



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0095308
(43) 공개일자 2020년08월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/02 (2017.01) C12Q 1/6869 (2018.01)
C12Q 1/689 (2018.01) G01N 33/569 (2017.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/02 (2013.01)
C12Q 1/6869 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2019-0051014
(22) 출원일자 2019년04월30일
심사청구일자 2019년04월30일
(30) 우선권주장
1020190013118 2019년01월31일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
홍수종
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88, 서울아산병원(풍납동)
(74) 대리인
특허법인 이룸리온

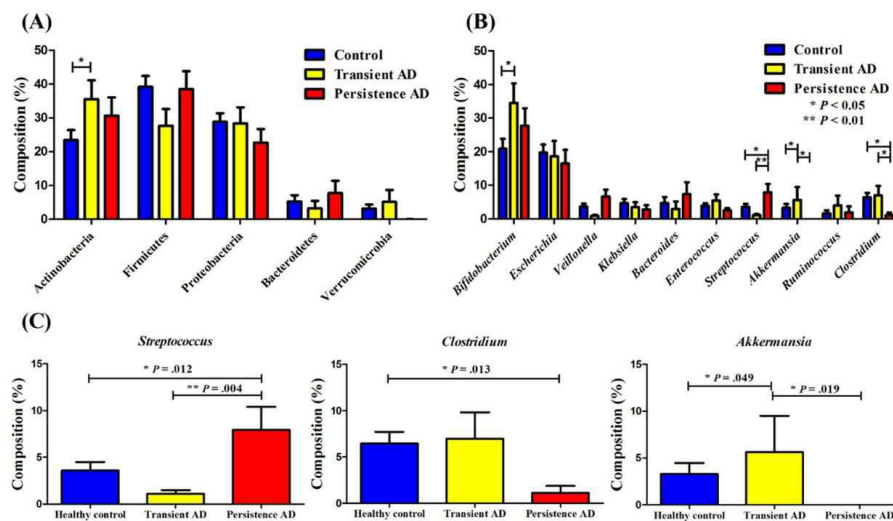
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 장내 미생물 군집의 변화를 이용한 아토피피부염 발생 및 지속성 예측

(57) 요약

본 발명은 분변 내 마이크로바이옴의 변화를 이용한 아토피피부염의 지속성 예측에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 아토피피부염 환자의 분변 시료에서 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 균주, 클로스트리디움(*Clostridium*) 속 균주 또는 아커만시아(*Akkermansia*) 속 균주를 검출함으로써 아토피피부염의 지속여부 또는 중증도를 객관적이고 간편하게 진단할 수 있고, 이를 통해 아토피피부염의 치료 방법을 선택하는데 기여할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12Q 1/689 (2018.05)

G01N 33/56966 (2013.01)

G01N 33/6854 (2013.01)

C12Q 2600/112 (2013.01)

G01N 2800/20 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711072976 (2017M3A9F3043834)

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발사업

연구과제명 아토피피부염 질환군의 면역기전연구를 통한 장내 마이크로바이옴 기반 파마바이오틱스 발

굴

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2017.05.25 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

아토피피부염 환자의 분변 시료에서 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 균주, 클로스트리디움(*Clostridium*) 속 균주 및 아커만시아(*Akkermansia*) 속 균주로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 균주를 검출할 수 있는 제제를 포함하고,

상기 제제는 균주에 특이적인 프라이머, 프로브, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 압타머 및 항체로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인, 아토피피부염 지속성 예측용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 프라이머는 상기 균주의 16S rRNA를 증폭할 수 있는 프라이머인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 아토피피부염 환자는 아토피피부염의 치료를 받고 있는 영유아인, 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 아토피피부염 지속성 예측용 키트.

청구항 5

i) 아토피피부염 환자의 분변 시료에서 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 균주, 클로스트리디움(*Clostridium*) 속 균주 및 아커만시아(*Akkermansia*) 속 균주로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 균주 DNA의 증폭산물의 양을 측정하는 단계;

ii) 상기 증폭산물의 양을 아토피성 피부염을 가지고 있지 않은 건강한 사람의 분변 시료로부터 얻어진 계통 DNA의 증폭산물과 비교하는 단계;를 포함하는, 아토피피부염 지속성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 단계 ii)에서 비교한 결과가 하기 a) 또는 b)에 해당하는 경우 지속형 아토피피부염으로 평가하는, 방법:

- a) 스트렙토코커스 속 균주의 DNA 증폭산물의 증가;
- b) 클로스트리디움 속 균주의 DNA 증폭산물의 감소.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 단계 i)에서 아커만시아 속 균주가 검출되지 않고, 상기 단계 ii)에서 비교한 결과, 스트렙토코커스 속 균주의 DNA 증폭산물이 증가하거나 클로스트리디움 속 균주의 DNA 증폭산물이 감소하는 경우 지속형 아토피피부염으로 평가하는, 방법.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 단계 ii)에서 비교한 결과가 하기 c) 내지 e) 중 어느 하나 이상에 해당하는 경우 일시형 아토피피부염으로 평가하는 방법:

- c) 스트렙토코커스 속 균주의 DNA 증폭산물의 감소;
- d) 클로스트리디움 속 균주의 DNA 증폭산물의 증가;
- e) 아커만시아 속 균주의 DNA 증폭산물의 증가.

청구항 9

i) 아토피피부염의 치료를 받는 중인 환자의 분변 시료에서 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 균주 및 클로스트리디움(*Clostridium*) 속 균주로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 균주 DNA의 증폭산물의 양을 측정하는 단계;

ii) 상기 증폭산물의 양을 아토피성 피부염을 가지고 있지 않은 건강한 사람의 분변 시료로부터 얻어진 게놈 DNA의 증폭산물과 비교하는 단계;를 포함하는, 아토피피부염의 치료방침 결정에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 단계 ii)에서 비교한 결과, 스트렙토코커스 속 균주의 DNA 증폭산물이 증가하거나, 클로스트리디움 속 균주의 DNA 증폭산물이 감소할 경우, 아토피피부염의 중증도가 심한 것으로 보고 치료방침을 결정하도록 하는, 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 단계 ii)에서 비교한 결과, 스트렙토코커스 속 균주의 DNA 증폭산물이 감소하거나, 클로스트리디움 속 균주의 DNA 증폭산물이 증가할 경우, 아토피피부염의 중증도가 낮은 것으로 보고 치료방침을 결정하도록 하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아토피피부염 지속성을 예측하기 위한 조성물 및 이의 이용에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 아토피피부염(Atopic Dermatitis, AD)은 만성적인 염증성 피부질환으로서, 환경적 자극에 대한 피부 과민 반응

과 관련이 있으며, 소아의 15% 이상에게 영향을 줄 수 있다. 일반적으로 아토피피부염은 유아기와 유년기에 나타나지만 청소년기와 성인기까지 지속될 수 있다. 아토피피부염은 다양한 요인에 의해 증상이 변화하고, 특정 요인에 따라 중증도가 심해지거나 난치화 되기도 하며, 치료상황도 경과에 크게 영향을 준다.

[0004] 아토피피부염의 치료는 경미한 경우 건조, 피부장벽 기능 저하를 보완하고 염증을 예방할 목적으로 보습제 등을 사용하면 족하지만, 증상이 심한 경우 아토피피부염의 염증을 억제하기 위해 스테로이드제 등이 사용된다. 스테로이드제를 장기간 광범위하게 사용하면 부작용이 생길 수 있기 때문에 아토피피부염의 중증도에 따라 약제를 적절히 선택하는 등 치료방침을 달리 적용하는 것이 중요하다.

