(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0077509
(43) 공개일자 2009년07월15일

(51) Int. Cl.
A61K 38/20 (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0003502
(22) 출원일자 2008년01월11일
심사청구일자 2008년01월11일

(71) 출원인
주식회사 인섹트 바이오텍
대전광역시 유성구 전민동 엑스포로 507 (전민동 461-7)
(72) 발명자
박호용
대전 유성구 전민동 엑스포아파트 402-1101
손광희
대전시 유성구 어은동 한빛아파트 101-1303
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

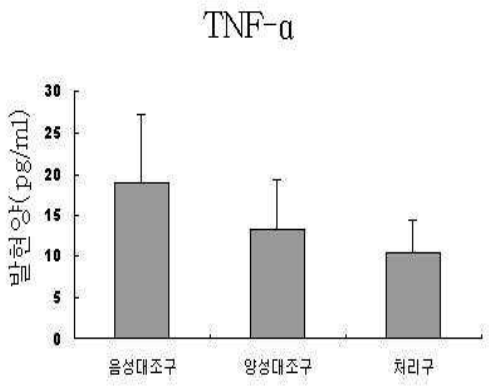
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 아라자임을 유효성분으로 하는 관절염 예방 및 치료용조성물

(57) 요 약

본 발명은 아라자임(Arazyme)을 유효성분으로 하는 관절염 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 본 발명의 아라니콜라 프로테오리티쿠스(*Aranicola proteolyticus*)가 생산하는 아라자임은 염증유발인자인 TNF-α의 발현을 억제하고 관절연골의 프로테오글리칸(proteoglycan) 및 콜라겐(collagen)의 소실을 막아 관절염의 진행을 억제하고 관절을 보호함으로써 관절염 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

신동하

대전시 유성구 송강동 청솔아파트 308-1210

정규식

대구광역시 수성구 범물동 우방미진하이츠 105동 1203호

특허청구의 범위

청구항 1

아라자임(arazyme)을 유효성분으로 함유하는 관절염 예방 및 치료제.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 아라자임은,

(a) 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질;

(b) 서열 번호 2에 기재된 염기 서열의 코딩 영역을 포함하는 DNA에 의해 코딩되는 단백질;

(c) 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열에서 하나 또는 그 이상의 아미노산이 치환, 결실, 삽입 및/또는 첨가된 아미노산 서열로 구성되며, 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 기능적으로 동일한 단백질; 및

(d) 서열 번호 2에 기재된 염기 서열을 포함하는 DNA와 엄격한 조건하에서 혼성화되는 DNA에 의해 코딩되는 단백질이며, 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 기능적으로 동일한 단백질 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료제.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 아라자임은 아라니콜라 프로테오리티쿠스(*Aranicola proteolyticus*) 배양액으로부터 분리된 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료제.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 아라니콜라 프로테오리티쿠스(*Aranicola proteolyticus*)는 아라니콜라 프로테오리티쿠스(*Aranicola proteolyticus*) HY-3(수탁번호 : KCTC 0268BP)인 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료제.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 관절염은 퇴행성관절염(osteoarthritis), 류마티스관절염(Rhematoid arthrits), 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 반응성관절염(reactive arthritis), 건선관절염, 전신성홍반성루프스(Systemic lupus erythematosus), 다발성근육염(polymyositis) 또는 류마티스다발근육통(polymyalgia rhematica)인 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료제.

청구항 6

제 1항에 있어서, TNF-α의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료제.

청구항 7

제 1항에 있어서, 관절연골 손상을 억제하는 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료제.

청구항 8

제 1항에 있어서, 관절연골의 프로테오글리칸(proteoglycan) 소실을 억제하는 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료제.

청구항 9

제 1항에 있어서, 관절연골의 콜라겐(collagen) 소실을 억제하는 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료제.

청구항 10

약학적으로 유효한 양의 아라자임을 관절염에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 관절염 치료방법.

청구항 11

약학적으로 유효한 양의 아라자임을 관절염에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 관절염 예방방법.

청구항 12

아라자임(arazyme)을 유효성분으로 함유하는 관절염 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 아라자임은,

(a) 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질;

(b) 서열 번호 2에 기재된 염기 서열의 코딩 영역을 포함하는 DNA에 의해 코딩되는 단백질;

(c) 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열에서 하나 또는 그 이상의 아미노산이 치환, 결실, 삽입 및/또는 첨가된 아미노산 서열로 구성되며, 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 기능적으로 동일한 단백질; 및

(d) 서열 번호 2에 기재된 염기 서열을 포함하는 DNA와 엄격한 조건하에서 혼성화되는 DNA에 의해 코딩되는 단백질이며, 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 기능적으로 동일한 단백질 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 14

제 12항에 있어서, 상기 아라자임은 아라니콜라 프로테오리티쿠스(*Aranicola proteolyticus*) 배양액으로부터 분리된 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 아라니콜라 프로테오리티쿠스(*Aranicola proteolyticus*)는 아라니콜라 프로테오리티쿠스(*Aranicola proteolyticus*) HY-3(수탁번호 : KCTC 0268BP)인 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 16

제 12항에 있어서, 상기 관절염은 퇴행성관절염(osteoarthritis), 류마티스관절염(Rhematoid arthrits), 강직성척추염(ankylosing spondylitis), 반응성관절염(reactive arthritis), 건선관절염, 전신성홍반성루프스(Systemic lupus erythematosus), 다발성근육염(polymyositis), 류마티스다발근육통(polymyalgia rhematica)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 개선용 건강기능식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 아라자임(Arazyme)을 유효성분으로 하는 관절염 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 관절염(arthritis)은 관절에 이상이 있는 것을 말한다. 관절염은 사소한 것에서 심각한 것까지 여러 가지 형태가 있으며, 항상 나빠지는 것은 아니다. 관절염 관련 질환은 전 세계 인구의 약 12 %가 고통을 격고 있는 대표적인 퇴행성, 난치성 질환으로 국내에도 약 200만 명 이상의 환자가 있다. 관절염은 신체의 근 골격 및 결합조직에 염증성 변화가 생겨 근 골격계에 전신 증상이 나타나는 것을 총칭하는 병명이다. 상기 질환은 관절, 뼈, 연골 조직 또는 척수에 영향을 주어, 종종 영구적인 조직 손상, 기형, 퇴화 및 장애를 일으키는 만성 염증을 특징으로 한다(Hofbause, L. C., et.al., *Arthritis and Rheumatism* 44: 253-259, 2001).

<3> 관절염의 종류로는 퇴행성관절염(osteoarthritis), 류마티스관절염(Rhematoid arthrits), 강직성척추염(ankylosing spondylitis), 반응성관절염(reactive arthritis), 건선관절염, 전신성홍반성루프스(Systemic lupus erythematosus), 다발성근육염(polymyositis) 및 류마티스다발근육통(polymyalgia rhematica)등이 있다.

<4> 퇴행성관절염이라고도 불리는 골관절염 또는 마모성 관절염은 가장 흔한 관절염으로 주로 중년 또는 노년에 발생하며 척추 및 하지의 관절(고관절, 무릎, 발관절)을 침범하는 관절염을 말하며, 일반인에게서 60대나 70대가 되면 약 60% 이상 이환된다. 골관절염은 나이가 들어가면서 모든 사람에게 올 수 있는 흔한 병이다. 60세 이상에서는 일반적이만, 45세까지는 여성보다 남성에서 더 많이 생기고 55세 이상은 여성에서는 자주 나타난다. 골관절염의 원인은 크게 일차성과 이차성으로 나눌 수 있는데, 확실한 원인 없이 정상적이던 관절연골이 노쇄 현상으로 낡아진 증상, 즉 퇴행성 변화가 일어나는 것으로 일차성이라 하며 여자에 흔히 발생한다. 일차성 골관절염의 정확한 원인 및 병인에 대해서는 알려져 있지 않다. 이차성 골관절염은 크게 관절 손상, 연골기질의 이상, 연골하골의 변형 등에 의해 유발되는 것으로 분류할 수 있다.

<5> 퇴행성관절염은 연령이 증가할수록 그 발생 빈도가 증가되는 만성관절염으로 특히 무릎 골관절염은 발병률이 매우 높은 질환으로 한국인의 경우에는 주로 좌식생활을 하는 특성상 무릎이 0자로 휘게 되면서 무릎 안쪽에 압력이 비정상적으로 증가하게 돼 중년에는 골관절염이 발생할 확률이 커진다는 보고가 있다. 이러한 염증이 계속되면 주위 근육의 위축을 유발하여 관절의 기형까지도 초래할 수 있어 치료경비 지출뿐 아니라 이로 인한 노령인구의 사회활동 저해 등 여러 가지 사회적 손실이 큰 질환이다.

<6> 류마티스관절염은 염증성 관절염의 가장 일반적인 형태로 인구의 1 ~ 2%가 앓고 있다. 류마티스관절염은 윤활관절의 염증이 원인이며, 10대 이상 누구에게든 생길 수 있다. 그러나 여성에서 더 일반적이며 30 ~ 50세에 흔히 발생한다.

<7> 강직성척추염은 척추와 골반을 연결하는 관절에 염증이 생기는 것이다. 간혹 엉덩이에 발병하기도 한다. 이 병은 여성보다 남성이 3배 더 많으며 20 ~ 40세에 주로 나타난다. 부모형제가 이병을 앓은 사람의 경우 20배 정도 발병위험이 높아진다.

<8> 전신성홍반성루프스는 결합조직병이라 부르는 질병 가운데 하나이다. 전신성홍반성루프스는 자가면역병이라는 점에서 류마티스관절염과 비슷하다. 하지만 훨씬 드물게 발생되며 류마티스관절염보다 대개는 덜 심각하다. 이 병에 걸리는 사람의 90%는 20 ~ 40대의 젊은 여성이다.

<9> 관절염의 치료에는 약물요법, 운동요법 또는 수술요법 등이 실시되고 있다. 이들 중 약물요법으로는 진통제, 부신피질호르몬제, 비스테로이드성 진통소염제 등 주로 염증을 치료하여 통증을 완화시키는 약물들이 이용되고 있으며, 본질적으로 관절염의 치료약물은 아직 없는 실정이다. 미국이나 유럽을 비롯해 우리나라에서 최근 관절연골을 구성하고 있는 한 성분이 건강보조식품으로 판매되어 효능을 나타내기도 하지만, 그 치료효과가 일정하지 않아서 더 많은 연구가 요구되고 있다.

<10> 진통제는 통증을 완화하는 작용을 하지만 항염증작용은 없다. 또한 타이레놀을 제외한 진통제들은 졸음이나 변비를 유발할 수 있다. 따라서 관절경직이나 부기에는 거의 효과가 없다.

