



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. (11) 공개번호 10-2007-0054828
C12N 1/20 (2006.01) (43) 공개일자 2007년05월30일

(21) 출원번호 10-2005-0112836
(22) 출원일자 2005년11월24일
심사청구일자 2005년11월24일

(71) 출원인 한국해양연구원
경기 안산시 상록구 사동 1270번지

(72) 발명자 신희재
경기 수원시 권선구 금곡동 LG빌리지 305-205
정성운
부산 수영구 망미2동 수영강변 대림e-편한세상 아파트 302동601호
김태식
경기 안산시 상록구 사동 1172-6 201호
이희승
서울 광진구 광장동 극동아파트 7동 1105호

(74) 대리인 진천웅
조현동

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 항암물질을 생산하는 방선균 스트렙토마이세스 속 균주,이의 분리방법, 이로부터 반고형 추출물을 제조하는 방법,이로부터 유래한 반고형 추출물 및 이를 이용한 항암제 조성물

(57) 요약

본 발명은 항암물질을 생산하는 방선균 스트렙토마이세스 속 균주, 이의 분리방법, 이로부터 반고형 추출물을 제조하는 방법, 이로부터 유래한 반고형 추출물 및 이를 이용한 항암제 조성물에 관한 것으로, 특히 인체의 백혈병 세포에 대한 항암물질을 생산하는 방선균(actinomycetes) 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCCM-10664P 균주와 이것의 배양물 및 배양여과액으로부터 얻어지는 조추출 항암활성 물질은, 생리 활성 실험 결과 인체의 백혈병 등과 같은 암세포에 대하여 강한 독성을 나타내는 효과가 있다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

인체의 백혈병 세포에 대한 항암물질을 생산하는 방선균(actinomycetes) 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCCM-10664P.

청구항 2.

제1항에 있어서, 성장 가능 온도는 15°C 내지 40°C 범위 내인 것을 특징으로 하는 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P.

청구항 3.

제1항에 있어서, 기질균사(substract mycelium)는 밤색 또는 보라색이고, 그 위로 회색 또는 노란색의 기중균사(aerial mycelium)가 형성되며, 배면색은 밤색 또는 보라색인 것을 특징으로 하는 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P.

청구항 4.

제1항에 있어서, 포자사슬은 나선형이고, 포자표면은 매끄러우며, 포자는 원형모양으로 0.5 μ m 내지 0.9 μ m 범위 내의 크기를 갖는 것을 특징으로 하는 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P.

청구항 5.

제1항에 있어서, 디(D)-글루코스, 디(D)-만니톨, 디(D)-자일로스, 디(D)-갈락토스, 디(D)-슈크로스 및 엘(L)-람노스를 탄소원으로 이용하는 것을 특징으로 하는 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P.

청구항 6.

제1항에 있어서, 젤라틴 액화능, 전분 분해력, 질산염 환원능, 황화수소 생성능은 양성이고, 카제인 분해능은 음성인 것을 특징으로 하는 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P.

청구항 7.

제1항에 있어서, 세포벽 성분으로 글루코스와 리보오스 및 엘엘-디아미노피멜릭산(LL-diaminopimelic acid)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P.

청구항 8.

제1항에 있어서, 16S rDNA 유전자는 서열번호 1의 DNA 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P.

청구항 9.

제1항에 있어서, 16S rDNA 유전자는 방선균 스트렙토마이세스 래벤둘레(*Streptomyces lavendulae*) IFO 12789^T (D85116)와 97%의 상동성을 나타내는 것을 특징으로 하는 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P.

청구항 10.

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P를 포함하는 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

청구항 11.

심해로부터 퇴적토 시료를 채취하는 단계;

상기 시료를 열처리하는 단계;

상기 열처리된 시료를 변형된 벤넷(modified Bennett's) 배지에서 배양하는 단계; 및

상기 배양된 시료를 도말하여 균주를 분리하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 인체의 백혈병 세포에 대한 항암물질 을 생산하는 방선균(actinomycetes) 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCCM-10664P의 분리방법.

청구항 12.