[0005] 한편, 아토피피부염의 중증도 판단은 육안에 의한 소견에 의존하며, 의사는 소견에 따른 중증도 판단에 의존하여 환자의 치료 지침을 결정하게 된다. 아토피성 피부염의 중증도 분류에 세계적으로 자주 사용하는 Severity Scoring of Atopic Dermatitis(SCORAD)의 경우에도 숙련된 의사에 의한 전문적인 기량이 필요하고, 시간이 오래 걸린다는 한계점을 내포한다. 특히, 아토피피부염 환자의 약 89%를 차지하는 영유아에 있어서, 아토피피부염은 단기간에 악화되기 때문에 예민하게 병세를 반영하는 지표가 필요하지만, 기준 지표는 병세를 예민하게 반영하지 않거나, 영유아기에 높은 값을 나타내는 등의 문제점이 있다.

[0006] 최근 유전자 서열분석 기술이 발달하면서, 인체 내 다양한 부위에서 마이크로바이옴(microbiome)의 조사가 가능해졌으며, 다양한 연구에 의하면 아토피피부염을 앓고 있는 유아의 미생물 군이 아토피피부염이 없는 유아의 미생물 군과 다르다는 사실이 밝혀졌다(Fujimura KE, Nat Med 2016; 22: 1187-91). 그러나, 지금까지 장내 미생물 군집(microbiome)과 아토피피부염의 표현형 또는 중증도 간의 관련성을 규명하고 이를 아토피피부염 치료 방향의 선택 및 치료 경과 판단에 활용하고자 하는 연구는 전무한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 아토피피부염의 표현형에 따른 장내 미생물을 특성화하고, 유전자 서열 분석을 사용하여 아토피피부염의 발병 및 지속성을 예측하는 장내 미생물 군집을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0009] 본 발명에서는 정상 대조군, 일시형 아토피피부염군 및 지속형 아토피피부염군의 장내 마이크로바이옴을 분석하여 아토피피부염 발생 가능성 및 지속성을 시사하는 예측 표지자를 발굴함으로써 유아의 아토피피부염 발생 초기에 예방하거나 아토피피부염 발생 후 치료 방법을 선택하는데 기여하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 일 양태로, 본 발명은 아토피피부염 환자의 분변 시료에서 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 균주, 클로스트리디움(*Clostridium*) 속 균주 및 아커만시아(*Akkermansia*) 속 균주로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 균주 DNA를 검출할 수 있는 체계를 포함하는, 아토피피부염 지속성 예측용 조성물을 제공한다.

[0012] 다른 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 아토피피부염 지속성 예측용 키트를 제공한다.

[0013] 또 다른 양태로서, 본 발명은 i) 아토피피부염 환자의 분변 시료에서 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 균주, 클로스트리디움(*Clostridium*) 속 균주 및 아커만시아(*Akkermansia*) 속 균주로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 균주 DNA의 증폭산물의 양을 측정하는 단계; ii) 상기 증폭산물의 양을 아토피성 피부염을 가지고 있지 않은 건강한 사람의 분변 시료로부터 얻어진 게놈 DNA의 증폭산물과 비교하는 단계;를 포함하는, 아토피피부염 지속성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0014] 또 다른 양태로서, 본 발명은 i) 아토피피부염의 치료를 받는 중인 환자의 분변 시료에서 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 균주 및 클로스트리디움(*Clostridium*) 속 균주로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 균주 DNA의 증폭산물의 양을 측정하는 단계; 및 ii) 상기 증폭산물의 양을 아토피성 피부염을 가지고 있지 않은 건강한 사람의 분변 시료로부터 얻어진 게놈 DNA의 증폭산물과 비교하는 단계;를 포함하는, 아토피피부염의 치료방침 결정에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

- [0016] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0017] 본 발명에서는 아토피피부염을 가진 것으로 진단받은 6개월의 영아의 분변에서 미생물 커뮤니티의 구성이 아토피피부염의 지속성 및 중증도 판단에 미치는 영향을 분석한 결과, 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 균주의 증가, 클로스트리디움(*Clostridium*) 속 균주의 증가, 아커만시아(*Akkermansia*) 속 균주의 감소 또는 불검출이 아토피피부염의 지속성 및 중증도에 영향을 주는 것으로 확인하였다.
- [0018] 따라서, 본 발명에서는 아토피피부염을 가진 환자의 분변 시료에서 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 균주, 클로스트리디움(*Clostridium*) 속 균주, 또는 아커만시아(*Akkermansia*) 속 균주를 검출하기 위한 조성물, 키트 및 방법을 제공한다. 본 발명에서 용어 “마이크로바이옴”은 인간의 몸속에서 함께 공존하고 있는 미생물들의 유전 정보 전체를 일컫는 용어로, 본 발명에서 장내 마이크로바이옴은 장내에 존재하는 미생물들의 유전정보 전체를 의미한다.
- [0019] 본 발명에서 용어 “일시형 AD”는 생후 6개월에 아토피피부염이 발생하여 1세에 아토피피부염이 사라지는 표현형을 의미하고, “지속형 AD”는 생후 6개월에 아토피피부염이 발달하여 2세까지 지속되는 표현형을 의미한다.
- [0020] 본 발명에서 용어, “아토피피부염 지속성 예측”이란, 아토피피부염으로 진단받은 영유아에 대하여 생후 24개월 이하에서 아토피피부염 치료 가능성이 상대적으로 낮은지, 또는 아토피피부염의 중증도가 심해지거나 난치화되는지 여부를 판별하는 것을 말한다. 본 발명은 아토피피부염을 가진 24개월 이하의 영유아에 대하여 지속성 아토피피부염을 가지거나 아토피피부염의 중증도가 높은 영유아들을 조기에 진단하여 가장 적절한 치료 방식을 선택하거나 치료 경과 판단에 임상적으로 사용될 수 있다.
- [0021] 본 명세서에서 “스트렙토코커스”란, 분류학적으로 스트렙토코커스 속에 속하는 종(Species)들로 구성된 미생물 또는 그 군집을 말한다. 본 발명에서 스트렙토코커스는, 종래에 보고된 균주들 뿐 아니라, 종래에 보고된 스트렙토코커스와 16S rRNA 서열 비교시 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 미생물들이 모두 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0022] 본 발명에서 “클로스트리디움”란, 분류학적으로 클로스트리디움 속에 속하는 종(Species)들로 구성된 미생물 또는 그 군집을 말한다. 본 발명에서 클로스트리디움은, 종래에 보고된 균주들 뿐 아니라, 종래에 보고된 클로스트리디움과 16S rRNA 서열 비교시 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 미생물들이 모두 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0023] 본 발명에서 “아커만시아”란, 분류학적으로 아커만시아 속에 속하는 종(Species)들로 구성된 미생물 또는 그 군집을 말한다. 본 발명에서 아커만시아는, 종래에 보고된 균주들 뿐 아니라, 종래에 보고된 아커만시아와 16S rRNA 서열 비교시 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 미생물들이 모두 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0024] 본 발명에서 용어, “검출할 수 있는 제제”란, 분변 내에서 아토피피부염 지속성 진단 마커인 스트렙토코커스, 클로스트리디움 및/또는 아커만시아의 존재를 검출하기 위하여 사용될 수 있는 물질을 의미한다. 예를 들어, 스트렙토코커스, 클로스트리디움 및/또는 아커만시아에 특이적으로 존재하는 단백질, 핵산, 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자를 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머, 프로브, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 압타머, 또는 항체 등이 될 수 있다.
- [0025] 바람직하게, 본 발명에서 검출할 수 있는 제제는 스트렙토코커스, 클로스트리디움 및/또는 아커만시아를 검출할 수 있는 프라이머 일 수 있다. 상기 프라이머는 스트렙토코커스, 클로스트리디움 및/또는 아커만시아의 게놈 서열을 특이적으로 검출하고 다른 미생물의 게놈 서열에는 특이적 결합을 하지 않는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게, 스트렙토코커스, 클로스트리디움 및/또는 아커만시아로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 미생물의 16S rRNA를 증폭할 수 있는 프라이머 일 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 용어, “프라이머”란, 주형 가닥에 상보적인 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고, 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능하는 7개 내지 50개의 핵산서열을 의미한다. 프라이머는 보통 합성하지만 자연적으로 생성된 핵산에서 이용할 수도 있다. 프라이머의 서열은 반드시 주형의 서열과 정확히 같을 필요는 없으며, 충분히 상보적이어서 주형과 혼성화될 수 있으면 된다. 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 혼입할 수 있는 추가의 특징의 예로 메틸화, 캡화, 하나 이상의 핵산을 동족체로의 치환 및 핵산 간의 변형 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게, 본 발명의 프라이머는 스트렙토코커스, 클로스트리디움 및/또는 아커만시아 미생물의 16S rRNA를 증폭할 수 있는 프라이머일 수 있다.

