아를 포함하는 제품은 첫 번째로 투여될 수 있고, 이후 유도인자는 박테리아에 첨가되거나 적용될 수 있다. 또 다른 일 실시예에서, 박테리아와 유도인자는 투여 전에, 예를 들어 투여 바로 전에 또는 바로 직전에, 또는 투여하는 동안 예비혼합될 수 있다.

[0084] 박테리아가 냉동건조 또는 동결건조 형태로 제공되는 경우, 박테리아는 투여 전에, 예를 들어 사용하기 전에 또는 사용 중에 재구성하거나, 재현탁하는 것이 바람직할 수 있다. 이것은 상처 및 사용되는 제품의 형태에 따라 달라진다. 예를 들어, 일부 상처의 경우, 박테리아가 재구성되고/재현탁되어 활성 상태로 되기에 충분한 액체로 존재할 수 있다. 그러나, 다른 실시예에서, 액체는 박테리아의 재구성을 위한 (또는 선택적으로 발현되고, 현탁 또는 재현탁을 위한) 액체로 제공되는 것이 바람직할 수 있다. 이는 별도의 용기 또는 컨테이너 (예를 들어, 키트 또는 조합품의 일부), 또는 컨테이너, 또는 용기 또는 장치의 개별적인 칸에 제공될 수 있다. 액체는 유도인자를 포함하거나 함유할 수 있고, 유도인자가 존재하는 경우, 별도의 용기 또는 컨테이너 또는 칸에 제공될 수 있다. 액체는 동결건조된 박테리아의 재구성 또는 현탁에 적합한 임의의 액체, 예를 들어 물, 또는 수용액, 또

는 버퍼 또는 성장 또는 배양 배지일 수 있다.

[0085] 따라서, 두 개의 구획 시스템 (예를 들어, 드레싱 또는 장치 또는 컨테이너 또는 용기 (예를 들어, 병)의 예로, 하나의 칸에 동결건조된 박테리아를 포함하고, 나머지 칸에는 액체를 포함할 수 있다. 액체는 선택적으로 유도인자를 함유할 수 있다. 사용 시, 또는 사용 전에, 두 개의 구획은 혼합되거나 접촉되어 상처에 적용될 수 있다. 보다 구체적인 실시예에서, 박테리아는 액체 형태로 상처에 투여될 수 있고, 이후 별도의 드레싱이 적용될 수 있다. 따라서, 간단한 일 실시예에서, 키트는 단순히 동결건조된 박테리아를 포함하는 제 1 용기 또는 컨테이너와 박테리아의 재구성을 위한 액체를 함유하는 제2 용기 또는 컨테이너를 포함할 수 있음을 알 수 있다. 선택적으로, 키트는 제2 용기에 또는 별도의 제3 용기 또는 컨테이너에 함유된 유도인자를 또한 함유할 수 있다.

[0086] 따라서, 예를 들어 상기 프로바이오틱 제품은 바람직하게는 유산균 균주에서 발현되도록 단백질의 발현을 활성화할 수 있는 활성 펩티드를 포함한다. 상기 활성 펩티드는 바람직하게는 펩티드 SppIP (즉, SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 펩티드)이다.

[0087] 피부 상처의 경우, 상기 상처 드레싱은 한 칸에는 동결건조된 박테리아를 포함하고 다른 한 칸에는 활성 펩티드를 포함할 수 있다. 상처에 적용하는 경우, 두 구획은 서로 합쳐져 박테리아가 활성 펩티드와 접촉된다. 선택적으로, 박테리아는 방수 석고의 접착면 또는 삼출물과 접촉하는 드레싱면 상에 겔-유사 구조로 함유될 수 있다. 사용 시, 활성 펩티드는 수동으로 박테리아에 적용되고 석고 또는 드레싱은 상처 영역에 적용된다.

[0088] 생존 박테리아는 또한 하이드로콜로이드, 예를 들어 천연 젤라틴에 포함된다. 박테리아는 하이드로콜로이드, 예를 들어 가소화 및 건조된 젤라틴 필름 내로 가교결합됨으로써 삽입될 수 있고, 수화될 때까지 저장하는 동안 생존력이 유지된다. 생존 박테리아는 또한 가교결합된 전기방사 하이드로겔 섬유 내에 캡슐화될 수 있다. 이 형태에서, 박테리아는 동결건조할 필요가 없다.

[0089] 위장관의 상처의 경우, 적어도 두 개의 분리된 구획을 포함하는 정제가 고안되며, 여기서 한 칸은 동결건조 박테리아를 포함하고, 나머지 다른 칸은 액체와 활성 펩티드를 포함한다. 정제는 섭취 전에 짜내서 두 구획을 분리하는 내부 멤브래인을 깨뜨리고 내용물을 혼합한다. 구강 내 (예를 들어, 잇몸) 상처를 위해, 본 발명의 박테리아는 고점성의 페이스트로 투여될 수 있다.

[0090] 구체적으로, 피부에 국소 투여하기 위한 제형은 약학적으로 허용가능한 담체에 투여되도록 연고, 크림, 겔, 및 페이스트를 포함할 수 있다. 국소 제형은 당해 기술분야에 공지된 바와 같이 유성 또는 수용성 연고기제를 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 이들 제형은 식물성 오일, 동물성 지방, 더욱 바람직하게는 석유로부터 수득되는 반고체 탄화수소를 포함할 수 있다. 사용되는 특정 성분은 백색 연고, 황색 연고, 아세틸 에스테르 왁스, 올레산, 올리브 오일, 파라핀, 바셀린, 백색 바셀린, 경랍, 전분 글리세라이트, 백색 왁스, 황색 왁스, 라놀린, 무수 라놀린, 및 글리세릴 모노스테아레이트를 포함할 수 있다. 예를 들어 글리세롤 에테르 및 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리옥실 40 스테아레이트, 및 폴리소르베이트를 포함하는 다양한 수용성 연고기제도 사용될 수 있다.

[0091] 박테리아 균주는 상처에 활성 물질을 전달하기 위한 기질, 고체 지지체, 및/또는 상처 드레싱 상에 그리고/또는 내부에 제공될 수 있다. 고체 지지체 또는 기질은 의료장치 또는 이의 일부일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "기질" 또는 "고체 지지체" 및 "상처 드레싱"은 제조 및 상처에 적용 시 보호, 흡수, 배수 등을 위한 임의의 기질을 광범위하게 말한다.

[0092] 일 실시예에서, 본 발명은 형질전환된 박테리아 균주와 결합되거나 이를 포함하는 상처 치유 물질 또는 드레싱을 제공하고, 드레싱은 본 발명의 형질전환된 박테리아를 투여하기 위한 비히클이다. 선택적으로, 비히클은 석고 또는 붕대일 수 있다. 본 발명은 상업적으로 이용가능한 수많은 종류의 기질 및/또는 지지체 중 어느 하나를 포함할 수 있고, 상처 치유 물질의 선택은 치료될 상처의 특성에 따라 달라지게 된다. 가장 일반적으로 사용되는 상처 드레싱은 하기에 간략하게 기재하였다.

[0093] 투명 필름 드레싱은, 예를 들어 폴리우레탄, 폴리아미드, 또는 젤라틴으로 구성된다. 이러한 합성 필름은 수증기 산소 및 다른 기체에는 투과성이지만 물과 박테리아에는 비투과성이며, 흡수성이 낮고 삼출물이 적은 상처에 적합하며), 하이드로콜로이드 (폴리우레탄 발포체에 결합된 친수성 콜로이드 입자), 하이드로겔 (약 적어도 60%의 물을 함유하는 교차결합 폴리머는 더 높은 흡수성을 가지고 상처 부위로부터 독성 성분을 제거하고 상처 영역의 습도와 온도를 유지함), 발포체 (친수성 또는 소수성, 예를 들어 폴리우레탄 발포체의 변형을 통해 생산된 고분자 발포체 드레싱은 우수한 흡수성을 가지고 수증기에 투과됨), 알긴산칼슘 (해조콜로이드 유래 알긴산칼슘

의 섬유의 비-직조 합성물인, 알긴산 염류는 메우 높은 흡수력을 가진다. 이들은 또한 알긴산염과 삼출물 사이의 이온-교환이 불용성 알긴산칼슘을 가용성 알긴산나트륨으로 변환시키기 때문에 자가융해성 창상 절제를 촉진하며, 습기를 갖는 상처 부위, 상처 치유에 이상적인 손상되지 않은 표면을 제공한다.) 및 셀로판 (가소제를 포함하는 셀룰로오스)이 있다. 상처의 모양 및 크기가 측정될 수 있고, 상처에 대해 측정치를 바탕으로 정확한 부위에 맞춤화된 상처 드레싱이 상처에 제공될 수 있다. 상처 부위가 기계적 강도, 두께, 민감도 등의 측면에서 다를 수 있기 때문에, 기질은 기구 및/또는 부위의 다른 요구를 특이적으로 처리하도록 만들어질 수 있다. 예를 들어, 기질의 두께는 고도로 분산된 위치, 예를 들어 손가락 끝에 대해 최소화될 수 있다. 다른 상처 부위, 예를 들어 손가락, 발목, 무릎, 팔꿈치 등은 더 높은 기계적 스트레스에 노출될 수 있고, 다층의 기질을 필요로 한다.

[0094] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 박테리아 균주를 이를 필요로 하는 인간 또는 동물 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 인간 또는 동물 개체에서 상처 치유를 위한 방법을 제공한다. 상기 박테리아 균주는 바람직하게는 본원에 전술된 바와 같이 약학적 조성물 또는 상처 드레싱에 포함된다. 이와 같은 방법에서, 인간 또는 동물 개체는 바람직하게는 감소된 말초혈액관류, (말초동맥질환), 고혈당증 또는 신경병증과 같은 약화된 상처 치유를 야기하는 근본적인 질환으로 인해 상처 치유를 필요로 한다.

[0095] 하기 실시예에서 수득되고 포함된 결과는 발명의 이점을 입증한다. 특히, 개선된 상처 치유 (예를 들어, 보다 양호하거나 보다 빠른 상처 봉합 측면에서)가 예를 들어, 직접 단백질 제조 (즉, 단순 단백질, 박테리아 없음) 또는 박테리아만 단독 (단백질을 발현하도록 변형되지 않은 박테리아, 예를 들어 재조합 플라스미드를 함유하지 않음)인 경우와 비교하여 본 발명의 단백질-발현 형질전환 박테리아를 사용함으로써 수득될 수 있다. 또한, 개선된 효과는 박테리아가 상처에 투여될 때, 형질전환된 박테리아 배양물로부터 수득된 상층액의 투여에 비해 나타날 수 있다. 따라서, 단백질을 발현하는 유산균 숙주를 이용하여 상처에 단백질을 전달하는 것이 유리하다. 이는 상승효과가 있는 것으로 판단된다. 즉, 상처 치유에 대한 박테리아의 효과와 단백질의 효과 사이에 상승효과가 있을 수 있다. 따라서, 일부 실시예에서, 형질전환되지 않은 해당 박테리아 (즉, 플라스미드를 함유하지 않음)의 효과와 단백질로 제공된 (즉, 원 위치에서(*in situ*) 박테리아로부터 발현되지 않음) 단백질의 효과에 비례하여 상처에 대한 형질전환된 박테라아의 누적효과보다 더 큰 효과가 있을 수 있다.

[0096] 이러한 측면에서, 예를 들어 상처 부위에서 pH를 낮추는 박테리아의 효과는 단백질의 활성을 증가 또는 강화 또는 촉진하는데 도움을 줄 수 있는 것으로 판단된다. 이론에 얽매이는 것을 바라지는 않지만, 추가로 본 발명에 따른 형질전환된 박테리아의 투여는 상처 부위에서 대식세포 활성을 촉진하는데 이로운 효과를 나타낼 수 있는 것으로 판단된다. 예를 들어, 대식세포의 수를 증가시킬 수 있다.

[0097] 형질전환된 박테리아의 상처 치유에 대한 효과는 즉각적이거나 그렇지 않을 수 있고, 효과를 나타내는데 다소 시간 (개선된 상처 치유가 관찰되기 전에, 예를 들어 효과를 나타내는데 1, 2, 3, 4, 5 또는 6 또는 그 이상, 또는 더 긴 시간, 예를 들어 8, 10, 12, 15, 18, 20 또는 24시간 또는 그 이상, 또는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 또는 그 이상, 또는 더 길게, 예를 들어 8, 10, 12, 15, 18, 20 또는 24일 또는 그 이상)이 걸릴 수 있다. 노인의 만성 상처는 처리군과 대조군 사이에서 차이를 보이는데 더 긴 시간이 걸릴 수 있고, 예를 들어 약 12주가 걸릴 수 있다.

[0098] 본 발명의 특별히 중요한 유용성은 만성 상처, 특히 궤양의 치료 및 특히 당뇨성 족부 궤양의 치료에 있다.

[0099] 당뇨병을 앓고 있는 사람의 만성 족부 궤양의 유병률은 약 18%이다. 2013년에, 유럽 인구는 7억 4250만에 도달하였고, 당뇨병 환자 수는 3270만명이며, 이 중 290만-580만명이 만성 족부 궤양을 앓고 있다. 이러한 유형의 궤양의 평균 지속기간은, 표준 치료를 받은 경우 상처의 25% 미만이 12주 이내에 치료되는 몇 개월 범위이다. 이 질환의 최종 단계는 영향을 받은 다리의 절단이다. 오늘날 만성 족부 궤양을 앓고 있는 사람들의 치료는 1차 진료, 홈 케어, 양로원, 친척, 자가 관리 및 상처 클리닉 내원으로 나누어진다. 현재 치료법은 오프-로딩(off-loading), 수술적 창상 절제를 이용한 죽은 조직의 제거, 상처 드레싱의 반복적인 교체, 전신성 항생제에 의존하고, 특별한 경우에는 살아있는 유충 또는 콜라게나아제로 처리하며 스웨덴의 몇몇 지역에서 고압산소 치료가 제공될 수 있다. 근본적인 원인이 또한 더 큰 동맥의 장애를 포함하는 경우, 정맥 이식으로 우회하여 외과적으로 교정될 수 있다. 오늘날 상처는 2일 또는 3일마다 치료된다. 임의의 제안된 형태 또는 제형으로 제안된 변형 유산균을 처리하는 것은 이러한 실질적인 일상을 방해하지 않는다. 따라서, 본 발명의 처리에 의한 이러한 상처의 개선된 치유는 상당한 경제적 이익이 될 뿐만 아니라, 환자에게 개인적인 이득이 된다.

[0100] 박테리아는 활성이고 생체 내(*in vivo*)에서 일정 기간 동안 (예를 들어, 약 1시간) 상처 표면에 코딩된 단백질을 생성하고 전달한다. 이후 박테리아는 불활성화되고 죽는다. 느린 또는 죽은 유산균은 드레싱이 정상으로 바

뀔 때까지 상처/드레싱 환경에서 위험을 나타내지 않을 수 있다.

[0101] 본 발명에 따른 생물치료제 (biotherapeutic)는 단백질 약물 합성물과 비교하여 현저하게 낮은 생산 비용을 가질 것이다. 이는 생물치료제가 스스로 상처에 활성 단백질을 생성하기 때문이다.

[0102] 발의 기능 상실을 동반하는 당뇨성 족부 궤양과 같은 개방형 상처는 상당한 불편을 야기하고, 심지어 환자에게 장애를 유발하며, 상당한 위험 또는 감염, 이에 따라 연장된 항생제의 사용 및 최후에는 절단 수술에 이르는, 생활의 질에 상당히 부정적인 영향을 미친다. 따라서, 상처 치유는 환자에게 굉장한 개인적 이득이 되고, 항생제 사용 (결과적으로 항생제 내성의 확산)도 줄여주는 이점을 갖는다. 본 발명에 따라 상기 만성 상처를 치료하는 것은 상처에 내인성 경고 신호를 증폭시킬 수 있고 지연된 또는 만성 상처의 치료 과정을 촉진할 수 있으며, 치료 시간을 단축시킬 수 있는 것으로 판단된다.

[0103] 추가로, 본 발명은 의료진에 의한 사용의 유연성 및 용이성에 이점을 가질 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0104] 본 발명에 따른 대표적인 방법 및 바람직한 실시예는 하기 비제한적인 실시예 및 도면을 참조하여 추가로 기술될 것이다:

도 1. OD 0.285 및 0.51에서 시작해서 10 또는 50 ng/ml의 프로모터 활성 펩티드 SppIP를 첨가하여 밤새 배양하고 재접종된 mLrCK1 락토코커스 락티스 (*Lactococcus lactis*)에서의 시간 경과에 따른 성장 (A) 및 pH (B).

도 2. OD 0.5에서 시작하여 밤새 배양하고 재접종된 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC에서 시간에 따라 바이오이미징으로 시험관 내 (*in vitro*)에서 측정한 pLAB112_Luc의 발현. 시간 0에서 기준 이미지를 획득하였다. 이후 프로모터 활성 펩티드 SppIP (50 ng/ml) 및 기질 D-루시페린 (150 μg/ml)을 즉시 첨가하였다. 플레이트를 5분에서 그리고 매 30분 마다 1400분 동안 이미지화하였다. 모든 샘플에 사용된 배지는 MRS이다. 펩티드는 프로모터 활성 펩티드 SppIP이다. 각 그룹은 8개의 샘플로 구성된다.

도 3. OD 0.5에서 시작해서 밤새 배양하고 재접종하여 1일 된 피부 전층 상처에 적용된 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC에서 pLAB112_Luc의 발현. 생체 내(*in vivo*) 발현은 시간이 경과함에 따라 비침습적 바이오이미징으로 측정하였다. 1일된 피부 전체 두께 상처를 갖는 5마리의 마취된 마우스에서 시간 0의 기준 이미지를 획득하였다. 그 다음, 프로모터 활성화 펩티드 SppIP (50 ng/ml) 및 기질 D-루시페린 (150 μg/ml)으로 활성화된 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) R2LC_ pLAB112_Luc 25 μℓ를 상처 중간에 첨가하고 5분에서 그리고 매 15분 마다 270분 동안 이미지화하였다.

도 4. 건강한 마우스에서 상처 치유 시간. 50 % (A), 75 % (B) 또는 완전히 (100 %) (C) 상처 표면이 치유된 시간, 모든 그룹은 n=5, A, B, C, 일원분산분석, 본페로니는 모든 컬럼을 비교한다.

도 5. 건강한 마우스에서 시간 경과에 따른 상처 크기 (A) 및 상처 노출 (B). 눈금을 포함하는 이미지로 매일 측정한 상처 크기, 모든 그룹은 n=5이다. A, 이원분산분석, 본페로니는 모든 컬럼을 비교하고, d0-d5가 분석되었다. 시간 및 처리로 인한 변화. 대조군과 비교하여 d1 및 d2에 R2LC_pLAB112_LrCK1.4에 의해 감소된 상처 크기. B, 일원분산분석, 본페로니는 모든 컬럼을 비교하고, 모든 날이 분석되었다. 전체 치료 과정 동안 R2LC_pLAB112_LrCK1.4에 의해 감소된 상처 노출.

도 6. 상처 유도 전 대퇴동맥 결찰에 의한 허혈 유도, 모든 그룹에서 n=4이다. 시간 경과에 따른 마취된 마우스의 허혈성 다리 (A) 및 대측의 영향을 받지 않은 해당 다리 (B)에서 Laser Speckle Contrast Analysis를 이용하여 측정한 혈류. 데이터는 관류 단위 (PFU)로 표현된다. A 및 B, 이원분산분석, 본페로니는 모든 컬럼을 비교하고, d0-d7에서 분석되었다. 시간 또는 처리에 의한 변화는 관찰되지 않았다.

도 7. 상처 유도 당시 허혈을 앓고 있던 마우스에서 상처 치유에 대한 시간. 50% (A), 75 % (B) 또는 완전히 (100 %) (C) 상처 표면이 치유되는 시간, 모든 그룹은 n=4이다. A, B, C, 일원분산분석, 본페로니는 모든 컬럼을 비교한다.

도 8. 상처 유도 당시 그 위치에 국소 허혈을 갖는 마우스에서 시간 경과에 따른 상처 크기 및 상처 노출. 상처 크기는 눈금을 포함하는 이미지로부터 매일 측정되었고, 모든 그룹은 n=4이다. A, 이원분산분석, 본페로니는 모든 컬럼을 비교하고, d0-d7에서 분석되었다. 시간 및 처리로 인한 변화. 대조군과 비교하여 d1및 d2에 R2LC_pLAB112_LrCK1.4 상처 크기 감소. B, 일원분산분석, 본페로니는 모든 컬럼을 비교하고, 모든 날에서 분석되었다. 전체 치료 과정 동안 R2LC_pLAB112_LrCK1.4에 의한 상처 노출 감소.

도 9. 알록산 모노하이드레이트의 단일 정맥 주사로 당뇨병을 유도한 후 체중 (A) 및 혈당 (B). 당뇨 대조군은 n=4, 당뇨 R2LC_pLAB112_Luc는 n=5, 당뇨 R2LC_pLAB_LrCK1.4는 n=4이다. A 및B, 이원분산분석, 본페로니는 모든 컬럼을 비교하고, d0-d6에서 분석되었다. 치간 또는 처리로 인한 변화는 관찰되지 않았다.

도 10. 상처 유도 시 당뇨를 앓고 있던 마우스에서 상처 치유에 대한 시간. 50% (A), 75 % (B) 또는 완전히 (100 %) (C) 상처 표면이 치유되는 시간, 당뇨 대조군은 n=4, 당뇨 R2LC_pLAB112_Luc는 n=5, 당뇨 R2LC_pLAB_LrCK1.4는 n=4이다. A, B, C, 일원분산분석, 본페로니는 모든 컬럼을 비교한다.

도 11. 상처 유도 시 당뇨를 앓고 있던 마우스에서 시간 경과에 따른 상처 크기 및 상처 노출. 상처 크기는 눈금이 포함된 이미지로부터 매일 측정되었고, 당뇨 대조군은 n=4, 당뇨 R2LC_pLAB112_Luc는 n=5, 당뇨 R2LC_pLAB_LrCK1.4는 n=4이다. A, 이원분산분석, 본페로니는 모든 컬럼을 비교하고, d0-d7에서 분석되었다. 시간에 의한 변화. B, 일원분산분석, 본페로니는 모든 컬럼을 비교하고, 모든 날에 분석되었다. 차이없음. (p=0.08).

도 12. pSIP411 플라스미드.

도 13. 11일 동안 비침습적 바이오이미징 (IVIS Spectrum)에 의한 발광 신호의 검출을 이용한 상처 가장자리 진피 (40 μg DNA)에서 플라스미드 발현의 정량화 (n=10).

도 14. 건강한 마우스에서 상처 치유에 대한 시간. 50% (A), 75 % (B) 또는 완전히 (100 %) (C) 상처 표면이 치유되는 시간(n=8 pCTR, n=9 pCXCL12). A, B, C, 스튜던트 비쌍체 양측 t 검정.

도 15. 건강한 마우스에서 시간 경과에 따른 상처 크기 (A) 및 상처 노출 (B). 상처 크기는 눈금을 포함하는 이미지로부터 매일 측정하였다 (n=8 pCTR, n=9 pCXCL12). (A) 이원분산분석, 본페로니는 모든 컬럼을 비교하고, d0-d7에서 분석되었다. 시간에 의한 변화. (B) 스튜던트 양측 비쌍체 t 검정. 전체 치료 과정 동안 pCXCL12에 의한 상처 노출이 감소되는 경향 (p=0.08).

도 16. 광학 밀도 (OD) 및 ml 당 콜로니 형성 단위 (CFU/ml)로 표현된 락토바실러스 루테리 (Lactobacillus reuteri) R2LC에 대한 박테리아 농도의 측정.

도 17. 서로 다른 농도의 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_LrCK1.4로 처리한 건강한 마우스에서의 시간 경과에 따른 상처 크기 (A) 및 상처 노출 (B). 상처 크기는 눈금이 포함된 이미지로부터 매일 측정되었다. A, 이원분산분석, 본페로니는 모든 컬럼을 비교하고, d0-d2에서 분석되었다. 시간 및 처리에 의한 변화. (A) 이원분산분석 본페로니는 모든 컬럼을 비교하고, (B) 일원분산분석 본페로니는 모든 컬럼을 비교한다 ($p<0.05$). 미처리 상ㅊ와 비교하여 OD 0.2, 0.5, 1.0 및 1.25에서 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC__pLAB112_LrCK1.4의 처리에 의한 상처 노툴 감소. (대조군, n=15; OD 0.2, n=4; 0.5, n=10, OD 1.0, n=4; OD 1.25, n=5).

도 18. 이틀 동안 하루에 한 시점에서 서로 다른 농도의 쥐 CXCL12 1α로 처리된 건강한 마우스에서 시간에 따른 상처 크기 (A) 및 상처 노출 (B). 상처 크기는 눈금을 포함한 이미지로부터 매일 측정하였다. A, 이원분산분석, 본페로니는 모든 컬럼을 비교하고, d0-d2에서 분석되었다. 시간에 의한 변화. B, 첫 이틀 동안의 상처 노출 (대조군, n=15; 0.2 μg CXCL12 1α, n=4; 0.6 μg CXCL12 1α, n=5, 1.0 μg CXCL12 1α, n=4).

도 19. 매일 한 시간 동안 10분 마다 0.2 μg의 재조합 단백질로 처리한 건강한 마우스에서 시간에 따른 상처 크기 (A) 및 상처 노출 (B). 상처 크기는 눈금을 포함한 이미지로부터 매일 측정하였다. A, 이원분산분석, 본페로니는 모든 컬럼을 비교하고, d0-d2에서 분석되었다. 시간에 의한 변화. B, 첫 이틀 동안의 상처 노출. (미처리, n=15; CXCL12 1α, n=6; CXCL17, n=9, Yml, n=9).

도 20. 피부 표피 펀치 생검 상처에서 측정된 재상피화. 패널 A는 미처리, 또는 LB_Luc 또는 LB_LrCK1로 처리한 표피 상처를 포함하는 피부 디스크를 24시간 배양한 후 배양 배지에서 측정한 pH를 보여준다. 패널 B는 배양 14일 후 노출된 표피 위의 상처 가장자리로부터 성장한 새롭게 형성된 표피 슬리브의 길이를 보여준다. *은 차이를 나타내고, 일원분산분석 본페로니는 선택된 컬럼을 비교한다 ($p<0.05$).

도 21. 동결건조 상태로부터 재생 직후 시간에 따라 바이오이미지로 시험관 내 (*in vitro*) 측정한 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC에서의 pLAB112_Luc의 시험관 내 (*in vitro*) 발현. 시간 0에서 기준 이미지를 획득하였다. 이후 프로모터 활성 펩티드 SppIP (50 ng/ml)와 기질 D-루시페린 (150 μg/ml)를 바로 첨가하였다. 플레이트는 5분에 이미지화하였고, 이후 930분 동안 매 5-15분마다 이미지화하였다. 모든 샘플에 사용된

배지는 MRS이다. 펩티드는 프로모터 활성 펩티드 SppIP이다. 각 그룹은 4개의 샘플로 구성된다.

도 22. 동결건조 상태로부터 재생하고 1일 된 피부 전층 상처에 적용한 직후 시간에 따라 바이오이미지로 생체 내 (*in vivo*) 측정한 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC에서의 pLAB112_Luc의 생체 내 (*in vivo*) 발현. 그 다음 프로모터 활성 펩티드 SppIP (50 ng/ml)와 기질 D-루시페린 (150 ㎍/ml)으로 활성화된 25 ㎕ 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_ pLAB112_Luc를 상처 중간에 첨가하였고, 마우스를 5분에서 이미지화하였고, 이후 270분 동안 매 15분마다 이미지화하였다.