<11> 항염증제 중 비스테로이드계 항염증제는 스테로이드제와 마찬가지로 염증을 줄이는 작용을 하지만 약리작용 방식이나 잠재적인 부작용 측면에서 스테로이드제와 성격이 완전히 다르다. 비스테로이드계는 통증뿐 아니라 염증으로 야기된 경직이나 부기를 제거하는 데 특히 효과적이다. 그러나 비스테로이드계를 다량 또는 장기간 복용할 경우, 위벽의 출혈, 위궤양 또는 소화불량 등의 부작용이 발생한다.

<12> 이에, 본 발명자들은 아라니콜라 프로테오리티쿠스(Aranicola proteolyticus) 균주에서 유래한 아라자임(Arazyme)의 효과를 조사한 결과, 사람의 퇴행성관절염(degenerative joint disease)과 유사한 병변을 유발하는 것으로 알려져 있는 뉴질랜드산 희색 토끼(Newzealand White Rabbit)의 동물모델에 골관절염을 유도한 후 아라자임을 처리한 결과 염증유발인자인 TNF-α의 발현을 억제하고 관절연골의 프로테오글리칸(proteoglycan) 및 콜라겐(collagen)의 소실을 막아 관절염 진행을 억제하고 관절을 보호하는 것을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<13> 본 발명의 목적은 아라니콜라 프로테오리티쿠스(*Aranicola proteolyticus*)가 생산한 아라자임(Arazyme)을 유효성분으로 하는 관절염 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<14> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아라자임(arazyme)을 유효성분으로 함유하는 관절염 예방 및 치료제를 제공한다.

<15> 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 아라자임을 관절염에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 관절염 치료방법을 제공한다.

<16> 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 아라자임을 관절염에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 관절염 예방방법을 제공한다.

<17> 아울러, 본 발명은 아라자임(arazyme)을 유효성분으로 함유하는 관절염 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

효 과

<18> 본 발명의 아라니콜라 프로테오리티쿠스(*Aranicola proteolyticus*)가 생산하는 아라자임은 염증유발인자인 TNF-α의 발현을 억제하고 관절연골의 프로테오글리칸(proteoglycan) 및 콜라겐(collagen)의 소실을 막아 관절염의 진행을 억제하고 관절을 보호함으로써 관절염 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<19> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<20> 본 발명은 아라자임(arazyme)을 유효성분으로 함유하는 관절염 예방 및 치료제를 제공한다.

<21> 또한, 본 발명은 하기와 같은 단계들을 포함하는 아라자임의 제조방법을 제공한다.

<22> 1) 아라니콜라 프로테오리티쿠스(*Aranicola proteolyticus*) 균주를 배양하여 배양액을 얻는 단계;

<23> 2) 상기 배양액을 여과하여 상등액을 얻는 단계; 및

<24> 3) 상등액내 포함된 상기 아라자임을 수지를 이용하여 정제하는 단계,

<25> 상기 제조방법에 있어서, 아라자임을 생산하는 미생물로서 아라니콜라 프로테오리티쿠스 균주를 이용하는 것이 바람직하며, 한국생명공학연구원 유전자은행에 1996년 7월 29일자로 기탁된 수탁번호 KCTC 0268BP호의 아라니콜라 프로테오리티쿠스 HY-3를 이용하는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 아라니콜라 프로테오리티쿠스 HY-3 균주는 거미 장내에서 분리한 호기성의 그람 음성 세균으로서, 0.5 ~ 0.8 ㎜ 크기의 구형이고 운동성을 가지고 있으며 카탈라아제(catalase)에는 양성 반응을, 옥시다아제(oxidase)에는 음성반응을 나타낸다(WO 01/57222호).

<26> 본 발명에서는 상기와 같은 방법으로 수득된 아라자임을 이용하는 것이 바람직하며, 하기와 같은 방법으로 생산된 아라자임을 이용하는 것이 더욱 바람직하다. 아라니콜라 프로테오리티쿠스 균주의 배양을 위해서 사용하는 원료는 순수 정제시 보다 편하고 고순도의 결과물이 나올 수 있는 의약품 수준의 것이 바람직하며, 배양 후, 암모늄설페이트 침전(또는 아세톤 침전)을 수행한다. 이러한 암모늄설페이트 또는 아세톤 침전 후, 원심분리 및 여과를 통하여 아라자임만을 회수한다. 이는 미생물에서 생산이 되는 다른 대부분의 단백질은 아라자임과 침전농도가 다른 것을 이용한 것이다. 아라자임을 회수한 후, 막여과를 이용한 1차 불순물의 정제 및 한외 여과기를 이용하여 마지막으로 순수 분리 정제하고 이렇게하여 수득된 용액 상태의 고농도 아라자임을 동결 건조기를 통해 파우더 타입으로 제조한 것을 이용한다.

<27> 또한, 본 발명은 하기와 같은 방법으로 아라자임을 제조할 수 있다.

<28> 1) 아라자임의 코딩 영역을 포함하는 염기 서열의 DNA를 발현 벡터에 클로닝하는 단계;

<29> 2) 상기 단계 1)에서 클로닝된 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하는 단계;

<30> 3) 상기 단계 2)에서 형질전환된 숙주 세포를 선별하는 단계; 및

<31> 4) 상기 3)에서 선별된 숙주 세포에서 발현된 아라자임을 수득하는 단계,

<32> 상기 제조방법에 있어서, 단계 1)의 아라자임의 코딩 영역을 포함하는 염기 서열은 서열번호 2에 기재된 것, 서열 번호 2에 기재된 염기 서열을 포함하는 DNA와 엄격한 조건하에서 혼성화되는 DNA라면 바람직하다. 엄격한 조건은 혼성화 후 세정 시에 결정된다. 엄격한 조건 중의 하나는 상온에서 6× SSC, 0.5% SDS로 15분 세정한

뒤 45℃에서 2× SSC, 0.5% SDS로 30분간의 세정하고, 50℃에서 0.2× SSC, 0.5% SDS로 30분간의 세정을 두 번 반복한다. 더 바람직한 엄격한 조건은 더 높은 온도를 이용하는 것이다. 상기 엄격한 조건의 다른 부분은 동일하게 수행하되 마지막의 두 번의 30분은 60℃에서 0.2× SSC, 0.5% SDS로 세정한다. 또 다른 엄격한 조건은 상기 엄격한 조건에서 마지막 두 번을 65℃에서 0.1× SSC, 0.1% SDS로 세정하는 것이다. 당업자라면 필요한 엄격한 조건을 얻기 위하여 이러한 조건을 명백히 설정할 수 있다. 또한, 발현 벡터로는 당업계에 널리 알려진 그람 음성세균 또는 그람 양성세균 등, 상업적으로 이용가능한 벡터를 이용할 수 있으며 스크리닝을 위한 약제 내성 유전자가 도입되면 바람직하다. 아라자임 유전자에 어떤 영향을 주지 않는 다면, 어떠한 벡터라도 무방하다.

<33> 상기 제조방법에 있어서, 단계 2)의 숙주 세포로는 세균인 *E. coli* 및 *Bacillus subtilis* 등이 있으며, 효모인 *Saccharomyces cerevisiae, Candia* 및 *Phicia*로 구성된 군으로부터 선택되어 사용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

<34> 상기 제조방법에 있어서, 단계 3)의 형질전환된 숙주 세포의 선별은 벡터로 도입한 약제 내성 유전자를 이용한 스크리닝과 서던 블랏팅(Southern blotting) 또는 PCR을 이용한 스크리닝을 병용하여 선별하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

<35> 상기 제조방법에 있어서, 단계 4)에서 수득된 아라자임은 단백질의 어떠한 정제 방법에 따라서 정제된 것이더라도 실질적으로 정제된 단백질이라면 모두 포함될 수 있다. 상기 정제된 단백질은 크로마토그래피 컬럼, 필터, 한외여과, 염석, 용매침전, 용매추출, 증류, 면역침강, SDS-폴리아크릴 아마이드겔 전기영동, 등전점 전기영동법, 투석 또는 재결정 등을 적절히 선택 또는 조합하여 실질적으로 정제된 단백질인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 DNA로부터 코딩되는 아라자임은 당업자에게 널리 알려진 단백질 발현계를 이용하여 얻을 수 있다. 또한, 아라자임을 발현하는 세포의 배양물로부터 회수·정제될 수 있다.

<36> 본 발명의 아라자임은

<37> (a) 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질;

<38> (b) 서열 번호 2에 기재된 염기 서열의 코딩 영역을 포함하는 DNA에 의해 코딩되는 단백질;

<39> (c) 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열에서 하나 또는 그 이상의 아미노산이 치환, 결실, 삽입 및/또는 첨가된 아미노산 서열로 구성되며, 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 기능적으로 동일한 단백질; 및

<40> (d) 서열 번호 2에 기재된 염기 서열을 포함하는 DNA와 엄격한 조건하에서 혼성화되는 DNA에 의해 코딩되는 단백질이며, 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 기능적으로 동일한 단백질로 구성된 군으로부터 선택된 어느하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

<41> 상기 혼성화를 엄격한 조건하에서 실시하면 상동성이 높은 염기 서열을 가진 DNA가 선별되어 결과적으로 분리되는 단백질에는 아라자임과 기능적으로 동일한 단백질이 포함될 가능성이 높아진다. 상동성이 높은 염기 서열이란 예를 들면, 서열번호 2에 기재된 염기 서열과 70 % 이상, 바람직하게는 80 % 이상, 더욱 바람직하게 90 % 이상, 가장 바람직하게는 95 % 이상의 동일성을 가진 서열을 의미한다. 또한 아미노산 서열은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 70 % 이상, 바람직하게는 80 % 이상, 더욱 바람직하게 90 % 이상, 가장 바람직하게는 95 % 이상의 높은 상동성의 서열이라면 가능하다. 상기의 상동성 비율은 당업계의 당업자에 의해 선택된 보통의 알고리즘으로 결정될 수 있다. 상기 혼성화는 당해업계에 잘 알려진 엄격한 조건(Hames and Higgins, *Eds. Nucleic Acid Hybridisation*, IRL Press, U.K. , 1985)의 DNA-DNA 혼성화로 제공되며, 혼성화에서 엄격한 조건은 상기에서 언급하였듯이 혼성화 후 세정 시에 결정된다.