제11항에 있어서, 상기 변형된 벤넷 배지는 0.1% 효모추출물(yeast extract), 0.1% 쇠고기 추출물(beef extract), 0.2% 트립톤(tryptone), 1% 포도당(glucose), 1.5% 한천(agar, pH 7.2, 숙성해수:증류수=7:3), ISP-2(International Streptomyces Project-2, 3.74%, pH 7.2, 숙성해수:증류수=7:3, Difco, USA), ISP-4 (International Streptomyces Project-4, 3.74%, pH 7.2, 숙성해수:증류수=7:3), Starch-casein KNO₃, 1% 가용성 전분(soluble starch), 0.03% 카제인(casein), 0.2% 질산칼륨(KNO₃), 0.2% 제2인산칼륨(K₂HPO₄), 0.2% 염화나트륨(NaCl), 황산제일철 수화물(FeSO₄·7H₂O), 황산마그네슘 수화물(MgSO₄·7H₂O) 및 탄산칼슘(CaCO₃)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P의 분리방법.

청구항 13.

인체의 백혈병 세포에 대한 항암물질을 생산하는 방선균(actinomycetes) 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCCM-10664P 균주를 배양한 후, 그 배양물을 액상 또는 갑압하에서 증발 건조시켜서, 항암활성을 가지는 반고형 조추출 물을 제조하는 방법.

청구항 14.

인체의 백혈병 세포에 대한 항암물질을 생산하는 방선균(actinomycetes) 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCCM-10664P 균주를 배양한 후, 그 배양물에서 균사체를 제거한 상청액을 액상 또는 갑압하에서 증발 건조시켜서, 항암 활성을 가지는 반고형 조추출물을 제조하는 방법.

청구항 15.

제13항 또는 제14항에 따른 방법에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 항암활성을 가지는 반고형 조추출물.

청구항 16.

제15항에 따른 반고형 조추출물을 포함하는 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 방선균(actinomycetes) 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 균주에 관한 것으로, 특히 항암물질을 생산하는 방선균 스트렙토마이세스 속 균주, 이의 분리방법, 이로부터 반고형 추출물을 제조하는 방법, 이로부터 유래한 반고형 추출물 및 이를 이용한 항암제 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 인체의 백혈병 세포에 대한 항암활성을 나타내는 항암물질을 생산하는 방선균 스트렙토마이세스 속 균주이다.

현대 의학의 대표적 암 치료법에는 외과적 수술요법, 생물요법, 방사선요법, 항암물질 투여에 의한 화학요법 등이 있다. 화학요법은 항암제를 경구나 주사로 투여하여 암세포의 증식을 억제하는 방법으로서, 화학요법이 가지는 장점은 몸의 어떤 부위에 생긴 암이라도 약물이 도달할 수 있고, 전이된 암을 치료할 수 있다는 것으로, 현재 화학요법은 전이성 암 치료에 표준요법으로 사용되고 있다. 물론 화학요법으로 전이된 암을 완치시킬 수 있는 것은 아니지만 증상을 완화시켜 수명을 연장시켜주는 중요한 역할을 한다.

현재까지 천연물 유래의 항암제 중 가장 널리 사용되고 있는 항암제는 택솔(taxol)로서 유방암, 난소암의 치료에 사용되고 있다. 그러나 이러한 화학요법제는 부작용, 항암제 내성 등의 문제점을 가지고 있으며, 지금까지 암에 대한 많은 연구가 계속되고 있음에도 불구하고 암 자체의 다양성 및 발병기전의 다양화로 인해 부작용이 적고 내성을 극복할 수 있는 항암제는 개발되지 않았다.

종래의 육상 생물로는 신의약 소재 개발의 한계가 있어 새로운 소재 개발을 위해서는 새로운 미생물 다양성의 확보가 반드시 선결되어야 한다. 세계 해양 바이오 시장 규모는 2000년에 33억 달러로 2010년에는 163억 달러로 예상되어지며, 특히 의약품 해양 신물질 시장은 연간 18%의 성장률을 보일 것으로 예상되어 2010년에는 56만 달러로 전망된다. 해양은 지구상의 생물종의 80%가 생식하고 있는 생물 다양성의 보고이며, 특히 미이용 미생물 자원은 첨단 해양 바이오 기술 접목시 그 개발 가능성은 무한하다. 더욱이 해양 미생물의 1% 만이 실험실적으로 배양이 가능하며, 99% 이상은 난배양성으로 남아 있는 실정이다. 이와 같이 해양에는 미지의 다양하고 풍부한 생물자원이 존재하고 있으며, 해양 생물은 육상 생물과는 다른 환경에 생식하고 있기 때문에 생산되는 물질에도 신규성이 높은 화학구조를 가진 화합물이 많이 발견되었다.