도 23. 동결건조되고, 재생된 다음 유도된 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_LrCK1.4로 처리한 건강한 마우스에서 시간에 따른 상처 크기 (A) 및 상처 노출 (B). 상처 크기는 눈금을 포함하는 이미지로부터 매일 측정하였다. (A) 이원분산분석, 본페로니는 모든 컬럼을 비교하고, d0-d2에 분석되었다. 시간 및 처리에 의한 변화. (B) 일원분산분석 본페로니는 모든 컬럼을 비교한다 ($p<0.05$). 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_Luc에 비해 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_LrCK1.4로 처리한 후 감소된 상처 크기가 관찰되었고, 이때 박테리아는 동결건조되고 바로 재생된 다음 유도되어 상처에 적용되었다 (R2LC_pLAB112_Luc, n=4, R2LC_pLAB112_LrCK1.4, n=5).

도 24. 건강한 마우스에서 시간 경과에 따른 상처 크기 (A) 및 상처 노출 (B). 상처 크기는 눈금이 포함된 이미지로부터 매일 측정되었다. 변화는 시간과 처리로 인한 것이며 pH 7.35의 현탁액과 비교하여 pH 6.35의 CXCL12 1α에 의해 상처 크기가 감소되는 경향이 있다 ($p=0.07$) (pH 7.35; n=8, pH 6.35; n=5, pH 5.35; n=4). 일원분산분석, 본페로니는 모든 컬럼을 비교한다.

도 25. 건강한 마우스에서 시간 경과에 따른 상처 크기 (A) 및 상처 노출 (B). 상처 크기는 눈금이 포함된 이미지로부터 매일 측정되었다. 관찰된 변화는 오직 시간으로 인한 것이며 두 개의 서로 다른 박테리아 현탁액 (R2LC_pLAB112_Luc; n=4, R2LC_pLAB112_LrCK1; n=5) 사이에 다른 점은 없었다. 스튜던트 양측 비쌍체 t 검정.

도 26. 상처가 OD 0.5, 1.0, 및 OD 1.25의 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_LrCK1로 처리한 진피 (A), 표피 (B) 및 모낭 (C)에서 상처 유도 이틀 후 상처 바로 옆 피부 부위의 CXCL12 1α 수준 측정. 일원분산분석, 본페로니는 모든 컬럼을 비교한다.

도 27. 대조군 상처 및 OD 0.5, 1.0, 및 OD 1.25의 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_LrCK1로 처리된 상처에서 상처 유도 이틀 후 상처 옆 피부의 진피 (A) 및 표피 (B)에서 $F4/80^+$ 대식세포의 밀도 측정. (대조군, n=15; 0.5, n=10, OD 1.0, n=4; OD 1.25, n=5). 일원분산분석, 본페로니는 ㅁ모든 컬럼을 비교한다.

도 28. 건강한 마우스에서 상처 치유 시간. 상처는 pLAB112 (L.L_pLAB112_LrCK1)로 형질전환된 락토바실러스 락티스 (*Lactococcus Lactis*) 또는 대조군 락토바실러스 락티스 (*Lactococcus Lactis*)로 처리하였다. 50% (A), 75% (B) 또는 완전히 (100%) (C) 상처 표면이 치유된 시간, 두 그룹 모두 n=5이다. 스튜던트 양측 비쌍체 t 검정.

도 29. 건강한 마우스에서 시간 경과에 따른 상처 크기 (A) 및 상처 노출 (B). 상처 크기는 눈금을 포함하는 이미지로부터 매일 측정되었고, 두 그룹 모두 n=5. 변화는 시간과 처리로 인한 것이며 상처 크기는 대조군 락토코커스 락티스 (*Lactococcus Lactis*)와 비교하여 d1 내지 d4에서 L.L_pLAB112_LrCK1에 의해 감소된다. 스튜던트 양측 비쌍체 t 검정.

도 30. 1시간 동안 재조합 케모카인으로 처리한 건강한 마우스에서 상처 치유 시간. 50% (A), 75% (B) 또는 완전히 (100%) (C) 상처 표면이 치유된 시간 (대조군; n=11, mCXCL12 1α; n=6, mCXCL17; n=8, mYm1; n=9). 일원분산분석, 본페로니는 모든 컬럼을 비교한다.

도 31. 1시간 동안 재조합 케모카인으로 처리한 건강한 마우스에서 시간 경과에 따른 상처 크기 (A) 및 상처 노출 (B). 상처 크기는 눈금이 포함된 이미지로부터 매일 측정되었다 (대조군; n=11, mCXCL12 1?; n=6, mCXCL17; n=8, mYm1; n=9). 변화는 시간 및 처리로 인한 것이며 상처 크기는 대조군과 비교하여 CXCL12 1α, CXCL17 및 Ym1에 의해 감소된다. 일원분산분석, 본페로니는 모든 컬럼을 비교한다.

도 32. 미처리 또는 서로 다르게 처리한 건강한 마우스에서 첫 24시간 동안의 상처 봉합. (비처리, n=15; 0.2 ㎍ CXCL12 1α, n=4; 0.6 ㎍ CXCL12 1α, n=5; 1.0 ㎍ CXCL12 1α, n=4; 0.2 ㎍ CXCL12 1α 1hr, n=6; 0.2 ㎍ CXCL17 1hr, n=9, 0.2 ㎍ Ym1 1hr, n=9; R2LC_pLAB112_Luc OD 0.5, n=4; R2LC_ pLAB112_LrCK1.4 OD 0.2, n=4; R2LC_pLAB112_LrCK1.4 OD 0.5, n=10, R2LC_pLAB112_LrCK1.4 OD 1.0, n=4; R2LC_pLAB112_LrCK1.4 OD 1.25;

n=5, 동결건조된 R2LC_pLAB112_Luc, n=4, 동결건조된 R2LC_pLAB112_LrCK1.4, n=5, R2LC_pLAB112_Luc 상층액; n=4, R2LC_pLAB112_LrCK1.4 상층액, n=5, pCTR n=8; pCXCL12, n=9). 이 데이터세트에 대한 통계 분석은 이루어지지 않았다.

도 33. DSS-유도 질환 활성의 일간(daily) 평가 (A) 및 1-7일에서 총 질환 부담 평가 (B). 비히클로 처리한 대조군과 비교하여 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) pLAB112_Luc 및 pLAB112_LrCK1.4의 처리에 의한 DSS-유도 대장염 질환 활성의 유사한 개선 (DSS+비히클; n=5, DSS+R2LC_pLAB112_Luc; n=6, DSS+R2LC_pLAB112_LrCK1.4; n=7), 일원분산분석, 본페로니는 모든 컬럼을 비교한다.

도 34. DSS-유도 질환 활성의 일간(daily) 평가 (A) 및 1-8일에서 총 질환 부담 평가 (B). 종래에 설명된 바와 같이 (참고문헌 16), 질병 활성은 관련 임상 증상을 측정하여 평가하였다. 화살표는 치료의 개시를 나타낸다. pLAB112_Luc (DSS+R2LC_pLAB112_Luc; n=6, DSS+R2LC_pLAB112_LrCK1.4; n=6)로 처리한 것과 비교하여 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) pLAB112_LrCK1.4의 처리에 의한 DSS-유도 대장염 질환 활성의 개선, 스튜던트 양측 비쌍체 t 검정.

도 35. 시간 0, 그리고 미처리, R2LC Luc 또는 R2LC LrCK1로 처리한 후 24시간에 건강한 마우스에서 유도된 전층 피부 상처 (지름 5 mm)의 대표 이미지. 이미지는 마취된 마우스에서 눈금을 포함하여 찍은 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0105] **실시예**

[0106] 재료 및 방법

[0107] *유전자 컨스트럭트 디자인 및 생산*

[0108] 플라스미드 백본 pLAB112 (pSIP411와 동일; Refs. 11 및 15; 표 1)은 라스 액셀슨 교수로부터 제공받았다 (노르웨이 식품 연구소). 락토코커스 락티스 (*Lactococcus lactis*) MG1363 박테리아는 pLAB112로 형질전환되고 24시간 동안 확장되었다. 그 다음 플라스미드를 정제하고 DNA 생산물을 겔 상에서 확인하였다.

표 1

[0109] pSIP411/pLAB112의 주요 특징

특징	위치 (SEQ ID NO: 20)
복제 결정요인 (레플리콘 영역)	260-2010
ermB (에리트로마이신 내성 마커)	2342-2840
$P_{spp}IP$ (유도성 프로모터)	3139-3290
sppK (히스티딘 단백질 키나아제)	3305-4647
sppR (반응 조절인자)	4653-5396
gusA (베타-글루쿠로니다아제)	5853-7658
$P_{orf}X$ (유도성 프로모터)	5689-5835
전사 종결인자	129-155; 5428-5460; 5602-5624
멀티클로닝 부위	1-35; 5851-5856; 7662-7673

[0110] 쥐 CXCL12-1α에 대한 서열은 DNA2.0 (Menlo Park, CA, USA)을 사용하여 스웨덴 농과대학 (SLU)의 스테판 루스에 의해 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*)에서 번역을 위해 최적화되었다. 최적화된 서열 (SEQ ID NO: 1)은 플라스미드 벡터 pJ204에서 DNA 2.0에 의해 합성되었다. 인간 CXCL12-1α, 쥐 CXCL17, 인간 CXCL17, 쥐 Ym1 및 인간 Ym1에 대한 서열은 GenScript (Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 SLU의 스테판 루스에 의해 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*)에서 번역을 위해 최적화 되었다. 최적화된 서열은 SEQ ID NO: 4 (인간 CXCL12-1α); SEQ ID NO: 7 (쥐 CXCL17); SEQ ID NO: 10 (인간 CXCL17); SEQ ID NO: 13 (쥐 Ym1); 및 SEQ ID NO: 16 (인간 Ym1)에 기재된 바와 같다.

[0111] 프라이머는 pLAB112에 인서트 (hCXCL12opt), 171 bp를 탐지하기 위해 디자인 되었다:

[0112] 5' GCAGCCTTAACAGTCGGCACCT3' (SEQ ID NO: 22);

[0113] 5'ACGTGCAACAATCTGCAAAGCAC3' (SEQ ID NO: 23).

[0114] 인서트의 말단은 또한 분자 프로세싱 (molecular processing)을 계속하기 위해 최적화되어 인서트는 신규 벡터 pLAB112에 적합하다. 최적화된 mCXCL12opt 서열을 플라스미드 PJ204에 전달하였다. 대장균 (*E. coli*) PK401은 pJ204로 형질전환 시켰다. 플라스미드 (pLAB112 and pJ204)를 NEB2 버퍼에서 제한효소 *Xho*I 및 *Nco*I으로 절단하였다. 이후 단편 mCXCL12opt를 겔 상에서 정제하였다. mCXCL12opt 인서트를 T4 DNA 리가아제를 사용하여 pLAB112 벡터에 연결시켜 컨스트럭트 mLrCK1를 제조하였다. pLAB112 벡터에서 인서트 컨스트럭트를 PCR로 확인하였다. 그 다음 컨스트럭트를 서열 분석으로 확인하였다 (마크로젠). 마지막으로, 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) 균주 R2LC 및 DSM 20016를 mLrCK1로 형질전환시키고 컨스트럭트에 대해 양성인 두 개의 R2LC 클론 (4 및 7)을 모으고 이들 콜로니로부터의 플라스미드 mLrCK1 (현재 mLrCK1.4 및 mLrCK1.7)를 다시 서열 분석으로 확인하였다 (마크로젠).

[0115] 플라스미드 hLrCK1, mLrCK2, hLrCK2, mLrMP1 및 hLrMP2를 동일한 프로토콜 및 절차에 따라 유사한 방식으로 생성하였다 (하기 표 2를 참조한다).

표 2

[0116] 플라스미드 개요

플라스미드	설명
pLAB112	pSIP411와 동일 (참고문헌 15 및 SEQ ID NO: 20)
mLrCK1	최적화된 mCXCL12-1α 인서트를 포함하는 pLAB112
mLrCK1.4	형질전환된 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC 클론 4 유래 mLrCK1
mLrCK1.7	형질전환된 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC 클론 7 유래 mLrCK1
hLrCK1	최적화된 hCXCL12-1α 인서트를 포함하는 pLAB112
mLrCK2	최적화된 mCXCL17 인서트를 포함하는 pLAB112
hLrCK2	최적화된 hCXCL17 인서트를 포함하는 pLAB112
hLrMP1	최적화된 인간 Ym1 인서트를 포함하는 pLAB112
mLrMP2	최적화된 쥐 Ym1 인서트를 포함하는 pLAB112
pLAB112_Luc	루시페라아제 인서트를 포함하는 pLAB112

[0117] *플라스미드 발현의 시험관 내 (In vitro) 분석*밤새 배양하고, 재접종하여 OD 0.5로 성장시킨 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC pLAB112_Luc를 96웰 플레이트에 도말하거나 (200 ㎕/웰) 동결건조된 제제로부터 즉시 재현탁하였다. 발광 강도는 비침습적 바이오이미징 (IVIS Spectrum, Perkin Elmer)을 사용하여 측정하였다. 시간 0에서 기준 이미지를 획득하였다. 그 다음 활성 펩티드 SppIP (50 ng/ml)와 D-루시페린 (150 ㎍/ml)을 즉시 첨가하였다. 이후 플레이트를 5분에 그리고 14000분 동안 매 30분 마다 이미지화 하였다. 데이터는 리빙 이미지 3.1 소프트웨어 (Perkin Elmer)를 사용하여 정량화 하였고, 비교 분석을 위해 이미징 파라미터를 유지하였다. 래디언스 (radiance)는 플라스미드 발현에 비례하는 것으로 간주하였다.

[0118] *동물*

[0119] 실험은 웁살라 지역 실험동물 윤리 위원회의 승인을 받았다. C57Bl/6 (Taconic) 및 C57Bl/6을 바탕으로 하는 (원래 잭슨 래보라토리가 출처인) CX3CR1$^{+/GFP}$ 마우스를 사용하였다. 실험을 진행하는 동안 동물은 물과 식이를 자유롭게 섭취하였다.

[0120] *상처 유도*

[0121] 마우스를 마취시키고 (1-3% 이소플루레인, 200 ml/분) 뒷다리의 털을 면도 후 제모 크림 (Veet®)을 1분 도포하고 물로 씻어내어 제거하였다. 멸균 펀치 생검 바늘 (직경 5mm)을 사용하여 전층 (표피, 진피 및 피하조직) 상처를 유도하였다. 국부적 국소 진통제 (Embla cream)를 처음 5일 동안 매일 적용하였다.

[0122] *국소 상처 치료*

[0123] 상처를 매일 25 ㎕ 식염수, 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC pLAB112_Luc 또는 R2LC pLAB112_LrCK1로 처리하였다. 박테리아를 밤새 배양하고, 재접종하여 OD 0.5로 성장시키고 활성 펩티드 SppIP (50 ng/ml)를 적용하기 5분 전에 예비 활성화시킨 다음 상처 표면 중간에 국소적으로 첨가하였다. 투여량 실험을 위해, 상처를 이틀 동안 매일 25 ㎕ 식염수 또는 밤새 배양하고 재접종하여 OD 0.5로 성장시키고, 적용하기

5분 전에 활성 펩티드 SppIP (50 ng/ml)로 예비활성화시키며, OD 0.2, 0.5, 1.0 또는 1.25의 농도에서 상처 표면의 중간에 국소적으로 첨가된 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC pLAB112_LrCK1로 처리하였다. 각각의 단백질에 대한 비교 실험을 위해, 상처를 매일 10㎕의 식염수 또는 쥐 CXCL12, CXCL17 또는 Ym1으로 처리하였다 (한 시간 동안 10분 간격으로 60 ㎕의 식염수에 용해된 총 200 ng의 단백질이 주어짐). CXCL12의 투여량 증가 연구를 위해, 200 ng, 600 ng 또는 1 ㎍을 10 ㎕의 식염수에 용해하여 하루에 한번 동시에 상처에 첨가하였다.

[0124] *플라스미드 발현의 생체 내 (In vivo) 분석*

[0125] 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC pLAB112_Luc를 밤새 배양하고, 재접종하여 OD 0.5로 성장시켰다. 발광 강도는 비침습적 바이오이미징 (IVIS Spectrum, Perkin Elmer)을 사용하여 측정하였다. 시간 0에서 기준 이미지를 획득하였다. 그 다음 25 ㎕의 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC pLAB112_Luc를 상처 중간에 첨가하였다. 박테리아를 활성 펩티드 SppIP (50 ng/ml)와 D-루시페린 (150 ㎍/ml)을 적용하기 5분 전에 예비 활성화 시켰다. 마우스를 270분 동안 매 15분 마다 이미지화하였다. 데이터는 리빙 이미지 3.1 소프트웨어 (Perkin Elmer)를 사용하여 정량화하였고, 비교 분석을 위해 이미징 파라미터를 유지하였다. 래디언스 (radiance)는 플라스미드 발현에 비례하는 것으로 간주하였다.

[0126] *상처 크기 및 외관 모니터링*

[0127] 상처의 크기 및 외관을 마취시킨 마우스 (1-3% 이소플루레인, 200 ml/분)에서 통상적인 사진을 획득하여 매일 모니터링하였다. 획득 시 이미지에 눈금이 포함되어 있고 상처 크기는 ImageJ (NIH의 무료 소프트웨어)를 사용하여 분석하였다. 상처의 크기가 <0.5 mm^2인 경우, 상처가 치료된 것으로 간주하였다.

[0128] *피부 혈류 모니터링*

[0129] 치유 상처를 갖는 전체 뒷다리의 혈류를 마취된 마우스에서 (1-3% 이소플루레인, 200 ml/분) 비침습적 Laser Speckle Contrast Analysis를 이용하여 측정하고 PIMSoft 3 (Perimed)로 데이터를 분석하였다. 다리를 (프레임 1.4 x1.4 cm) 20회로 평균화하여 10 이미지/초로 2분 동안 이미지화하였다. 데이터는 관류 단위 (PFU)로 표현하였다.

[0130] *관류 감소*

[0131] 마우스를 마취시키고 (1-3% 이소플루레인, 200 ml/분) 뒷다리 허혈을 표피 상복부 동맥 분지 위의 대퇴동맥 결찰 및 절제로 유도하였다.

[0132] *고혈당 유도*

[0133] 멸균 식염수에 즉시 용해된 알록산 모노하이드레이트의 1회 투여량 (8 mg/ml, 1 ㎕/g 체중)을 꼬리 정맥에 주사하였다. 혈당 및 체중을 실험이 진행되는 동안 매일 모니터링하였다. 고혈당은 혈당이 >16.7 mmol/l인 것으로 정의된다.

[0134] *통계 분석*

[0135] 데이터는 평균 ± SEM으로 나타내었다. host 테스트를 사용하여 시간에 따른 치유 과정을 분석한 후 본페로니를 포함하는 이원분산분석은 모든 컬럼을 비교한다. host 테스트를 사용하여 n>2의 그룹에서 한 시점에 치유 과정을 분석한 후 본페로니를 포함하는 일원분산분석은 모든 컬럼을 비교하고, 스튜던트 양측 비쌍체 t 검정을 이용하여 n=2인 경우 한 시점에서 치유과정을 분석한다. $p<0.05$는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0136] 실시예 1: 플라스미드 LrCK1로 형질전환된 박테리아의 성장

[0137] 밤새 배양하고, 재접종하여 OD 0.3 또는 0.5로 성장시킨 mLrCK1를 포함하는 락토코커스 락티스 (*Lactococcus lactis*)는 활성 펩티드 SppIP (SEQ ID NO: 19)를 10 또는 50 ng/ml로 첨가 시 성장 장애를 보이지 않았다. 이러한 성장 실험 동안, pH를 측정하였고 성장 단계에서 pH 저하가 가장 두드러졌으며 Mes-배지에서 성장 시 pH 6.7 정도에서 안정화되었다 (도 1). (피부의 pH=5,5, 상처에서의 pH=7.15-8.9, 여기서, 알칼리성 pH는 낮은 치유율과 연관되어 있다 (참고문헌 14))

[0138] 실시예 2: 플라스미드 pLAB112_Luc의 발현

[0139] 밤새 배양하고 재접종하여 2시간 동안 성장시킨 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC에서 플라스미드 pLAB112_Luc의 시험관 내(*in vitro*) 발현은 600분 이상 (10h.) 높은 상태로 유지되었다. 활성화 펩티드

SppIP로 활성화되지 않은 플라스미드로부터의 누출/발현은 없었다 (도 2).

[0140] 밤새 배양하고 재접종하여 2시간 동안 성장시킨 pLAB112_Luc를 포함하는 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC를 마취된 마우스의 1일된 피부 전층 상처에 두는 경우, 박테리아는 상처 부위에 제한되고 플라스미드 발현은 처음 1시간 동안 높았지만 신호는 4시간 이상 동안 검출되었다 (도 3).

[0141] 실시예 3: 건강한 마우스에서 개선된 상처 치유

[0142] 상처는 치료 과정 동안 매일 모니터링 되었다. 건강한 마우스에서 매일 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_mLrCK1.4를 1회 도포한 경우, 상처에 아무것도 도포하지 않은 대조군 마우스와 대조균인 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC (pLAB112_Luc)를 매일 도포한 마우스와 비교하여 75% 상처 표면 봉합 및 완전한 (100%) 상처 봉합에 대한 시간이 감소되었다 (도 4). 상처 치유에 미치는 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_mLrCK1.4의 영향은 상처 유도 후 첫 번째 날동안 가장 두드러졌다. 상처 크기는, 상처에 아무것도 도포하지 않은 대조군 마우스와 비교하여, 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_mLrCK1.4를 매일 도포함으로써 (상처 유도 1일 또는 2일 후) 추가로 감소되었다. 이 그룹에서, 커브 아래의 면적으로 측정된 총 상처 노출은 상처에 아무것도 도포하지 않은 대조군 마우스와 비교하여 감소되었다 (도 5). 도 35는 시간 0 및 미처리하거나 R2LC Luc 또는 R2LC LrCK1의 처리 24시간 후 건강한 마우스에서 유도된 전층 피부 상처 (직경 5㎜)의 대표 이미지를 보여준다.

[0143] 실시예 4: 손상된 조직 관류를 갖는 건강한 마우스에서의 개선된 상처 치유

[0144] 피부 관류는 상처가 유도된 다리의 대퇴동맥 결찰로 상처를 유도한 날에 50% 감소하였다 (도 6 및 표 3). 허혈을 갖는 마우스에서, 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_mLrCK1.4을 매일 1회 적용하는 경우, 대조균 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC (pLAB112_Luc)를 매일 적용한 마우스 뿐만 아니라 상처에 아무것도 적용하지 않은 대조군 마우스와 비교하여 50% 및 75% 상처 표면 봉합에 대한 시간이 감소하였다 (도 7). 또한, 감소된 피부 관류를 갖는 마우스에서 상처 치유에 대한 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_mLrCK1.4의 효과는 상처 유도 후 첫 번째 날 동안 가장 두드러졌고, 상처 유도 후 1일 및 2일에 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_mLrCK1.4를 매일 적용함으로써 상처에 아무것도 적용하지 않은 대조군 마우스에 비해 상처 크기가 감소하였다. 이 그룹에서, 총 상처 노출은 상처에 아무것도 적용하지 않은 대조군 마우스에 비해 감소하였다 (도 8).

표 3

[0145] 마취된 마우스에서 Laser Speckle Contrast Analysis로 측정된 기저 피부 관류. 데이터는 관류 (PFU)에서 단위 평균 ± SEM로 표현하였고, 모든 그룹은 n=4이다.

	건강한 마우스	허혈 마우스	감소(%)
대조군	62.5±4.3	34.0±1.8	46
R2LC_pLAB112_Luc	57.3±2.7	31.3±1.1	46
R2LC_pLAB112_LrCK1.4	65.0±7.2	30.8±0.4	52

[0146] 실시예 5: 고혈당 마우스에서의 개선된 상처 치유마우스에 알록산을 이용하여 당뇨병을 유발시켰고, 이들은 이후 상처 치유 과정 동안 고혈당 상태(>16.7 mmol/l)를 유지하였으며, 체중 감소는 없었다 (도 9). 당뇨병을 앓고 있는 마우스에서, 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_LrCK1.4를 매일 1회 적용하는 경우, 상처에 아무것도 적용하지 않은 대조군 마우스 및 대조균 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC (pLAB112_Luc)를 매일 적용한 마우스에 비해 75% 상처 표면 봉합에 대한 시간이 감소하였다 (도 10). Luc를 갖는 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC를 매일 적용한 경우와 상처에 아무것도 적용하지 않은 대조군 마우스에 비해 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_mLrCK1.4를 매일 적용한 당뇨 마우스의 상처 노출은 감소되는 경향 (p=0.08)이 있었다 (도 11).

[0147] 실시예 6: CXCL12을 코딩하는 플라스미드로 트렌스펙션된 상처 가장자리 피부에서 CXCL12 피부 과발현

[0148] CMV 프로모터 (SEQ ID NO: 24) (V260-20, Invitrogen, Waltham, MA, USA)를 포함하는 pVAX1 백본 상에 플라스미드를 구성하고, pCTR (SEQ ID NO: 25)로 언급된 인서트 -copGFP-T2A-Luc2- 또는 pCXCL12 (SEQ ID NO:26)로 언급된 인서트 -CXCL12-P2A-copGFP-T2A-Luc2-를 종래 문헌에 기술된 바와 같이 도입하였다 (참고문헌 18). CXCL12에 대한 분비 서열을 쥐 IgG 분비 서열로 대체하였다. 따라서, pCTR 플라스미드는 녹색 형광 단백질(GFP)

및 루시페라아제를 코딩하지만 케모카인은 코딩하지 않는다. 플라스미드 (총 부피 100 ㎕ 식염수에 40 ㎍)를 상처 가장자리의 4곳의 피부 위치에 주사하였다. 마취를 하고 바이오이미징 장치 (IVIS Spectrum, Perkin Elmer)를 이용하여 이미지를 수득하기 10분 전에 D-루시페린 (150 mg/kg, #122796, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)을 복강 주사한 후 루시페라아제 활성을 기반으로 시간이 경과함에 따라 이식유전자 발현을 측정하였다. 데이터를 Living Image 3.1 software (Perkin Elmer)로 정량화하였고 비교 분석을 위해 이미징 파라미터를 유지시켰다. 반대측 참조 영역을 뺀 관심 영역을 선택하여 세팅을 유지하였다. 래디언스는 플라스미드 발현에 비례하는 것으로 간주하였다.

[0149] 상처 가장자리의 진피에서의 플라스미드 발현을 비침습적 바이오이미징을 사용하여 측정하였고 CXCL12의 발현과 동일한 플라스미드에 의해 코딩된 루시페라아제 효소에 의해 생성된 빛과 상관관계가 있다. 발현은 이틀째에 정점에 이르렀고 이후 상처가 봉합되고 진피가 재형성됨에 따라 감소되었다 (도 13). CXCL12의 과발현은 완전한 상처 치유를 촉진하지는 않았으나 pCTR에 비해 상처 표면의 75% 봉합 시간을 단축시켰다 (도 14). 상처 표면은 상처 유도 및 진피 트렌스펙션 후 4-6일째의 pCTR에 비해 pCXCL12 진피 발현에 의해 감소 되었다 (도 15). 이러한 결과는 이 시스템으로 상처에 CXCL12를 전달하는 경우, 첫 24시간에는 극적인 효과가 없지만 이후 시점에서는 그보다 작은 효과가 있음을 보여준다.