<42> 본 발명에서는 아라자임(Arazyme)이 골관절염에 미치는 영향을 조사하기 위해, 사람의 퇴행성관절염(degenerative joint disease)과 유사한 병변을 유발하는 것으로 알려져 있는 뉴질랜드산 흰색 토끼(Newzealand White Rabbit)의 동물모델을 이용하여 오른쪽 앞쪽십자무릎인대 절단을 통해 골관절염을 유도한 후 아라자임을 투여하였다.

<43> 본 발명에서는 상기 아라자임을 투여한 토끼의 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 혈청 내의 TNF-α를 ELISA법(Quantikine®, R&D system)을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 아라자임을 투여한 시험군은 투여하지 않은 대조군에 비해 초기염증과정에 관여하는 TNF-α의 발현을 억제하는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 발명의 아라자임은 염증유발인자인 TNF-α의 발현을 억제함으로써 골관절염의 발생을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있다.

<44> 또한, 본 발명에서는 상기 아라자임을 투여한 토끼의 관절연골의 변화를 조사하기 위해, 대퇴골과 경골을 분리하고 주변 근육을 제거한 후 관절연골의 표면을 관찰하였다. 그 결과, 아라자임을 투여한 시험군은 투여하지 않은 대조군에 비해 전반적으로 연골손상이 적은 것으로 관찰되었다. 따라서 본 발명의 아라자임은 골관절염에 대한 효능을 나타냄을 알 수 있다.

<45> 또한, 본 발명에서는 조직변화, 및 콜라겐(collagen) 및 프로테오글리칸(proteoglycan)의 소실 정도를 관찰하기 위해, 상기 분리한 대퇴골과 경골의 조직절편을 제조하여 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin, H&E), 아잔(Azan) 염색 및 톨루이딘 블루(Toluidine blue) 염색을 각각 실시한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 아라자임을 투여한 시험군은 투여하지 않은 대조군에 비해 모두 연골의 손상이나 프로테오글리칸 및 콜라겐의 소실이 적은 것으로 나타났다. 따라서 본 발명의 아라자임은 현재 골관절염 환자에게 주로 처방되는 비스테로이드계 항염증제 계열 약물인 세레콕십(Celecoxib)과 비슷한 수준의 연골손상과 미약한 프로테오글리칸 및 콜라겐의 소실을 나타내 골관절염 예방 및 치료에 효능이 있는 것을 알 수 있다.

<46> 이상의 결과를 통해, 본 발명의 아라자임의 투여는 골관절염을 유도한 동물모델에서 골관절염의 진행을 억제하고 완화하는 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다. 아라자임의 섭취가 염증유발인자인 TNF-α의 발현을 억제하고 관절연골의 프로테오글리칸 및 콜라겐의 소실을 막는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명의 아라자임은 관절염의 예방 및 치료에 사용할 수 있으며, 이로 인해 골관절염의 진행을 억제하고 골관절을 보호할 수 있다.

<47> 본 발명의 아라자임에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 투여를 위해서는 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로스 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 산제, 정제, 캡슐제, 환, 과립 또는 주사액제로 제제화 할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

<48> 본 발명의 관절염 예방 및 치료용 조성물은 목적하는 방법에 따라 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명에 따른 아라자임의 일일 투여량은 0.01 ~ 5000 ㎎/㎏ 이며, 바람직하게는 0.01 ~ 10 ㎎/㎏ 이며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

<49> 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 아라자임을 관절염에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 관절염 치료방법을 제공한다.

<50> 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 아라자임을 관절염에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 관절염 예방방법을 제공한다.

<51> 아울러, 본 발명은 아라자임(arazyme)을 유효성분으로 함유하는 관절염 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

<52> 본 발명의 아라니콜라 프로테오리티쿠스의 배양액 또는 이로부터 분리된 아라자임을 식품 첨가물로 이용할 경우, 아라니콜라 프로테오리티쿠스의 배양액 또는 상기의 아라자임을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 이용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 이용될 수 있다. 아라자임은 상기와 같은 동일한 방법으로 수득하여 이용한다. 유효 성분의 혼합양은 이용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에는 본 발명의 아라니콜라 프로테오리티쿠스의 배양액 또는 이로부터 분리된 아라자임은 원료에 대하여 0.01 ~ 10 중량부, 바람직하게는 0.05 ~ 1 중량부의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 이용될 수 있다.

<53> 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한

다.

<54> 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 이용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 음료 조성물 100 ㎖당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

<55> 상기 외에 아라니콜라 프로테오리티쿠스의 배양액 또는 이로부터 분리된 아라자임은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 이용되는 탄산화제 등에 첨가할 수 있다. 그밖에 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육에도 아라니콜라 프로테오리티쿠스의 배양액 또는 이로부터 분리된 아라자임을 첨가할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 이용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 아라니콜라 프로테오리티쿠스의 배양액 또는 이로부터 분리된 아라자임 100 중량부 당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

<56> 이하 본 발명을 실시예, 실험예 및 제제예에 의해 상세히 설명한다.

<57> 단, 하기 실시예, 실험예 및 제제예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및 제제예에 한정되는 것은 아니다.

<58> **<실시예 1> 아라자임(arazyme)의 제조**

<59> 본 발명의 유효성분인 아라자임(arazyme)을 제조하기 위하여, 아라니콜라 프로테오리티쿠스(*Aranicola proteolycius*) HY-3 균주(KCTC 0268BP)를 배양배지(박토 트립톤 0.5 %, 효모 추출물 0.5 %, 염화 나트륨 0.1 %, 염화 칼륨 0.05 %, 염화 칼슘 0.02 %, 황산 마그네슘 0.02 %)에서 22℃로 18 시간 동안 배양하였다. 배양액을 2 ㎛ 막여과(2 ㎛ filter, Satorius, USA)를 이용해서 균체와 상등액을 분리한 다음 분리된 상등액을 10 kDa의 막여과(10 kDa Memebrane filter, Pall sept, PALL Corporation, USA)를 이용하여 농축하였다. 본 발명의 아라자임은 기본적으로 음이온의 특성을 가지므로 농축액을 50 mM 트리스-염산 완충액(pH 7.6)으로 전처리한 DEAE-셀룰로오즈(DEAE-cellulose, Sigma, USA)를 이용한 이온 교환 수지(ion exchange resin, Sigma USA)와 20 mM 트리스-염산 완충액(pH 7.6)으로 전처리한 세파덱스 G-75(Sephadex G-75, Sigma USA)를 이용한 젤 여과 교환 수지(gel filtration exchange resin)를 이용해 정제를 했다. 정제된 효소액은 10% SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel)로 전기영동을 하여 밴드 경향을 확인하였는데 그 결과 본 발명의 아라자임은 소단위를 갖지 않는 단일체(monomer)로서 약 51.5 kDa의 분자량을 갖는 밴드를 나타냄을 확인하였다. 단, 아라자임 생산을 위한 아라니콜라 프로테오리티쿠수 HY-3 균주(KCTC 0268BP)는 다양한 산업용 배지에서 생산을 할 수 있으며 생산된 배양액 또한 다양한 방법으로 분리 및 정제하여 이용할 수 있다. 본 발명의 아라자임은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 가지며, 이를 암호화하는 유전자는 서열번호 2로 기재되는 염기 서열을 가진다.

<60> **<실시예 2> 실험동물의 준비**

<61> **<2-1> 실험동물의 사육**

<62> 본 발명자들은 실험을 위해 뉴질랜드산 흰색 토끼(NewZealand White Rabbit)((주)오리엔트, 서울)를 사용하였다. 상기 실험동물은 입수시 주령은 9주령이었으며, 입수시 체중은 1.2 ~ 1.5 kg이었다. 실험을 위한 투여개시 주령은 15주령, 투여개시시 체중은 2.1 ~ 2.7 kg 이었다. 시험동물은 입수 후 외관을 육안으로 검사한 후 7일간 시험을 실시하는 동물실에서 순화시킨 후 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다.

<63> 사육환경은 온도 22±2℃, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간(09:00 점등 ~ 21:00 소등)으로 설정된 자동온습도 조절장치가 설치된 경북대학교 수의과대학 병리학교실의 동물실에서 순화 및 사육되었다. 전 시험기간 동안 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 사육환경의 변동은 인정되지 않았다. 시험기간 중 동물실의 온습도는 자동온습도 조절장치에 의하여 조절되었으며, 환경조건은 정기적(3개월 1회)으로 측정되었다. 환경측정의 결과, 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 인정되지 않았다. 또한, 전 시험기간 동안 동물은 광택이 있는 알루미늄 합금제로 만들어진 바닥에 금망이 깔려있고 이동식 오물받이가 있는 사육상자(너비: 480, 길이: 610, 높이: 450 mm)에 각각 1마리씩 수용하였다. 개체식별은 유성 매직펜을 이용한 이부표식법과 사육상자별 그룹식

별카드표시법을 이용하였다. 사료는 토끼용 고형사료((주)애그리브랜드 퓨리나코리아)를 자유 섭취시켰으며, 음수는 일반 음용 상수도수와 시험물질을 혼합하여 물병을 이용하여 자유섭취시켰다.

<64> **<2-2> 실험 동물의 관절염 유도**

<65> 무릎반달을 제거한 토끼 모델은 반복적인 관절손상이 유발될 뿐만 아니라 사람의 퇴행성골관절염의 발생과 유사한 병변을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한, 토끼에 이용되는 골관절염 유발 방법으로는 앞쪽십자무릎인대를 절단하는 방법이 있다(Hulth A, et al., *Acta Orthp Scand.* 41:522-530, 1970). 본 실험에서는 토끼의 앞쪽십자무릎인대를 절단하여 관절의 불안정성을 유발함과 동시에 내측반달을 제거하여 골관절염을 유발하였다.

<66> 모든 실험동물의 오른쪽 무릎의 앞쪽십자무릎인대(cranial cruciate ligament)를 절단하여 관절의 불안정성을 유발함과 동시에 내측반달(medial meniscus)을 제거하여 골관절염을 유발하였고, 왼쪽 무릎은 시험물질 투여에 대한 대조용으로 이용하기 위해 sharm-operation을 실시하였다. 앞쪽십자무릎인대의 절단 및 내측반달 제거 수술은 하기와 같이 수행하였다. 수술 전 6 ~ 12시간을 절식시키고 음수만을 공급하였다. 이후 자일라진(Xylazine)(럼푼, 바이엘코리아) 1.25mL/6mg/kg과 조레틸(Zoletil50, Virbac) 0.2mL/10mg/kg의 마취제를 근육 조사하여 마취를 실시하였다. 마취 후 토끼의 오른쪽 무릎의 내측으로 접근하여 피부와 근막을 절개하고 피부와 근막절개로 노출된 관절낭을 절개하고 대퇴골과 경골의 일부를 노출시켰다. 노출 후 대퇴관절면과 경골관절면 사이를 잇는 앞쪽십자무릎인대를 찾아서 절단하고 내측 반달을 제거하였다. 수술을 마치고 절개된 근막과 피부를 봉합하여 마무리하였다. 수술 후 3일 동안은 항생제인 겐타마이신(gentamicin, 삼우메디안)을 0.1mL/10mg/kg의 농도로 주사하여 수술로 인한 주변 조직에서의 염증발생을 방지하였다. 효과적인 골관절염 유도를 위해 골관절염 유도 수술 후 4일째부터 모든 시험군을 대상으로 매일 5분간 트레드밀(treadmill)을 이용한 강제운동을 실시하였다.