그 중에서도 스트렙토마이세스 속 균주는 다양한 2차 대사산물을 생산하며 그 생리활성도 매우 다양하다. 특히 지금까지 미생물로부터 탐색된 100,000여종의 생리 활성 물질 가운데 약 2/3에 해당되는 64% 정도가 스트렙토마이세스 속 균주로부터 발견되었으며, 세균으로부터는 약 13%, 곰팡이로부터는 약 23%가 발견되었다. 이에 스트렙토마이세스 속을 포함하는 방선균(actinomycetes)은 각종 생리 활성 물질의 생산균으로서 산업적 또는 의학적인 측면에서 매우 중요한 미생물로서 자리 잡게 되었다. 본 발명 역시 이러한 연구의 일환으로 항암활성을 나타내는 해양 방선균을 분리하여, 이를 백혈병 등의 치료에 이용하고자 하는 것이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 인체의 백혈병 세포에 대한 항암물질을 생산하는 새로운 방선균(actinomycetes) 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCCM-10664P 균주를 제공하기 위함이다. 이를 통하여, 이것의 배양물 및 배양여과액으로부터 얻어지는 조추출 항암활성 물질을 분리해내고, 이를 이용하여 인체의 백혈병과 같은 암세포에 대한 항암활성을 가지는 항암제 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한, 이러한 본 발명에 의하여 항암물질을 생산하는 방선균 스트렙토마이세스 속 균주 뿐만 아니라, 이것을 분리하는 방법, 이로부터 반고형 추출물을 제조하는 방법, 이로부터 유래한 반고형 추출물 및 이를 이용한 항암제 조성물을 제공하여, 향후 항암제 용도로 다양하게 사용하기 위한 것이다.

발명의 구성

상기한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 인체의 백혈병 세포에 대한 항암물질을 생산하는 방선균(actinomycetes) 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCCM-10664P이다.

이에 따라, 상술한 바와 같은 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P를 포함하는 항암제 조성물도 본 발명의 범주에 포함된다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위한 다른 바람직한 실시형태는 이러한 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P를 분리하는 방법이다. 즉, 심해로부터 퇴적토 시료를 채취하는 단계; 상기 시료를 열처리하는 단계; 상기 열처리된 시료를 변형된 벤넷(modified Bennett's) 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 배양된 시료를 도말하여 균주를 분리하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 인체의 백혈병 세포에 대한 항암물질을 생산하는 방선균(actinomycetes) 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCCM-10664P의 분리방법이다.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위한 실시형태는 상술한 바와 같은 균주를 배양시켜 항암활성을 가지는 반고형 추출물을 제조하는 방법이다. 특히, 인체의 백혈병 세포에 대한 항암물질을 생산하는 방선균(actinomycetes) 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCCM-10664P 균주를 배양한 후, 그 배양물을 액상 또는 갑압하에서 증발 건조시켜서, 항암활성을 가지는 반고형 조추출물을 제조하는 방법과 상기 KCCM-10664P 균주를 배양한 후, 그 배양물에서 균사체를 제거한 상정액을 액상 또는 갑압하에서 증발 건조시켜서, 항암활성을 가지는 반고형 조추출물을 제조하는 방법이 가능하다.

물론, 이러한 제조방법에 의해 생산되는 것을 특징으로 하는 항암활성을 가지는 반고형 조추출물과 이를 포함하는 항암제 조성물 또한 본 발명의 또 다른 바람직한 실시형태에 속하는 것은 명백하다.

이하, 본 발명에 따라 항암물질을 생산하는 신규한 해양 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 균주, 이의 분리방법, 이로부터 반고형 추출물을 제조하는 방법, 이로부터 유래한 반고형 추출물 및 이를 이용한 항암제 조성물을 상세히 설명한다.

먼저, 본 발명은 인체의 백혈병 세포에 대한 항암활성을 가지는 항암활성 물질을 생산하는 스트렙토마이세스 속 균주, 및 상기 균주를 이용한 미생물 제제에 관한 것이다. 이러한 본 발명은 인체의 백혈병 세포에 대한 항암물질을 생산하는 방선균(actinomycetes) 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCCM-10664P 균주를 새롭게 만들어 낸 것이 특징이다.

본 발명자들은 본 발명에 따른 스트렙토마이세스 속 균주를 스트렙토마이세스 sp. KORDI-3238로 명명하였고, 이를 한국 미생물보존센터(KCCM)에 2005년 7월 7 일자로 기탁하여 기탁번호 KCCM-10664P를 부여받았다.