[0150] 실시예 7: Luc 및 LrCK1을 이용한 국소 처리의 용량 반응 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*)

[0151] 락토바실러스 (*Lactobacillus*)를 밤새 배양하고 재접종하여 OD 0.5로 성장시킨 다음 MRS에서 OD 0.2, 0.5, 1.0 및 1.25로 희석 또는 농축하였다. 4가지의 다른 농도를 10^{-9}에 10배로 희석하고 각 샘플의 10 ㎕를 에리트로마이신을 포함하는 MRS 아가에 도말하여 37℃, 5% 이산화탄소에서 하룻밤 동안 혐기성 챔버에서 밤새 배양하였다. 플레이트 상의 콜로니를 계수하고 ml 당 콜로니 형성 단위로 농도를 표현하였다 (CFU/ml).

[0152] 투여량 실험을 위해, 상처를 25 ㎕ 식염수 또는 밤새 배양하고 재접종하여 OD 0.5로 성장시킨 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC pLAB112_LrCK1.4로 이틀 동안 매일 처리하였고, 활성 펩티드 SppIP (50 ng/ml)를 적용하기 5분 전에 예비활성화시켰으며, 상처 표면 중간에 OD 0.2, 0.5, 1.0 또는 1.25의 농도로 국소 첨가하였다. OD 0.5의 25 ㎕에서, $5x10^7$ 박테리아 ($2x10^9$ cfu/ml)가 존재하고 1000회의 투여 기간을 의미한다.

[0153] 박테리아 농도는 광학 밀도로 측정하였고, ml 당 콜로니 형성 단위를 도 16에 나타내었다. 상처에 투여하기 전과 같이 배양 및 활성화된 R2LC__pLAB112_LrCK1.4의 최소 투여량 (OD 0.2는 $2x10^7$ 박테리아와 같음)은 24시간 후 가장 작은 상처 크기를 나타내었고, 4가지의 다른 모든 농도에서 상처 유도 후 24 시간 및 48시간에 현저하게 촉진된 상처 봉합이 나타났으며 (도 17A), 이에 따라 처리하지 않은 상처에 비해 첫 48시간에 대한 상처 노출이 감소되었다 (도 17B). 이러한 결과는 가장 큰 효과를 나타내는 최소 투여량보다 10^3배 많은 (OD 1.25는 $1x10^{10}$ 박테리아와 같음) 용량을 투여하는 것 또한, 처리를 하지 않은 상처 및 최대 상처 봉합을 나타내는 용량과 같은 정도로 처리한 상처에 비해 첫 48시간에 상처 치유를 현저하게 촉진한다는 것을 나타낸다. 최대 투여량이 주어진 상처에서 염증 유도 또는 다른 부정적인 부작용에 대한 징후는 관찰되지 않았다. 상기 데이터는 적은 용량의 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_LrCK1도 상처 치유를 촉진한다는 것을 보여준다.

[0154] 실시예 8: 국소 치료제로서 mCXCL12 1α의 투여량 증가

[0155] 상처 표면에 투여된 mCXCL12 1α의 용량 효과를 조사하기 위해, 0.2 ㎍, 0.6 ㎍ 또는 1 ㎍의 mCXCL12 1α (RnD Systems)를 10 ㎕의 식염수에 용해하여 이틀 동안 매일 상처에 전달하였다. 투여는 하루에 한번하였다.

[0156] 하루에 한번 단일 시점에 mCXCL12 1α를 매일 전달한 경우 미처리군과 같이 처음 이틀 동안은 상처 치유가 촉진되지 않았다 (도 18A, B). 이들 데이터는 CXCL12 1α의 지속적인 전달이, 1시간 동안 10분 간격으로 매일 총 0.2 ㎍의 mCXCL12 1α가 주어져 첫 48시간에 치유를 촉진하기 때문에 상처 치유를 촉진시킨다는 것을 보여준다 (도 18 및 19).

[0157] 실시예 9: 인간 피부 생검에서 재상피화 검정.

[0158] 기증 동의서를 얻어 웁살라 대학 병원에서 일상적인 유방 감소를 가진 건강한 백인 여성으로부터 멸균한 정상 인간 피부를 수득하였다. 샘플을 2% 송아지 혈청 (Hyclone®, HyClone Laboratories, Logan USA)이 보충된 생리학적 DMEM으로 덮고 멸균 조건 하에 실험실로 옮겼다.

[0159] 종래 문헌에 기술된 바와 같이 (참고문헌 17), 피하를 제거하고 남은 진피와 표피를 6 mm 피부 생검 펀치

(Integra Miltex, York, PA, USA)와 멸균 가위로 절단하였다. 6 mm 직경의 각 피부 디스크의 중앙에서 3 mm 피부 생검 펀치와 멸균 가위로 표피를 제거하였다. 그런 다음 샘플을 표피면을 위로하여 멸균한 24 웰 플레이트에 하나씩 차례로 놓았다. 모든 배양 배지 (DMEM)는 2 또는 10 %의 BSA와 항생제 (에리트로마이신 10 ㎍/ml, Sigma Aldrich, Buchs, Swizerland)로 보충하였다. 진피쪽에 영양을 유지시키기 위해, 즉 피부의 진피쪽에 최대 농도로 영양을 유지시키기 위해, 0.5 ml 배지를 각 웰에 첨가하고 매일 배지를 교체하였다. 배지 교체와 동시에 10 ㎕의 MRS 내 10^6개의 락토바실러스 루테리 (*Lactobacilus reuteri*) R2LC_Luc 또는 락토바실러스 루테리 (*Lactobacilus reuteri*) R2LC_LrCK1을 부유 피부 디스크의 표피 상처 중간에 두었다. 박테리아를 MRS에 접종하고 2-4시간 동안 성장시켜 지수기가 되도록 하였다. 샘플을 37℃, 5% 이산화탄소 및 95% 습도에서 14일 동안 배양하였다.

[0160] 시료를 중간을 통해 반으로 절단한 다음 절반은 pH 7.38, 4% 포름알데히드에 밤새 고정시키고 에탄올-자일렌 시리즈를 통해 탈수하여 최종적으로 파라핀에 삽입하였다. 시료 중앙부에서부터 시작하여 단면 (10 μm)을 고정, 재수화, 및 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다. 이미지를 Leica DFC420 C 카메라 및 Plan Fluot 40x0.7 NA 대물렌즈를 포함하는 Leica Leits Dmrb를 사용하여 캡쳐하였다. 재상피화 또는 표피 슬리브(sleeve) 길이는 ImageJ (NIH)를 이용한 이미지에서 측정되었다.

[0161] 락토바실러스 (*Lactobacillus*)를 배지의 피부 디스크에 첨가하고 24시간 후 측정시 배양 배지의 pH가 낮아졌다 (도 20A). 피부 디스크에 유도된 상처의 가장자리의 표피는, 배양 배지에 10% FCS가 존재하는 경우, 증식하여 노출된 진피를 덮었고, 스킨 디스크가 2% FCS가 공급된 배지에서 배양된 경우, 배양 14일 후에 증식이 거의 나타나지 않았다 (도 20B). R2LC pLAB112 Luc 또는 R2LC pLAB112_LrCK1로 처리된 피부 디스크에서 육안상으로 악영향이 탐지되지 않았고, 증가된 재상피화는 피부 디스크가 14일 동안 R2LC pLAB112_LrCK1로 처리된 상처에서 측정되었다 (도 20B).

[0162] 실시예 10: 동결건조 및 재생 후 박테리아의 기능성

[0163] 동결건조에 대한 서로 다른 프로토콜 및 35가지의 서로 다른 제형을 테스트하고 생존율을 최대 2달 동안 측정하였다. 또한, 동결건조된 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*)의 더 큰 배치는 우수의약품제조관리기준에 따라 대규모의 산업화된 생산과 동일한 세팅으로 생산되었다. 이 배치의 동결건조된 샘플을 -20 내지 40℃ 범위의 온도에서 최대 2달 동안 저장한 후 생존율을 분석하였다. 동결건조된 박테리아는 동일한 부피의 물 또는 SppIP (50ng/ml)를 포함하는 MRS 배지를 첨가하여 재생시켰고, 이를 96 웰 플레이트에 도말하거나 상기한 바와 같이 1일된 상처에 직접 적용하여 시험관 내(*in vitro*) 및 생체 내(*in vivo*) 발현을 즉시 분석하였다.

[0164] 가장 유망한 제형의 경우, 생존율이 동결건조 직후에서부터 +4 ℃에서 저장한 샘플을 2달 째에 측정한 분석때까지 안정하였다. 생존율은 현재 식이 보조제로 판매되는 동결건조된 박테리아의 허용가능한 범위 이내였다. 소생 직후 동결건조된 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_Luc에서 플라스미드 발현을 측정하는 것은 발현의 즉각적인 유도를 나타내며, 이는 450분에 정점에 이른 후 감소하였다 (도 21). 24시간 (1440분) 후에는 발현이 없었고 살아있는 박테리아도 없었다. 동결건조된 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_Luc가 재생되어 50 ng/ml (SppIP)로 유도되고 마우스의 피부 상처에 바로 놓여지면 (25 ㎕ 당 $5x10^7$), 발현은 직접적으로 증가하고, 용액에 용해된 성장기의 신선한 박테리아를 첨가하였을 때와 유사한 패턴으로 약 1시간 동안 높게 유지 되었다 (도 3).

[0165] 동결건조된 박테리아 (25 ㎕ 당 $5x10^7$)를 다시 재생시키고, 유도하여 마우스의 피부 상처에 바로 두었을 경우, 상처 치유에 대한 효과를 테스트하였다. 상처는 이틀 동안 매일 모니터링하였고, 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_LrCK1로 처리된 상처는 이 프로토콜을 사용하더라도 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_Luc로 처리된 상처에 비해 촉진된 치유를 나타내었다 (도 23). 이러한 데이터는 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112가 생체 내(*in vivo*) 상처 치유를 촉진하기에 충분한 양으로 CXCL12를 생산하고 전달하기 위해 지수기로 사전배양될 필요가 없음을 나타낸다.

[0166] 실시예 11: 케모카인 신호전달의 pH 의존적 효과

[0167] 케모카인은 그 자체로 또는 다른 케모카인과 함께 상호작용하여 단량체, 이량체 또는 다량체로 나타날 수 있다 (참고문헌 22). 서로 다른 조합 및 구조는 상이한 수용체 신호전달을 유도하며 따라서 상이한 세포 반응을 유도한다 (참고문헌 34). 이는 새로운 미개척 분야로 가능성의 조합은 국소 조직 미세환경에 따라 달라진다. 또한 국소적 pH는 국소 대식세포 기능에 영향을 미친다 (참고문헌 23).

[0168] 케모카인 효능의 pH 의존적 효과에 대한 연구를 위해, 0.2 ㎍ CXCL12 1α를 pH 7.35, 6.35 또는 5.35의 식염수 10 ㎕에 용해하여 이틀 동안 매일 상처에 적용하였다.

[0169] 케모카인을 함유하는 버퍼에서 pH를 변경하는 것은 처리된 상처의 치유 패턴에 영향을 미치며, CXCL12가 pH 6.35의 식염수에 현탁된 경우, CXCL12가 pH 7.35의 식염수에 현탁된 경우와 비교하여 상처 유도 하루 후 상처 크기가 더 작은 경향이 있었다 (p=0.07) (도 24). 이들 데이터는 pH 6.35가 상처 치유 촉진을 유도하는 측면에서 상처 표면에 적용된 재조합 CXCL12의 효과를 증가시킨다는 것을 나타낸다.

[0170] 실시예 12: 효과를 위한 상처 표면으로 박테리아 현장 케모카인 전달의 중요성

[0171] 신선한 상층액으로 상처를 처리하기 위해, 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_Luc 및 R2LC_pLAB112_LrCK1을 37℃에서 10 ml의 MRS에 접종하고 OD 0.5로 성장시켜, 원심분리한 다음 (>2000 rpm, 5분), 1 ml MRS에 재현탁시키고, 활성화시킨 후 (SppIP, 50 ng/ml) 4시간 동안 성장시켰다. 이후 샘플을 원심분리하고 (>2000 rpm, 5분) 상층액을 저장하였다. 25 ㎕의 상기 상층액을 이틀 동안 매일 한번씩 상처에 적용하였다.

[0172] 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_LrCK1에 의한 상처 표면으로의 직접적인 CXCL12 1α의 박테리아성 전달의 중요성은 상처 유도 후 유도된 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*)로부터의 신선한 상층액을 이틀 동안 매일 상처에 첨가한 모델에서 입증하였다. 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_Luc 또는 R2LC_pLAB112_LrCK1로부터의 신선한 상층액으로 처리한 경우 상처 크기 또는 총 상처 노출 (p=0.2595)에 차이는 없었다 (도 25).

[0173] 실시예 13: 락토바실러스 (*Lactobacillus*) 전달 CXCL12는 상처 주변 피부에서 CXCL12의 수준을 증가시킨다.

[0175] *정량적 분석을 위해, 상처 주변 피부 (상처로부터 0-100 μm)를 실험 마지막 날에 제거하고 액체 질소에 급속 동결시켜 절편화 하였다 (10 μm). 얼음처럼 차가운 메탄올에 고정하고 (10분) 0.5 % Triton-X (15 min)에 투과한 후 (15분), 조직을 대식세포 항원 F4/80 (클론 BM8, eBioscience)과 CXCL12 1α (폴리클로날, Abcam)를 표적하는 항체와 배양하고, 세척한 다음 Alexa Fluor488 및 Nordic Lights 557 (Invitrogen)에 결합된 매칭 2차 항체로 배양하였다. 조직을 최종적으로 세척하고 라인-스캐닝 공초점 현미경 (0.5 광학 줌을 갖는 피에조 모터-제어 WPlanApo 40x/1.0를 포함하는, Zeiss LSM 5 Live, Zeiss, Oberkochen, Germany)을 사용하여 이미지화하기 전에 고정 (Fluoromount, #0100-10, Southern Biotech, Birmingham, AL, USA)하였다. 단백질 수준과 대식세포를 ImageJ (NIH) 및 IMARIS 소프트웨어 8.2 (Bitplane, Zurich, Switzerland)를 사용하여 이미지에서 정량화하였다. 현미경 세팅은 획득하는 동안 비교가 가능하도록 유지시켰다. CXCL12 1α 측정 값은 평균 형광 강도 (MFI)로 나타내었다.

[0176] 상이한 용량으로 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_LrCK1을 이틀 동안 매일 한번 씩 상처에 처리하는 경우, 미처리된 상처 옆의 피부와 비교하여, 상처 바로 옆의 피부는 CXCL12 1α의 증가된 피부 조직 수준을 나타내었고 이는 진피, 표미 및 모낭 모두에서 나타났다.

[0177] 실시예 14: 락토바실러스 (*Lactobacillus*) 전달 CXCL12은 상처 주변 피부에서 대식세포를 증가시킨다.

[0178] 상이한 용량으로 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_LrCK1을 이틀 동안 매일 한번 씩 상처에 처리하는 경우, OD 0.2 및 0.5의 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_LrCK1을 상처에 적용시, 미처리 상처 옆의 진피에 비해, 상처 유도 이틀 후 상처 바로 옆의 진피에서 F4/80+ 대식세포의 농도가 증가되었다 (도 27A). F4/80+ 대식세포는 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_pLAB112_LrCK1을 OD 1.25로 상처 표면에 공급시, 미처리 상처 옆의 표피와 비교하여, 상처 유도 이틀 후 상처 옆의 표피에서 증가되었다 (도 27B).

[0179] 실시예 15: 락토바실러스 락티스 (*Lactococcus Lactis*)를 이용한 상처 치유 촉진에 대한 효과 확인

[0180] 박테리아에 의해 생산된 특정 케모카인의 국소적이고 지속적인 전달이 박테리아 균주와 관계없이 메카니즘에 중요하다는 것을 보여주기 위해, 다른 균주를 사용하여 케모카인을 생산하고 상처 표면에 직접적으로 전달하였으며, 락토코커스 락티스 (*Lactococcus Lactis*)는 pLAB112 (mLrCK1)로 형질전환시켰다. 박테리아를 락토바실러스 루테리 (*Lactobacuillus reuteri*)를 사용한 처리법에 기재된 것과 동일한 프로토콜에 따라 하루에 한번 건강한 마우스의 전층 상처에 적용하였다.

[0181] 이 모델에서 mCXCL12 1α의 전달은 상처 봉합을 촉진하고 (도 28), 상처 크기 및 노출을 감소시키는 경향을 나

타냈다 (도 29).

[0182] 실시예 16: 재조합 단백질로 전달된 mCXCL12 1α, mCXCL17 및 Ym1의 처리에 의한 상처 봉합 시간의 적절한 효과

[0183] 전달 방식 및 유산균에 의해 활성화된 지속적인 단백질 생산이 메카니즘에 중요하다는 것을 입증하기 위해, 쥐 재조합 mCXCL12 1α, mCXCL17, mYm1 (60 ㎕에 용해된 총 200ng, 모두 RnD Systems) 또는 대조군으로 식염수를 한 시간 동안 10분마다 하루에 한번씩 상처에 전달하였다.

[0184] mCXCL12 1α의 경우, 복강 내로 30 ng의 전달은 3시간 후 현저하게 증가된 면역세포의 보충을 유도하고, 이는 25㎛^{2}의 영역에 200ng이 높은 용량으로 간주되는 이유이다.

[0185] 상처에서 높은 프로테아제 활성은, 하나의 단일 시점에 재조합 단백질로 제공되는 경우, 케모카인을 분해할 수 있고, 따라서 상처 봉합을 강화하기 위해 단백질이 다시 박테리아에 의한 생산되는 것이 요구된다. 또한, 유산균은 상처 치유를 위한 유익한 국소 환경을 제공할 수 있다 (도 1B, 4, 5, 24, 30 및 31).

[0186] 실시예 17: 건강한 마우스의 상처 봉합에 대한 서로 다른 처리법의 효과 비교

[0187] 건강한 마우스에서 첫 24시간 동안의 상처 봉합을 수행된 모든 다른 처리법에 대해 분석하였다 (도 32). 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_Luc로 처리하거나 한 시점에서 CXCL12 1α의 낮은 단일 용량으로 상처에 투여하는 것은 첫 24시간 동안 치유에 영향을 미치는 것이 명확하다.

[0188] 상처 표면에 1시간 동안 10분 마다 전달된 CXCL12 1α, CXCL17 및 Ym1은 첫 24시간 동안 상처 봉합을 촉진하는 경향이 있으나, 이러한 효과는 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) R2LC_LrCK1에 의해 상처 표면에 1시간 동안 지속적으로 CXCL12 1α가 전달된 경우 더욱 분명해진다. 진피 과발현을 통한 CXCL12의 전달은 오히려 24시간 상처 봉합에 해로운 영향을 미친다.

[0189] 실시예 18: pLAB112_mLrCK1.4를 포함하는 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*)에 의한 점막 표면의 상처 치유 촉진

[0190] 상처 표면으로 국소적이고 지속적인 CXCL12의 전달이 전체적인 메카니즘을 통해 피부 상피 및 장 상피 둘 다에 작용하는 테스트하기 위해, DSS-유도 대장염의 2가지 실험 프로토콜을 사용하였다. DSS (덱스트란 설페이트 소듐)은 결장의 점막 표면에 상처를 유도하는 것으로 알려져 있다 (참고문헌 16).

[0191] 첫 번째 프로토콜의 경우, 마우스를 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*)로 14일 동안 하루에 한번 위관영양법 (1ml OD 0.5 회전 및 0.1 ml에 재현탁)으로 처리하고 DSS를 7-14일에 식수에 공급하였다. 이 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) 균주는 결장에 콜로니를 형성하기 때문에, 이 프로토콜을 이용하여 대장염이 유발되었을 때 결장의 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) pLAB112_mLrCK1의 존재가 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) pLAB112_Luc와 비교하여 유익한지 평가하는 것이 목적이다.

[0192] 두 번째 프로토콜은 명백한 대장염을 치료하는 것이 목적으로, 1-8일에 식수에 용해한 DSS를 마우스에 공급하고 5-8일에 매일 3회씩 위관영양법으로 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*)를 투여하였다.

[0193] 대장염의 중증도는 체중 감소, 대변 농도 및 혈액 성분을 포함하는 임상적 파라미터를 바탕으로 매일 평가되었고, 쿠퍼와 그의 동료에 의해 상세하게 기술된 스코어링 방법인 DAI (Disease Activity Index)로 나타내었다 (참고문헌 16).

[0194] 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) pLAB112_Luc와 pLAB112_LrCK1.4의 전처리에 의해 DSS-유도 대장염 질환 활성의 유사한 개선이 있었고, 그 효과는 오직 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*)로 인한 것으로 나타났다.

[0195] 대조적으로, pLAB112_Luc (도 34)를 처리에 대해 관찰되지 않았던 대장염 마우스에 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) pLAB112_LrCK1.4가 투여되었을 때 전달된 케모카인의 효과가 나타나 질환의 진전이 개선되었다.

[0196] 참고문헌

[0197] 1. Demidova-Rice TN, Hamblin MR and Herman IM. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Advances in skin & wound care*. 2012;25:304-14.

[0198] 2. Demidova-Rice TN, Hamblin MR and Herman IM. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery. *Advances in skin & wound care*. 2012;25:349-70.

[0199] 3. Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OMZ, Anver MR, Kleinman HK, Murphy WJ and Oppenheim JJ. Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Induce Expression of CXCR4 on Human Endothelial Cells: In Vivo Neovascularization Induced by Stromal-Derived Factor-1α. *The American Journal of Pathology*. 1999;154:1125-1135.

[0200] 4. Hattermann K, Sebens S, Helm O, Schmitt AD, Mentlein R, Mehdorn HM and Held-Feindt J. Chemokine expression profile of freshly isolated human glioblastoma-associated macrophages/microglia. *Oncology reports*. 2014;32:270-6.

[0201] 5. Badillo AT, Chung S, Zhang L, Zoltick P and Liechty KW. Lentiviral gene transfer of SDF-1alpha to wounds improves diabetic wound healing. *The Journal of surgical research*. 2007;143:35-42.

[0202] 6. Lee WY, Wang CJ, Lin TY, Hsiao CL and Luo CW. CXCL17, an orphan chemokine, acts as a novel angiogenic and anti-inflammatory factor. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2013;304:E32-40.

[0203] 7. Burkhardt AM, Tai KP, Flores-Guiterrez JP, Vilches-Cisneros N, Kamdar K, Barbosa-Quintana O, Valle-Rios R, Hevezi PA, Zuniga J, Selman M, Ouellette AJ and Zlotnik A. CXCL17 Is a Mucosal Chemokine Elevated in Idiopathic Pulmonary Fibrosis That Exhibits Broad Antimicrobial Activity. *The Journal of Immunology*. 2012;188:6399-6406.

[0204] 8. Goren I, Pfeilschifter J and Frank S. Uptake of Neutrophil-Derived Ym1 Protein Distinguishes Wound Macrophages in the Absence of Interleukin-4 Signaling in Murine Wound Healing. *Am J Pathol*. 2014.

[0205] 9. Poutahidis T, Kearney SM, Levkovich T, Qi P, Varian BJ, Lakritz JR, Ibrahim YM, Chatzigiagkos A, Alm EJ and Erdman SE. Microbial symbionts accelerate wound healing via the neuropeptide hormone oxytocin. *PLoS One*. 2013;8:e78898.

[0206] 10. Ramos AN, Cabral ME, Noseda D, Bosch A, Yantorno OM and Valdez JC. Antipathogenic properties of Lactobacillus plantarum on Pseudomonas aeruginosa: the potential use of its supernatants in the treatment of infected chronic wounds. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2012;20:552-62.

[0207] 11. Sorvig E, Mathiesen G, Naterstad K, Eijsink VGH and Axelsson L. High-level, inducible gene expression in Lactobacillus sakei and Lactobacillus plantarum using versatile expression vectors. *Microbiology*. 2005;151:2439-2449.

[0208] 12. Eijsink VG, Axelsson L, Diep DB, Havarstein LS, Holo H and Nes IF. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2002;81:639-54.

[0209] 13. Gao Z, Tseng C-h, Pei Z and Blaser MJ. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104:2927-2932.

[0210] 14. Gethin G. The significance of surface pH in chronic wounds. *Wounds UK*. 2007;3:52-56.

[0212] *15. Sorvig E, Gronqvist S, Naterstad K, Mathiesen G, Eijsink VG, and Axelsson L. Construction of vectors for inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *L plantarum*. *FEMS Microbiol Lett*. 2003; 229(1):119-126.

[0213] 16. Cooper H.S., Murthy S.N., Shah R.S., Sedergran D.J. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. Lab. Invest. 1993;69(2):238-249.

[0214] 17. Nyman E, Huss F, Nyman T, Junker J, Kratz G. Hyaluronic acid, an important factor in the wound healing properties of amniotic fluid: in vitro studies of re-epithelialisation in human skin wounds. J

Plast Surg Hand Surg. 2013 Apr;47(2):89-92.

[0215] 18. Vagesjo E, Christoffersson G, Walden T, Carlsson P, Essand M, Korsgren O, and Phillipson M. Immunological shielding by induced recruitment of regulatory T lymphocytes delays rejection of islets transplanted to muscle. Cell transplantation. 2015;24(2):263-76.

[0216] 19. Bohmer N, K?nig S and Fischer L. A novel manganese starvation-inducible expression system for Lactobacillus plantarum . FEMS Microbiol Lett 342 (2013) 37-44.

[0217] 20. Duong, T, Miller, M., Barrangou,R., Azcarate-Peril A. and Klaenhammer T., Construction of vectors for inducible and constitutive gene expression in *Lactobacillus*mbt_200 357.. Microbial Biotechnology (2010) 4(3), 357-367.

[0218] 21. Sorvig E, Mathiesen G, Naterstad K, Eijsink VG, and Axelsson L. High-level, inducible gene expression in Lactobacillus sakei and Lactobacillus plantarum using versatile expression vectors. Microbiology. 2005 Jul;151(Pt 7):2439-49.

[0219] 22. Nesmelova I, Sham Y, Gao J, and Mayo K. CXC and CC chemokines form mixed heterodimers association free energies from molecular dynamics simulations and experimental correlations. JBC Papers in Press, June 12, 2008, DOI 10.1074/jbc.M803308200.

[0220] 23. Bellocq A, Suberville S, Philippe C, Bertrand F, Perez J, Fouqueray B, Cherqui G, Baud L. Low environmental pH is responsible for the induction of nitric-oxide synthase in macrophages. Evidence for involvement of nuclear factor-kappaB activation. J Biol Chem. 1998 Feb 27;273(9):5086-92.

[0221] 24. Thompson J, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice (1994) Nucleic Acids Res., 22: 4673-4680.

[0222] 25. Myers E and Miller W, Optimal alignments in linear space. (1988) CABIOS, 4: 11-17.

[0223] 26. W. R. Pearson and D. J. Lipman. Improved Tools for Biological Sequence Analysis (1988) PNAS, 85:2444-2448.

[0224] 27. W, R. Pearson (1990), Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. Methods Enzymol., 183: 63-98,

[0225] 28. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402.

[0226] 29. Holm L and Sander C. Protein structure comparison by alignment of distance matrices (1993) J. Mol. Biol., 233: 123-38; 9.

[0227] 30. Holm L and Sander C. Dali: a network tool for protein structure comparison. (1995) Trends Biochem. Sci., 20: 478-480.