- [0027] 본원에서 용어, "16S rRNA "란, 원핵생물 리보솜의 30S 소단위체를 구성하고 있는 rRNA로, 모든 종에 공통적인 보존 영역(conserved region)과 특정 종을 분류할 수 있는 초가변 영역(hypervariable region)이 존재하므로 염기서열분석을 통하여 미생물을 동정할 수 있다. 특히 동종 간에는 다양성이 거의 없는 반면에 타종 간에는 다양성이 나타나므로 16S rRNA의 서열을 비교하여 원핵생물을 유용하게 동정할 수 있다. 또한 16S rDNA 는 16S rRNA 를 코딩하는 유전자이므로, 16S rDNA 를 활용하여 미생물을 동정할 수도 있다.
- [0028] 바람직한 일구현예로, 본 발명에서 상기 프라이머는 스트렙토코커스, 클로스트리디움 및/또는 아커만시아 속에 특이적인 16S rRNA (또는 16S rDNA) 서열을 증폭시키는 데 사용될 수 있으며, 서열 증폭 결과 원하는 생성물의 생성 여부를 통하여 스트렙토코커스 속, 클로스트리디움 속, 및/또는 아커만시아 속의 존재를 검출할 수 있다. 프라이머를 이용한 서열 증폭 방법은 당업계에 알려진 다양한 방법들을 사용할 수 있다. 예를 들어, 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR), 멀티플렉스 PCR, 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR, 부스터(booster) PCR, 실시간(real-time) PCR, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 인버스(inverse) 중합효소 연쇄반응, 벡토레트(vectorette) PCR, TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR), 리가아제 연쇄 반응, 복구 연쇄 반응, 전사-중재 증폭, 자가 유지 염기서열 복제, 또는 타겟 염기서열의 선택적 증폭 반응을 이용할 수 있으나, 본 발명의 범위가 이에 제한되지는 않는다.
- [0029] 또한, 본 발명에서 미생물 검출 제제는, 항체일 수 있으며, 항원-항체 반응을 기반으로 한 면역학적 방법을 사용하여 해당 미생물을 검출할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (Complement Fixation Assay), FACS(Fluorescence activated cell sorter), 또는 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 그 외, 당업계에 널리 사용되는 분자 및 면역학적 방법이 본 발명의 미생물을 검출하는 데 사용될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 상기 미생물 검출 제제를 포함하는 진단용 조성물은, 진단 키트 형태로 구현되어 제공될 수 있다. 본 발명의 키트는 해당 미생물을 검출하기 위한 프라이머, 프로브, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 앵타머, 또는 항체 등의 검출 제제를 포함할 뿐만 아니라, 분석 방법에 적합한 1종 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액, 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0032] 구체적인 일례로, 본 발명에서 스트렙토코커스 속, 클로스트리디움 속, 및/또는 아커만시아 속에 특이적인 프라이머를 포함하는 키트는, PCR 등의 증폭 반응을 수행하기 위한 필수 요소들을 포함하는 키트 일 수 있다. 예를 들어, 상기 PCR 용 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 또는 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0034] 다른 측면에서, 본 발명은 아토피피부염 환자의 분변으로부터 스트렙토코커스 속 균주, 클로스트리디움 속 균주 및/또는 아커만시아 속 미생물을 검출함으로써, 환자의 아토피피부염 지속성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0035] 달리 말하면, 본 발명은 아토피피부염 지속성 예측에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 아토피피부염 환자의 분변으로부터 스트렙토코커스 속 균주, 클로스트리디움 속 균주 및/또는 아커만시아 속 미생물을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0036] 바람직한 일례로, 상기 방법은 다음의 단계를 포함하여 구현될 수 있다:
- [0037] (a) 아토피피부염 환자의 분변으로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계,
- [0038] (b) 상기 추출된 게놈 DNA 에 스트렙토코커스 속 균주, 클로스트리디움 속 균주 및/또는 아커만시아 속 미생물에 특이적인 프라이머를 반응시키는 단계, 및
- [0039] (c) 상기 반응물을 증폭시키는 단계.
- [0040] 상기 단계 (b) 에서 아토피피부염 환자의 분변으로부터 게놈 DNA의 추출은 당업계에 알려진 일반적인 기술을 적용하여 수행할 수 있으며, 스트렙토코커스 속 균주, 클로스트리디움 속 균주 및/또는 아커만시아 속 미생물에

특이적인 프라이머는 위에서 설명한 바와 같다.