<67> **<2-3> 실험동물의 구성**

<68> 체중 2.1 ~ 2.7 kg인 실험동물은 각 군당 4 ~ 5마리씩 사용하였으며 실험군의 구성은 하기와 같이 3그룹으로 나누었다. 양성대조군(positive control)의 경우 상수도수(tap water) 250 ~ 300ml에 셀레콕십(Celecoxib, Pfizer)를 10mg/kg/day의 농도로 매일 급여하였으며, 시험군의 경우 상수도수(tap water) 250 ~ 300ml에 본 발명의 조성물을 250mg/kg로 각각 희석하여 매일 공급하였다. 상기 양성대조군으로 사용한 셀레콕십(Celecoxib, 한국화이자제약)은 골관절염 환자에게 주로 처방되는 비스테로이드계 항염증제(Non-Steroid Anti-Inflammatory Drug) 계열의 약물로 전통적인 비스테로이드 항염증제 계열의 약물보다 골관절염 치료 효과는 우수하나 소화기계 궤양 등의 유발이 적어 골관절염 치료에 사용되고 있다(Loewen PS. *focus on clinical aspects.* 4:268-75, 2002). 음성대조군(negative control) 동물에는 상수도수(tap water) 250 ~ 300ml씩 모든 동물에 동일양의 음수를 매일 공급하였다. 투여 경로 및 투여방법은 시험물질과 상수도수(tap water) 250 ~ 300ml씩 모든 동물에 동일양의 음수를 매일 공급하였다.

표 1

<69> **시험군의 구성**

그룹	동물 수	관절염 수술	약물 투여
음성대조군	4	오른쪽 무릎	상수도수
양성대조군	5	오른쪽 무릎	셀레콕십
처리군	4	오른쪽 무릎	아라자임

<70> 효과적인 골관절염 유도를 위해, 골관절염 유도 수술 후 4일째부터 모든 실험군을 대상으로 매일 5분간 트레드밀(treadmill)을 이용한 강제운동을 실시하였고, 시험물질 투여 후 4주, 8주 및 12주에 토끼의 양측 무릎관절에 대해 방사선 촬영을 실시하여 관절면의 변화를 측정하였다. 시험물질 투여 후 12주에 부검을 실시하여 채혈을 통해 얻어진 혈액에 대한 혈청학적 검사를 실시하고 조직병리학적 검사를 통해 시험물질의 골관절염 제어 효능을 검정하였다.

<71> **<실험예 1> TNF-α의 발현 억제 효과 측정**

<72> 본 발명자들은 상기 실험동물을 자일라진(Xylazine) 및 조레틸(Zoletil)로 주사마취 후 개복하여 복대정맥으로부터 채혈을 실시하여 혈액을 채취한 후, 채취한 혈액을 3000rpm에서 15분 동안 원심분리하여 혈청을 분리하였

다. 혈청 내의 TNF-α를 ELISA법(Quantikine®, R&D system)을 이용하여 분석하였다.

<73> 측정 결과, 음성대조군을 기준으로 한 통계적인 유의성은 나타나지 않았지만 양성대조군 및 시험물질 투여군은 음성대조군에 비해 초기염증과정에 관여하는 TNF-α의 발현이 낮게 나타났다. 양성대조군에 비해 시험물질 투여군은 더 낮은 TNF-α의 발현을 나타내었다. 따라서 본 발명의 아라자임이 염증유발인자인 TNF-α의 발현을 억제함으로써 골관절염의 발생을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다(도 1 참조).

<74>

<75> **<실험예 2> 관절연골 변화의 육안적 관찰**

<76> 본 발명자들은 상기 실험동물의 부검시 육안적으로 모든 내부 장기의 이상 유무를 관찰한 후, 양쪽 대퇴골과 경골을 분리하고 주변 근육을 제거하여 관절연골 표면의 변화를 육안으로 관찰하였다. 관절연골 변화의 육안적 관찰시 그 병변에 대한 판단기준은 하기의 표 2와 같다(Shimizu C, et al., Long-term effects of hyaluronan on experimental osteoarthritis in the rabbit knee. 6:1-9, 1998).

표 2

<77> **골관절염이 유발된 연골에 대한 육안관찰 등급(Grade) 평가**

등급	관련 기준
G0	정상 관절면
G1	미약한 원섬유화나 관절면의 미약한 변색
G2	내측관절융기의 약한 침식과 외측관절융기의 원섬유화
G3	대퇴관절융기의 중등도의 괴사와 원섬유화
G4	과도한 침식, 분명한 원섬유화와 골증식체 형성

<78> 부검시 대퇴골과 경골을 분리하고 주변조직을 제거한 후 관절표면의 변화를 1차적으로 육안검사하였다. 관찰 결과, 정상적인 왼쪽 무릎관절면의 경우 매끄러운 관절표면을 가지고 있었으며 주변조직으로부터 분리가 용이하였다. 반면에, 골관절염이 유발된 오른쪽 무릎의 경우에는 관절면의 표면이 분열되고 엷은 조각으로 벗겨지는 것이 관찰되었으며 움푹 들어간 자국들이 간혹 관찰되었다. 음성대조군의 대퇴연골의 경우 육안적으로 관찰하여도 가장 심한 병변을 관찰할 수 있었는데, 연골이 갈라져 깊은 골이 생기거나 중등도의 원섬유화(fibrillation)와 부분적인 연골의 침식(erosion) 등이 관찰되었다. 대조약물 및 시험물질 투여그룹의 경우 육안 소견상으로는 그룹간의 차이가 분명하게 구분되는 정도는 아니였으나 음성대조군과 비교하여 볼 때는 전반적으로 연골손상이 적은 것으로 관찰되었다. 경골관절면의 경우, 수술을 하지 않은 왼쪽 경골은 정상적인 매끄러운 관절표면은 갖는데 반해 골관절염이 유발된 오른쪽 경골의 관절면의 표면은 매끄럽지 않게 분열되어 있는 것이 관찰되었으며, 주변조직과의 분리 또한 용이하지 않았다(도 2 참조).

<79> 또한, 경골 관절면의 비교에서도 음성대조군에서 중등도의 원섬유화 및 부분적인 연골의 침식이 관찰되었지만 양성대조군과 시험물질 투여군에서는 전반적으로 비슷한 정도의 병변이 관찰되어 그룹간의 차이를 확인하기는 어려웠다. 그러나 대퇴골과 경골의 관절면의 손상정도를 각각 구분하여 볼 때는 음성대조군을 제외하고 그룹간의 차이를 쉽게 확인하기 어려웠으나 양성대조군과 처리군의 손상수준이 비슷하게 나타남을 관찰하였다(도 3 참조).

<80> **<실험예 3> 관절연골에 대한 조직병리학적 관찰**

<81> 분리한 대퇴골 및 경골을 각각 10% 중성포르말린 용액(neutral buffered formalin)에 고정하였다. 일반적인 표본제작방법을 통해 조직을 자르기 위해서 3달 동안 EDTA를 함유한 탈회용액에 담아 탈회를 실시한 후 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀(paraffin)에 포매한 후 4㎛의 조직절편을 제작하였다. 상기 조직절편에 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin, H&E) 염색을 실시하여 조직변화를 관찰, 아잔(azan) 염색을 실시하여 콜라겐(collagen) 섬유의 소실 정도를 관찰 및 톨루이딘 블루(toluidine blue) 염색을 통해 프로테오글리칸(proteoglycan) 소실 정도를 광학현미경으로 검사하였다(Prizker KP, et al., *Osteoarthritis Cartilage*. 14:13-29, 2006).

<82> 관절연골의 조직병리학적 변화 관찰시 그 병변에 대한 판단기준은 하기와 같다. 관절연골 손상정도에 따른 등급(grade)(표 3 참조) 및 손상범위에 따른 단계(stage)(표 4 참조)를 구하고 이들을 서로 곱하여 최종적으로 점

수(score)(표 5 참조)를 구하여 연골손상정도를 점수화하였다.

<83> 시험의 모든 자료는 각 그룹의 평균과 표준편차로 표시하였다. 얻어진 자료에 대한 통계분석은 student t-test를 이용하였다. p값(p-value)은 0.05 미만일 때 유의한 것으로 평가하였다.

표 3

<84> **골관절염이 유발된 연골에 대한 조직병리학적 등급(Grade) 평가**

등급	2차 등급	관련 기준
등급 0: 정상 연골	없음	정상연골
등급 1: 연골 표면정상	1.0 연골세포정상 1.5 세포 죽음	기질 : 표면층은 정상이나 부종 또는 원섬유화 관찰 세포 : 연골세포의 증식과 비대
등급 2: 연골 표면의 불연속성	2.0 표면층내 원섬유화 2.5 표면층내 기질소실과 박리	표면층의 불연속성 관절연골의 위 1/3층의 프로테오글리칸 소실(콘드론(chondron)의 배열 흐트러짐)
등급 3: 수직 틈새	3.0 단순 수직틈새 3.5 복합수직틈새	관러연골의 위 1/3층의 프로테오글리칸 소실(새로운 콜라겐(collagne)의 형성)
등급 4: 침식	4.0 표면층의 분리형성층 형성 4.5 이행층의 오목형성	연골기질 소실 연골기질내 포낭(cyst) 형성
등급 5: 연골 벗겨짐	5.0 골표면정상 5.5 표면에 회복조직형성	표면의 경화조직형성이나 섬유연골을 포함한 회복조직형성
등급 6: 기형	6.0 관절경계에 골증식체 형성 6.5 관절경계와 중심에 골증식체 형성	골재형성 관절면의 기형형성 미세골절과 수복

<85> 등급(grade) : 관절연골의 손상깊이

표 4

<86> **골관절염이 유발된 연골에 대한 조직병리학적 단계(Stage) 평가**

단계	% 관여도(표면, 부위, 용적)
단계 0	어떠한 손상도 관찰되지 않는 상태
단계 1	< 10%
단계 2	10 - 25%
단계 3	25 - 50%
단계 4	> 50%