본 발명에 따른 상기 스트렙토마이세스 속 균주는 심해저 퇴적토로부터 분리된 균주이고, 본 발명자들은 이러한 항암활성 물질을 생산하는 해양 방선균을 동정하기 위하여, 형태학적, 배양학적, 생화학적 특성을 종합적으로 검토하였으며, 16S rDNA 염기서열을 분석하여 계통분류학적 방법으로 이를 확인하였다.

그 결과, 본 발명에 따른 상기 방선균 스트렙토마이세스 속 균주는 인체의 백혈병 세포 등과 같은 암세포에 항암활성을 가지고 있는 새로운 균주로 확인되었다. 이러한 균주의 균학적 성질은 다음과 같은 것이 바람직하다. 먼저, 상기 균주의 성장 가능 온도는 15°C 내지 40°C 범위 내인 것이 바람직한 것으로 확인되었다.

그리고, 광학 현미경에 의한 형태적 특성과 버지의 미생물 분류법(Lechevalier, H. N. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 4, p. 2344, 1989) 및 생화학 실험법(MacFaddin, T. F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 36-308, 1984)에 근거한 동정결과, 형태학적 특성으로서, 상기 방선균 스트렙토마이세스 속 균주의 기질균사(substract mycelium)는 밤색 또는 보라색이고, 그 위로 희색 또는 노란색의 기증균사(aerial mycelium)가 형성되며, 배면색은 밤색 또는 보라색인 것이 가능하다.

또한, 상기 방선균 스트렙토마이세스 속 균주의 상기 포자사슬은 나선형이고, 포자표면은 매끄러우며, 포자는 원형모양으로 0.5 μ m 내지 0.9 μ m 범위 내의 크기를 갖는 것일 수 있다. 나아가, 디 (D)-글루코스, 디 (D)-만니톨, 디 (D)-자일로스, 디 (D)-갈락토스, 디 (D)-슈크로스 및 엘 (L)-람노스를 탄소원으로 이용하는 것이 바람직하고, 젤라틴 액화능, 전분 분해력,

질산염 환원능, 황화수소 생성능은 양성이고, 카제인 분해능은 음성인 것이 더욱 바람직하다. 이와 더불어, 세포벽 성분으로는 글루코스와 리보오스 및 엘엘-디아미노피멜릭산(LL-diaminopimelic acid)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P일 수 있다.

더욱 구체적으로, 상기 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 균주의 16S rDNA 유전자 염기서열 분석에 의한 계통분류를 기준으로 동정하였다. 본 발명의 해양 방선균 균주는 계통분류학적 위치상 스트렙토마이세스 속에 속하지만 다른 스트렙토마이세스 균주와는 모두 1% 이상의 염기서열상 차이를 가지는 독립적인 가치를 형성하였다. 즉, 본 발명의 스트렙토마이세스 속 균주는 스트렙토마이세스에 속하는 신종 균주이다. 이에 따라, 본 발명에 따른 상기 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 균주의 16S rDNA 유전자는 서열번호 1의 DNA 염기서열을 포함하는 것이 바람직하고, 16S rDNA 유전자는 방선균 스트렙토마이세스 래벤둘레 (*Streptomyces lavendulae*) IFO 12789^T(D85116)와 97%의 상동성을 나타내는 것이 더욱 바람직한 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P이다.

이에 따라, 상술한 바와 같은 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P를 포함하는 항암제 조성물도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 발명에 따른 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 균주는 항암활성을 가지는 항암물질을 생산하고, 특히 인체 백혈병 세포에 대하여 항암활성을 가지며, 바람직하기로는 human leukemia cell-line K-562 및 leukemia cell-line HL-60 세포에 대한 항암활성 물질을 생산하는 항암제 조성물인 것이다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위한 다른 바람직한 실시형태는 이러한 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P를 분리하는 방법이다. 즉, 심해로부터 퇴적토 시료를 채취하는 단계; 상기 시료를 열처리하는 단계; 상기 열처리된 시료를 변형된 벤넷(modified Bennett's) 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 배양된 시료를 도말하여 균주를 분리하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 인체의 백혈병 세포에 대한 항암물질을 생산하는 방선균(actinomycetes) 스트렙토마이세스 속 (*Streptomyces* sp.) KCCM-10664P의 분리방법이다.