- [0041] 상기 단계 (c)에서 반응물을 증폭시키는 방법은 당업계에 알려진 일반적인 증폭 기술들, 예를 들어 중합효소 연쇄반응, 역전사-중합효소 연쇄반응, 멀티플렉스 PCR, 터치다운 PCR, 핫 스타트 PCR, 네스티드 PCR, 부스터 PCR, 실시간 PCR, 분별 디스플레이 PCR, cDNA 말단의 신속 증폭, 인버스 PCR, 벡토레트 PCR, TAIL-PCR, 리가아제 연쇄 반응, 복구 연쇄 반응, 전사-중재 증폭, 자가 유지 염기서열 복제, 타겟 염기서열의 선택적 증폭 반응을 이용할 수 있으나, 본 발명의 범위가 이에 제한되지는 않는다.
- [0042] 상기 단계 (c)에서, 반응물의 증폭 산물의 양을 아토피피부염이 없는 건강한 사람의 분변의 증폭산물 또는 임계 값(cut-off) 과 비교하는 단계를 추가로 수행할 수 있다.
- [0043] 바람직한 일례로, 본 발명의 아토피피부염 지속성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법은 i) 아토피피부염 환자의 분변 시료에서 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 균주, 클로스트리디움(*Clostridium*) 속 균주 및 아커만시아(*Akkermansia*) 속 균주로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 균주 DNA의 증폭산물의 양을 측정하는 단계, 및 ii) 상기 증폭산물의 양을 아토피성 피부염을 가지고 있지 않은 건강한 사람의 분변 시료로부터 얻어진 게놈 DNA의 증폭산물과 비교하는 단계를 포함하여 구현될 수 있다.
- [0044] 상기 단계 ii)에서 비교한 결과가 하기 a) 또는 b)에 해당하는 경우 지속형 아토피피부염으로 평가할 수 있다.
- [0045] a) 스트렙토코커스 속 균주의 DNA 증폭산물의 증가;
- [0046] b) 클로스트리디움 속 균주의 DNA 증폭산물의 감소.
- [0047] 또한, 상기 단계 i)에서 아커만시아 속 균주가 증폭되지 않고, 상기 단계 ii)에서 비교한 결과, 스트렙토코커스 속 균주의 DNA 증폭산물이 증가하거나 클로스트리디움 속 균주의 DNA 증폭산물이 감소하는 경우 지속형 아토피피부염으로 평가할 수 있다.
- [0048] 상기 단계 ii)에서 비교한 결과가 하기 c) 내지 e) 중 어느 하나 이상에 해당하는 경우 일시형 아토피피부염으로 평가할 수 있다.
- [0049] c) 스트렙토코커스 속 균주의 DNA 증폭산물의 감소;
- [0050] d) 클로스트리디움 속 균주의 DNA 증폭산물의 증가;
- [0051] e) 아커만시아 속 균주의 DNA 증폭산물의 증가.
- [0053] 또 다른 측면에서, 본 발명은 i) 아토피피부염의 치료를 받는 중인 환자의 분변 시료에서 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 균주 및 클로스트리디움(*Clostridium*) 속 균주로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 균주 DNA의 증폭산물의 양을 측정하는 단계, 및 ii) 상기 증폭산물의 양을 아토피피부염을 가지고 있지 않은 건강한 사람의 분변 시료로부터 얻어진 게놈 DNA의 증폭산물과 비교하는 단계를 포함하는, 아토피피부염의 치료방침 결정에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0054] 상기 단계 ii)에서 비교한 결과, 스트렙토코커스 속 균주의 DNA 증폭산물이 증가하거나, 클로스트리디움 속 균주의 DNA 증폭산물이 감소할 경우, 아토피피부염의 중증도가 심한 것으로 보고 치료방침을 결정하도록 할 수 있다.
- [0055] 상기 단계 ii)에서 비교한 결과, 스트렙토코커스 속 균주의 DNA 증폭산물이 감소하거나, 클로스트리디움 속 균주의 DNA 증폭산물이 증가할 경우, 아토피피부염의 중증도가 낮은 것으로 보고 치료방침을 결정하도록 할 수 있다.
- [0056] 본 발명에서 미생물의 비율은 시료 내 전체 마이크로바이옴의 16s rRNA 시퀀스 증폭산물량 중 해당 미생물의 16s rRNA 시퀀스 증폭량이 차지하는 것을 의미하며, 예를 들어 16s rRNA 시퀀스 증폭량을 나타내는 증폭 산물의 중량% (w/w%), 또는 증폭산물의 카피수 비율(copy number) 등으로 표시될 수 있다.

발명의 효과

- [0058] 본 발명은 아토피피부염의 지속성을 조기에 진단할 수 있는 미생물 바이오마커를 제공하며, 이를 이용하면 간단

한 분변 채취를 통하여 아토피피부염의 지속성 또는 중증도 판단을 통해 치료방법을 결정하는데 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 아토피피부염의 표현형 및 아토피피부염 표현형에 따른 장내 미생물 군집의 변화를 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 2는 정상 대조군, 일시형 AD 및 지속형 AD의 장내 미생물 군집의 다양성을 나타낸 것이다: (A-B) 장내 미생물 군집의 OTUs와 샤논 다양성(Shannon diversity)의 박스 점도를 그룹 간 비교 하였다. 그룹 간의 차이의 중요성은 Mann-whitney 테스트를 사용하여 확인하였다.

도 3은 정상 대조군, 일시형 AD 및 지속형 AD의 장내 미생물 군집의 차이점을 문(phyla) 및 속(Genus) 수준에서 비교하여 나타낸 것이다: 각 군에서 가장 빈번하게 검출된 미생물 문(A) 및 속(B)으로 평균 직경 $\pm$ 표준 편차(SD) 및 P 값으로 표시하였다. 파란색은 정상 대조군, 노란색은 일시형 AD군, 빨간색은 지속형 AD군을 나타낸다. (C) 장내 미생물 군집에서 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 군주, 클로스트리디움(*Clostridium*) 속 군주, 및 아커만시아(*Akkermansia*) 속 군주의 조성 비교. 그룹 간의 차이의 중요성은 Mann-whitney 테스트를 사용하여 확인하였다(* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$).

도 4는 (A) 정상 대조군 대 지속형 AD, (B) 일시형 AD 대 지속형 AD 및 (C) 정상 대조군 대 일시형 AD에서의 장내 미생물 수준을 분석하여 나타낸 것이다. 막대 그래프는 LDA 점수를 나타낸다.

도 5는 장내 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 군주 또는 클로스트리디움(*Clostridium*) 속 군주와 IgE, SCORAD 및 호산구(Eosinophil)의 상관 관계를 나타낸 그래프이다: (A) 장내 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 군주의 상대적 존재량과 AD 군의 SCORAD 사이의 관계, (B) 장내 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 군주의 상대적 존재량과 AD군의 IgE(IU/ml) 사이의 관계, (C) 장내 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 군주의 상대적 존재량과 AD군의 호산구(%) 사이의 관계, (D) 장내 클로스트리디움(*Clostridium*) 속 군주의 상대적 존재량과 AD군의 SCORAD 사이의 관계, (E) 장내 클로스트리디움(*Clostridium*) 속 군주의 상대적 존재량과 AD군의 IgE(IU/ml) 사이의 관계, (F) 장내 클로스트리디움(*Clostridium*) 속 군주의 상대적 존재량과 AD군의 호산구(%) 사이의 관계.

도 6은 집단 중 (A) 1st 및 (B) 2nd KO 범주에서 KEGG 경로와 관련된 메타게놈의 기능적 유전자의 상대적 존재량을 나타낸 그래프이다: 녹색은 정상 대조군, 노란색은 일시형 AD군, 빨간색은 지속형 AD군을 나타낸다.

도 7은 정상 대조군, 일시형 AD 및 지속형 AD의 장내 미생물 군집의 메타게놈 분석을 이용하여 대사경로를 비교하여 나타낸 것으로, 산화형 인산화와 관련된 기능 유전자와 그 그룹에 포함된 종을 비교한 결과이다(하늘색 화살표: 아커만시아 뮤시니필라(*Akkermansia muciniphila*), $P < 0.094$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

실시예 1. 연구 대상군 선별 및 샘플의 수집

정상 대조군 84명, 일시형 아토피피부염(일시형 AD, Transient AD) 군 22명, 지속형 아토피피부염(지속형 AD, Persistence AD) 군 26명을 코호트를 통해 모집하였다. 일시형 AD는 생후 6개월에 아토피피부염이 발생하여 1세에 아토피피부염이 사라지는 표현형으로 정의하고, 지속형 AD는 생후 6개월에 아토피피부염이 발발하여 2세까지 지속되는 표현형으로 정의하였으며, 대상 환자의 기본 특성을 하기 [표 1]에 나타내었다.

구체적으로, 아토피피부염 환자는 Hanifin and Rajka's criteria 에 근거한 진단을 받았고, 정상 대조군(건강한 영아)은 피부 습진의 눈에 띄는 징후의 병력이 없고, 소아 알레르기 전문가에 의해 확인된 피부에 스테로이드 치료를 사용하지 않은 영유아를 선별하였다. 이전에 항생제를 복용하지 않은 영유아의 6개월 및 12개월 분변 수

집 시 SCORAD 지수를 사용한 아토피피부염의 중증도(severity)를 동시에 평가했다. 이 연구는 아산 병원 (IRB no. 2008-0616)의 기관 검토위원회 (IRB), 삼성 의료원 (IRB no. 2009-02-021), 세브란스 병원 (IRB no. 4-2008-0588), 차병원 (IRB no. 2010-010), 서울 대학교 병원 (IRB no. H-1401-086-550). 아산 병원 윤리위원회의 승인을 받아 진행하였고, 참가자들 또는 부모들(참가자가 17세 미만인 경우)에게 서면 동의서를 제출했다.