[0228] 31. Holm L and Sander C. Touring protein fold space with Dali/FSSP. (1998) Nucleic Acid Res., 26: 316-9).

[0229] 32. Massena S, Christoffersson G, Vagesjo E, Seignez C, Gustafsson K, Binet F, Herrera Hidalgo C, Giraud A, Lomei J, Westrom S, Shibuya M, Claesson-Welsh L, Gerwins P, Welsh M, Kreuger J, Phillipson M. Identification and characterization of VEGF-A-responsive neutrophils expressing CD49d, VEGFR1, and CXCR4 in mice and humans. Blood. 2015 Oct 22;126(17):2016-26. doi: 10.1182/blood-2015-03-631572. Epub 2015 Aug 18.

[0230] 33. Hatse S, Princen K, Liekens S, Vermeire K, De Clercq E, Schols D. Fluorescent CXCL12AF647 as a novel probe for nonradioactive CXCL12/CXCR4 cellular interaction studies. Cytometry A. 2004 Oct;61(2):178-88.

[0231] 34. Drury L, Ziarekb J, Gravelc,S, Veldkampb C, Takekoshif T, Hwangf S, Hevekerc N, Volkmanb B and

Dwinella M. Monomeric and dimeric CXCL12 inhibit metastasis through distinct CXCR4 interactions and signaling pathways. PNAS October 25, 2011,vol. 108, no. 43, pages 17655-17660.

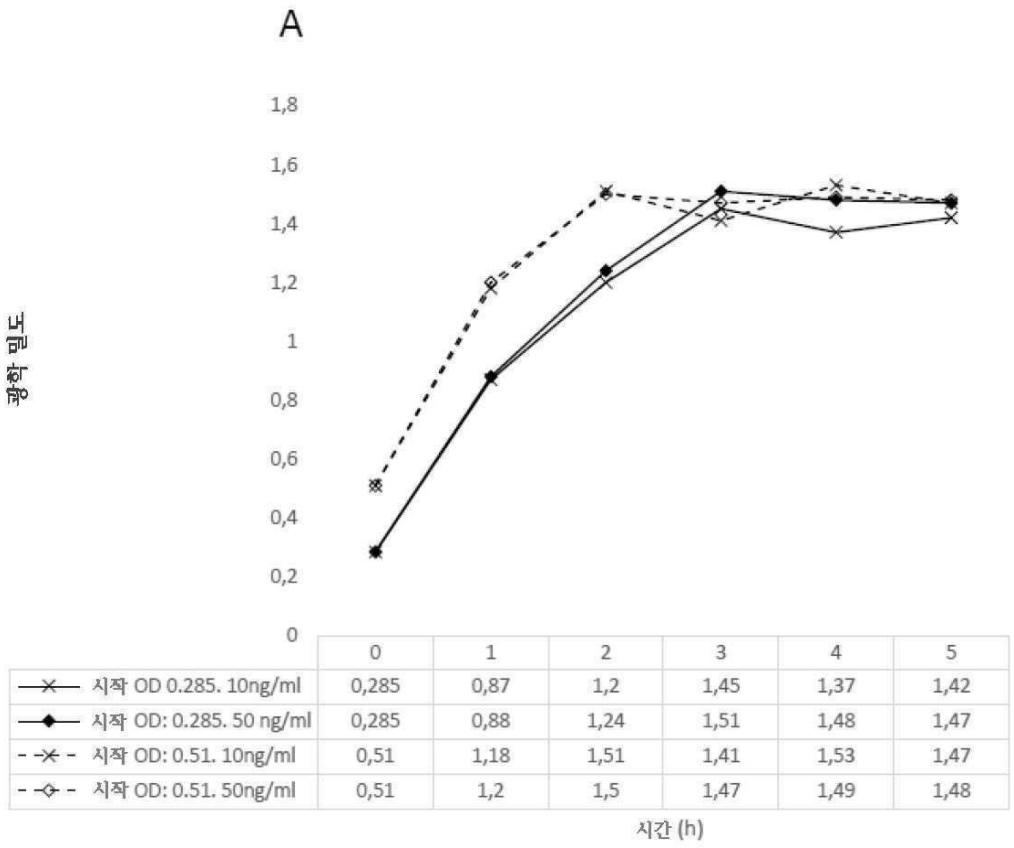
표 4

[0232] 서열목록 요약

SEQ ID NO:	설명
1.	mLrCK1_opt DNA
2.	mLrCK1_opt 단백질
3.	mCXCL12 천연 단백질
4.	hLrCK1_opt DNA
5.	hLrCK1_opt 단백질
6.	hCXCL12 천연 단백질
7.	mLrCK2_opt DNA
8.	mLrCK2_opt 단백질
9.	mCXCL17 천연 단백질
10.	hLrCK2_opt DNA
11.	hLrCK2_opt 단백질
12.	hCXCL17 천연 단백질
13.	mYm1_opt DNA
14.	mYm1 단백질
15.	mYm1 천연 단백질
16.	hYm1_opt DNA
17.	hYm1 단백질
18.	hYm1 천연 단백질
19.	SppIP; 활성 펩티드
20.	pSIP411 DNA
21.	pSIP411 단백질
22.	PCR 프라이머
23.	PCR 프라이머
24.	pVAX1 DNA
25.	pCTR DNA 인서트
26.	pCXCL12 DNA 인서트

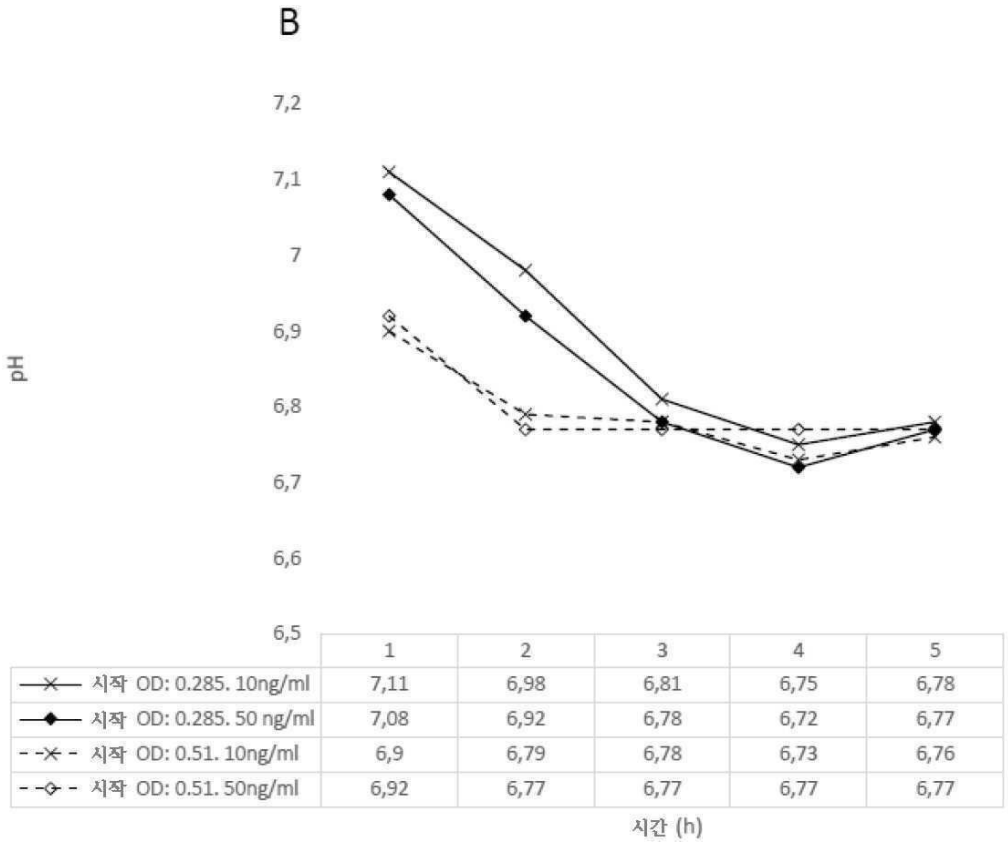
도면

도면1a



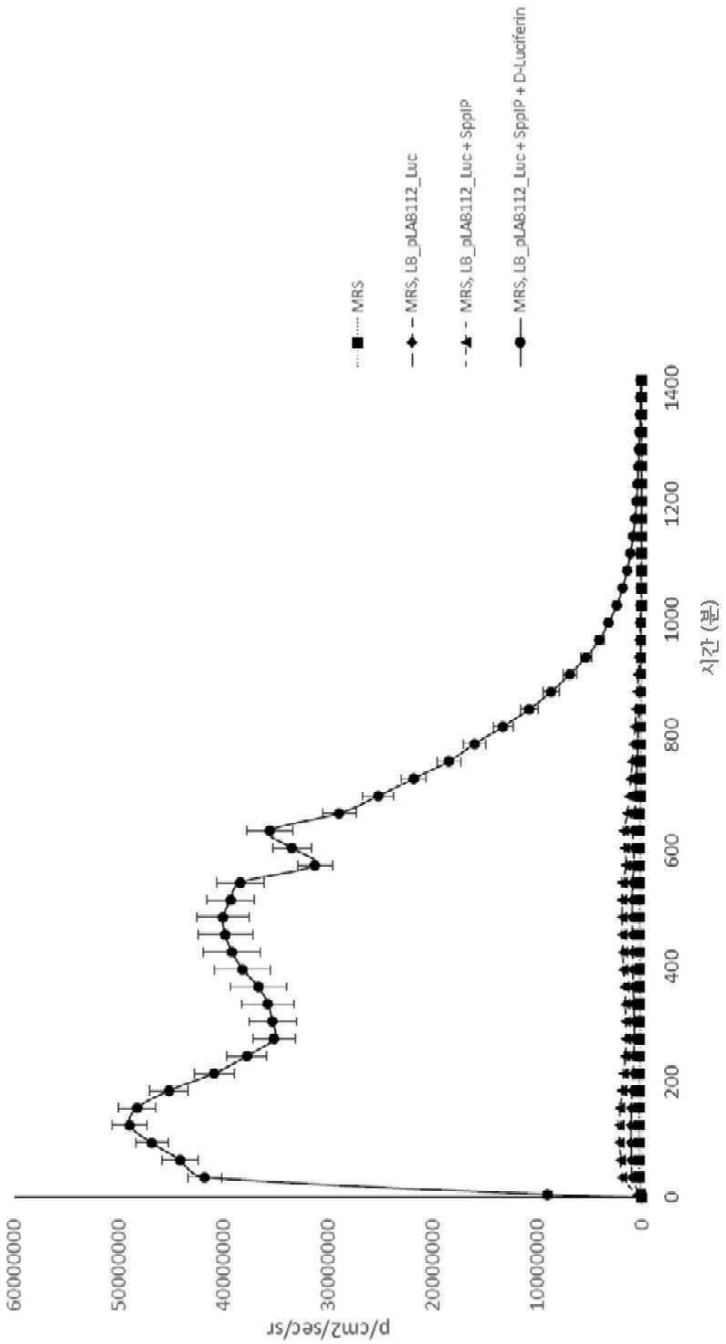
	0	1	2	3	4	5
시작 OD 0.285. 10ng/ml	0,285	0,87	1,2	1,45	1,37	1,42
시작 OD: 0.285. 50 ng/ml	0,285	0,88	1,24	1,51	1,48	1,47
시작 OD: 0.51. 10ng/ml	0,51	1,18	1,51	1,41	1,53	1,47
시작 OD: 0.51. 50ng/ml	0,51	1,2	1,5	1,47	1,49	1,48

도면1b

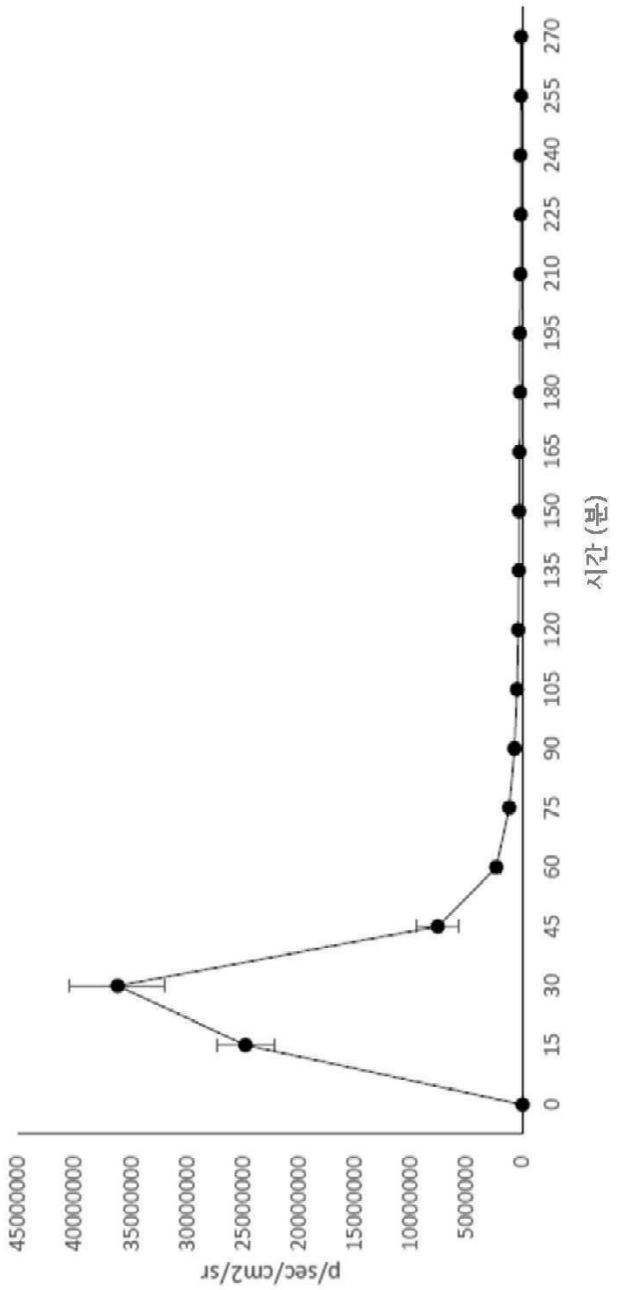


	1	2	3	4	5
시작 OD: 0.285. 10ng/ml	7,11	6,98	6,81	6,75	6,78
시작 OD: 0.285. 50 ng/ml	7,08	6,92	6,78	6,72	6,77
시작 OD: 0.51. 10ng/ml	6,9	6,79	6,78	6,73	6,76
시작 OD: 0.51. 50ng/ml	6,92	6,77	6,77	6,77	6,77

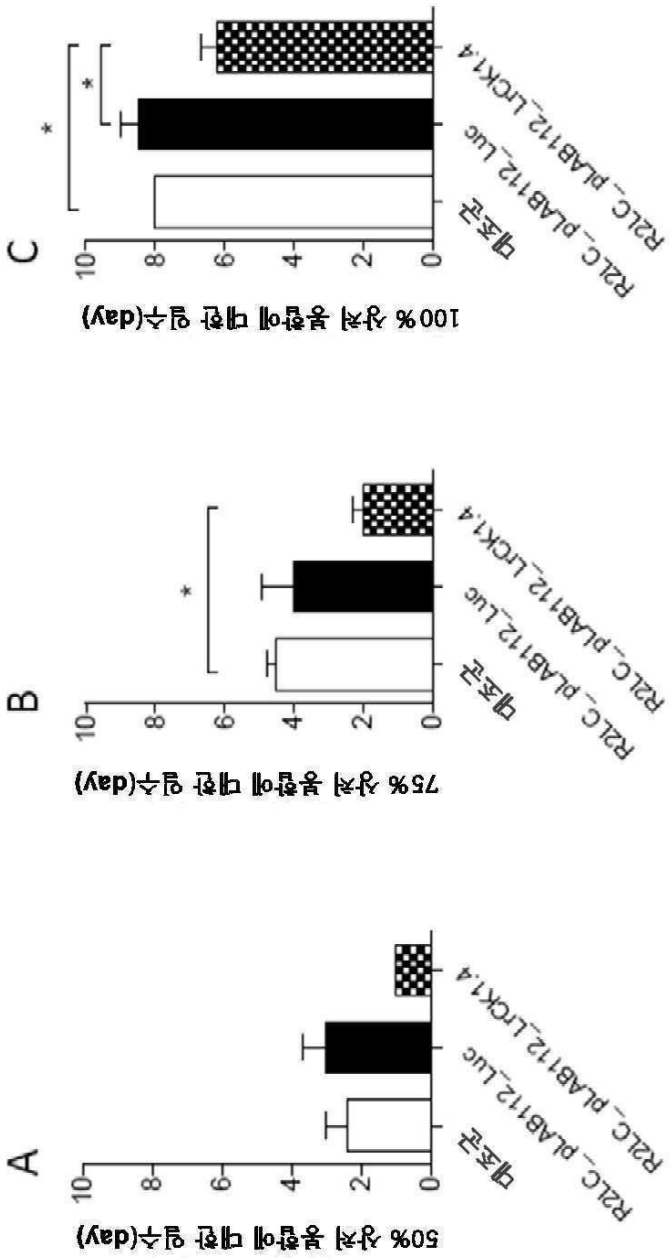
도면2


MRS
MRS, LB_pLAB112_luc
MRS, LB_pLAB112_luc+SpoIP
MRS, LB_pLAB112_luc+SpoIP + D-Luciferin
p/cm2/sec/sr
60000000
50000000
40000000
30000000
20000000
10000000
0
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
시간 (분)

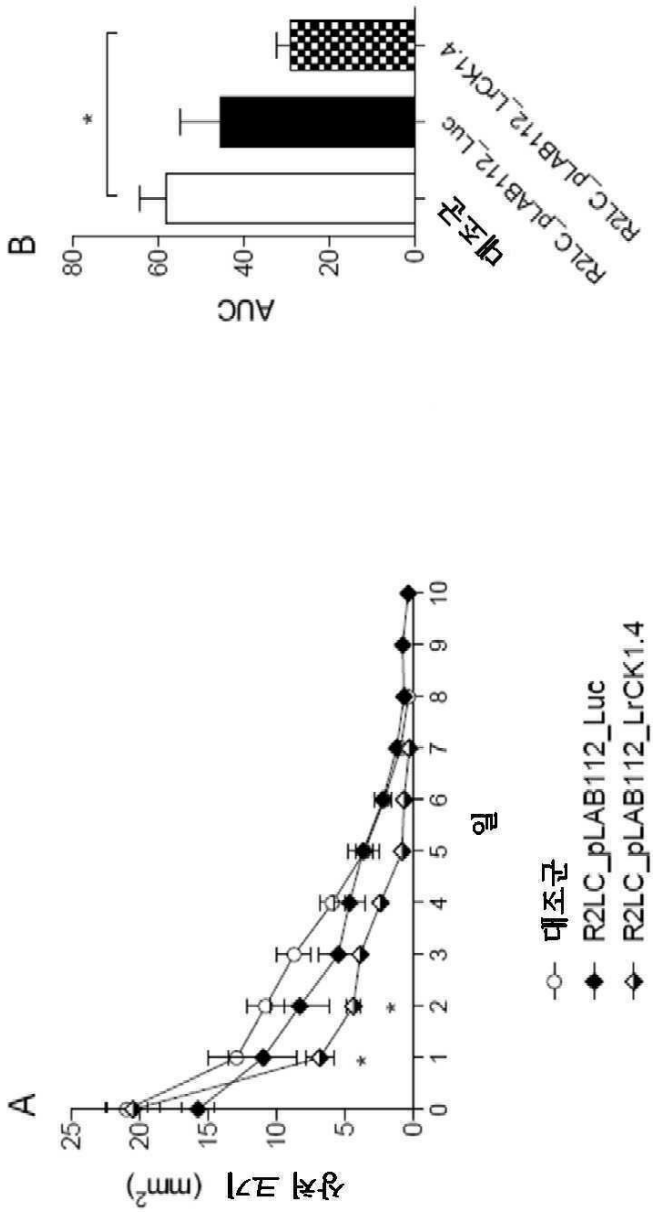
도면3


45000000
40000000
35000000
30000000
25000000
20000000
15000000
10000000
5000000
0
p/sec/cm2/sr
0
15
30
45
60
75
90
105
120
135
150
165
180
195
210
225
240
255
270
시간 (분)

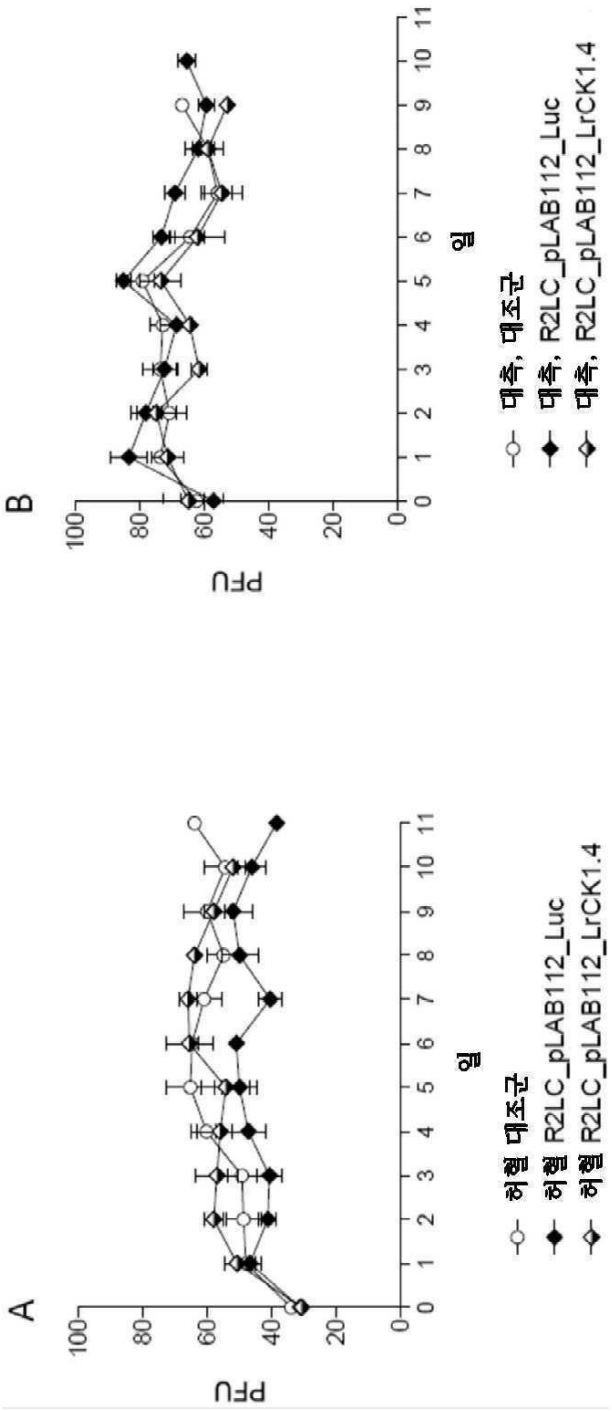
도면4


A
50% 상처 봉합에 대한 일수(day)
대조군
R2LC_pLAB112_Luc
R2LC_pLAB112_LrCK1.4
B
75% 상처 봉합에 대한 일수(day)
대조군
R2LC_pLAB112_Luc
R2LC_pLAB112_LrCK1.4
C
100% 상처 봉합에 대한 일수(day)
대조군
R2LC_pLAB112_Luc
R2LC_pLAB112_LrCK1.4
0
2
4
6
8
10
*
*
*

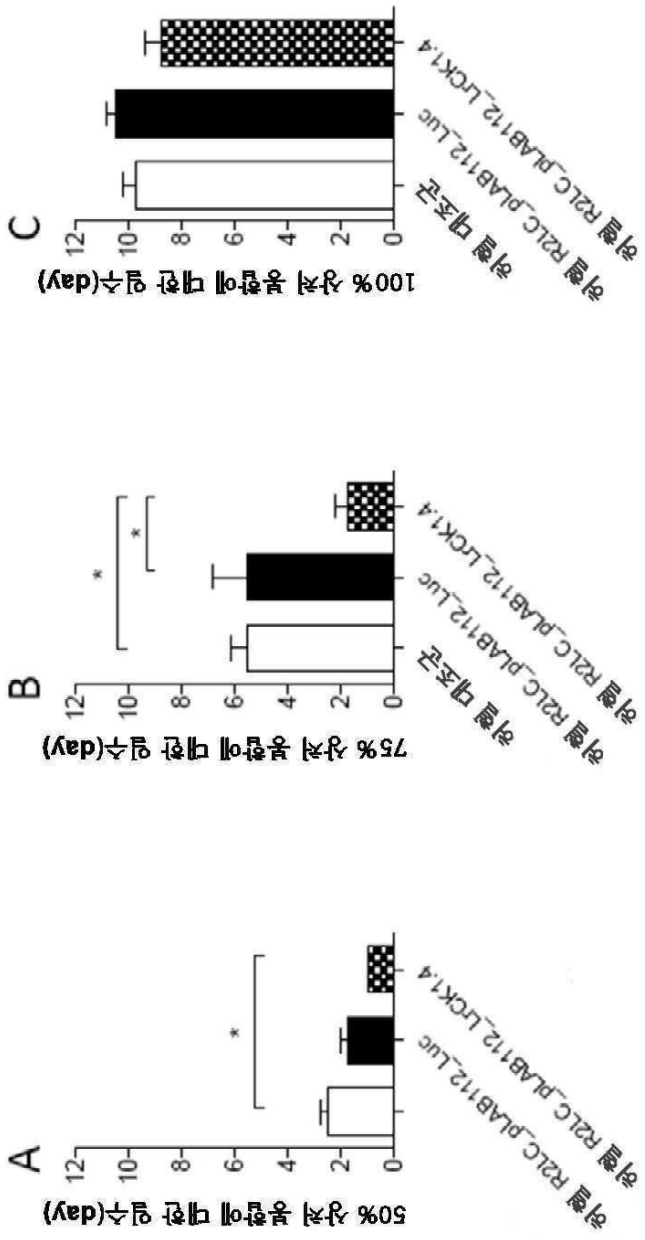
도면5


B
AUC
0
20
40
60
80
대조군
R2LC_pLAB112_Luc
R2LC_pLAB112_LrCK1.4
*
A
상처 크기 (mm²)
0
5
10
15
20
25
일
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
대조군
R2LC_pLAB112_Luc
R2LC_pLAB112_LrCK1.4
*
*
*