여기서, 본 발명에 따른 방선균인 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 균주는 방선균 배양 배지에서 배양하거나 생육시킬 수 있으며, 대표적인 배양 배지로는 변형된 벤넷(modified Bennett's), Starch-casein KNO₃, 각종의 ISP (International Streptomyces Project) 배지가 있다. 배양조건은 25 내지 30℃에서 3일 내지 7일간 진탕배양하는 것이 바람직하다. 상기 배지는 통상의 스트렙토마이세스 속 균주의 배양에 사용되는 것이면 어느 것이나 될 수 있으나, 여기에 한정되는 것은 아니다.

그 중에서도 상기 변형된 벤넷 배지는 0.1% 효모추출물(yeast extract), 0.1% 쇠고기 추출물(beef extract), 0.2% 트립톤(tryptone), 1% 포도당(glucose), 1.5% 한천(agar, pH 7.2, 숙성해수:증류수=7:3), ISP-2(International Streptomyces Project-2, 3.74%, pH 7.2, 숙성해수:증류수=7:3, Difco, USA), ISP-4 (International Streptomyces Project-4, 3.74%, pH 7.2, 숙성해수:증류수=7:3), Starch-casein KNO₃, 1% 가용성 전분(soluble starch), 0.03% 카제인(casein), 0.2% 질산칼륨(KNO₃), 0.2% 제2인산칼륨(K₂HPO₄), 0.2% 염화나트륨(NaCl), 황산제일철 수화물(FeSO₄·7H₂O), 황산마그네슘 수화물(MgSO₄·7H₂O) 및 탄산칼슘(CaCO₃)를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위한 실시형태는 상술한 바와 같은 균주를 배양시켜 항암활성을 가지는 반고형 추출물을 제조하는 방법이다. 특히, 인체의 백혈병 세포에 대한 항암물질을 생산하는 방선균(actinomycetes) 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCCM-10664P 균주를 배양한 후, 그 배양물을 액상 또는 갑압하에서 증발 건조시켜서, 항암활성을 가지는 반고형 조추출물을 제조하는 방법과 인체의 백혈병 세포에 대한 항암물질을 생산하는 방선균(actinomycetes) 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCCM-10664P 균주를 배양한 후, 그 배양물에서 균사체를 제거한 상청액을 액상 또는 갑압하에서 증발 건조시켜서, 항암활성을 가지는 반고형 조추출물을 제조하는 방법이 가능하다.

물론, 이러한 제조방법에 의해 생산되는 것을 특징으로 하는 항암활성을 가지는 반고형 조추출물과 이를 포함하는 항암제 조성물 또한 본 발명의 또 다른 바람직한 실시형태에 속하는 것은 명백하다.

또한, 본 발명에 따른 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 균주로부터 생산되는 항암물질은 세포외로 분비될 수 있다. 이에 본 발명에서는 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P, 이의 배양물 및 배양 여과액으로 이루어진 균으로부터 1종 이상 선택된 것을 유효성분으로 포함하는 항암제 조성물을 제공할 수 있다. 상기 항암제 조성물 중 유효성분의 함량은 사용 목적 및 사용 방법 등을 고려하여 적절히 선택할 수 있으며, 예를 들면 0.01 중량% 이상일 수 있다. 또한 상기 항암제 조성물은 통상적으로 사용되는 첨가제를 더욱 포함할 수 있다.

상기 배양물은 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P를 고체 한천배지 또는 액체 배양 배지에서 15 내지 40℃에서 3일 내지 14일 배양하여 수득할 수 있으며, 이를 액상 또는 감압하에서 증발 건조시킨 고체상의 조추출물로 항암제 조성물에 포함될 수 있다. 상기 배양여과액은 상기 배양물에서 균사체 (mycelium)를 제거한 상청액으로, 원심분리 또는 여과를 통하여 수득할 수 있으며, 이를 액상 또는 감압하에서 증발 건조시킨 고체상의 조추출물로 항암제 조성물에 포함될 수 있다. 본 발명의 항암제 조성물은 상기한 유효성분 이외에 사용용도, 목적 및 방법에 따라 담체를 더욱 포함할 수 있다. 또한, 항암제 조성물은 식품 첨가제 및 약제로 사용할 수도 있다.

이하에서는 본 발명의 바람직한 하나의 실시형태를 첨부된 도면을 참고로 하여 구체적으로 설명한다. 본 발명은 하기의 실시예에 의하여 보다 더 잘 이해 될 수 있으며, 하기의 실시예는 본 발명의 예시 목적을 위한 것이고, 첨부된 특허청구범위에 의하여 한정되는 보호범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.