[0067] 미생물의 구성을 변화시킬 수 있는 외부 요인을 통제하기 위해, 대변 샘플링 전에 항생제 사용 이력이 없는 피험자를 포함시켰다. 부모들은 6 개월 쯤 기저귀에 담긴 유아의 분변을 채취하여 즉시 -20 °C에 두었고, 시료를 신속하게 생명 과학 연구소에 전달하여 DNA를 추출하기 전까지 -70 °C에 보관하였다.

[0069] 실시예 2. 장내 미생물, 혈청 IgE 수준 및 호산구 측정

[0070] 총 IgE는 12개월에 혈청 면역 글로블린 E (IgE)와 혈중 호산구의 백분율을 측정하였다. ImmunoCAP-CAP 1000 시스템 (Phadia AB, Uppsala, Sweden)을 사용하여 총 혈청 IgE 수치를 측정하였다. 검출 한계는 2kU/L였다. 자동 혈구 계수기 (XE-100, Sysmex Co., Kobe, Japan)를 사용하여 호산구를 계수 하였다. 측정 결과는 장내 미생물과 상관분석을 통해 분석하여 유의한 결과를 도출하였다.

[0072] 실시예 3. DNA 추출 및 파이로시퀀싱

[0073] Power Microbiome RNA/DNA Isolation Kit (MOBIO/Qiagen, Carlsbad, Calif)를 사용하여 제조자의 프로토콜에 따라 실시예 1의 분변 샘플에서 메타게놈 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 -20°C에서 보관하였다. DNA의 농도와 순도는 분광 광도계로 정량하였다.

[0074] 파이로시퀀싱 (pyrosequencing)을 위해 추출한 DNA를 16S rRNA 유전자의 V1-V3 영역을 표적으로 하는 바코드 프라이머 [Forward: 5'-barcode-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'(서열번호 1), Reverse: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'(서열번호 2)]를 사용하여 증폭하였다. DNA 증폭은 94°C에서 5분간 변성 후, 30 cycles의 94°C에서 30초 동안 변성, 55°C에서 30초 동안 어닐링, 72°C에서 30초 동안 신장 후 마지막 신장 72°C에서 7분 동안 이루어졌다. 증폭 산물은 AMPure XP bead kit (Agencout Bioscience, Beverly, MA, USA)를 이용하여 정제하였다. 시퀀싱은 Roche/454 FLX Titanium system (Roche, Mannheim, Germany)를 이용하여 진행하였다.

[0076] 실시예 4. 전체 유전자 시퀀싱과 시퀀스 분석

[0077] 실시예 1의 분변 샘플에서 48개의 분변 샘플(정상 대조군 20개, 일시형 AD군 12개, 지속형 AD군 16개 샘플)을 무작위로 선택하고, 선택한 샘플의 메타게놈 DNA는 Covaris M220 sonicator (Covaris, Woburn, Mass)를 이용하여 준비하고, TruSeq DNA sample preparation kit (Illumina, San Diego, Calif)를 이용하여 메타게놈 라이브러리를 준비하였다. 각 라이브러리(2nM)은 Illumina adapter sequence 프라이머 [Forward: 5'-ATACGCGACCAACCGAGATC-3'(서열번호 3), Reverse: 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAG-3'(서열번호 4)]를 이용하여 정량적 실시간 PCR을 통해 계산하였다.

[0078] 일루미나 HiSeq2000 (Illumina HiSeq 2000)을 이용하여 전체 유전자 시퀀스(whole-genome sequence)를 얻었다. DNA 라이브러리를 만들어서, 250 bp의 페어드 엔드 리드(250-bp paired ends read)를 얻었으며, sequencing data analysis toolset (ver. 0.127, <http://www.vicbioinformatics.com/software.nesoni.shtml>)를 이용하여 Illumina adapter sequences(150 bp), 짧은 길이의 리드(150 bp) 및 낮은 Q 스코어 (Q < 15)는 제거하였다. BMAP (<http://sourceforge.net/project/bbmap>)을 이용하여 오염된 유전자를 제거하였고, UniRef50 IDs를 KO (KEGG Orthology)로 변형하여 K-numbers를 매칭한 후 그룹에 따른 KO 카테고리를 설정하여 분석하였다.

[0080] [실험결과]

[0081] 연구집단의 일반적 특성

[0082] 연구 집단의 일반적인 특징은 하기 [표 1]과 같다.

[0083] [표 1]

특성	대조군	일시형 AD	지속형 AD	Trend P-value
샘플 갯수	84	22	26	-
성별, 남아/여아, n	45/39	14/8	13/13	.937
알레르기 질환 병력, 양성/전체 (%)	32/83 (38.6)	10/22 (45.5)	19/26 (73.1)	.003
총 IgE (mean±SD)	38.02±6.86	93.89±48.19	188.44±113.50	.013
계란 특이 IgE (mean±SD)	0.57±0.27	3.4±3.02	5.11±2.34	.005
우유 특이 IgE (mean±SD)	0.29±0.10	0.39±0.15	0.97±0.37	.012
호산구 비율 (%) (mean±SD)	2.90±0.20	4.39±0.83	6.34±0.94	<.001
SCORAD	NA	16.07±2.07	29.30±3.43	.003
아토피피부염 (≥ 1 positive response; ≥0.35 IU/ml, specific IgE), n (%)	14/76 (18.4)	8/17 (47.1)	16/22 (72.7)	<.001
수유방식, 모유/분유/혼합, n	25/10/47	4/0/16	13/1/12	.053

Mean±Standard Error (SE)

NA, not available.

SCORAD, SCORing of Atopic Dermatitis

[0084]

[0086] 연구 대상은 정상, 일시형 AD 및 지속형 AD 표현형의 세 그룹으로 나누었다. 성별에 유의한 차이는 없었다 ($P = 0.937$). 천식, 아토피피부염 및 알레르기성 비염을 포함한 알레르기 질환의 병력은 정상 대조군 ($P = 0.003$), 아토피피부염 (≥ 1 긍정적인 반응으로 정의됨, ≥ 0.35 IU/ml, 특정 IgE) 정상 대조군과 일시형 AD 표현형 ($P < 0.001$)보다 지속형 AD에서 증가하였다. 또한 호산구의 비율은 정상 대조군 (2.90 ± 0.20 %) 또는 일시형 AD 표현형 (4.39 ± 0.83 %)보다 지속형 AD 표현형 (평균 $\pm$ 표준 편차; 6.34 ± 0.94 %; $P < 0.001$)에서 가장 높았다. AD 증상 점수 체계가 6 개월 때의 SCORAD는 일시형 AD (16.74 ± 2.07)보다 지속형 AD (평균 $\pm$ 표준 편차 29.30 ± 3.43 , $P = 0.005$)에서 가장 높았다. 전체 IgE 수치는 정상 대조군과 일시형 AD ($P = 0.013$)보다 지속형 AD에서 증가했다.

[0088] 장내 미생물 군집의 다양성 및 표현형에 따른 조성의 비교

[0089] 실시예 1에서 선택된 132 명의 신생아의 대변 샘플에서 총 2,507,762 리드의 관독 결과를 분석하였다. 세 샘플의 유사성을 검사하기 위해 알파 다양성을 확인했다. 알파 다양성 결과는 운영 분류학적 단위 (관측된 다양성, OTU)와 샤넨 다양성 지수가 세 그룹간에 차이가 없음을 보여주었다 ($P > 0.05$, 도 2).