<87> 단계(Stage) = 관절연골의 손상범위

표 5

<88> **골관절염이 유발된 연골에 대한 조직병학적 점수(Score) 평가**

등급	단계			
	S1	S2	S3	S4
G1	1	2	3	4
G2	2	4	6	8
G3	3	6	9	12
G4	4	8	12	16
G5	5	10	15	20
G6	6	12	18	24

<89> 점수(core) = 등급(grade) X 단계(stage)(등급 점수와 단계 점수를 곱하여 산출)

<90> 정상적인 왼쪽 무릎관절의 경우, 관절표면이 매끄럽고 연골세포(chondrocyte)와 기질(matrix)의 배열이 균형적이다. 관찰결과, 도 5에서와 같이 관절연골의 3개의 층(표면존(superficial zone), 미드존(mid zone), 딥존(deep zone))이 잘 구분되어 배열하고 있었으며 콘드론(cartilage cell including pericellular matrix, chondron; 세포주위기질을 포함하고 있는 연골세포)의 비대나 연골세포의 증식성 변화 등도 관찰되지 않았다. 연골세포를 제외하고 관절연골의 대부분(98 ~ 99%)을 차지하는 것은 연골기질로 이들의 주성분은 제 Ⅱ 형 교원질(Type Ⅱ collagen), 단백다당(proteoglycan), 물, 기타 단백 및 당단백 등으로 구성되어 있었다. 음성 대조구의 경우, 미드존(mid zone) 및 때때로 딥존(deep zone)까지 연골이 갈라져 수직균열(vertical fissure)을 형성하거나 연골이 벗겨져 나가 연골 밑의 뼈가 노출되는 것이 관찰되었다. 또한, 손상되어 갈라지거나 벗겨진 연골주위에는 콘드론(chondron)의 비대와 연골세포(chondrocyte)의 과도한 증식을 관찰할 수가 있었고 관절표면의 전반적인 소섬유화(fibrilation)와 함께 관절면이 주름지어 나타나기도 하였다. 양성대조군과 처리군은 전반적으로 비슷한 정도의 손상정도를 나타내었다. 일부 딥존(deep zone)까지 수직균열(vertical fissure)이 형성된 것이 관찰되었으나 대부분은 표면에서 미드존(mid zone)에 해당하는 부위까지 수직균열(vertical fissure)을 형성하며, 연골표면의 불연속성(discontinuity)과 함께 콘드론(chondron)의 비대와 연골세포(chondrocyte)의 증식 등을 관찰할 수 있었다(도 5 참조).

<91> 도 6의 음성대조구에서와 같이, 프로테오글리칸(proteoglycan)이라고 하는 황산화 글리코사미노글리칸(sulfated glycosaminoglycans)은 단백질의 복합체인 고분자물질로 구성되어 있으며 이는 톨루이딘 블루(toluidine blue) 염료로 염색시 푸른색으로 나타난다. 따라서 톨루이딘 블루(toluidine blue)로 염색된 왼쪽 정상 무릎관절을 보면 푸른색으로 짙게 염색된 풍부한 프로테오글리칸(proteoglycan)을 관찰할 수가 있었다. 음성대조구는 프로테오글리칸(proteoglycan)의 소실로 미드존(mid zone)까지 톨루이딘 블루(toluidine blue)에 대한 염색성이 떨어지는 것을 관찰할 수 있고 때로는 딥존(deep zone)까지 전체연골층의 전반적인 프로테오글리칸(proteoglycan)의 소실도 관찰되었다. 양성대조군과 처리군은 비슷한 양상을 보였다. 톨루이딘 블루(toluidine blue) 염색에서도 표면존(superficial zone)에서의 프로테오글리칸(proteoglycan)의 소실이 두드러지게 나타나며 때때로 미드존(mid zone)까지 프로테오글리칸(proteoglycan)이 소실된 것을 관찰할 수가 있었다(도 6 참조).

<92> 도 7에서와 같이, 관절연골의 기질에 풍부하게 함유된 콜라겐 섬유(collagen fiber)는 아잔(azan) 염색상에서 푸른색으로 염색됨으로 이를 통해 왼쪽 무릎관절에 정상적으로 존재하는 풍부한 콜라겐(collagen)을 확인할 수 있었다. 음성대조구는 기질 내 콜라겐(collagen)의 함량 또한 정상에 비해 줄어든 것을 관찰할 수 있었다. 양성대조군과 처리군은 아잔(Azan) 염색을 통해 전반적으로 미약한 콜라겐(collagen)의 소실을 관찰할 수 있었다(도 7 참조).

<93>

<94> 도 8과 같이, 이를 기준으로 하여 조직학적 관찰에 대한 등급(grade)을 매긴 결과 양성대조군과 처리군에서 비슷한 수준의 등급(grade)이 나타났다. 음성대조군을 기준으로 한 유의성 검증에서는 p값이 0.05이하 범위에 들어가지는 않았으나 양성대조군은 p값이 0.052, 처리군은 0.064으로 각각 나타났다(도 8 참조).

<95> **<실험예 4> 아라자임의 급성 독성실험**

<96> 본 발명의 아라자임의 급성 독성을 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<97> 위스터(Wistar) 계통의 9주령 특정병원체부재(SPF) 암컷 랫트((주)오리엔트, 대한민국, 서울)에 대해 각각 4마리씩 4개군으로 나누어, 온도 22± 3℃, 습도 55± 10%, 조명 12L/12D 조건의 동물실 내에서 사육하였다. 랫트 입수 후 동물실에서 1 주일간 검역 및 순화과정을 거쳤다. 전 시험기간 동안 폴리카보네이트제 사육상자(240W X 390L X 175H mm)에서 5마리 이하씩 수용하였다. 개체식별은 유성 매직펜을 이용한 피부표식법과 사육상자별 개체식별 카드표시법을 이용하였다. 실험 동물용 고형사료(PMI Nutrition International, 미국)는 멸균하였으며, 물은 상수도수를 물병을 이용하여 자유 섭취시켰다.

<98> 상기 실시예의 아라자임을 0, 1250, 2500 및 5000 ㎎/㎏ 농도로 주사용 멸균주사용수에 용해하여 10 ㎖/㎏의 용량으로 조재하여 랫트에 경구투여용 존데(zonde)를 이용하여 단회 경구 투여하였다. 일주일간의 순화 기간을 거쳐서 4개의 그룹으로 분리한 후 10 주령의 랫트에 아라자임 농도별로 투여한 후 일반 증상 관찰을 실시하였다. 이 후 아라자임의 실질 장기에 대한 독성을 평가하기 위해서 24 시간 후 부검을 실시하였다.

<99> 암컷 랫트에 아라자임을 경구 투여한 후 시험물질 투여에 따른 일반증상을 정확하게 관찰하고 독성을 평가하기

위해서 동물의 행동, 외관, 기능에 대한 관찰을 실시하였다.

<100> 실험결과, 아라자임 투여 후 동물의 활동성, 보행, 기질, 경련 등에 있어서는 아무런 이상 증상이 관찰되지 않았으며, 피모 상태, 안구주변, 귀, 생식기, 사지 상태, 꼬리 상태 등의 동물의 외관 관찰 및 호흡 상태, 타액 분비, 분변, 구토 등의 기능 관찰에서도 아무런 이상 증상이 관찰되지 않았다. 아라자임 투여 24 시간 후에 부검을 실시한 결과, 육안부검 소견에서도 전장기에서 아라자임 투여에 의한 아무런 이상도 관찰되지 않았다. 아라자임 치사량(LD_{50})은 5000 ㎎/㎏이상의 고농도인 것으로 판단된다. 현미경학적 관찰에 있어서 간, 심장, 폐 및 췌장 등의 실질 장기에서는 아무런 병리학적 이상 소견이 관찰되지 않았다.

<101> 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제제예를 예시한다.

<102> **<제제예 1> 약학적 제제의 제조**

<103> **<1-1> 산제의 제조**

<104> 아라자임 2 g

<105> 유당 1 g

<106> 상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

<107> **<1-2> 정제의 제조**

<108> 아라자임 100 ㎎

<109> 옥수수전분 100 ㎎

<110> 유 당 100 ㎎

<111> 스테아린산 마그네슘 2 ㎎

<112> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

<113> **<1-3> 캡슐제의 제조**

<114> 아라자임 100 ㎎

<115> 옥수수전분 100 ㎎

<116> 유 당 100 ㎎

<117> 스테아린산 마그네슘 2 ㎎

<118> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

<119> **<1-4> 환의 제조**

<120> 아라자임 1 g

<121> 유당 1.5 g

<122> 글리세린 1 g

<123> 자일리톨 0.5 g

<124> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

<125> **<1-5> 과립의 제조**

<126> 아라자임 150 ㎎

<127> 대두추출물 50 ㎎

<128> 포도당 200 ㎎

<129> 전분 600 ㎎

<130> 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 ㎎을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충진

하였다.

<131> **<1-6> 주사액제의 제조**

<132> 아라자임 10 ㎍/㎖

<133> 묽은 염산 BP pH 7.6로 될 때까지

<134> 주이용 염화나트륨 BP 최대 1 ㎖

<135> 적당한 용적의 주이용 염화나트륨 BP 중에 아라자임을 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묽은 염산 BP를 이용하여 pH 7.6로 조절하고, 주이용 염화나트륨 BP를 이용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 5 ㎖ 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하에 봉입시키고, 120℃에서 15 분 이상 오토클래이브시켜 살균하여 주사액제를 제조하였다.

<136> **<제제예 2> 식품의 제조**

<137> 상기 제제예 1의 산제, 정제, 캡슐제, 환 및 과립을 식품에 응용하여도 무방하며, 상기의 아라니콜라 프로테오리티쿠스의 배양액 또는 이로부터 분리된 아라자임을 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.

<138> **<2-1> 밀가루 식품의 제조**

<139> 아라니콜라 프로테오리티쿠스의 배양액 또는 이로부터 분리된 아라자임 0.1 ~ 10.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 통상의 방법으로 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

<140> **<2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조**

<141> 아라니콜라 프로테오리티쿠스의 배양액 또는 이로부터 분리된 아라자임 0.1 ~ 1.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 통상의 방법으로 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

<142> **<2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조**

<143> 아라니콜라 프로테오리티쿠스의 배양액 또는 이로부터 분리된 아라자임 10 중량부를 그라운 비프에 첨가하여 통상의 방법으로 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

<144> **<2-4> 유제품(dairy products)의 제조**

<145> 아라니콜라 프로테오리티쿠스의 배양액 또는 이로부터 분리된 아라자임 0.1 ~ 1.0 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 통상의 방법으로 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

<146> **<2-5> 선식의 제조**

<147> 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

<148> 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

<149> 아라니콜라 프로테오리티쿠스의 배양액 또는 이로부터 분리된 아라자임을 진공 농축기에서 감압, 농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

<150> 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 아라니콜라 프로테오리티쿠스의 배양액 또는 이로부터 분리된 아라자임의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 통상의 방법으로 제조하였다.