실시예 1: 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P의 분리

먼저, 본 발명에 따른 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P를 분리하고자 하였다. 서태평양의 Ayu Trough 해역 (01° 38' 35N, 132° 43' 59E)의 심해 퇴적토에서 채취한 시료 약 1g을 멸균된 해수 20 ml가 채워진 유리병(vial)에 넣고 5분 동안 sonification하였다. 그리고, 일반 세균(박테리아)을 사멸시키기 위하여 60℃ dry oven에서 50분간 열처리하고, 열처리를 마친 시료를 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} 으로 순차적으로 희석하였다.

이어서, 상기 희석된 시료를 방선균 분리용 배지인 변형된 벤넷 배지, 즉 변형된 벤넷(0.1% 효모추출물 (yeast extract), 0.1% 쇠고기 추출물 (beef extract), 0.2% 트립톤 (tryptone), 1% 포도당 (glucose), 1.5% 한천 (agar), pH 7.2, 숙성해수:증류수=7:3), ISP-2 (International Streptomyces Project-2, 3.74%, pH 7.2, 숙성해수:증류수=7:3, Difco, USA), ISP-4 (International Streptomyces Project-4, 3.74%, pH 7.2, 숙성해수:증류수=7:3) 및 Starch-casein KNO₃ (1% 가용성 전분 (soluble starch), 0.03% 카제인 (casein), 0.2% 질산칼륨 (KNO₃), 0.2% 제2인산칼륨 (K₂HPO₄) 0.2% 염화나트륨 (NaCl), 미량의 황산제일철 수화물 (FeSO₄·7H₂O), 미량의 황산마그네슘 수화물 (MgSO₄·7H₂O, 미량의 탄산칼슘 (CaCO₃), 1.5% 한천 (agar), pH 7.2, 숙성해수:증류수=7:3) 배지에 0.1 ml을 접종하여 순차적으로 도말하였다.

계속해서, 이를 30℃ 배양기에서 14일 동안 배양한 후, 방선균 집락이 관찰되면 2차 분리용 변형된 벤넷(modified Bennett's) 배지에 3차 도말(streaking)하여 분리한 균주를 집락형태 및 광학 현미경상에서 관찰하여 전형적인 방선균 형태의 300여 균주를 1차로 순수 분리, 선별하였다.

실시예 2: 항암활성 균주의 선별

상기 실시예 1에 따라 분리된 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 중에서 항암활성을 나타내는 균주를 선별하였다. 상기 분리된 균주 중에서 포자가 완전히 형성된 방선균은 20% (w/v) glycerol에 보관하여 하루동안 실온에 방치한 후 vortex시켜 -70℃에서 보관하였다. 상기 동결 보존한 방선균을 변형된 벤넷 액체배지에서 7일간 배양하여 활성화시키고, 백혈병 세포(leukemia cell-line K-562 및 HL-60)를 이용하여, 하기의 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)방법(실시예 7 참조)에 따라 1차적인 항암활성을 검색하여 60종의 방선균을 선별하였고, 그 중에서 항암활성이 가장 우수한 해양 방선균 균주를 선별하였으며, 이를 스트렙토마이세스 sp. KORDI-3238로 명명하였고, 한국미생물보존센터(KCCM)에 기탁번호 KCCM-10664P로 기탁한 것이다.

실시예 3: 균주의 형태, 생리 및 생화학적 특성

실시예 1에서 선별한 항암활성이 우수한 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 균주를 버지의 미생물 분류법과 생화학 실험법 및 국제 스트렙토마이세스 프로젝트(International Streptomyces Project; ISP)에 준하여 생화학적으로 동정하였다. 형태학적 특징은 변형된 벤넷 배지 및 국제 스트렙토마이세스 프로젝트 배지에서 배양한 후, 광학현미경으로 관찰하였다.

본 발명에 따른 상기 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 균주는 상기 배지에서 전반적으로 생육이 양호하였고, 성장 가능 온도 범위는 15~40℃였으며, 최적 성장 온도는 25~30℃였다. 기질균사(substract mycelium)는 주로 밤색 또는 보라색이었으며 그 위로 회색 또는 노란색의 기증균사(aerial mycelium)를 형성하였고 배면색은 주로 밤색 또는 보라색이었다(도 1 참조). 이러한 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P의 배양학적 특성을 하기의 표 1에 정리하였다.