[0090] 세 그룹 사이의 장내 미생물 군집의 구성을 문(phylum) 및 속(genus) 수준에서 확인하였다. 문(phylum) 수준에서 악티노박테리아(Actinobacteria), 페미큐티스(Firmicutes) 및 프로테오박테리아(Proteobacteria) 3 개의 문(phyla)이 세 그룹 중 우세했다. 악티노박테리아(Actinobacteria)의 비율은 정상 대조군보다 일시형 AD에서 더 높았다 ($P=0.029$). 그러나, 페미큐티스와 프로테오박테리아의 차이는 그룹간에 유의하지 않았다 ($P > 0.05$; 도 3의 A).

[0091] 다음으로, 속(genus) 수준에서 미생물 군 구성의 세부적인 차이를 확인했다. LEfSe를 이용한 분석은 LDA 효과

크기 점수 > 4 ($P < 0.05$, 도 4의 A-C) 인 AD 표현형간에 유의미하게 차별적이었다. 지속형 AD 영아에서 스트렙토코커스 속 균주 ($7.93 \pm 2.47 \%$)는 정상 대조군과 일시형 AD에 비해 유의하게 높았다 (대조군에서는 $3.59 \pm 0.91 \%$, 일시적 AD에서는 $P = 0.012$, $1.09 \pm 0.39 \%$, $P = 0.004$; 도 3의 B, C). 클로스트리디움 속 균주는 뒤를 이어 지배적인 속이었다(대조군에서는 $6.45 \pm 1.24 \%$, 지속형 AD에서는 $1.12 \pm 0.74 \%$, $P = 0.015$; 도 3의 B, C). 그러나 클로스트리디움은 정상 대조군과 일시형 AD (일시적 $6.97 \pm 2.93 \%$, $P > 0.05$, 도 3의 C), 일시형 AD와 지속형 AD 사이에는 차이가 없었다 ($P > 0.05$, 도 3의 C). 또한, 아커만시아 속 균주는 일시형 AD (5.61 ± 3.98 , $P = 0.010$, 도 3의 B, C)와 비교하여 지속형 AD($0.01 \pm 0.01 \%$)에서 더 낮았다. 더욱이 일시형 AD에서 아커만시아 속 균주의 조성은 정상 대조군보다 증가했다 ($3.27 \pm 1.18 \%$, $P = 0.024$, 도 3의 B, C). 그러나, 아커만시아 속 균주는 정상 대조군과 지속형 AD간에 통계적 차이가 없었다 ($P > 0.05$, 도 2의 C). 퍼미큐티스가 지배하는 샘플 외에도 스트렙토코커스 속 균주와 클로스트리디움 속 균주의 우위에 따라 분리되었다. 대장균은 모든 군에서 더 높았지만 이들 세균 조성의 차이는 유의하지 않았다 ($P > 0.05$; 도 3의 B). 더욱이, 비피도박테리움(*Bifidobacterium*)은 정상 대조군 보다 일시형 AD에서 더 높았다 ($P = 0.027$, 도 3의 B).

[0093] 총 IgG, SCORAD, 호산구와 장내 미생물 조성의 상관 관계

[0094] 아토피피부염에 대한 스트렙토코커스 속 균주와 클로스트리디움 속 균주의 역할을 조사하기 위해 아토피피부염을 가진 영아에서 총 IgE (IU/ml), SCORAD, 호산구(%)와 스트렙토코커스 속 균주 및 클로스트리디움 속 균주의 상대적 존재량을 분석하였다.

[0095] 그 결과, [도 5]에 나타난 바와 같이, 스트렙토코커스 속 균주의 양은 SCORAD와 뚜렷한 상관 관계를 보였으나 ($\rho = 0.484$, $P = 0.002$; 도 5의 A), 총 IgE와 호산구 (%)에서는 유의하지 않았다 ($P > 0.05$; 도 5의 B, C). 또한 클로스트리디움 속 균주의 양은 SCORAD와 부정적 상관 관계를 보였으나 ($\rho = -0.556$, $P = 0.013$; 도 5의 D), 전체 IgE와 호산구와 상관 관계가 없었다 ($P > 0.05$; 도 5의 E,F).

[0097] 아토피피부염의 지속성에 따른 장내 미생물의 다양한 기능적 프로파일

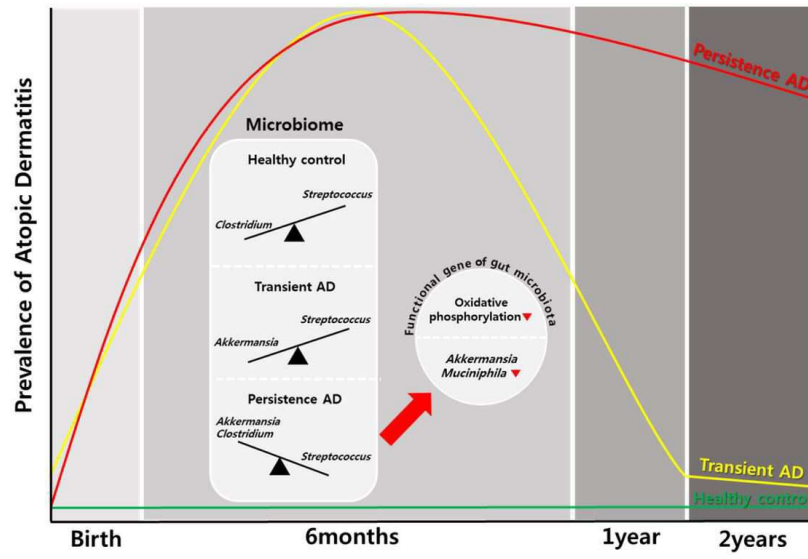
[0098] 각 군간의 기능적 유전자의 차이를 KO 항목을 이용하여 비교하였고 인간 및 식물 유전자 서열을 제거한 후 분석하였다. 유의한 차이가 있는 KO 항목은 P 값 < 0.05 로 선택되었다. 확인된 KO 범주 중 두 번째 KO 범주의 44 개 경로를 포함하여 KO 1 차 범주의 6 개 경로를 도시하였다.

[0099] 그 결과, [도 6]에 나타난 바와 같이, 정상 대조군 ($P < 0.05$; 도 6의 B)과 비교하여 지속형 AD에서 면역 계통과 발달 경로가 감소하고 보조 인자와 비타민 경로의 대사가 일시형 AD에 비해 지속형 AD에서 증가하는 것을 확인하였다($P < 0.05$).

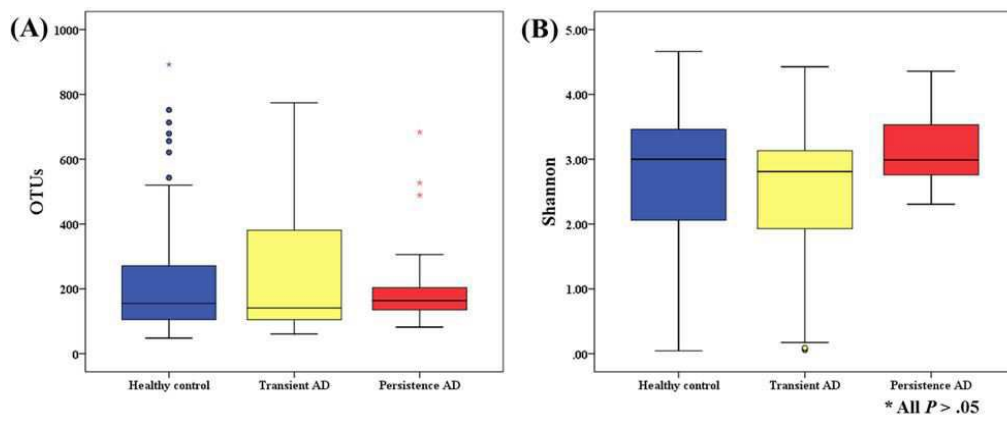
[0100] 다음으로 그룹의 3 번째 KO 카테고리를 확인한 결과 산화성 인산화와 관련된 유전자의 상대적 존재는 정상 대조군에 비해 지속형 AD에서 감소했다 ($P = 0.001$; 도 7). 아커만시아 뮤시니필라는 지속형 AD와 정상 대조군 사이의 산화적 인산화의 발현 차이에 약하게 기여했다 ($P = 0.094$).