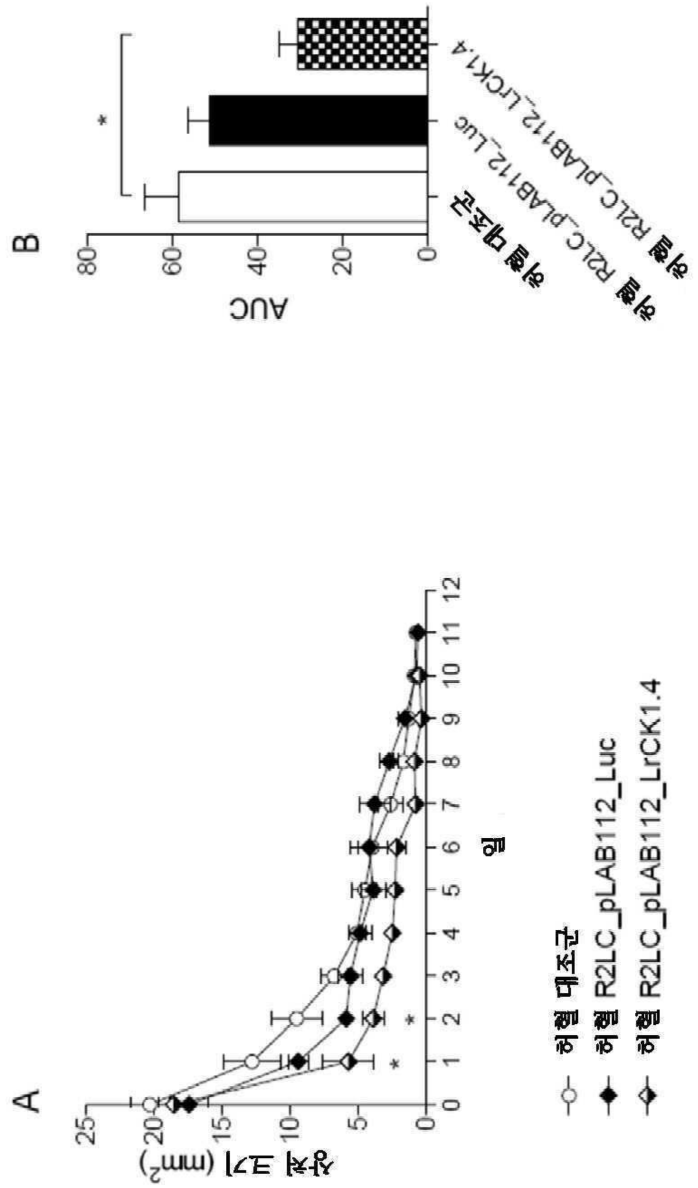
도면6


A
PFU
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
일
허첼 대조군
허첼 R2LC_pLAB112_Luc
허첼 R2LC_pLAB112_LrCK1.4
B
PFU
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
일
대추, 대조군
대추, R2LC_pLAB112_Luc
대추, R2LC_pLAB112_LrCK1.4

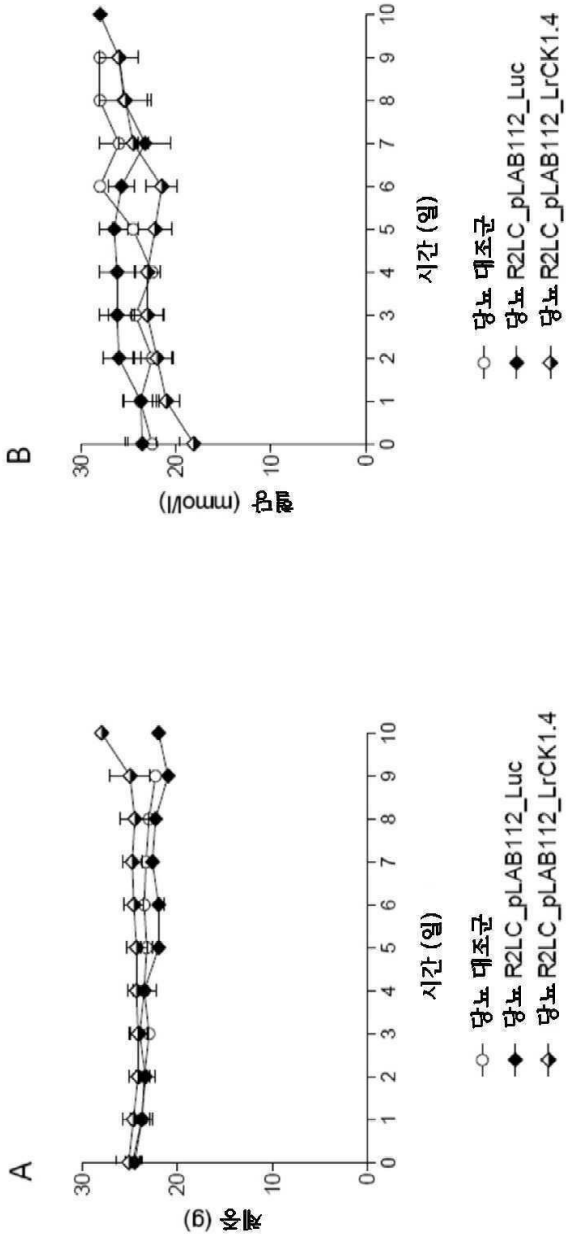
도면7


A
50% 상처 봉합에 대한 일수(day)
12
10
8
6
4
2
0
*
위별 R2LC_pLAB112_Luc
위별 R2LC_pLAB112_LrCK1.4
B
75% 상처 봉합에 대한 일수(day)
12
10
8
6
4
2
0
*
*
위별 대조군
위별 R2LC_pLAB112_Luc
위별 R2LC_pLAB112_LrCK1.4
C
100% 상처 봉합에 대한 일수(day)
12
10
8
6
4
2
0
위별 대조군
위별 R2LC_pLAB112_Luc
위별 R2LC_pLAB112_LrCK1.4

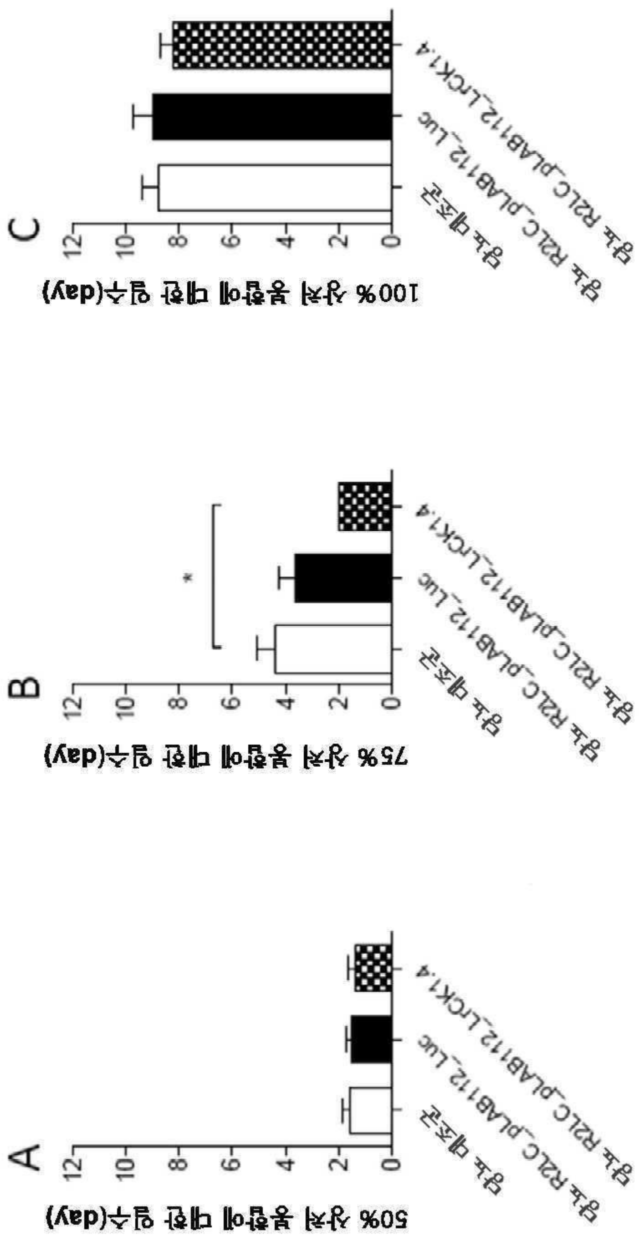
도면8


A
창상 크기 (mm²)
일
허혈 대조군
허혈 R2LC_pLAB112_Luc
허혈 R2LC_pLAB112_LrCK1.4
B
AUC
허혈 대조군
허혈 R2LC_pLAB112_Luc
허혈 R2LC_pLAB112_LrCK1.4

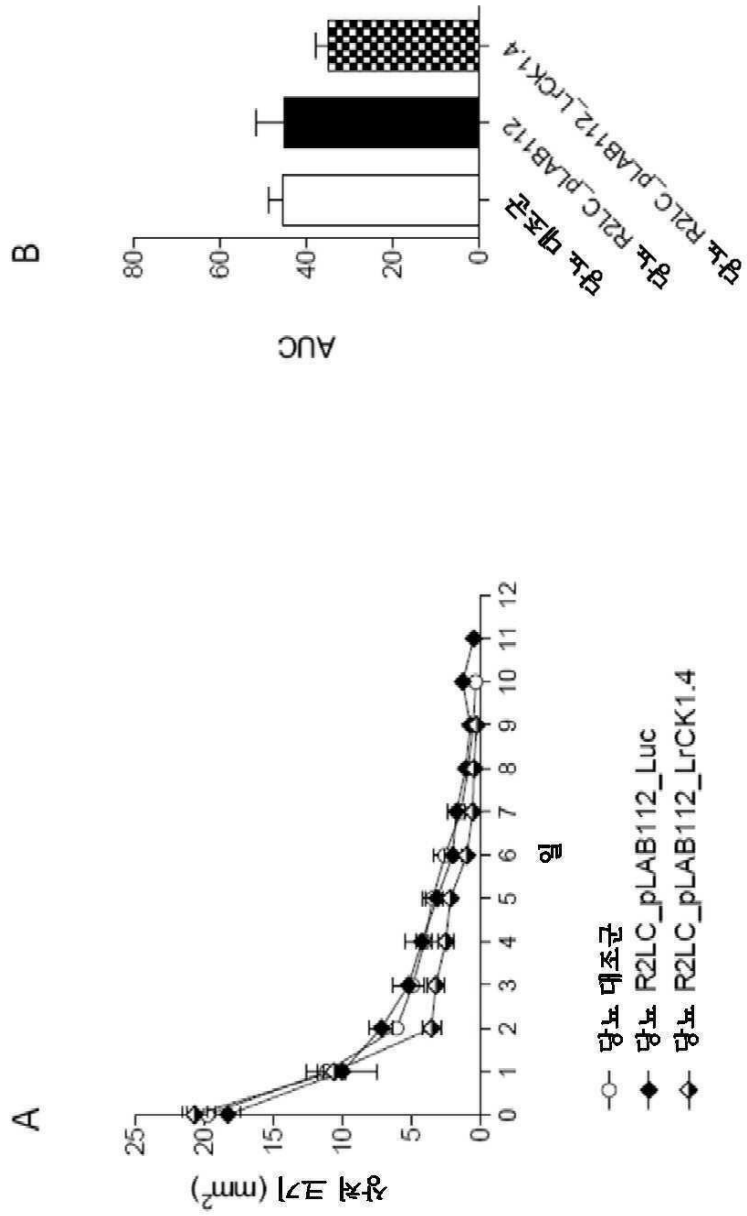
도면9


A
체중 (g)
30
20
10
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
시간 (일)
당뇨 대조군
당뇨 R2LC_pLAB112_Luc
당뇨 R2LC_pLAB112_LrCK1.4
B
혈당 (mmol/l)
30
20
10
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
시간 (일)
당뇨 대조군
당뇨 R2LC_pLAB112_Luc
당뇨 R2LC_pLAB112_LrCK1.4

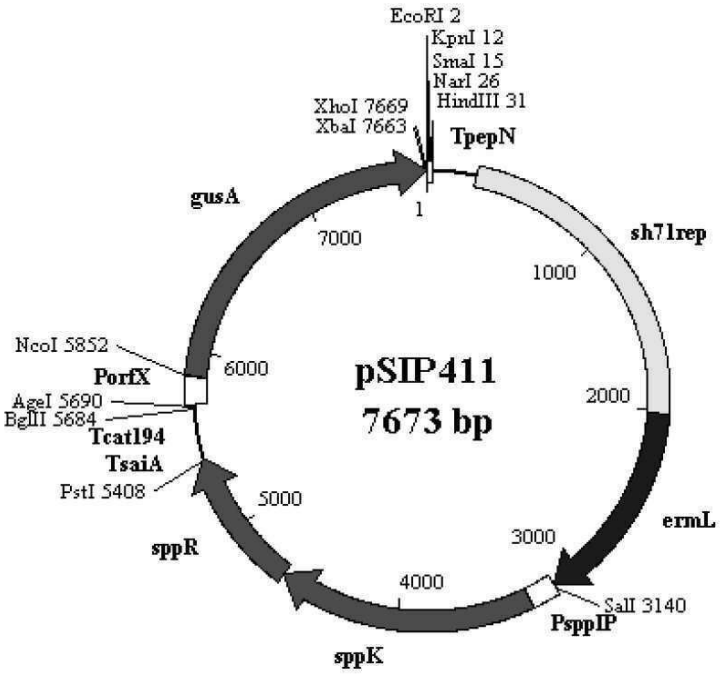
도면10


C
100% 상처 봉합에 대한 일수(day)
B
75% 상처 봉합에 대한 일수(day)
A
50% 상처 봉합에 대한 일수(day)
R2LC_pLAB112_Luc
R2LC_pLAB112_LrCK1.4

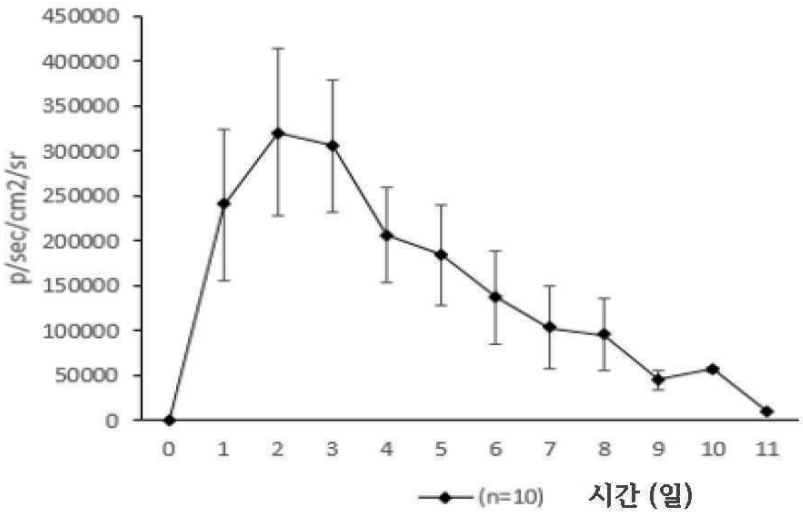
도면11


A
염증 면적 (mm²)
일
염증 대조군
염증 R2LC_pLAB112_Luc
염증 R2LC_pLAB112_LrCK1.4
B
AUC
염증 대조군
염증 R2LC_pLAB112
염증 R2LC_pLAB112_LrCK1.4

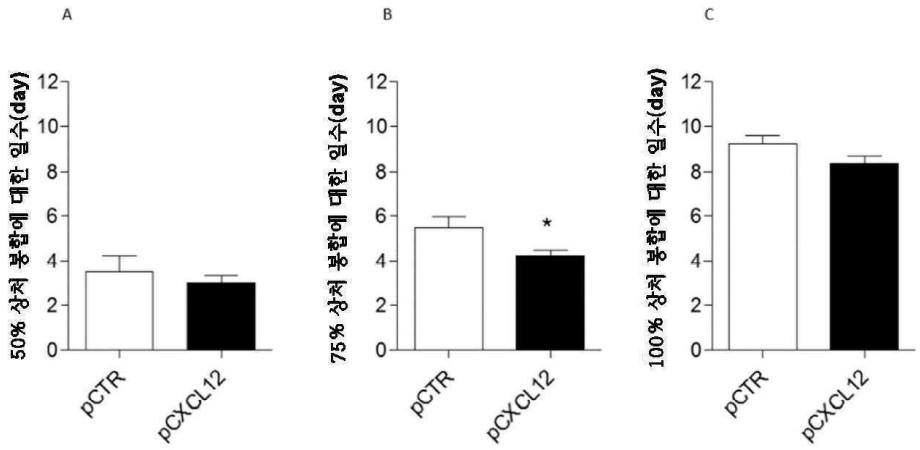
도면12


EcoRI 2
KpnI 12
SmaI 15
NarI 26
HindIII 31
XhoI 7669
XbaI 7663
TpepN
gusA
sh71rep
ermL
NcoI 5852
PorfX
AgeI 5690
BglII 5684
Tcat194
TsaiA
PstI 5408
sppR
sppK
SalI 3140
PsppIP
pSIP411
7673 bp
1
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000

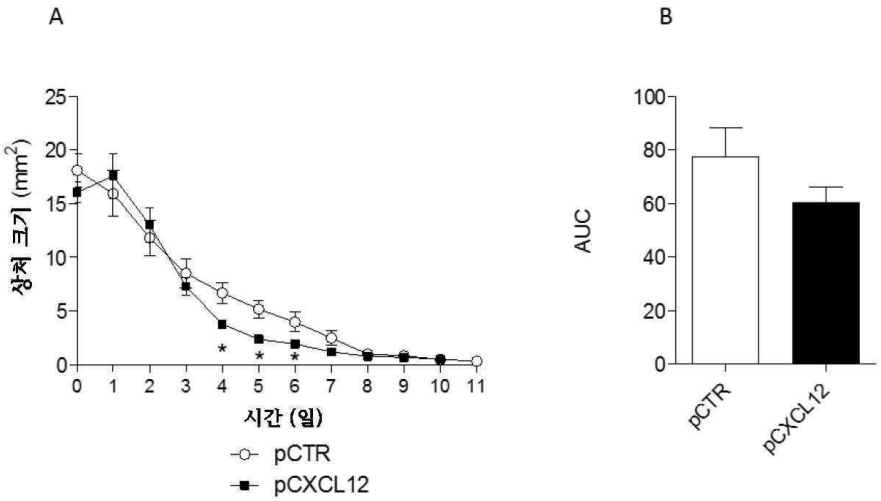
도면13


p/sec/cm2/sr
450000
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
(n=10)
시간 (일)

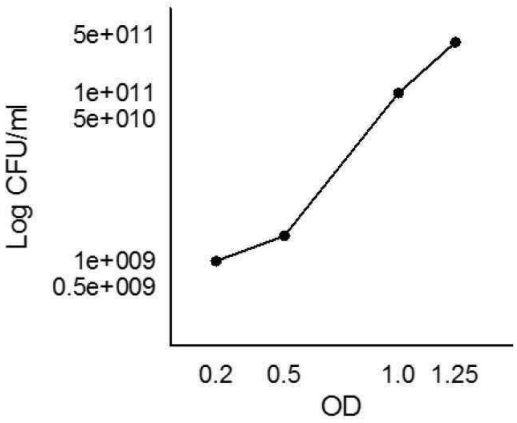
도면14



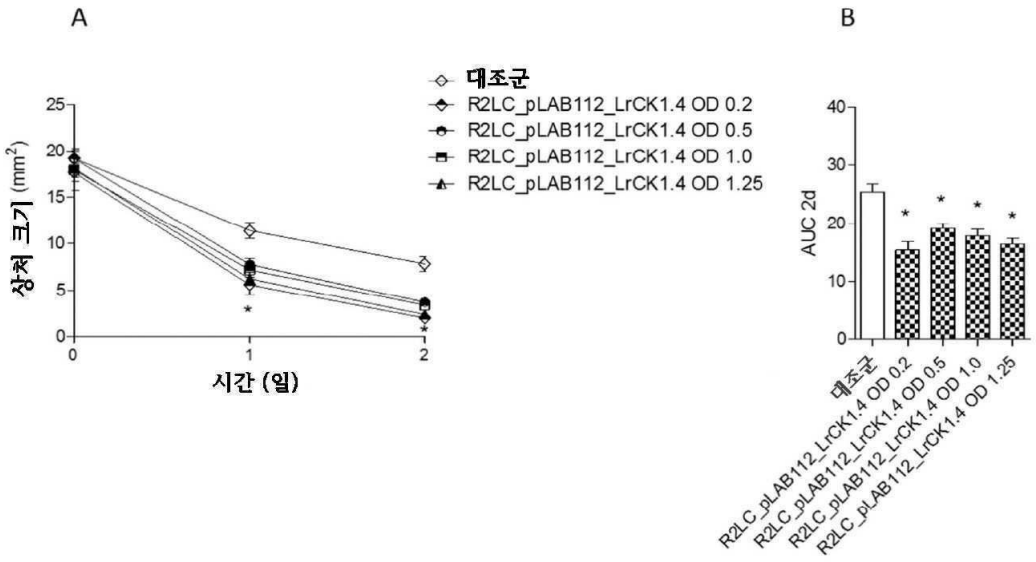
도면15



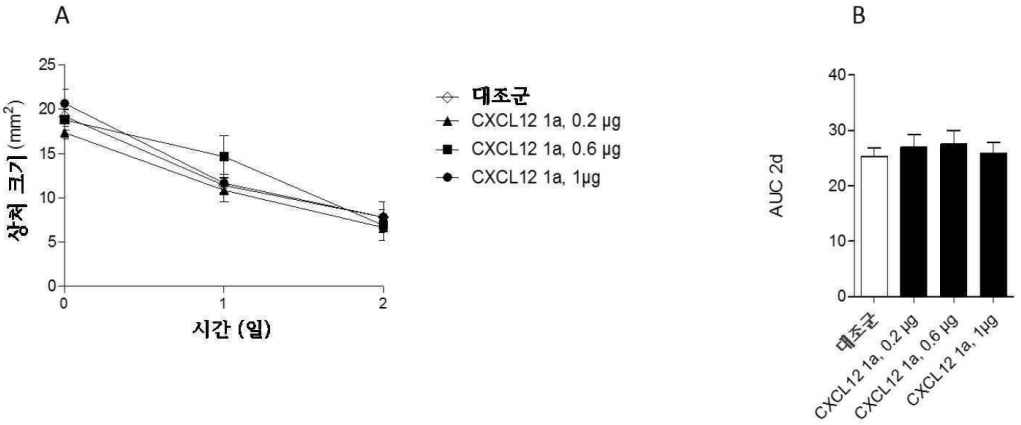
도면16



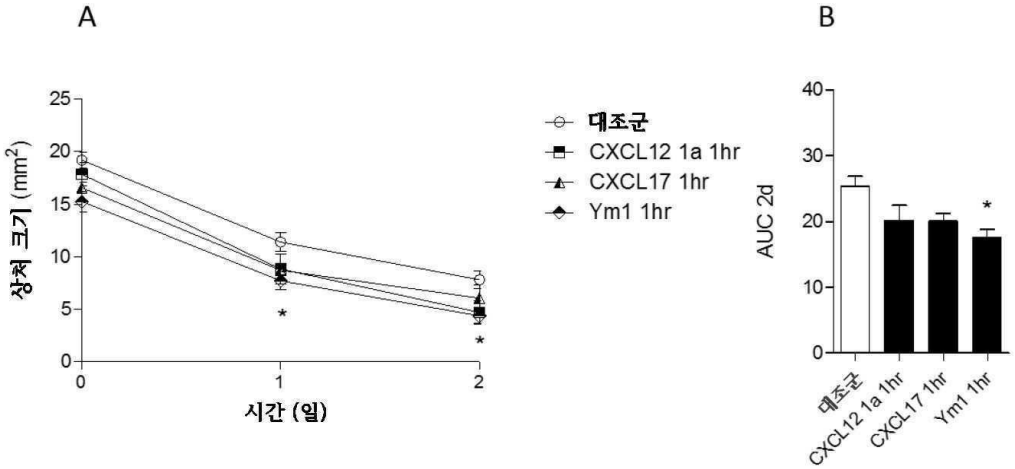
도면17



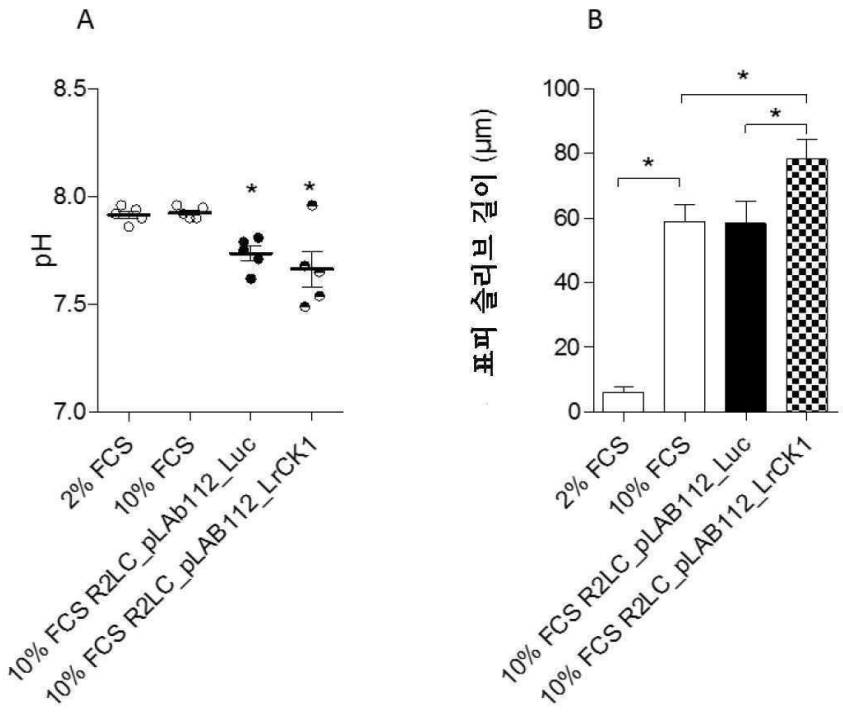
도면18



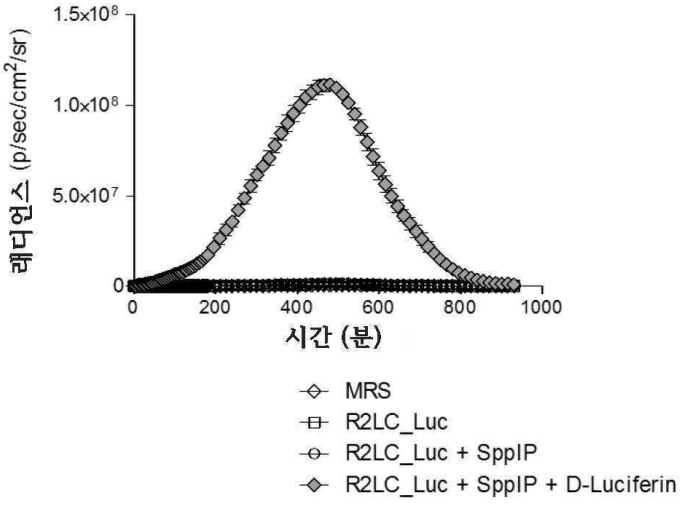
도면19



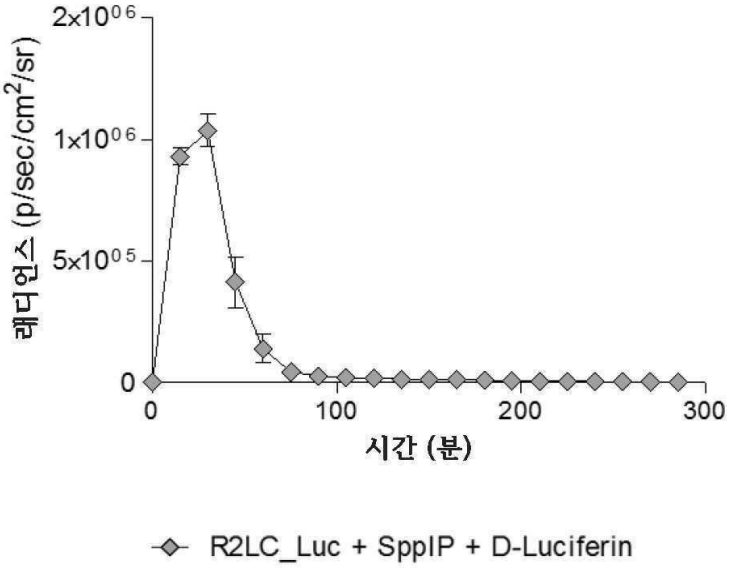
도면20


A
B
pH
8.5
8.0
7.5
7.0
표피 슬리브 길이 (μm)
100
80
60
40
20
0
*
2% FCS
10% FCS
10% FCS R2LC_pLAb112_Luc
10% FCS R2LC_pLAB112_LrCK1