[표 1: 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P의 배양학적 특성]

배지	생장 정도	기중균사 색	기질균사 색	배면색	수용성 색소
변형된 벤넷 한천배지	매우 좋음	연한 노란색	보라색	보라색	보라색
트립톤-효모 추출물 한천배지 (ISP-1)	좋음	밝은 회색	진한 노란색	진한 노란색	연한 노란색
효모 추출물-말트 추출물 한천배지 (ISP-2)	좋음	밝은 회색	밝은 밤색	진한 밤색	연한 노란색
무기염-전분 한천배지 (ISP-4)	좋음	밝은 회색	보라색	보라색	없음
펩톤-효모 추출물-철 한천배지 (ISP-6)	보통	밝은 회색	연한 노란색	연한 노란색	없음

그리고, 상기 변형된 벤넷 배지에서 3일간 배양한 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 균주를 8% 글루타알데하이드 용액으로 하루 예비고정하고 포자형성이 잘된 부위를 절단하여 하루 고정한 후, Bio-Rad E5550 SEM 코팅 장치를 사용하여 gold coating한 후, 주사전자 현미경(Phillips model 515)을 사용하여 포자를 관찰한 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 방선균 균주의 포자사슬은 나선형이었으며, 포자표면은 매끄럽고, 특이적인 돌출물을 가지지 않았으며, 포자는 원형으로 0.5~0.9 μm 의 크기였으며, 기질균사는 분절된 형태를 나타내지 않았다.

또한, 상기 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P의 탄소원 이용특성을 조사하였고, 그 결과는 하기의 표 2에 나타난 바와 같다. 즉, 본 발명에 따른 방선균은 배지내의 디 (D)-글루코스, 디 (D)-만니톨, 디 (D)-자일로스, 디 (D)-갈락토스, 디 (D)-슈크로스, 엘 (L)-람노스 등 대부분의 당류를 이용하였으나, 디 (D)-프럭토스와 엘 (L)-아라비노스는 이용하지 않았다.

[표 2: 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P의 탄소원 이용특성]

탄소원	이용능
디 (D)-글루코스	양성
디 (D)-만니톨	양성
디 (D)-프럭토스	음성
디 (D)-자일로스	양성
디 (D)-슈크로스	양성
디 (D)-갈락토스	양성
엘 (L)-아라비노스	음성
엘 (L)-람노스	양성

나아가, 상기 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P의 생리학적 특성을 조사하였고, 그 결과는 하기의 표3에 나타난 바와 같다. 즉, 본 발명에 따른 방선균은 젤라틴 액화능, 전분 분해력, 질산염 환원능, 황화수소 생성능은 양성이었으나, 카제인 분해능은 음성으로 나타났으며, ISP-6과 ISP-7 배지에서 멜라닌은 생성되지 않았다.

[표 3: 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P의 생리학적 특성]

항목	특성
멜라닌 생성능	음성
질산염 환원능	양성
전분 분해능	양성
젤라틴 액화능	양성
카제인 분해능	음성
황화수소 생성능	양성

이와 더불어, 상기 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P의 세포벽 성분 특성을 조사하였다. 세포벽 성분 특성 조사는 Staneck과 Roberts의 방법과 TLC를 이용한 분석 방법에 따라 세포벽의 펩티도글리칸(peptidoglycan)에 존재하는 디아미노피멜릭산(diaminopimelic acid)과 전 균체의 가수분해액에 대한 당을 분석하였다. 세포벽을 분해시켜 세포벽내 당분석을 실시한 결과, 하기의 표 4에 나타난 바와 같이 글루코스 및 리보오스가 검출되었으며, 아미노산의 분석에서는 엘엘-디아미노피멜릭산(LL-diaminopimelic acid)이 검출되었다.

[표 4: 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P의 세포벽 성분의 특성]

항목	성분
디에이피(DAP, diaminopimelic acid)	엘엘-디아미노피멜릭산 (LL-diaminopimelic acid)
글리신 (Glycine)	음성
당	글루코스, 리보오스

이와 같은 결과에 따라, 세포벽 특성에 따른 분류 방법(Goodfellow, M. and D. E. Minnikin. Chemical method in bacterial systematics. p. 131-143. Academic Press. New York, 1985; Lechevalier, H. N. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. vol. 4, p. 2344, 1989)에 의해 본 발명에 따른 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 균주는 I형의 세포벽(cell-wall type I)을 갖는 방선균으로 분류될 수 있다.