<151> 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

<152> 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

<153> 아라니콜라 프로테오리티쿠스의 배양액 또는 이로부터 분리된 아라자임의 건조분말(1 중량부),

<154> 영지(0.5 중량부),

<155> 지황(0.5 중량부)

<156> **<제제예 3> 음료의 제조**

<157> 아라니콜라 프로테오리티쿠스의 배양액 또는 이로부터 분리된 아라자임을 포함하는 음료를 다음과 같이 제조하였다.

<158> **<3-1> 건강음료의 제조**

<159> 액상과당(0.5 중량부), 올리고당(2 중량부), 설탕(2 중량부), 식염(0.5 중량부), 물(75 중량부)과 같은 부재료와 아라니콜라 프로테오리티쿠스의 배양액 또는 이로부터 분리된 아라자임(0.5 중량부)을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후, 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 건강음료를 제조하였다.

<160> **<3-2> 야채쥬스의 제조**

<161> 아라니콜라 프로테오리티쿠스의 배양액 또는 이로부터 분리된 아라자임 0.5 g을 토마토 또는 당근 등의 야채의 쥬스 1,000 ㎖에 가하여 통상의 방법으로 건강 증진용 야채쥬스를 제조하였다.

<162> **<3-3> 과일쥬스의 제조**

<163> 아라니콜라 프로테오리티쿠스의 배양액 또는 이로부터 분리된 아라자임 0.1 g을 사과 또는 포도 등의 과일의 쥬스 1,000 ㎖에 가하여 통상의 방법으로 건강 증진용 과일쥬스를 제조하였다.

도면의 간단한 설명

<164> 도 1은 혈청 내 TNF-α의 발현양을 측정한 결과를 나타내는 그래프이고,

<165> 도 2는 대퇴골 관절융기 변화의 육안관찰을 나타낸 그림이고:

<166> M : medial side(내측면); 및

<167> 붉은 화살표 : 침식 부위,

<168> 도 3은 경골 관절융기 변화의 육안관찰을 나타내는 그림이고,

<169> 도 4는 대퇴골 및 경골 융기 변화의 육안관찰을 등급(grade)으로 평가한 결과를 나타내는 그레프이고,

<170> 도 5는 조직표본의 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin) 염색을 통한 조직변화 관찰을 나타내는 그림이고,

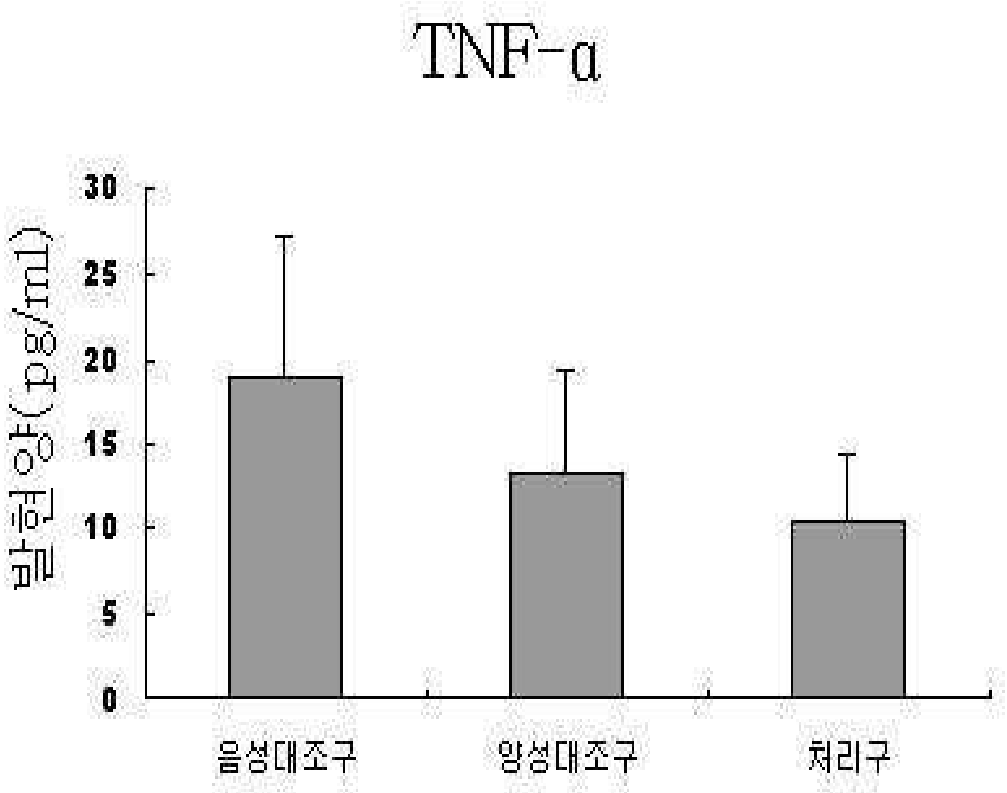
<171> 도 6은 톨루이딘 블루(Toluidine blue) 염색을 통한 아라자임의 급여가 골관절염에 미치는 조직병리학적 소견을 나타내는 그림이고,

<172> 도 7은 아잔(Azan) 염색을 통한 아라자임의 급여가 골관절염에 미치는 조직병리학적 소견을 나타내는 그림이고,

<173> 도 8은 아라자임의 급여가 골관절염에 미치는 조직병리학적 변화의 스코어(score)를 나타내는 그래프이다.