도면

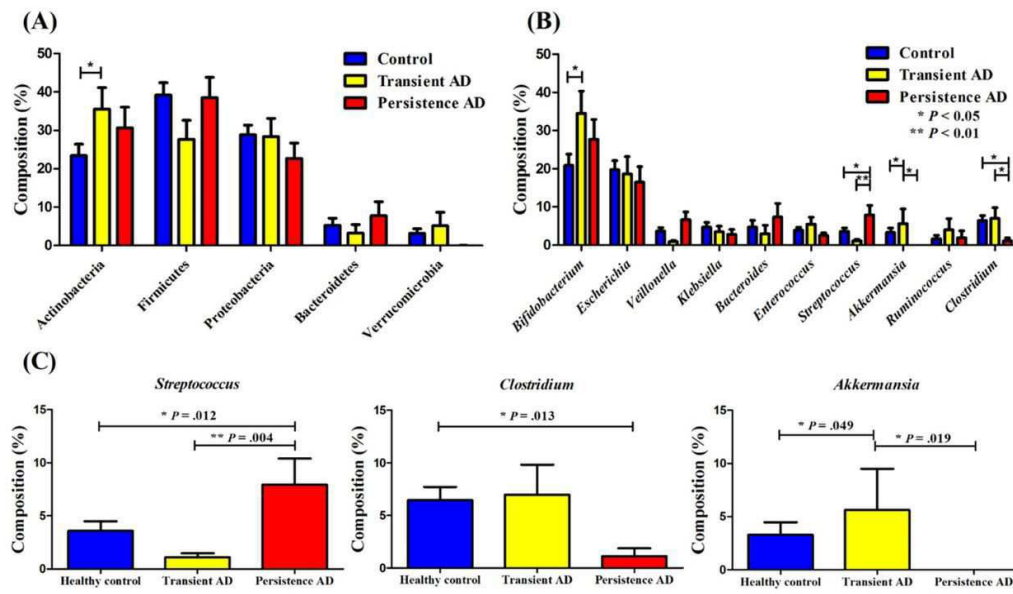
도면1



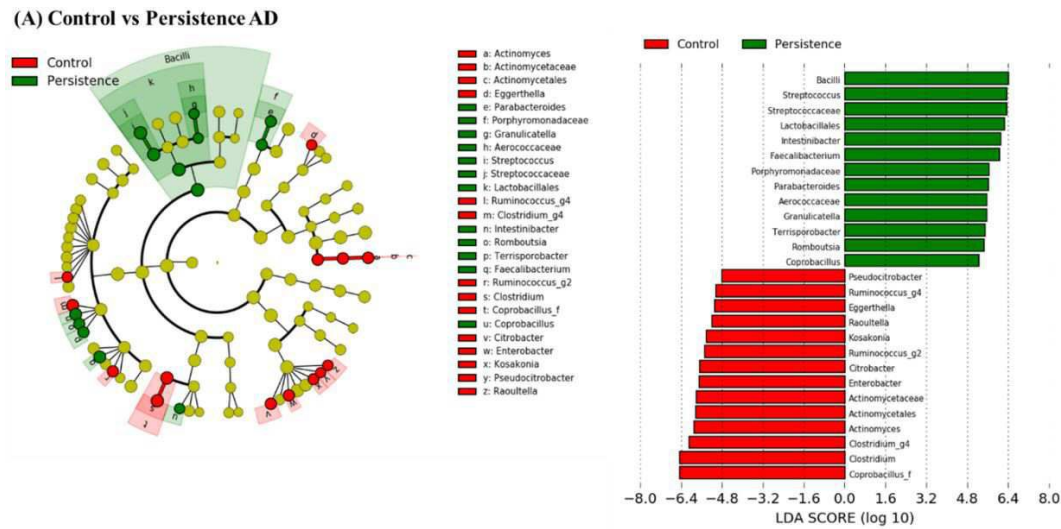
도면2



도면3

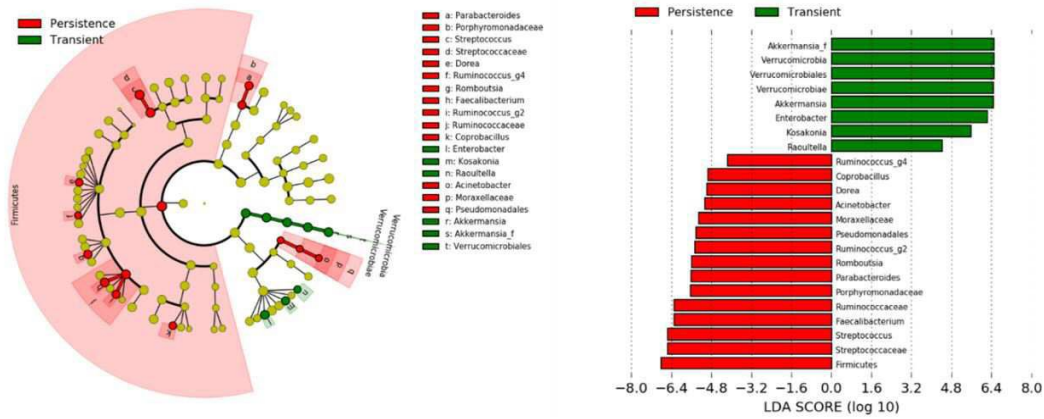


도면4a



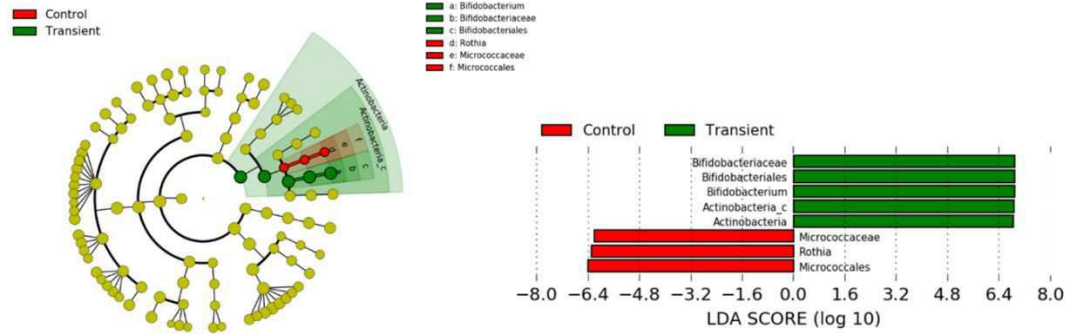
도면4b

(B) Transient AD vs Persistence AD

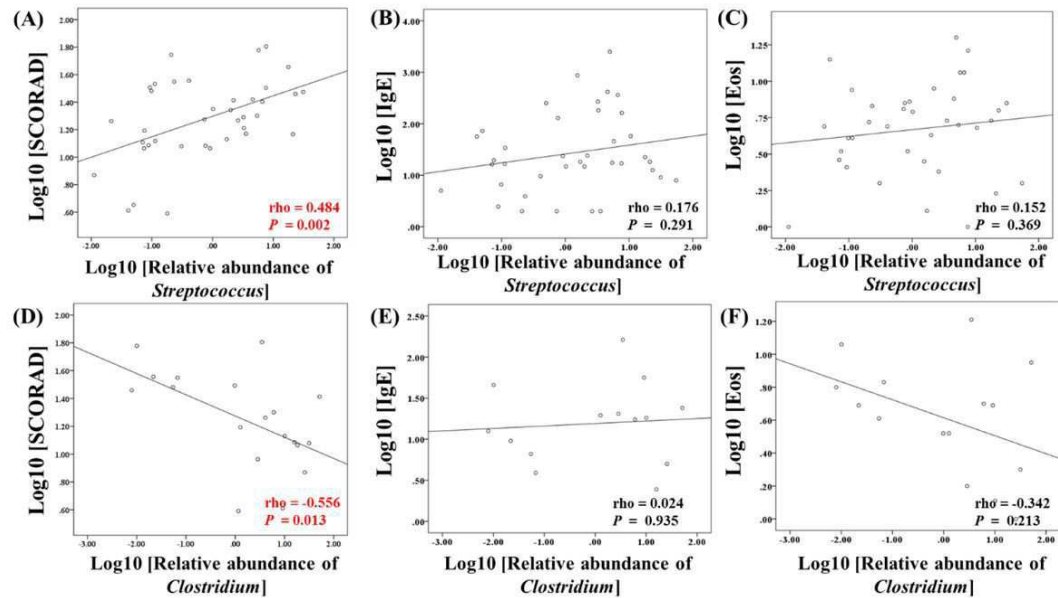


도면4c

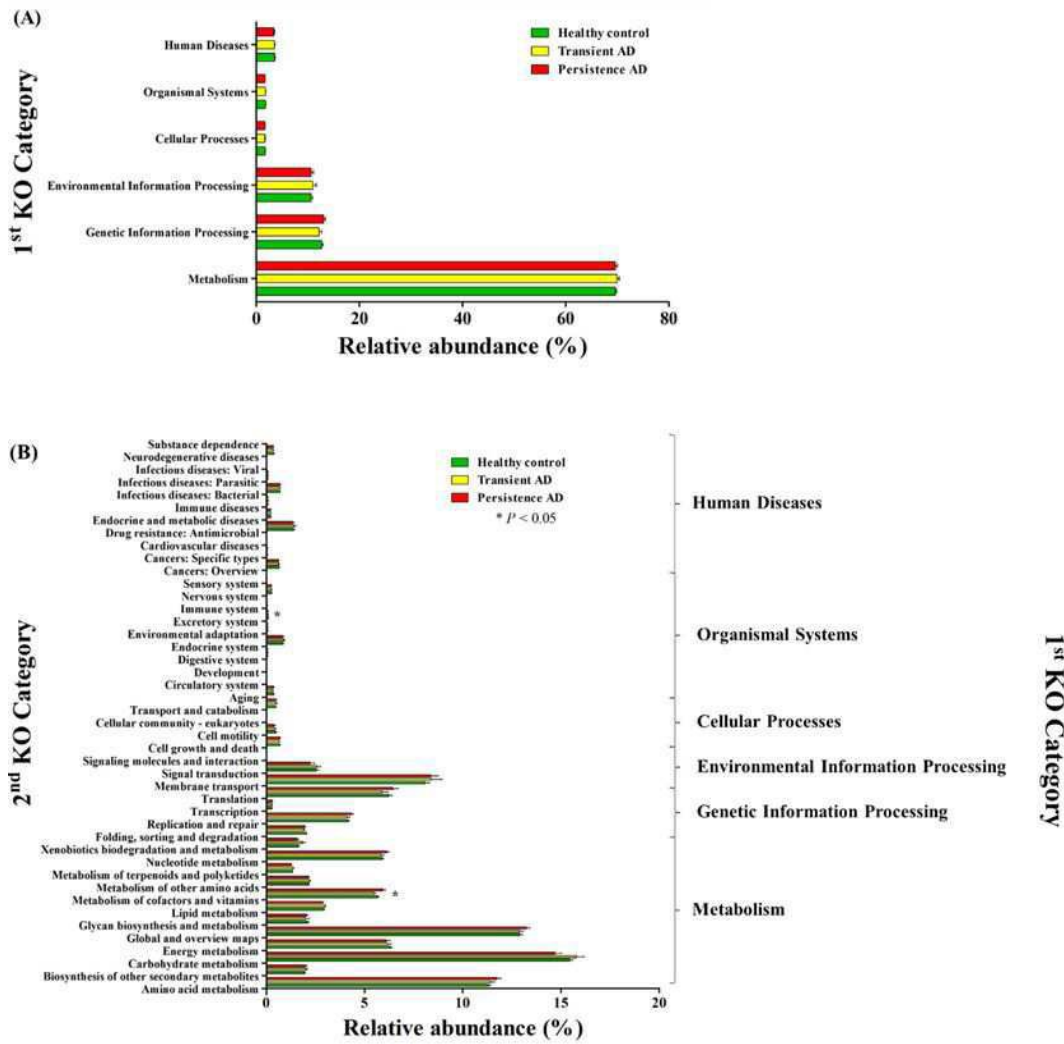
(C) Control vs Transient AD



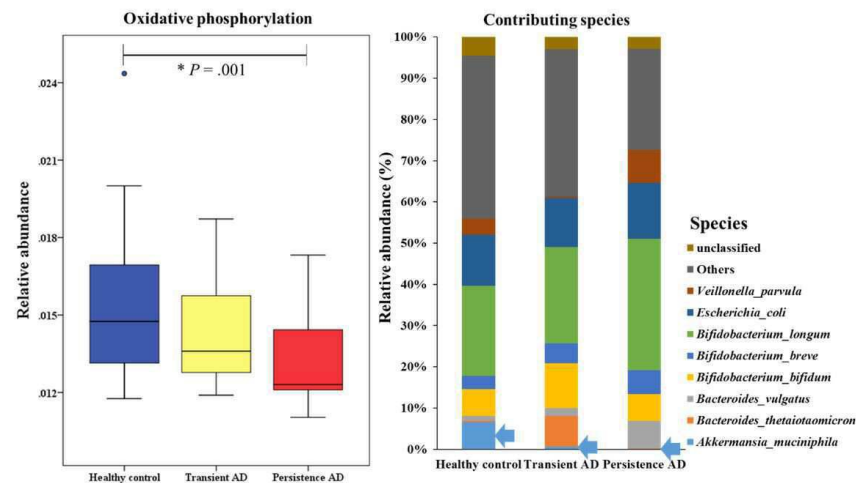
도면5



도면6



도면7



서열목록

<110> THE ASAN FOUNDATION

INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION OF ULSAN UNIVERSITY

<120> PREDICTION OF ATOPIC DERMATITIS DEVELOPMENT AND PERSISTENCE USING
CHANGES IN THE GUT MICROBIAL COMMUNITY

<130> 1065331

<150> KR 2019/0013118

<151> 2019-01-31

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer-F

<400> 1

agagtttgat cmtggctcag 20

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer-R

<400> 2

attaccgcgg ctgctgg 17

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Illumina adapter sequence primer-F

<400> 3

atcggcgac caccgagatc 20

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Illumina adapter sequence primer-R

<400> 4

caagcagaag acggcatacg ag

22