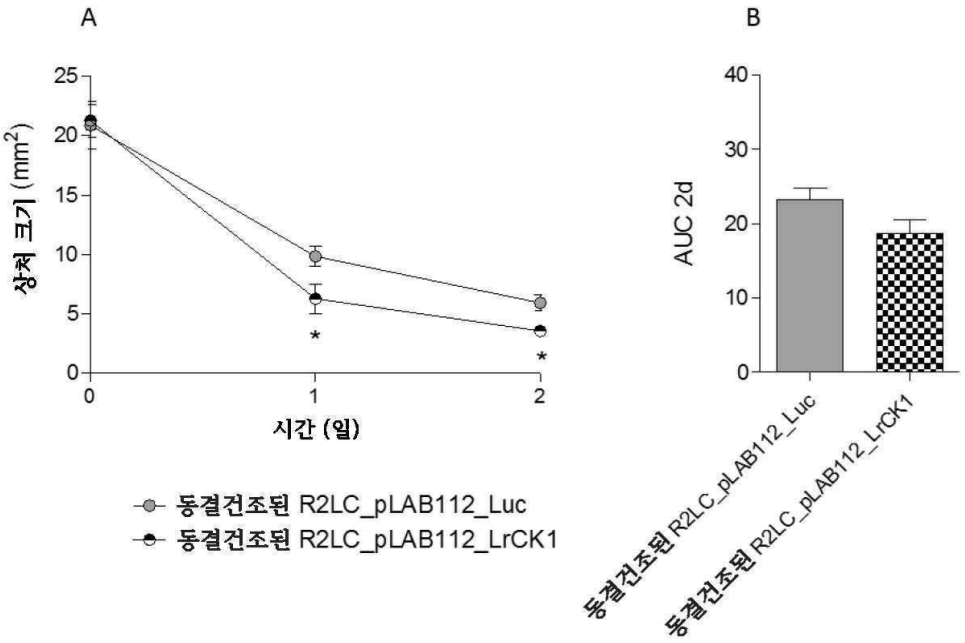
도면21


레디언스 (p/sec/cm²/sr)
1.5x10⁸
1.0x10⁸
5.0x10⁷
0
0
200
400
600
800
1000
시간 (분)
MRS
R2LC_Luc
R2LC_Luc + SppIP
R2LC_Luc + SppIP + D-Luciferin

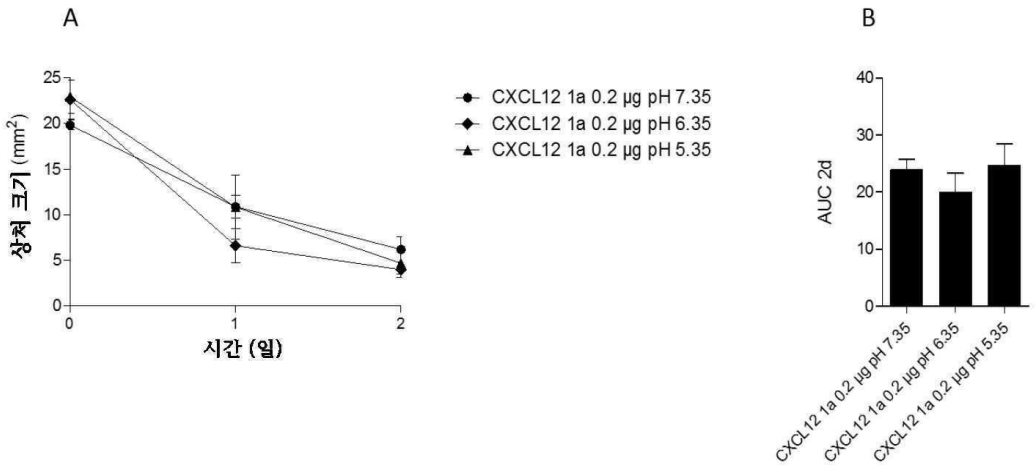
도면22


2x10^06
1x10^06
5x10^05
0
래디언스 (p/sec/cm²/sr)
0
100
200
300
시간 (분)
R2LC_Luc + SppIP + D-Luciferin

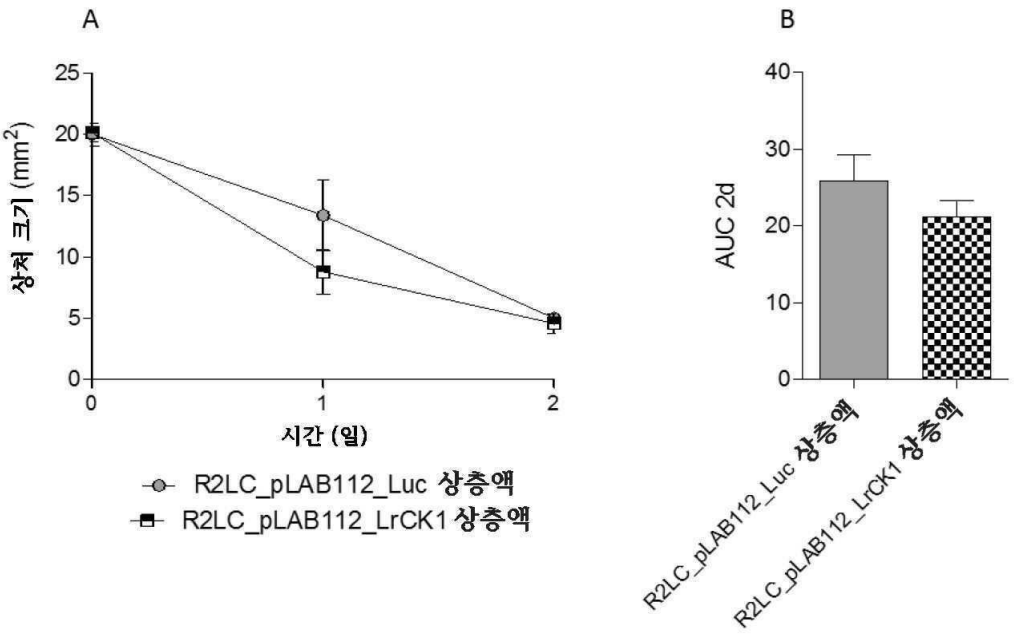
도면23


A
25
20
15
10
5
0
상처 크기 (mm²)
0
1
2
시간 (일)
*
*
동결건조된 R2LC_pLAB112_Luc
동결건조된 R2LC_pLAB112_LrCK1
B
40
30
20
10
0
AUC 2d
동결건조된 R2LC_pLAB112_Luc
동결건조된 R2LC_pLAB112_LrCK1

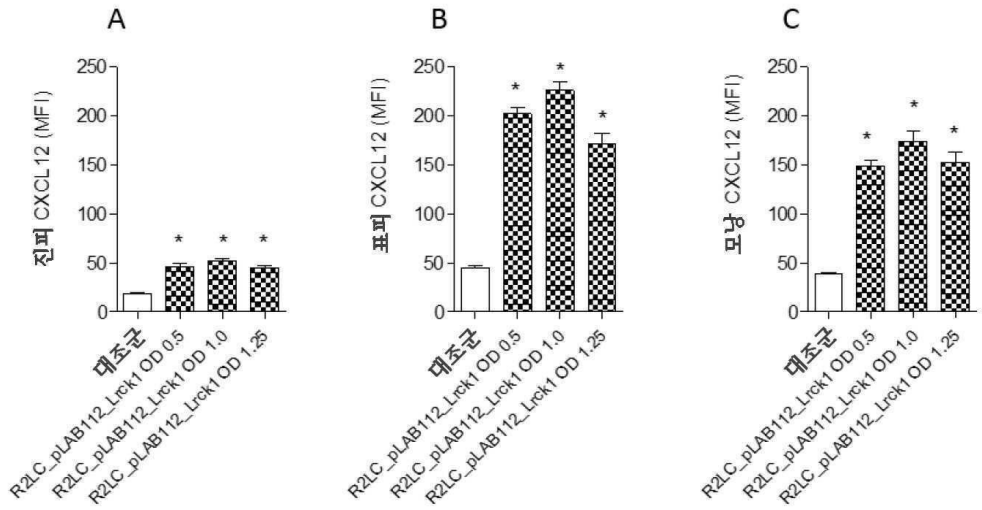
도면24


A
상처 크기 (mm2)
25
20
15
10
5
0
0
1
2
시간 (일)
CXCL12 1a 0.2 μg pH 7.35
CXCL12 1a 0.2 μg pH 6.35
CXCL12 1a 0.2 μg pH 5.35
B
AUC 2d
40
30
20
10
0
CXCL12 1a 0.2 μg pH 7.35
CXCL12 1a 0.2 μg pH 6.35
CXCL12 1a 0.2 μg pH 5.35

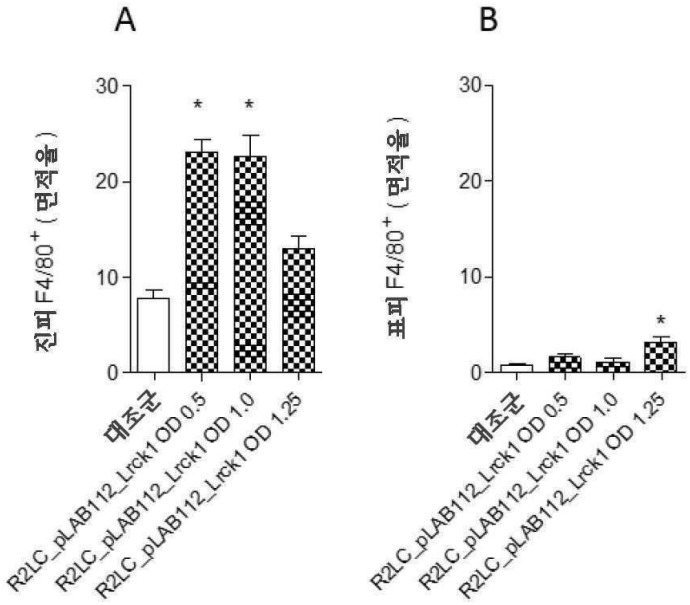
도면25


A
상처 크기 (mm2)
25
20
15
10
5
0
0
1
2
시간 (일)
R2LC_pLAB112_Luc 상층액
R2LC_pLAB112_LrCK1 상층액
B
AUC 2d
40
30
20
10
0
R2LC_pLAB112_Luc 상층액
R2LC_pLAB112_LrCK1 상층액

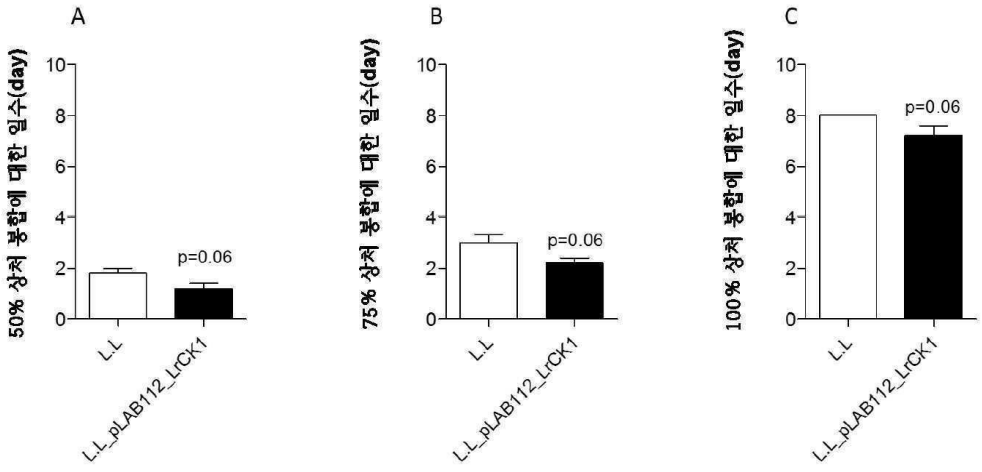
도면26



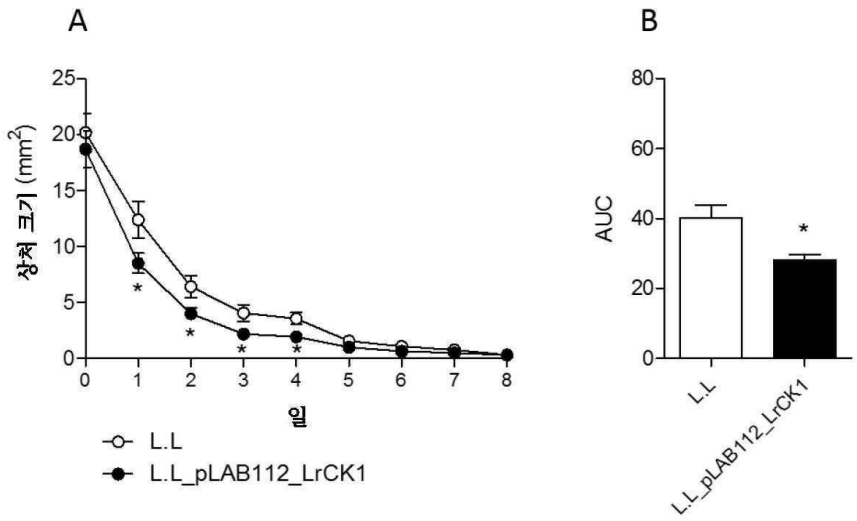
도면27



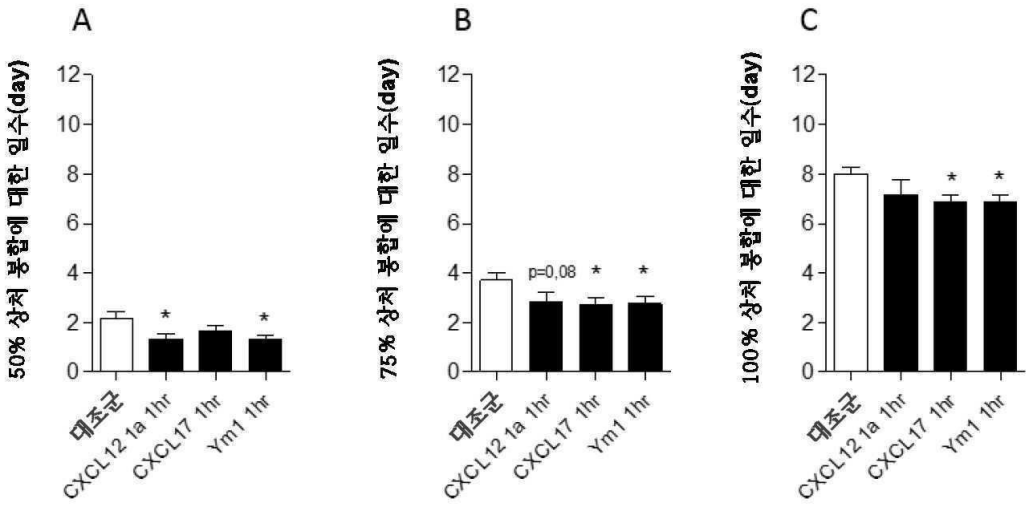
도면28



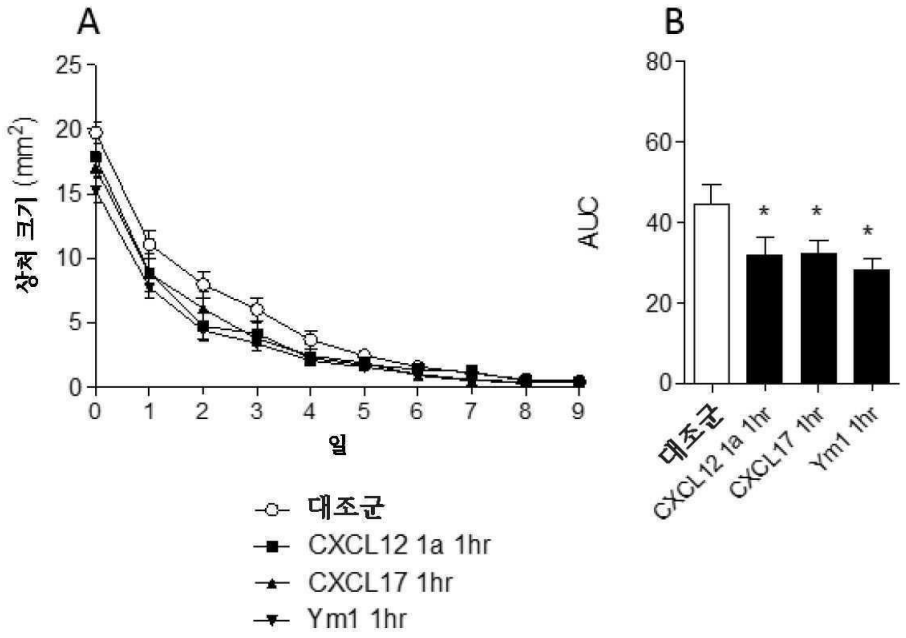
도면29


A
B
상처 크기 (mm2)
일
L.L
L.L_pLAB112_LrCK1
AUC
L.L
L.L_pLAB112_LrCK1

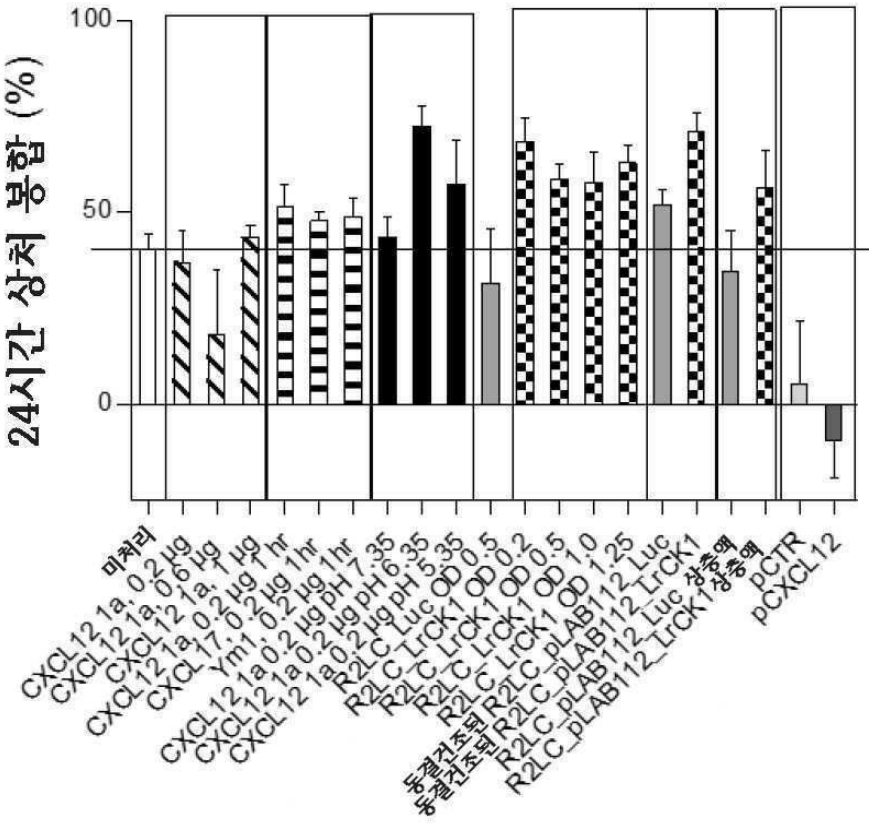
도면30


A
B
C
50% 상처 봉합에 대한 일수(day)
75% 상처 봉합에 대한 일수(day)
100% 상처 봉합에 대한 일수(day)
p=0,08
대조군
CXCL12 1a 1hr
CXCL17 1hr
Ym1 1hr

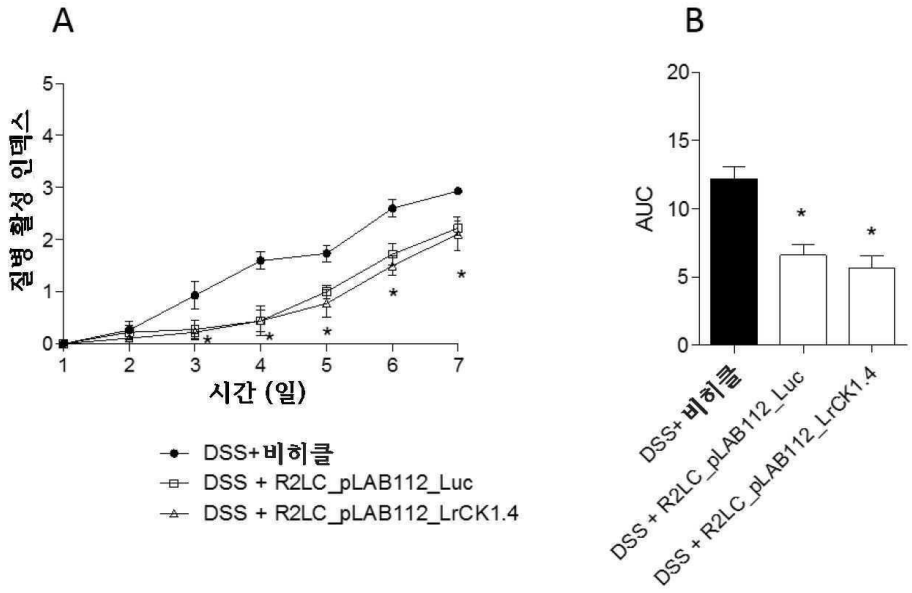
도면31


A
B
상처 크기 (mm²)
일
AUC
대조군
CXCL12 1a 1hr
CXCL17 1hr
Ym1 1hr

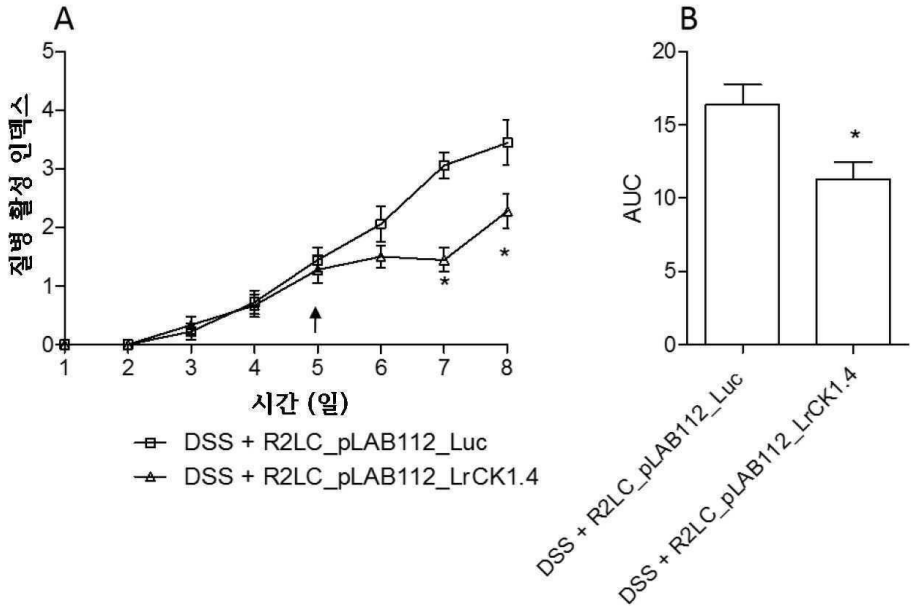
도면32


24시간 상처 봉합 (%)
미처리
CXCL12 1a, 0.2 μg
CXCL12 1a, 0.6 μg
CXCL12 1a, 1 μg
CXCL12 1a 0.2 μg 1 hr
CXCL17, 0.2 μg 1hr
Ym1, 0.2 μg 1hr
CXCL12 1a 0.2 μg pH 7.35
CXCL12 1a 0.2 μg pH 6.35
CXCL12 1a 0.2 μg pH 5.35
R2LC_LrCK1 OD 0.5
R2LC_LrCK1 OD 0.2
R2LC_LrCK1 OD 0.5
R2LC_LrCK1 OD 1.0
R2LC_LrCK1 OD 1.25
동결건조된R2LC_pLAB112_Luc
동결건조된R2LC_pLAB112_LrCK1
R2LC_pLAB112_Luc 상층액
R2LC_pLAB112_LrCK1상층액
pCTR
pCXCL12

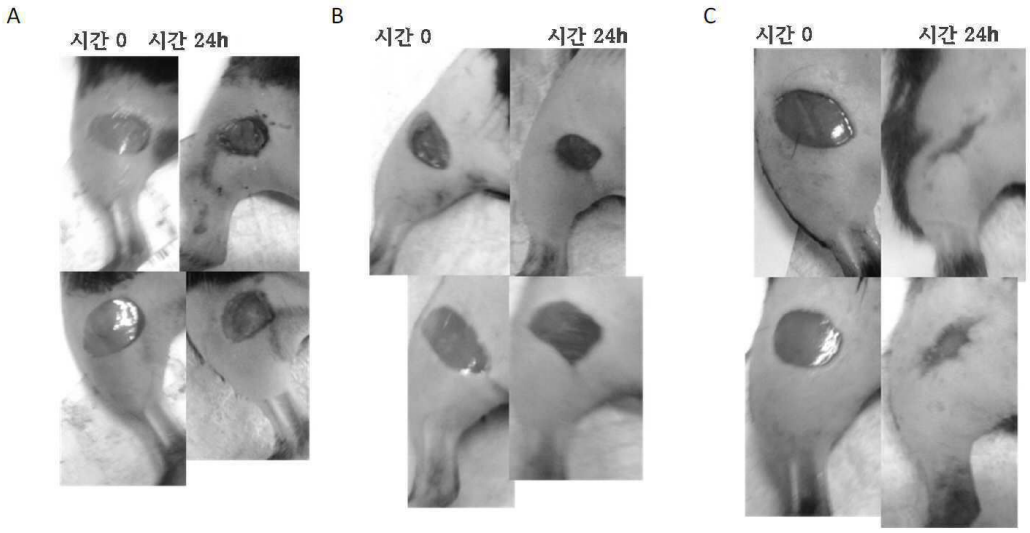
도면33


A
질병 활성 인덱스
시간 (일)
DSS+비히클
DSS + R2LC_pLAB112_Luc
DSS + R2LC_pLAB112_LrCK1.4
B
AUC
DSS+비히클
DSS + R2LC_pLAB112_Luc
DSS + R2LC_pLAB112_LrCK1.4

도면34


A
질병 활성 인덱스
시간 (일)
DSS + R2LC_pLAB112_Luc
DSS + R2LC_pLAB112_LrCK1.4
B
AUC
DSS + R2LC_pLAB112_Luc
DSS + R2LC_pLAB112_LrCK1.4

도면35



서 열 목 록

<110> PHILLIPSON, Mia

ROOS, Stefan

VGESJ, Evelina

<120> Methods for wound healing

<130> 27.34.126097

<150> 1451658-7

<151> 2014-12-23

<160> 26

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 299

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Organism: Mus musculus, CDS is from position 3 to position 293.