도면

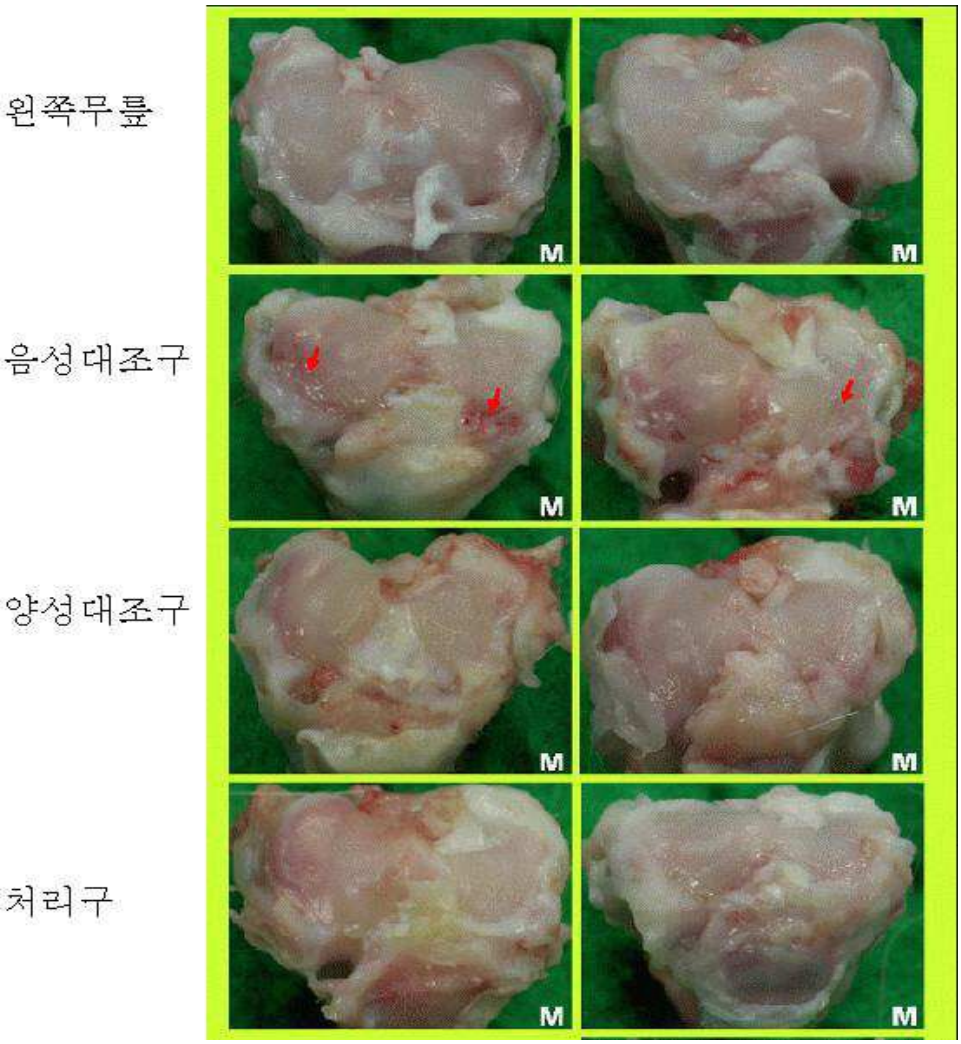
도면1



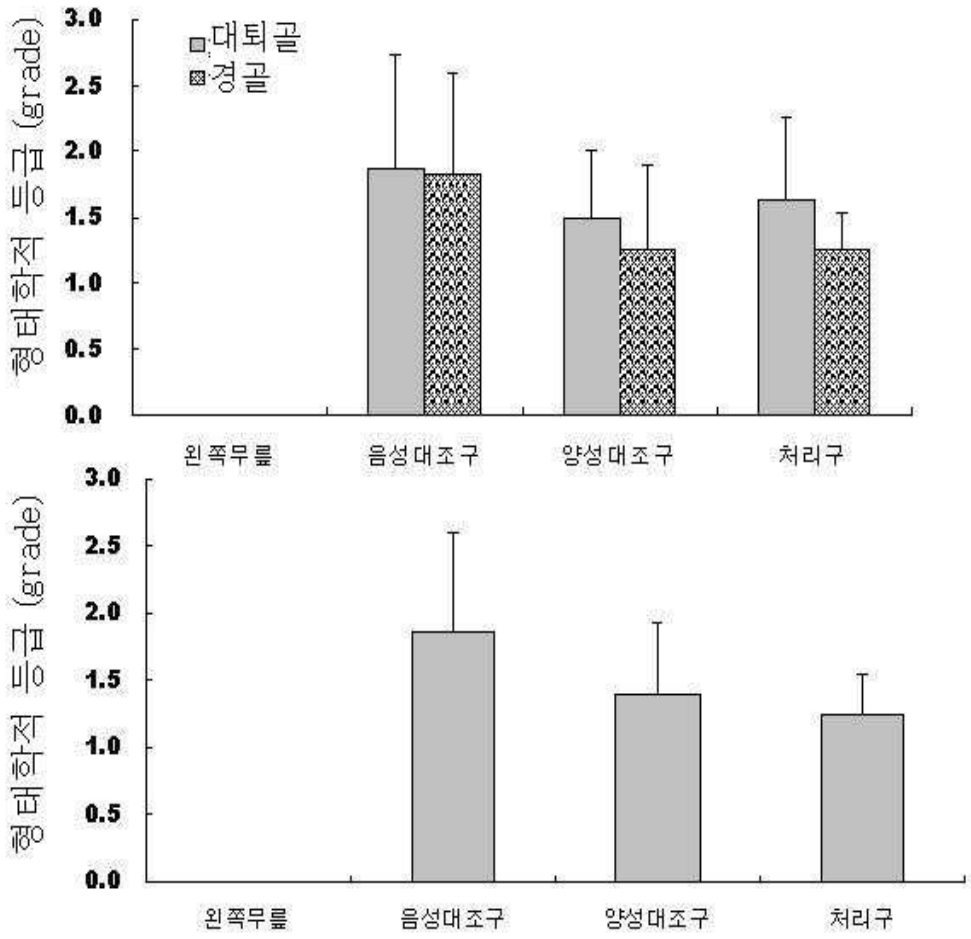
도면2



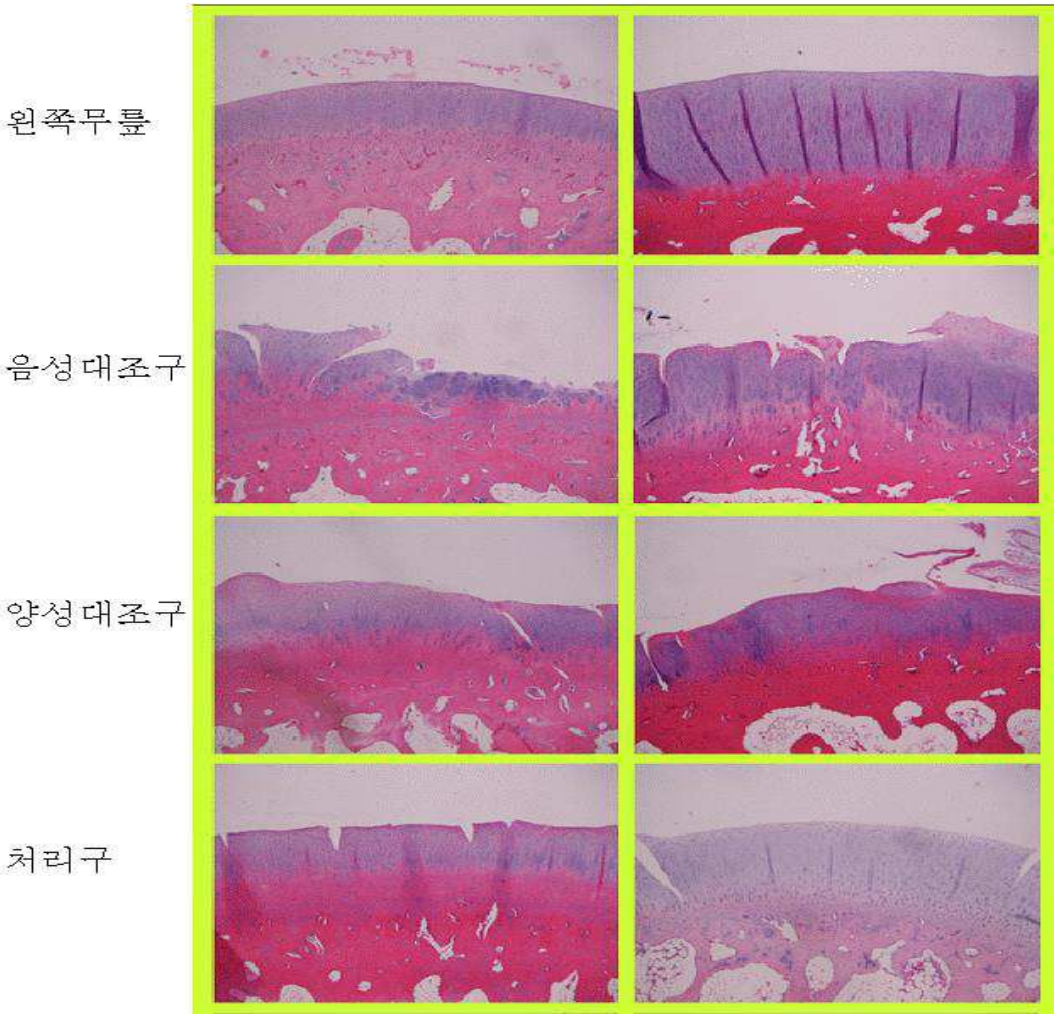
도면3



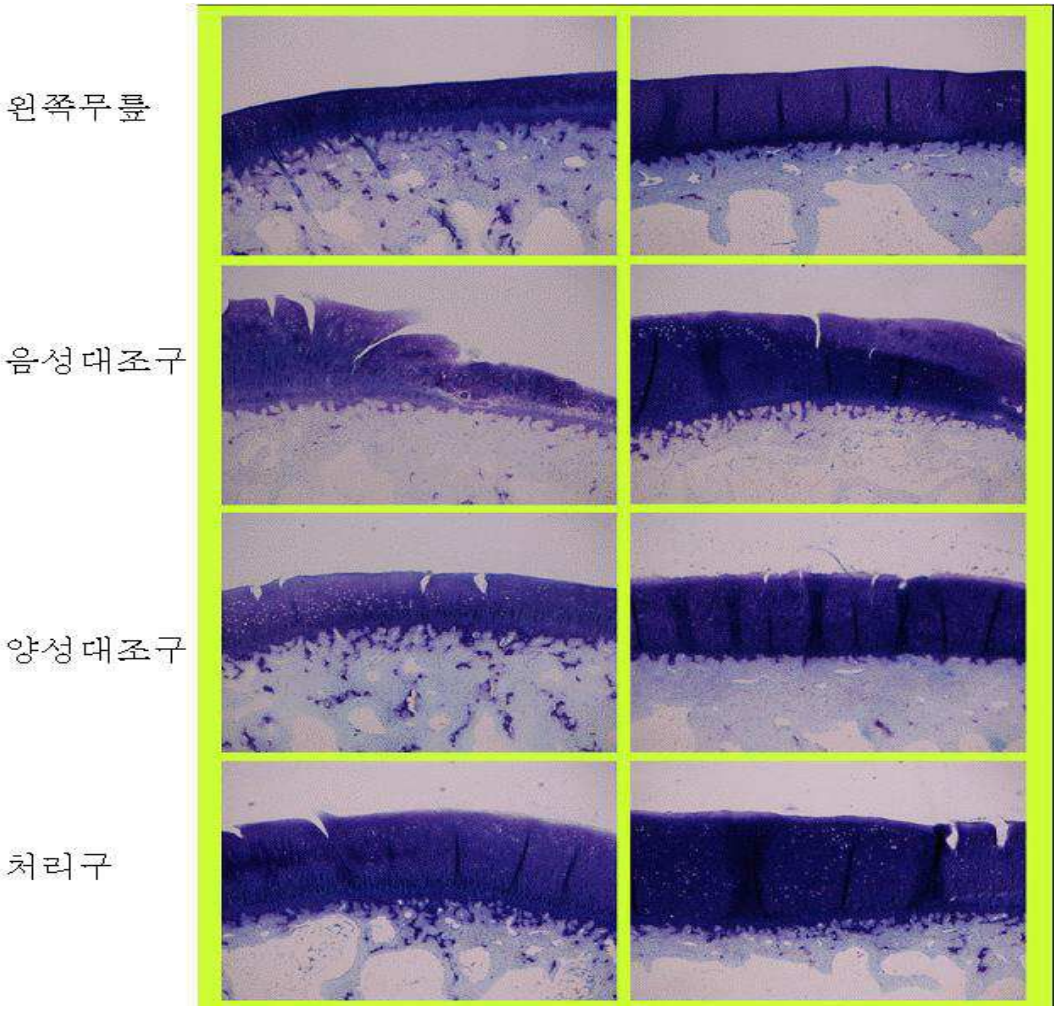
도면4


형태학적 등급 (grade)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
대퇴골
경골
왼쪽무릎
음성대조구
양성대조구
처리구
형태학적 등급 (grade)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
왼쪽무릎
음성대조구
양성대조구
처리구

도면5



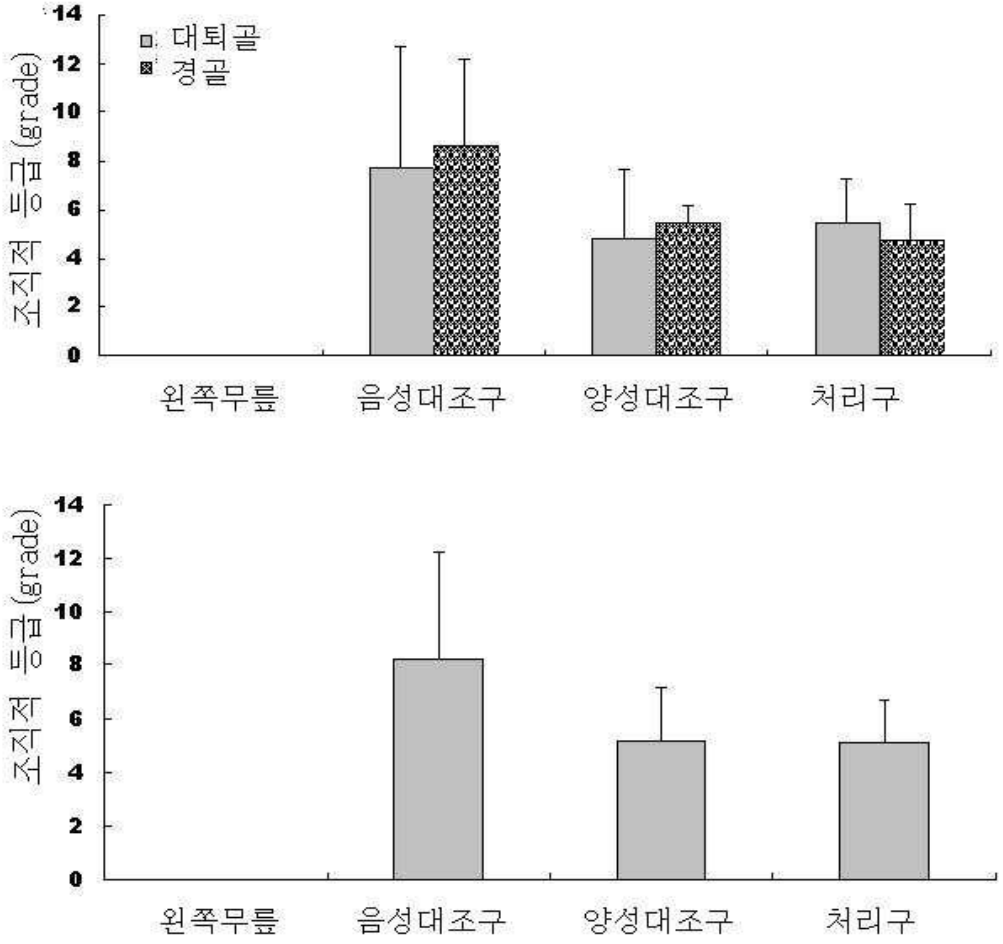
도면6



도면7



도면8



서 열 목 록

<110> Insect Biotech
<120> A composition containing arazyme for the prevention and treatment of arthritis

<130> 7p-10-09

<160> 2

<170> KOPATIN 1.5

<210> 1
<211> 487
<212> PRT
<213> Aranicola proteolyticus

<220>
<221> BINDING
<222> (192)
<223> Zn binding site

<220>
<221> BINDING
<222> (196)
<223> Zn binding site

<220>
<221> BINDING
<222> (323)
<223> Zn binding site

<400> 1

```
Met Gln Ser Thr Lys Lys Ala Ile Glu Ile Thr Glu Ser Ser Leu Ala
  1               5                  10                  15

Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Asn Ala Val Asp Asp Leu Leu His Tyr His
             20                  25                  30

Glu Arg Gly Asn Gly Ile Gln Val Asn Gly Lys Asp Ser Phe Ser Thr
         35                  40                  45

Glu Gln Ala Gly Leu Phe Ile Thr Arg Glu Asn Gln Thr Trp Asn Gly
     50                  55                  60

Tyr Lys Val Phe Gly Gln Pro Val Lys Leu Thr Phe Ser Phe Pro Asp
 65                  70                  75                  80

Tyr Lys Phe Ser Ser Thr Asn Val Ala Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys
                 85                  90                  95

Phe Ser Ala Glu Gln Gln Gln Gln Ala Lys Leu Ser Leu Gln Ser Trp
            100                 105                 110

Ser Asp Val Ala Asn Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Ala Gly Gln Lys
        115                 120                 125

Ala Asn Ile Thr Phe Gly Asn Tyr Ser Gln Asp Arg Pro Gly His Tyr
    130                 135                 140
```

```
Asp Tyr Asp Thr Gln Ala Tyr Ala Phe Leu Pro Asn Thr Ile Tyr Gln
145                 150                 155                 160

Gly Gln Asn Leu Gly Gly Gln Thr Trp Tyr Asn Val Asn Gln Ser Asn
                165                 170                 175

Val Lys His Pro Ala Ser Glu Asp Tyr Gly Arg Gln Thr Phe Thr His
            180                 185                 190

Glu Ile Gly His Ala Leu Gly Leu Ser His Pro Gly Asp Tyr Asn Ala
        195                 200                 205

Gly Glu Gly Asn Pro Thr Tyr Arg Asp Ala Ser Tyr Ala Glu Asp Thr
    210                 215                 220

Arg Glu Phe Ser Leu Met Ser Tyr Trp Ser Glu Thr Asn Thr Gly Gly
225                 230                 235                 240

Asp Asn Gly Gly His Tyr Ala Ala Ala Pro Leu Leu Asp Asp Ile Ser
                245                 250                 255

Ala Ile Gln His Leu Tyr Gly Ala Asn Gln Thr Thr Arg Thr Gly Asp
            260                 265                 270

Thr Val Tyr Gly Phe Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu Ser Thr
        275                 280                 285

Thr Ser Asn Pro Gln Lys Val Ile Phe Ala Ala Trp Asp Ala Gly Gly
    290                 295                 300

Asn Asp Thr Phe Asp Phe Ser Gly Tyr Thr Ala Asn Gln Arg Ile Asn
305                 310                 315                 320

Leu Asn Glu Lys Ser Phe Ser Asp Val Gly Gly Leu Lys Gly Asn Val
                325                 330                 335

Ser Ile Ala Ala Gly Val Thr Ile Glu Asn Ala Ile Gly Gly Ser Gly
            340                 345                 350

Asn Asp Val Ile Val Gly Asn Ala Ala Asn Asn Val Leu Lys Gly Gly
        355                 360                 365

Ala Gly Asn Asp Val Leu Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp Glu Leu Trp
    370                 375                 380
```

```
Gly Gly Ala Gly Lys Asp Thr Phe Val Phe Ser Ala Val Ser Asp Ser
385                 390                 395                 400

Ala Pro Gly Ala Ser Asp Trp Ile Lys Asp Phe Gln Lys Gly Ile Asp
                405                 410                 415

Lys Ile Asp Leu Ser Phe Phe Asn Gln Gly Ala Gln Gly Gly Asp Gln
            420                 425                 430

Ile His Phe Val Asp His Phe Ser Gly Ala Ala Gly Glu Ala Leu Leu
        435                 440                 445

Ser Tyr Asn Ala Ser Asn Asn Val Ser Asp Leu Ala Leu Asn Ile Gly
    450                 455                 460

Gly His Gln Ala Pro Asp Ile Leu Val Lys Ile Val Gly Gln Val Asp
465                 470                 475                 480

Val Ala Thr Asp Phe Ile Val
                485
```

<210> 2
<211> 2481
<212> DNA
<213> Aranicola proteolyticus

<400> 2

```
cgagcgcgaa agacccggaa ggcacgaggt gattagtcaa aaaaagaaaa tgttattcct   60

gcgggaacta aaaagtaccg gcggctaata ataaagagtt attaatctat aacgctttag  120

ccaaatttaa cttttagccg tctaaatccc agcacgattc gcttggctct gcaggccgca  180

tttttgttgg agtttgttac caactcatgg catttaagtt tcattaatat tgtaaataat  240

gcaaaaaacc agcataaatc cccttcgtaa cgataataaa tggctgatta ttttatgtgc  300

agttttacac cgctgcctat aattggaatc gattaccatt tatggtggta atcttatttg  360

ctgatatata tgcattaatt ctctctaaca cactgccggt ancggcgcat aaactccttc  420
```

ccgtaagcgt gcggttcgtt ctccgtggct tcctggcagg ttatgtctat ctgtctgatt 480

gaaaccaatc agctaatgag tggaatcgaa ccaatgcaat ctactaaaaa ggcaattgaa 540

attactgaat ccagccttgc ggctgcgagc tccgcttaca atgcagtaga tgatttgctg 600

cattatcatg agcgaggcaa cgggattcag gttaatggca aggactcatt ttctaccgaa 660

caagccgggc tgtttattac ccgcgagaac caaacctgga acggttataa agtttttggc 720

caaccggtta aattaacgtt ctctttcccg gattataaat tctcttccac caacgtcgcc 780

ggcgataccg gactgagcaa attcagcgcg gaacagcagc agcaggctaa gctgtcgctg 840

cagtcctggt ctgacgtggc caatatcacc tttaccgaag ttggtgccgg ccagaaggcc 900

aatatcacct tcggtaacta cagccaggat cgtcccggcc attatgacta cgatacccag 960

gcttacgcct tcctgccgaa caccatttat cagggccaaa acctgggcgg gcagacttgg 1020

tacaacgtca accagtccaa cgtgaaacat ccggccagcg aagactacgg ccgccagacc 1080

tttacccacg agattggcca tgcgttgggc ttgagccatc cgggcgatta caacgccggc 1140

gaaggcaacc cgacttacag agatgccagc tacgccgaag atactcgtga gttcagcctg 1200

atgagttact ggagcgaaac caacaccggt ggcgacaacg gcgggcacta cgctgcggcg 1260

ccactgctgg atgacatttc cgctattcag catctgtatg gtgccaacca gaccacccgt 1320

accggcgata ccgtgtatgg cttcaactca aataccggac gtgacttcct cagtaccacc 1380

agcaatccgc aaaaagtgat ctttgcggcc tgggatgcgg gtggtaatga caccttcgat 1440

ttctccggtt acaccgctaa ccagcgtatt aatctgaacg agaaatcttt ctccgacgtg 1500

ggtgggctga aaggcaacgt gtccattgcc gcaggtgtga ccatcgagaa cgcgattggc 1560

ggttcaggca atgacgtgat cgtcggcaat gcggccaaca acgtgctgaa aggtggcgcg 1620

ggcaacgacg tgctgttcgg cggtggtggg gctgatgagc tgtggggcgg tgcgggcaaa 1680

gacacctttg tcttctctgc ggtcagcgat tctgcgccgg gtgcctccga ctggatcaag 1740

gatttccaga aaggcatcga taaaatcgac ctgtcattct tcaatcaggg cgcgcagggt 1800

ggcgatcaga tccacttcgt cgatcatttc agtggcgcag cgggcgaagc cttgctgtct 1860

tacaatgcgt cgaataacgt cagcgatctg gccctgaata tcggcggcca tcaggccccg 1920

gacatcctgg tgaagatcgt cggccaggtt gatgtcgcca ctgactttat cgtttaacag 1980

tgcaggtgct aacgcccggc gccggttggc cgggcgttat acaggagacg atatgaaggg 2040

cagcttagcg cacgccgcct tagtggcagg cggcatgatg gttacggggg cagttatggc 2100

cagcagtttg gttcttccca gcgcgcaatc attggcgggg caatggctgg tcgccaatgc 2160

cgaacaacaa tgtcagattg agtttttggc cggtgaacag agtgaaatca acggctactc 2220

attggttgat cggcagcact gtttggaaaa ggtgttaacc gccgaggtgg tcggttggcg 2280

ccctgcaccg gacggcatcg ctttgctgcg ggcggatggc agtacgctgg cgttcttctc 2340

gcgcgatggc gatatttacc gcaaccagct tggcgcggat gacggactga cgctgaaagc 2400

gctggtataa caacagcggg ttcggcagtc gaacccgccc tgagcagcct tacagataca 2460

gcgaacgtac gatcaggaaa t 2481