<400> 1

ccatggcaaa attttggaag aaagcactat taacaattgc agccttaaca gtcggcacct 60

ccgcaggaat tacaagcgtt tctgccaaac cggtaagttt gtcatatcga tgtccatgcc 120

ggtttttcga atctcatatt gcacgcgcta atgtcaaaca cttaaagatt cttaatactc 180

ctaattgtgc tttgcagatt gttgcacgtt taaagaataa caatcgtcaa gtttgtatcg 240

atccaaagct taaatggatt caagagtact tagaaaaggc cttaaacaaa taactcgag 299

<210> 2

<211> 96

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Ala Lys Phe Trp Lys Lys Ala Leu Leu Thr Ile Ala Ala Leu Thr
1 5 10 15

Val Gly Thr Ser Ala Gly Ile Thr Ser Val Ser Ala Lys Pro Val Ser
20 25 30

Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His Ile Ala Arg
35 40 45

Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu
50 55 60

Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp
65 70 75 80

Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys
85 90 95

<210> 3

<211

> 89

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Met Asp Ala Lys Val Val Ala Val Leu Ala Leu Val Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15

Cys Ile Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys
20 25 30

Arg Phe Phe Glu Ser His Ile Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys
35 40 45

Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys
50 55 60

Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln
65 70 75 80

Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys

85

<210> 4

<211> 299

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Organism: Homo sapiens, CDS is from position 3 to position 293.

<400> 4

ccatggcaaa attttggaag aaagcactat taacaattgc agccttaaca gtcggcacct 60

ccgcaggaat tacaagcgtt tctgccaaac cggtaagttt gtcatatcga tgtccatgcc 120

ggtttttcga atctcatgtt gcacgcgcta atgtcaaaca cttaaagatt cttaatactc 180

ctaattgtgc tttgcagatt gttgcacgtt taaagaataa caatcgtcaa gtttgtatcg 240

atccaaagct taaatggatt caagagtact tagaaaaggc cttaaacaaa taactcgag 299

<210> 5

<211> 96

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Ala Lys Phe Trp Lys Lys Ala Leu Leu Thr Ile Ala Ala Leu Thr
1 5 10 15

Val Gly Thr Ser Ala Gly Ile Thr Ser Val Ser Ala Lys Pro Val Ser
20 25 30

Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg
35 40 45

Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu
50 55 60

Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp
65 70 75 80

Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys
85 90 95

<210> 6

<211

> 89

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Asn Ala Lys Val Val Val Val Leu Val Leu Val Leu Thr Ala Leu
1 5 10 15

Cys Leu Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys
20 25 30

Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys
35 40 45

Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys
50 55 60

Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln
65 70 75 80

Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys
85

<210> 7

<211> 386

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Organism: Mus musculus, CDS is from position 3 to position 380.

<400> 7

ccatggcaaa attttggaag aaagcactat taacaattgc agccttaaca gtcggcacct 60

ccgcaggaat tacaagcgtt tctgccagcc caaatccagg ggtcgccaga tctcacggcg 120

accagcacct ggctcctagg agatggctcc tggaaggcgg ccaagaatgt gagtgcaaag 180

attggttcct gcaagccccg aagagaaaag ccacagctgt gctggggcca ccaagaaagc 240

agtgcccctg tgatcatgtg aagggcagag aaaagaaaaa tagacaccaa aagcaccaca 300

gaaagagcca aagaccctcc agagcctgcc agcaatttct caaaaggtgt cacctagcca 360

gctttgctct gcctttgtag ctcgag 386

<210> 8

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Ala Lys Phe Trp Lys Lys Ala Leu Leu Thr Ile Ala Ala Leu Thr

1 5 10 15

Val Gly Thr Ser Ala Gly Ile Thr Ser Val Ser Ala Ser Pro Asn Pro

20 25 30

Gly Val Ala Arg Ser His Gly Asp Gln His Leu Ala Pro Arg Arg Trp

35 40 45

Leu Leu Glu Gly Gly Gln Glu Cys Glu Cys Lys Asp Trp Phe Leu Gln

50 55 60

Ala Pro Lys Arg Lys Ala Thr Ala Val Leu Gly Pro Pro Arg Lys Gln

65 70 75 80

Cys Pro Cys Asp His Val Lys Gly Arg Glu Lys Lys Asn Arg His Gln

85 90 95

Lys His His Arg Lys Ser Gln Arg Pro Ser Arg Ala Cys Gln Gln Phe

100 105 110

Leu Lys Arg Cys His Leu Ala Ser Phe Ala Leu Pro Leu

115 120 125

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Met Lys Leu Leu Ala Ser Pro Phe Leu Leu Leu Leu Pro Val Met Leu

1 5 10 15

Met Ser Met Val Phe Ser Ser Pro Asn Pro Gly Val Ala Arg Ser His

20 25 30

Gly Asp Gln His Leu Ala Pro Arg Arg Trp Leu Leu Glu Gly Gly Gln

35 40 45

Glu Cys Glu Cys Lys Asp Trp Phe Leu Gln Ala Pro Lys Arg Lys Ala

50 55 60

Thr Ala Val Leu Gly Pro Pro Arg Lys Gln Cys Pro Cys Asp His Val

65 70 75 80

Lys Gly Arg Glu Lys Lys Asn Arg His Gln Lys His His Arg Lys Ser

85 90 95

Gln Arg Pro Ser Arg Ala Cys Gln Gln Phe Leu Lys Arg Cys His Leu

100 105 110

Ala Ser Phe Ala Leu Pro Leu

115

<210> 10

<211> 386

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Organism: Homo sapiens, CDS is from position 3 to position 380.

<400> 10

ccatggcaaa attttggaag aaagcactat taacaattgc agccttaaca gtcggcacct 60

ccgcaggaat tacaagcgtt tctgcctcat taaatccagg agtagcacgg ggtcatcgag 120

atcggggaca agcaagtcgg cgttggttac aagaaggtgg tcaagaatgt gaatgtaaag 180

attggttttt acgtgctcca cgtcggaagt ttatgactgt tagtggtctt ccaaagaaac 240

aatgtccttg tgatcatttt aagggaaatg ttaagaaaac tcgacaccaa cgtcatcacc 300

ggaaacctaa taagcattca cgggcatgtc aacaatttct taaacaatgt caacttcgtt 360

cttttgctct tcctctttaa ctcgag 386

<210> 11

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Ala Lys Phe Trp Lys Lys Ala Leu Leu Thr Ile Ala Ala Leu Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Val Ala Arg Gly His Arg Asp Arg Gly Gln Ala Ser Arg Arg Trp

35 40 45

Leu Gln Glu Gly Gly Gln Glu Cys Glu Cys Lys Asp Trp Phe Leu Arg

50 55 60

Ala Pro Arg Arg Lys Phe Met Thr Val Ser Gly Leu Pro Lys Lys Gln
65 70 75 80

Cys Pro Cys Asp His Phe Lys Gly Asn Val Lys Lys Thr Arg His Gln
85 90 95
Arg His His Arg Lys Pro Asn Lys His Ser Arg Ala Cys Gln Gln Phe
100 105 110
Leu Lys Gln Cys Gln Leu Arg Ser Phe Ala Leu Pro Leu
115 120 125

<210> 12
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 12

Met Lys Val Leu Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Met Leu
1 5 10 15

Met Ser Met Val Ser Ser Ser Leu Asn Pro Gly Val Ala Arg Gly His
20 25 30
Arg Asp Arg Gly Gln Ala Ser Arg Arg Trp Leu Gln Glu Gly Gly Gln
35 40 45
Glu Cys Glu Cys Lys Asp Trp Phe Leu Arg Ala Pro Arg Arg Lys Phe
50 55 60
Met Thr Val Ser Gly Leu Pro Lys Lys Gln Cys Pro Cys Asp His Phe
65 70 75 80
Lys Gly Asn Val Lys Lys Thr Arg His Gln Arg His His Arg Lys Pro

85 90 95
Asn Lys His Ser Arg Ala Cys Gln Gln Phe Leu Lys Gln Cys Gln Leu
100 105 110
Arg Ser Phe Ala Leu Pro Leu
115

<210> 13
<211> 1226
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Organism: Mus musculus, CDS is from position 3 to position 1220.

<400> 13

ccatggcaaa attttggaag aaagcactat taacaattgc agccttaaca gtcggcacct 60

ccgcaggaat tacaagcgtt tctgcctacc aacttatgtg ttactacact tcatgggcta 120

aagatcgtcc aattgaaggt tcttttaagc caggaaatat tgatccttgt ctttgtacac 180

atcttattta cgcttttgct ggtatgcaaa ataatgaaat tacttacaca cacgaacaag 240

atttacgtga ttacgaagct cttaatggtc ttaaggataa gaatactgaa cttaagacac 300

ttcttgcaat tggtggatgg aagtttggac cagctccttt tagtgcaatg gtttcaactc 360

cacaaaatcg gcaaattttt attcaaagtg taattcggtt tttacggcaa tacaattttg 420

atggacttaa tcttgattgg caatacccag gtagtcgagg atcaccacct aaggataagc 480

atttatttag tgttcttgta aaagaaatgc gaaaggcttt tgaagaagaa agtgttgaaa 540

aggatattcc acgtcttctt cttactagta caggtgcagg aattattgat gtaattaagt 600

caggttacaa gattccagaa cttagtcaat cacttgatta cattcaagtt atgacttacg 660

atttacacga tcctaaggat ggttacacag gagaaaattc tccactttac aagagtcctt 720

acgatattgg aaagagtgct gatcttaatg ttgattctat tattagttac tggaaagatc 780

atggagctgc atcagaaaag cttattgttg gttttccagc ttacggacac acttttattc 840

tttcagatcc atctaagaca ggtattggag cacctactat ttctacaggt ccacctggaa 900

agtatactga tgaaagtggt cttttagctt actacgaagt ttgtacattt ttaaatgaag 960

gagctacaga agtttgggat gcaccacaag aagtacctta tgcataccag ggtaatgaat 1020

gggttggata cgataatgta cgtagtttta agcttaaggc tcaatggctt aaggataata 1080

atttaggtgg agcagttgta tggccacttg atatggatga tttttctggt agtttttgtc 1140

atcaacggca ctttcctctt acttcaacac ttaagggtga tcttaatatt cattcagcat 1200

cttgtaaggg accatattaa ctcgag 1226

<210> 14

<211> 405

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Met Ala Lys Phe Trp Lys Lys Ala Leu Leu Thr Ile Ala Ala Leu Thr

1 5 10 15

Val Gly Thr Ser Ala Gly Ile Thr Ser Val Ser Ala Tyr Gln Leu Met
20 25 30
Cys Tyr Tyr Thr Ser Trp Ala Lys Asp Arg Pro Ile Glu Gly Ser Phe
35 40 45
Lys Pro Gly Asn Ile Asp Pro Cys Leu Cys Thr His Leu Ile Tyr Ala
50 55 60
Phe Ala Gly Met Gln Asn Asn Glu Ile Thr Tyr Thr His Glu Gln Asp
65 70 75 80

Leu Arg Asp Tyr Glu Ala Leu Asn Gly Leu Lys Asp Lys Asn Thr Glu
85 90 95
Leu Lys Thr Leu Leu Ala Ile Gly Gly Trp Lys Phe Gly Pro Ala Pro
100 105 110
Phe Ser Ala Met Val Ser Thr Pro Gln Asn Arg Gln Ile Phe Ile Gln
115 120 125
Ser Val Ile Arg Phe Leu Arg Gln Tyr Asn Phe Asp Gly Leu Asn Leu
130 135 140
Asp Trp Gln Tyr Pro Gly Ser Arg Gly Ser Pro Pro Lys Asp Lys His

145 150 155 160
Leu Phe Ser Val Leu Val Lys Glu Met Arg Lys Ala Phe Glu Glu Glu
165 170 175
Ser Val Glu Lys Asp Ile Pro Arg Leu Leu Leu Thr Ser Thr Gly Ala
180 185 190
Gly Ile Ile Asp Val Ile Lys Ser Gly Tyr Lys Ile Pro Glu Leu Ser
195 200 205
Gln Ser Leu Asp Tyr Ile Gln Val Met Thr Tyr Asp Leu His Asp Pro
210 215 220

Lys Asp Gly Tyr Thr Gly Glu Asn Ser Pro Leu Tyr Lys Ser Pro Tyr
225 230 235 240
Asp Ile Gly Lys Ser Ala Asp Leu Asn Val Asp Ser Ile Ile Ser Tyr
245 250 255
Trp Lys Asp His Gly Ala Ala Ser Glu Lys Leu Ile Val Gly Phe Pro
260 265 270

Ala Tyr Gly His Thr Phe Ile Leu Ser Asp Pro Ser Lys Thr Gly Ile
275 280 285

Gly Ala Pro Thr Ile Ser Thr Gly Pro Pro Gly Lys Tyr Thr Asp Glu

290 295 300

Ser Gly Leu Leu Ala Tyr Tyr Glu Val Cys Thr Phe Leu Asn Glu Gly
305 310 315 320

Ala Thr Glu Val Trp Asp Ala Pro Gln Glu Val Pro Tyr Ala Tyr Gln
325 330 335

Gly Asn Glu Trp Val Gly Tyr Asp Asn Val Arg Ser Phe Lys Leu Lys
340 345 350

Ala Gln Trp Leu Lys Asp Asn Asn Leu Gly Gly Ala Val Val Trp Pro
355 360 365

Leu Asp Met Asp Asp Phe Ser Gly Ser Phe Cys His Gln Arg His Phe

370 375 380

Pro Leu Thr Ser Thr Leu Lys Gly Asp Leu Asn Ile His Ser Ala Ser
385 390 395 400

Cys Lys Gly Pro Tyr
405

<210> 15

<211> 398

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Met Ala Lys Leu Ile Leu Val Thr Gly Leu Ala Ile Leu Leu Asn Val
1 5 10 15

Gln Leu Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Met Cys Tyr Tyr Thr Ser Trp Ala

20 25 30

Lys Asp Arg Pro Ile Glu Gly Ser Phe Lys Pro Gly Asn Ile Asp Pro
35 40 45

Cys Leu Cys Thr His Leu Ile Tyr Ala Phe Ala Gly Met Gln Asn Asn

50 55 60

Glu Ile Thr Tyr Thr His Glu Gln Asp Leu Arg Asp Tyr Glu Ala Leu

65 70 75 80

Asn Gly Leu Lys Asp Lys Asn Thr Glu Leu Lys Thr Leu Leu Ala Ile

85 90 95

Gly Gly Trp Lys Phe Gly Pro Ala Pro Phe Ser Ala Met Val Ser Thr

100 105 110

Pro Gln Asn Arg Gln Ile Phe Ile Gln Ser Val Ile Arg Phe Leu Arg

115 120 125

Gln Tyr Asn Phe Asp Gly Leu Asn Leu Asp Trp Gln Tyr Pro Gly Ser

130 135 140

Arg Gly Ser Pro Pro Lys Asp Lys His Leu Phe Ser Val Leu Val Lys

145 150 155 160

Glu Met Arg Lys Ala Phe Glu Glu Glu Ser Val Glu Lys Asp Ile Pro

165 170 175

Arg Leu Leu Leu Thr Ser Thr Gly Ala Gly Ile Ile Asp Val Ile Lys

180 185 190

Ser Gly Tyr Lys Ile Pro Glu Leu Ser Gln Ser Leu Asp Tyr Ile Gln

195 200 205

Val Met Thr Tyr Asp Leu His Asp Pro Lys Asp Gly Tyr Thr Gly Glu

210 215 220

Asn Ser Pro Leu Tyr Lys Ser Pro Tyr Asp Ile Gly Lys Ser Ala Asp

225 230 235 240

Leu Asn Val Asp Ser Ile Ile Ser Tyr Trp Lys Asp His Gly Ala Ala

245 250 255

Ser Glu Lys Leu Ile Val Gly Phe Pro Ala Tyr Gly His Thr Phe Ile

260 265 270

Leu Ser Asp Pro Ser Lys Thr Gly Ile Gly Ala Pro Thr Ile Ser Thr

275 280 285

Gly Pro Pro Gly Lys Tyr Thr Asp Glu Ser Gly Leu Leu Ala Tyr Tyr

290 295 300

Glu Val Cys Thr Phe Leu Asn Glu Gly Ala Thr Glu Val Trp Asp Ala

305 310 315 320

Pro Gln Glu Val Pro Tyr Ala Tyr Gln Gly Asn Glu Trp Val Gly Tyr
325 330 335
Asp Asn Val Arg Ser Phe Lys Leu Lys Ala Gln Trp Leu Lys Asp Asn
340 345 350
Asn Leu Gly Gly Ala Val Val Trp Pro Leu Asp Met Asp Asp Phe Ser
355 360 365
Gly Ser Phe Cys His Gln Arg His Phe Pro Leu Thr Ser Thr Leu Lys
370 375 380

Gly Asp Leu Asn Ile His Ser Ala Ser Cys Lys Gly Pro Tyr
385 390 395

<210> 16

<211> 1181

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Organism: Homo sapiens, CDS is from position 3 to position 1175.

<400> 16

ccatggcaaa attttggaag aaagcactat taacaattgc agccttaaca gtcggcacct 60

ccgcaggaat tacaagcgtt tctgcctaca agcttgtttg ttactacact tcatggtctc 120

aataccgaga aggtgatgga agttgttttc cagatgctct tgatcggttt ttatgtacac 180

atattattta ctcttttgca aatattagta atgatcacat tgatacatgg gaatggaatg 240

atgttactct ttacggtatg cttaatacac ttaagaatcg taatccaaat ttaaagactt 300

tacttagtgt aggtggatgg aattttggtt ctcaacggtt tagtaagatt gcttcaaata 360

ctcaatctcg tcggacattt attaaaagtg ttccaccatt tttacgtact catggttttg 420

atggacttga tttagcatgg ctttatccag gtcgacgtga taagcaacac tttactacac 480

ttattaaaga aatgaaggct gaatttatta aggaagcaca acctggtaaa aagcaacttc 540

ttcttagtgc tgcattatca gctggaaagg ttactattga tagttcatac gatattgcaa 600

agattagtca acatcttgat tttatttcaa ttatgacata cgattttcac ggtgcttggc 660

ggggtactac aggacatcac agtccattat ttcgtggaca agaagatgct tcacctgatc 720

ggttttctaa tactgattat gcagttggtt acatgcttcg gttaggagct ccagcatcta 780

aacttgtaat gggtattcct acttttggac gatcatttac attagcttct agtgaaactg 840

gtgttggagc accaatttca ggtccaggaa ttcctggtcg ttttactaag gaagctggaa 900

cacttgcata ctacgaaatt tgtgattttc ttcggggtgc tactgttcat cgaacacttg 960

gacaacaagt accttatgca actaaaggta atcaatgggt tggatacgat gatcaagaaa 1020

gtgttaagtc aaaggtacaa taccttaagg atcgacaatt agctggtgca atggtatggg 1080

ctcttgatct tgatgatttt caaggtagtt tttgtggaca agatcttcgt tttccactta 1140

ctaatgctat taaggatgca ttagctgcaa cataactcga g 1181

<210> 17

<211> 390

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Ala Lys Phe Trp Lys Lys Ala Leu Leu Thr Ile Ala Ala Leu Thr
1 5 10 15

Val Gly Thr Ser Ala Gly Ile Thr Ser Val Ser Ala Tyr Lys Leu Val

20 25 30

Cys Tyr Tyr Thr Ser Trp Ser Gln Tyr Arg Glu Gly Asp Gly Ser Cys
35 40 45

Phe Pro Asp Ala Leu Asp Arg Phe Leu Cys Thr His Ile Ile Tyr Ser
50 55 60

Phe Ala Asn Ile Ser Asn Asp His Ile Asp Thr Trp Glu Trp Asn Asp
65 70 75 80

Val Thr Leu Tyr Gly Met Leu Asn Thr Leu Lys Asn Arg Asn Pro Asn
85 90 95

Leu Lys Thr Leu Leu Ser Val Gly Gly Trp Asn Phe Gly Ser Gln Arg
100 105 110

Phe Ser Lys Ile Ala Ser Asn Thr Gln Ser Arg Arg Thr Phe Ile Lys
115 120 125

Ser Val Pro Pro Phe Leu Arg Thr His Gly Phe Asp Gly Leu Asp Leu
130 135 140

Ala Trp Leu Tyr Pro Gly Arg Arg Asp Lys Gln His Phe Thr Thr Leu
145 150 155 160

Ile Lys Glu Met Lys Ala Glu Phe Ile Lys Glu Ala Gln Pro Gly Lys

165 170 175

Lys Gln Leu Leu Leu Ser Ala Ala Leu Ser Ala Gly Lys Val Thr Ile
180 185 190

Asp Ser Ser Tyr Asp Ile Ala Lys Ile Ser Gln His Leu Asp Phe Ile
195 200 205

Ser Ile Met Thr Tyr Asp Phe His Gly Ala Trp Arg Gly Thr Thr Gly
210 215 220

His His Ser Pro Leu Phe Arg Gly Gln Glu Asp Ala Ser Pro Asp Arg
225 230 235 240

Phe Ser Asn Thr Asp Tyr Ala Val Gly Tyr Met Leu Arg Leu Gly Ala
245 250 255

Pro Ala Ser Lys Leu Val Met Gly Ile Pro Thr Phe Gly Arg Ser Phe
260 265 270

Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Val Gly Ala Pro Ile Ser Gly Pro
275 280 285

Gly Ile Pro Gly Arg Phe Thr Lys Glu Ala Gly Thr Leu Ala Tyr Tyr
290 295 300

Glu Ile Cys Asp Phe Leu Arg Gly Ala Thr Val His Arg Thr Leu Gly

305 310 315 320

Gln Gln Val Pro Tyr Ala Thr Lys Gly Asn Gln Trp Val Gly Tyr Asp
325 330 335

Asp Gln Glu Ser Val Lys Ser Lys Val Gln Tyr Leu Lys Asp Arg Gln
340 345 350

Leu Ala Gly Ala Met Val Trp Ala Leu Asp Leu Asp Asp Phe Gln Gly
355 360 365

Ser Phe Cys Gly Gln Asp Leu Arg Phe Pro Leu Thr Asn Ala Ile Lys
370 375 380

Asp Ala Leu Ala Ala Thr
385 390

<210> 18

<211> 383

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Gly Val Lys Ala Ser Gln Thr Gly Phe Val Val Leu Val Leu Leu
1 5 10 15

Gln Cys Cys Ser Ala Tyr Lys Leu Val Cys Tyr Tyr Thr Ser Trp Ser
20 25 30

Gln Tyr Arg Glu Gly Asp Gly Ser Cys Phe Pro Asp Ala Leu Asp Arg
35 40 45

Phe Leu Cys Thr His Ile Ile Tyr Ser Phe Ala Asn Ile Ser Asn Asp

50 55 60

His Ile Asp Thr Trp Glu Trp Asn Asp Val Thr Leu Tyr Gly Met Leu
65 70 75 80

Asn Thr Leu Lys Asn Arg Asn Pro Asn Leu Lys Thr Leu Leu Ser Val
85 90 95

Gly Gly Trp Asn Phe Gly Ser Gln Arg Phe Ser Lys Ile Ala Ser Asn
100 105 110

Thr Gln Ser Arg Arg Thr Phe Ile Lys Ser Val Pro Pro Phe Leu Arg
115 120 125

Thr His Gly Phe Asp Gly Leu Asp Leu Ala Trp Leu Tyr Pro Gly Arg
130 135 140

Arg Asp Lys Gln His Phe Thr Thr Leu Ile Lys Glu Met Lys Ala Glu
145 150 155 160

Phe Ile Lys Glu Ala Gln Pro Gly Lys Lys Gln Leu Leu Leu Ser Ala
165 170 175

Ala Leu Ser Ala Gly Lys Val Thr Ile Asp Ser Ser Tyr Asp Ile Ala
180 185 190

Lys Ile Ser Gln His Leu Asp Phe Ile Ser Ile Met Thr Tyr Asp Phe

195 200 205

His Gly Ala Trp Arg Gly Thr Thr Gly His His Ser Pro Leu Phe Arg
210 215 220

Gly Gln Glu Asp Ala Ser Pro Asp Arg Phe Ser Asn Thr Asp Tyr Ala
225 230 235 240

Val Gly Tyr Met Leu Arg Leu Gly Ala Pro Ala Ser Lys Leu Val Met

245 250 255

Gly Ile Pro Thr Phe Gly Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr

260 265 270

Gly Val Gly Ala Pro Ile Ser Gly Pro Gly Ile Pro Gly Arg Phe Thr

275 280 285

Lys Glu Ala Gly Thr Leu Ala Tyr Tyr Glu Ile Cys Asp Phe Leu Arg

290 295 300

Gly Ala Thr Val His Arg Thr Leu Gly Gln Gln Val Pro Tyr Ala Thr

305 310 315 320

Lys Gly Asn Gln Trp Val Gly Tyr Asp Asp Gln Glu Ser Val Lys Ser

325 330 335

Lys Val Gln Tyr Leu Lys Asp Arg Gln Leu Ala Gly Ala Met Val Trp

340 345 350

Ala Leu Asp Leu Asp Asp Phe Gln Gly Ser Phe Cys Gly Gln Asp Leu

355 360 365

Arg Phe Pro Leu Thr Asn Ala Ile Lys Asp Ala Leu Ala Ala Thr

370 375 380

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> Lactobacillus

<400> 19

Met Ala Gly Asn Ser Ser Asn Phe Ile His Lys Ile Ile Lys Gln Ile

1 5 10 15

Phe Thr His Arg

20

<210> 20

<211> 7673

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant plasmid, CDS is from position 5853 to position 7658.

<400> 20

gaattcggta ccccgggttc gaaggcgcca agcttcaaat tacagcacgt gttgctttga 60

ttgatagcca aaaagcagca gttgataaag caattactga tattgctgaa aaattgtaat 120

ttataaataa aaatcacctt ttagaggtgg ttttttttatt tataaattat tcgtttgatt 180

tcgctttcga tagaacaatc aaagcgagaa taaggaagat aaatcccata agggcgggag 240

cagaatgtcc gagactaatt catgagatcg atttttttatt aaaacgtctc aaaatcgttt 300

ctgagacgtt ttagcgttta tttcgtttag ttatcggcat aatcgttaaa acaggcgtta 360

tcgtagcgta aaagcccttg agcgtagcgt gctttgcagc gaagatgttg tctgttagat 420

tatgaaagcc gatgactgaa tgaaataata agcgcagcgt ccttctattt cggttggagg 480

aggctcaagg gagtttgagg gaatgaaatt ccctcatggg tttgatttta aaaattgctt 540

gcaattttgc cgagcggtag cgctggaaaa atttttgaaa aaaatttgga atttggaaaa 600

aaatgggggg aaaggaagcg aattttgctt ccgtactacg acccccccatt aagtgccgag 660

tgccaatttt tgtgccaaaa acgctctatc ccaactggct caagggtttg aggggttttt 720

caatcgccaa cgaatcgcca acgttttcgc caacgttttt tataaatcta tatttaagta 780

gctttattgt tgtttttatg attacaaagt gatacactaa ttttataaaa ttatttgatt 840

ggagtttttt aaatggtgat ttcagaatcg aaaaaaagag ttatgatttc tctgacaaaa 900

gagcaagata aaaaattaac agatatggcg aaacaaaaag gtttttcaaa atctgcggtt 960

gcggcgttag ctatagaaga atatgcaaga aaggaatcag aataaaaaaa ataagcgaaa 1020

gctcgcgttt ttagaaggat acgagttttc gctacttgtt tttgataagg taatatatca 1080

tggctattaa atactaaagc tagaaatttt ggatttttat tatatcctga ctcaattcct 1140

aatgattgga aagaaaaatt agagagtttg ggcgtatcta tggctgtcag tcctttacac 1200

gatatggacg aaaaaaaaga taaagataca tggaatagta gtgatgttat acgaaatgga 1260

aagcactata aaaaaccaca ctatcacgtt atatatattg cacgaaatcc tgtaacaata 1320

gaaagcgtta ggaacaagat taagcgaaaa ttggggaata gttcagttgc tcatgttgag 1380

atacttgatt atatcaaagg ttcatatgaa tatttgactc atgaatcaaa ggacgctatt 1440

gctaagaata aacatatata cgacaaaaaa gatattttga acattaatga ttttgatatt 1500

gaccgctata taacacttga tgaaagccaa aaaagagaat tgaagaattt acttttagat 1560

atagtggatg actataattt ggtaaataca aaagatttaa tggcttttat tcgccttagg 1620

ggagcggagt ttggaatttt aaatacgaat gatgtaaaag atattgtttc aacaaactct 1680

agcgccttta gattatggtt tgagggcaat tatcagtgtg gatatagagc aagttatgca 1740

aaggttcttg atgctgaaac gggggaaata aaatgacaaa caaagaaaaa gagttatttg 1800

ctgaaaatga ggaattaaaa aaagaaatta aggacttaaa agagcgtatt gaaagataca 1860

gagaaatgga agttgaatta agtacaacaa tagatttatt gagaggaggg attattgaat 1920

aaataaaagc ccccctgacg aaagtcgaag ggggctttta ttttggtttg atgttgcgat 1980

taatagcaat acgattgcaa taaacaaaat gatcccctta gaagcaaact taagagtgtg 2040

ttgatagtgc attatcttaa aattttgtat aataggaatt gaagttaaat tagatgctaa 2100

aaataggaat tgaagttaaa ttagatgcta aaaatttgta attaagaagg agggattcgt 2160

catgttggta ttccaaatgc gtaatgtaga taaaacatct actgttttga aacagactaa 2220

aaacagtgat tacgcagata aataaatacg ttagattaat tcctaccagt gactaatctt 2280

atgacttttt aaacagataa ctaaaattac aaacaaatcg tttaacttca ggagagatta 2340

catgaacaaa aatataaata tctcaaactt tttaacgagt gaaaaagtac tcaaccaaat 2400

aataaaacaa ttgaatttaa aagaaaccga taccgtttac gaaattggaa caggtaaagg 2460

gcatttaacg acgaaactgg ctaaaataag taaacaggta acgtctattg aattagacag 2520

tcatctattc aacttatcgt cagaaaaatt aaaactgaat actcgtgtca ctttaattca 2580

ccaagatatt ctacagtttc aattccctaa caaacagagg tataaaattg ttgggaatat 2640

tccttacaat ttaagcacac aaattattaa aaaagtggtt tttgaaagcc gtgcgtctga 2700

catctatctg actgttgaag aaggattcta caagcgtacc ttggatattc accgaacact 2760

agggttgctc ttgcacactc aagtctcgat tcagcaattg cttaagctgc cagcggaatg 2820

ctttcatcct aaaccaaaag taaacagtgt cttaataaaa cttacccgcc ataccacaga 2880

tgttccagat aaatattgga agctatataa gtactttgtt tcaaaatggg tcaatcgaga 2940

atatcgtcaa ctgtttacta aaaatcagtt tcgtcaagca atgaaacacg ccaaagtaaa 3000

caatttaagt accattactt atgagcaagt attgtctatt tttaatagtt atctattatt 3060

taacgggagg aaataattct atgagtcgct tttttaaatt tggaaagtta cacgttacta 3120

aagggaatgg agaccggggt cgacccttca atagagttct taacgttaat ccgaaaaaaa 3180

ctaacgttaa tattaaaaaa taagatccgc ttgtgaatta tgtataattt gattagacta 3240

aagaatagga gaaagtatga tgatatttaa aaaactttct cgttaagata ggttgttggt 3300

gagcatgtta tatacggatg tatcggtttc cttaatgcaa aattttgttg ctatcttatt 3360

aatttttcta ttatatagat atattcaaag aaagataaca tttaaacgga tcatattaga 3420

tattttaata gcgattattt tttcaatatt atatctgttt atttcagatg cgtcattact 3480

tgtaatggta ttaatgcgat tagggtggca ttttcatcaa caaaaagaaa ataagataaa 3540

aacgactgat acagctaatt taattctaat tatcgtgatc cagttattgt tagttgcggt 3600

tgggactatt attagtcagt ttaccatatc gattatcaaa agtgatttca gccaaaatat 3660

attgaacaat agtgcaacag atataacttt attaggtatt ttctttgctg ttttatttga 3720
cggcttgttc tttatattat tgaagaataa gcggactgaa ttacaacatt taaatcaaga 3780
aatcattgaa ttttcgttag aaaaacaata ttttatattt atatttattt tatttatagt 3840
aatagaaatt attttagcag ttgggaatct tcaaggagta acagccacga tattattaac 3900
cattatcatt atttttgtg tccttatcgg gatgactttt tggcaagtga tgctttttt 3960
gaaggcttat tcgattcgcc aagaagccaa tgaccaattg gtccggaatc aacaacttca 4020
agattatcta gtcaatatcg aacagcagta caccgaatta cggcgattta agcatgatta 4080

tcaaaacatc ttattatcgt tggagagttt tgccgaaaag ggcgatcagc aacagtttaa 4140
ggcgtattac caagaattat tagcacaacg gccaattcaa agtgaaatcc aaggggcagt 4200
cattgcacaa ctcgactact tgaaaaatga tcctattcga ggattagtca ttcaaaagtt 4260
tttggcagcc aaacaggctg gtgttacttt aaaattcgaa atgaccgaac caatcgaatt 4320
agcaaccgct aatctattaa cggttattcg gattatcggt attttattag acaatgcgat 4380
tgaacaagcc gttcaagaaa ccgatcaatt ggtgagttgt gctttcttac aatctgatgg 4440
tttaatcgaa attacgattg aaaatacggc cagtcaagtt aagaatctcc aagcattttc 4500

agagttaggc tattcaacga aaggcgctgg tcgggggact ggtttagcta atgtgcagga 4560
tttgattgcc aaacaaacca atttattctt agaaacacag attgaaaata gaaagttacg 4620
acagacattg atgattacgg aggaaactta atttgtatcc cgtttattta ttagaggatg 4680
atttacagca acaagcgatt tatcagcaaa ttatcgcgaa tacgattatg attaacgaat 4740
ttgcaatgac tttaacatgc gctgccagtg atactgagac attgttggcg gcaattaagg 4800
atcagcaacg aggtttattc tttttggata tggaaattga ggataaccgc caagccggtt 4860
tagaagtggc aactaagatt cggcagatga tgccgtttgc gcaaattgtc ttcattacaa 4920

cccacgagga actgacatta ttaacgttag aacgaaaaat agcgccttta gattacattc 4980
tcaaggacca aacaatggct gaaatcaaaa ggcaattgat tgatgatcta ttgttagctg 5040
agaagcaaaa cgaggcggca gcgtatcacc gagaaaattt atttagttat aaaataggtc 5100
ctcgcttttt ctcattacca ttaaaggaag ttgtttattt atatactgaa aaagaaaatc 5160
cgggtcatat taatttgtta gccgttacca gaaaggttac ttttccagga aatttaaatg 5220
cgctggaagc ccaatatcca atgctctttc ggtgtgataa aagttactta gttaacctat 5280
ctaatattgc caattatgac agtaaaacac ggagtttaaa atttgtagat ggcagtgagg 5340

caaaagtctc gttccggaaa tcacgggaac tagtggccaa attaaaacaa atgatgtagc 5400

gcctgcaggc acgccaaatg atcccagtaa aaagccaccc gcatggcggg tggcttttta 5460

ttagccctag aagggcttcc cacacgcatt tcagcgcctt agtgccttag tttgtgaatc 5520

ataggtggta tagtcccgaa atacccgtct aaggaattgt cagataggcc taatgactgg 5580

cttttataat atgagataat gccgactgta ctttttacag tcggttttct aatgtcacta 5640

acctgccccg ttagttgaag aaggttttta tattacagct ccagatctac cggtttaatt 5700

tgaaaattga tattagcgtt taacagttaa attaatacgt taataatttt tttgtcttta 5760

aatagggatt tgaagcataa tggtgttata gcgtacttag ctggccagca tatatgtatt 5820

ctataaaata ctattacaag gagattttag ccatggtacg tcctgtagaa accccaaccc 5880

gtgaaatcaa aaaactcgac ggcctgtggg cattcagtct ggatcgcgaa aactgtggaa 5940

ttgatcagcg ttggtgggaa agcgcgttac aagaaagccg ggcaattgct gtgccaggca 6000

gttttaacga tcagttcgcc gatgcagata ttcgtaatta tgcgggcaac gtctggtatc 6060

agcgcgaagt ctttataccg aaaggttggg caggccagcg tatcgtgctg cgtttcgatg 6120

cggtcactca ttacggcaaa gtgtgggtca ataatcagga agtgatggag catcagggcg 6180

gctatacgcc atttgaagcc gatgtcacgc cgtatgttat tgccgggaaa agtgtacgta 6240

tcaccgtttg tgtgaacaac gaactgaact ggcagactat cccgccggga atggtgatta 6300

ccgacgaaaa cggcaagaaa aagcagtctt acttccatga tttctttaac tatgccggaa 6360

tccatcgcag cgtaatgctc tacaccacgc cgaacacctg ggtggacgat atcaccgtgg 6420

tgacgcatgt cgcgcaagac tgtaaccacg cgtctgttga ctggcaggtg gtggccaatg 6480

gtgatgtcag cgttgaactg cgtgatgcgg atcaacaggt ggttgcaact ggacaaggca 6540

ctagcgggac tttgcaagtg gtgaatccgc acctctggca accgggtgaa ggttatctct 6600

atgaactgtg cgtcacagcc aaaagccaga cagagtgtga tatctacccg cttcgcgtcg 6660

gcatccggtc agtggcagtg aagggcgaac agttcctgat taaccacaaa ccgttctact 6720

ttactggctt tggtcgtcat gaagatgcgg acttgcgtgg caaaggattc gataacgtgc 6780

tgatggtgca cgaccacgca ttaatggact ggattggggc caactcctac cgtacctcgc 6840

attaccctta cgctgaagag atgctcgact gggcagatga acatggcatc gtggtgattg 6900

atgaaactgc tgctgtcggc tttaacctct ctttaggcat tggtttcgaa gcgggcaaca 6960

agccgaaaga actgtacagc gaagaggcag tcaacgggga aactcagcaa gcgcacttac 7020

aggcgattaa agagctgata gcgcgtgaca aaaaccaccc aagcgtggtg atgtggagta 7080

ttgccaacga accggatacc cgtccgcaag gtgcacggga atatttcgcg ccactggcgg 7140

aagcaacgcg taaactcgac ccgacgcgtc cgatcacctg cgtcaatgta atgttctgcg 7200

acgctcacac cgataccatc agcgatctct ttgatgtgct gtgcctgaac cgttattacg 7260

gatggtatgt ccaaagcggc gatttggaaa cggcagagaa ggtactggaa aaagaacttc 7320

tggcctggca ggagaaactg catcagccga ttatcatcac cgaatacggc gtggatacgt 7380

tagccgggct gcactcaatg tacaccgaca tgtggagtga agagtatcag tgtgcatggc 7440

tggatatgta tcaccgcgtc tttgatcgcg tcagcgccgt cgtcggtgaa caggtatgga 7500

atttcgccga ttttgcgacc tcgcaaggca tattgcgcgt tggcggtaac aagaaaggga 7560

tcttcactcg cgaccgcaaa ccgaagtcgg cggcttttct gctgcaaaaa cgctggactg 7620

gcatgaactt cggtgaaaaa ccgcagggag gcaaacaatg atctagactc gag 7673

<210> 21

<211> 602

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 21

Met Val Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr Arg Glu Ile Lys Lys Leu Asp
1 5 10 15

Gly Leu Trp Ala Phe Ser Leu Asp Arg Glu Asn Cys Gly Ile Asp Gln
20 25 30

Arg Trp Trp Glu Ser Ala Leu Gln Glu Ser Arg Ala Ile Ala Val Pro
35 40 45

Gly Ser Phe Asn Asp Gln Phe Ala Asp Ala Asp Ile Arg Asn Tyr Ala
50 55 60

Gly Asn Val Trp Tyr Gln Arg Glu Val Phe Ile Pro Lys Gly Trp Ala
65 70 75 80

Gly Gln Arg Ile Val Leu Arg Phe Asp Ala Val Thr His Tyr Gly Lys
85 90 95

Val Trp Val Asn Asn Gln Glu Val Met Glu His Gln Gly Gly Tyr Thr
100 105 110

Pro Phe Glu Ala Asp Val Thr Pro Tyr Val Ile Ala Gly Lys Ser Val
115 120 125

Arg Ile Thr Val Cys Val Asn Asn Glu Leu Asn Trp Gln Thr Ile Pro
130 135 140

Pro Gly Met Val Ile Thr Asp Glu Asn Gly Lys Lys Lys Gln Ser Tyr
145 150 155 160

Phe His Asp Phe Phe Asn Tyr Ala Gly Ile His Arg Ser Val Met Leu
165 170 175
Tyr Thr Thr Pro Asn Thr Trp Val Asp Asp Ile Thr Val Val Thr His
180 185 190
Val Ala Gln Asp Cys Asn His Ala Ser Val Asp Trp Gln Val Val Ala
195 200 205
Asn Gly Asp Val Ser Val Glu Leu Arg Asp Ala Asp Gln Gln Val Val
210 215 220
Ala Thr Gly Gln Gly Thr Ser Gly Thr Leu Gln Val Val Asn Pro His

225 230 235 240
Leu Trp Gln Pro Gly Glu Gly Tyr Leu Tyr Glu Leu Cys Val Thr Ala
245 250 255
Lys Ser Gln Thr Glu Cys Asp Ile Tyr Pro Leu Arg Val Gly Ile Arg
260 265 270
Ser Val Ala Val Lys Gly Glu Gln Phe Leu Ile Asn His Lys Pro Phe
275 280 285
Tyr Phe Thr Gly Phe Gly Arg His Glu Asp Ala Asp Leu Arg Gly Lys
290 295 300

Gly Phe Asp Asn Val Leu Met Val His Asp His Ala Leu Met Asp Trp
305 310 315 320
Ile Gly Ala Asn Ser Tyr Arg Thr Ser His Tyr Pro Tyr Ala Glu Glu
325 330 335
Met Leu Asp Trp Ala Asp Glu His Gly Ile Val Val Ile Asp Glu Thr
340 345 350
Ala Ala Val Gly Phe Asn Leu Ser Leu Gly Ile Gly Phe Glu Ala Gly
355 360 365
Asn Lys Pro Lys Glu Leu Tyr Ser Glu Glu Ala Val Asn Gly Glu Thr

370 375 380
Gln Gln Ala His Leu Gln Ala Ile Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asp Lys

385 390 395 400

Asn His Pro Ser Val Val Met Trp Ser Ile Ala Asn Glu Pro Asp Thr

405 410 415

Arg Pro Gln Gly Ala Arg Glu Tyr Phe Ala Pro Leu Ala Glu Ala Thr

420 425 430

Arg Lys Leu Asp Pro Thr Arg Pro Ile Thr Cys Val Asn Val Met Phe

435 440 445

Cys Asp Ala His Thr Asp Thr Ile Ser Asp Leu Phe Asp Val Leu Cys

450 455 460

Leu Asn Arg Tyr Tyr Gly Trp Tyr Val Gln Ser Gly Asp Leu Glu Thr

465 470 475 480

Ala Glu Lys Val Leu Glu Lys Glu Leu Leu Ala Trp Gln Glu Lys Leu

485 490 495

His Gln Pro Ile Ile Ile Thr Glu Tyr Gly Val Asp Thr Leu Ala Gly

500 505 510

Leu His Ser Met Tyr Thr Asp Met Trp Ser Glu Glu Tyr Gln Cys Ala

515 520 525

Trp Leu Asp Met Tyr His Arg Val Phe Asp Arg Val Ser Ala Val Val

530 535 540

Gly Glu Gln Val Trp Asn Phe Ala Asp Phe Ala Thr Ser Gln Gly Ile

545 550 555 560

Leu Arg Val Gly Gly Asn Lys Lys Gly Ile Phe Thr Arg Asp Arg Lys

565 570 575

Pro Lys Ser Ala Ala Phe Leu Leu Gln Lys Arg Trp Thr Gly Met Asn

580 585 590

Phe Gly Glu Lys Pro Gln Gly Gly Lys Gln

595 600

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 22

gcagccttaa cagtcggcac ct 22

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 23

acgtgcaaca atctgcaaag cac 23

<210> 24

<211> 2999

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pVAX vector

<400> 24

gactcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta 60

atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata 120

acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat 180

aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga 240

ctatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc 300

ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt 360

atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat 420

gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag 480

tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc 540

aaaatgtcgt aacaactccg ccccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga 600

ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaaccc actgcttact ggcttatcga 660

aattaatacg actcactata gggagaccca agctggctag cgtttaaact taagcttggt 720

accgagctcg gatccactag tccagtgtgg tggaattctg cagatatcca gcacagtggc 780

ggccgctcga gtctagaggg cccgtttaaa cccgctgatc agcctcgact gtgccttcta 840

gttgccagcc atctgttgtt tgcccctccc ccgtgccttc cttgaccctg gaaggtgcca 900

ctcccactgt cctttcctaa taaaatgagg aaattgcatc gcattgtctg agtaggtgtc 960

attctattct gggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata 1020

gcaggcatgc tggggatgcg gtgggctcta tggcttctac tgggcggttt tatggacagc 1080

aagcgaaccg gaattgccag ctggggcgcc ctctggtaag gttgggaagc cctgcaaagt 1140

aaactggatg gctttctcgc cgccaaggat ctgatggcgc aggggatcaa gctctgatca 1200

agagacagga tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc 1260

ggccgcttgg gtggagaggc tattcggcta tgactgggca caacagacaa tcggctgctc 1320

tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgca ggggcgcccg gttctttttg tcaagaccga 1380

cctgtccggt gccctgaatg aactgcaaga cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac 1440

gacgggcgtt ccttgcgcag ctgtgctcga cgttgtcact gaagcgggaa gggactggct 1500

gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc ctgccgagaa 1560

agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg ctacctgccc 1620

attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga gcgagcacgt actcggatgg aagccggtct 1680

tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc 1740

caggctcaag gcgagcatgc ccgacggcga ggatctcgtc gtgacccatg gcgatgcctg 1800

cttgccgaat atcatggtgg aaaatggccg cttttctgga ttcatcgact gtggccggct 1860

gggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct 1920

tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt gctttacggt atcgccgctc ccgattcgca 1980

gcgcatcgcc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga attattaacg cttacaattt 2040

cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tacaggtggc 2100

acttttcggg gaaatgtgcg cggaacccct atttgtttat ttttctaaat acattcaaat 2160

atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatagca cgtgctaaaa 2220

cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaaa 2280

atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 2340

tcttcttgag atccttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 2400

ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 2460

ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 2520

cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg 2580

gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 2640

gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 2700

acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc 2760

gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 2820

agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 2880

tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 2940

agcaacgcgg cctttttacg gttcctgggc ttttgctggc cttttgctca catgttctt 2999

<210> 25

<211> 347

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> insert

<400> 25

gctagcatgg acgccaaggt cgtcgccgtg ctggccctgg tgctggccgc gctctgcatc 60

agtgacggta aaccagtcag cctgagctac cgatgcccct gccggttctt cgagagccac 120

atcgccagag ccaacgtcaa gcatctgaaa atcctcaaca ctccaaactg tgcccttcag 180

attgttgcac ggctgaagaa caacaacaga caagtgtgca ttgacccgaa attaaagtgg 240

atccaagagt acctggagaa agccttaaac aagggatcag gtgccacgaa cttctctctg 300

ttaaagcaag caggagacgt ggaagaaaac cccggtccca aaagctt 347

<210> 26

<211> 5395

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> vector

<400> 26

gactcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta 60

atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata 120

acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat 180

aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga 240

ctatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc 300

ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt 360

atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat 420

gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag 480

tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc 540

aaaatgtcgt aacaactccg ccccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga 600

ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaaccc actgcttact ggcttatcga 660

aattaatacg actcactata gggagaccca agctggctag cgtttaaact taagcttcgc 720

caccatggag agcgacgaga gcggcctgcc cgccatggag atcgagtgcc gcatcaccgg 780

caccctgaac ggcgtggagt tcgagctggt gggcggcgga gagggcaccc ccaagcaggg 840

ccgcatgacc aacaagatga agagcaccaa aggcgccctg accttcagcc cctacctgct 900

gagccacgtg atgggctacg gcttctacca cttcggcacc taccccagcg gctacgagaa 960

ccccttcctg cacgccatca acaacggcgg ctacaccaac acccgcatcg agaagtacga 1020

ggacggcggc gtgctgcacg tgagcttcag ctaccgctgc gaggccggcc gcgtgatcgg 1080

cgacttcaag gtggtgggca ccggcttccc cgaggacagc gtgatcttca ccgacaagat 1140

catccgcagc aacgccaccg tggagcacct gcaccccatg ggcgataacg tgctggtggg 1200

cagcttcgcc cgcaccttca gcctgcgcga cggcggctac cacagcttcg tggtggacaa 1260

ccacatgcac ttcaagagcg ccatccaccc cagcatcctg cagaacgggg gccccatgtt 1320

cgccttccgc cgcgtggagg agctgcacag caacaccgag ctgggcatcg tggagtacca 1380

gcacgccttc aagaccccca tcgccttcgc cagatcccgc gctcagtcgt ccaattctgc 1440

cgtggacggc accgccggac ccggctccac cggatctcgc gagggcagag gaagtcttct 1500

aacatgcggt gacgtggagg agaatcccgg ccctatggaa gatgccaaaa acattaagaa 1560

gggcccagcg ccattctacc cactcgaaga cgggaccgcc ggcgagcagc tgcacaaagc 1620

catgaagcgc tacgccctgg tgcccggcac catcgccttt accgacgcac atatcgaggt 1680

ggacattacc tacgccgagt acttcgagat gagcgttcgg ctggcagaag ctatgaagcg 1740

ctatgggctg aatacaaacc atcggatcgt ggtgtgcagc gagaatagct tgcagttctt 1800

catgcccgtg ttgggtgccc tgttcatcgg tgtggctgtg gccccagcta acgacatcta 1860

caacgagcgc gagctgctga acagcatggg catcagccag cccaccgtcg tattcgtgag 1920

caagaaaggg ctgcaaaaga tcctcaacgt gcaaaagaag ctaccgatca tacaaaagat 1980

catcatcatg gatagcaaga ccgactacca gggcttccaa agcatgtaca ccttcgtgac 2040

ttcccatttg ccacccggct tcaacgagta cgacttcgtg cccgagagct tcgaccggga 2100

caaaaccatc gccctgatca tgaacagtag tggcagtacc ggattgccca agggcgtagc 2160

cctaccgcac cgcaccgctt gtgtccgatt cagtcatgcc cgcgacccca tcttcggcaa 2220

ccagatcatc cccgacaccg ctatcctcag cgtggtgcca tttcaccacg gcttcggcat 2280

gttcaccacg ctgggctact tgatctgcgg ctttcgggtc gtgctcatgt accgcttcga 2340

ggaggagcta ttcttgcgca gcttgcaaga ctataagatt caatctgccc tgctggtgcc 2400

cacactattt agcttcttcg ctaagagcac tctcatcgac aagtacgacc taagcaactt 2460

gcacgagatc gccagcggcg gggcgccgct cagcaaggag gtaggtgagg ccgtggccaa 2520

acgcttccac ctaccaggca tccgccaggg ctacggcctg acagaaacaa ccagcgccat 2580

tctgatcacc cccgaagggg acgacaagcc tggcgcagta ggcaaggtgg tgcccttctt 2640

cgaggctaag gtggtggact tggacaccgg taagacactg ggtgtgaacc agcgcggcga 2700

gctgtgcgtc cgtggcccca tgatcatgag cggctacgtt aacaaccccg aggctacaaa 2760

cgctctcatc gacaaggacg gctggctgca cagcggcgac atcgcctact gggacgagga 2820

cgagcacttc ttcatcgtgg accggctgaa gagcctgatc aaatacaagg gctaccaggt 2880

agccccagcc gaactggaga gcatcctgct gcaacacccc aacatcttcg acgccggggt 2940

cgccggcctg cccgacgacg atgccggcga gctgcccgcc gcagtcgtcg tgctggaaca 3000

cggtaaaacc atgaccgaga aggagatcgt ggactatgtg gccagccagg ttacaaccgc 3060

caagaagctg cgcggtggtg ttgtgttcgt ggacgaggtg cctaaaggac tgaccggcaa 3120

gttggacgcc cgcaagatcc gcgagattct cattaaggcc aagaagggcg gcaagatcgc 3180

cgtgtaatct agagggcccg tttaaacccg ctgatcagcc tcgactgtgc cttctagttg 3240

ccagccatct gttgtttgcc cctcccccgt gccttccttg accctggaag gtgccactcc 3300

cactgtcctt tcctaataaa atgaggaaat tgcatcgcat tgtctgagta ggtgtcattc 3360

tattctgggg ggtggggtgg ggcaggacag caagggggag gattgggaag acaatagcag 3420

gcatgctggg gatgcggtgg gctctatggc ttctactggg cggttttatg gacagcaagc 3480

gaaccggaat tgccagctgg ggcgccctct ggtaaggttg ggaagccctg caaagtaaac 3540

tggatggctt tctcgccgcc aaggatctga tggcgcaggg gatcaagctc tgatcaagag 3600

acaggatgag gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc 3660

gcttgggtgg agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat 3720

gccgccgtgt tccggctgtc agcgcagggg cgcccggttc tttttgtcaa gaccgacctg 3780

tccggtgccc tgaatgaact gcaagacgag gcagcgcggc tatcgtggct ggccacgacg 3840

ggcgttcctt gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta 3900

ttgggcgaag tgccggggca ggatctcctg tcatctcacc ttgctcctgc cgagaaagta 3960

tccatcatgg ctgatgcaat gcggcggctg catacgcttg atccggctac ctgcccattc 4020

gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cggtcttgtc 4080

gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gttcgccagg 4140

ctcaaggcga gcatgcccga cggcgaggat ctcgtcgtga cccatggcga tgcctgcttg 4200

ccgaatatca tggtggaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt 4260

gtggcggacc gctatcagga catagcgttg gctacccgtg atattgctga agagcttggc 4320

ggcgaatggg ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga ttcgcagcgc 4380

atcgccttct atcgccttct tgacgagttc ttctgaatta ttaacgctta caatttcctg 4440

atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac accgcataca ggtggcactt 4500

ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttatttttt ctaaatacat tcaaatatgt 4560

atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atagcacgtg ctaaaacttc 4620

atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tccttttttga taatctcatg accaaaatcc 4680

cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt 4740

cttgagatcc ttttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac 4800

cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct 4860

tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact 4920

tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg 4980

ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata 5040

aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga 5100

cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag 5160

ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg 5220

agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac 5280

ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca 5340

acgcggcctt tttacggttc ctgggctttt gctggccttt tgctcacatg ttctt 5395