실시예 4: 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 및 계통수 작성

이번 실시예에서는 본 발명에 따른 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P의 계통분류학적인 위치를 확인하기 위하여 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하였다. 먼저 DNA 추출을 위하여 변형된 벤틀 배지에 3일간 현탁배양한 후 배양액을 원심 분리하여 cell을 분리하였고, Genomic DNA 추출은 AccuPrep™ Genomic DNA extraction kit (Bioneer 사)를 사용하였으며, PCR 반응을 실시하여 증폭된 16S rRNA 유전자 조각을 pGEM-T easy vector (Promega)를 이용하여 cloning하였다.

그리고, 형질전환된 대장균으로부터 플라스미드를 추출한 후, Termination Sequencing Ready Reaction kit(Perkin Elmer)와 ABI 377 genetic analyser(Perkin Elmer)를 이용하여 염기서열(1461 bp)을 분석하였으며, NCBI의 BLAST 프로그램을 이용하여 상동성(homology)을 확인하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 균주는 방선균 스트렙토마이세스 래벤둘레 (*Streptomyces lavendulae*) IFO 12789^T (D85116)와 97%의 상동성을 나타내었으며, 16S rDNA 상동성상에서 기존의 스트렙토마이세스 속 균주들과 모두 1% 이상의 염기서열 변이를 보였다.

이를 바탕으로 이미 분석된 스트렙토마이세스 속 균주들의 염기서열을 유전자 은행에서 취하여 MEGA 2.1 package 프로그램을 이용하여 근린결합 방법(neighbor-joining method)으로 계통수(phylogenetic tree)를 그렸고, 이를 도 3에 나타내었다. 이후, 계통수의 구조(topology)를 평가하기 위하여 스트렙토스포렙기움 로세움 (*Streptosporangium roseum*) DSM 43021^T (X89947)을 외집단(out group)으로 하여 1000회 반복적으로 부트스트랩 (bootstrap)을 수행하였다. 본 발명에 따른 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 균주는 계통수 상에서 스트렙토마이세스 속에 속하지만, 다른 스트렙토마이세스 균주들과는 모두 1% 이상의 염기서열 상의 차이를 가지는 독립적인 가지를 형성하였다. 즉, 상기 계통수 분석으로 본 발명에 따른 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 균주는 스트렙토마이세스 속에 속하는 신종 균주임을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로 항암활성 물질을 생산하는 본 발명에 따른 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 균주의 형태학적, 배양학적, 생화학적 특성을 종합적으로 검토하고 16S rDNA 염기서열 분석 및 MEGA 프로그램을 이용하여 계통분류를 실시한 결과, 본 발명자들은 상기 균주를 스트렙토마이세스 속 KORDI-3238로 명명하였고, 부다페스트 조약에 의거한 특허미생물 국제 공인 기탁기관인 한국미생물 보존센터에 2005년 7월 7 일자로 기탁하였다(기탁번호 KCCM-10664P).

실시예 5: 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 균주의 배양

상술한 실시예에 따른 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 균주를 변형된 벤넷 (modified Bennett's)배지에서 7일간 배양하여 활성화시킨 후, 동일 배지 100 ml이 들어있는 플라스크 (×3)에서 27℃, 150 rpm으로 4일간 종배양 (seed culture)하였다. 종배양한 균주를 다시 동일한 배지 0.8 l가 들어있는 3 l Fernbach flask (×10)에 30 ml씩 접종하여 동일 조건하에서 7일간 진탕 배양하였다. 그 결과, 상기 균주의 성장 가능 온도는 15℃ 내지 40℃ 범위 내인 것이 바람직한 것으로 확인되었다.

실시예 6: 항암제 조성물의 추출

상기한 실시예 5에서 얻은 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 균주의 배양액에 대하여 고속 원심분리기 (ultracentrifuge, 9000 rpm, 15분)를 사용하여 균사체를 제거하였다. 이와 같이 분리된 배양여과액을 다시 0.2 μm 멤브레인 필터(membrane filter)로 여과하여 여분의 균사체를 완전히 제거하였다. 이와 같이 하여 얻은 배양여과액을 1l 정도가 되도록 감압하에서 증발 농축하여 항암활성을 가지는 반고형 조추출물을 얻었다.

실시예 7: 조추출 항암제 조성물의 항암활성 측정

본 발명에 따른 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 균주로부터 상기 실시예 6을 통하여 얻은 반고형 추출물에 대한 저해 활성(IC₅₀)은, 세포내 환원효소에 의한 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 환원에 따른 생세포수 측정 방법으로 측정하였다. 본 실험에 사용한 암세포는 인체의 백혈병 세포인 leukemia cell-line K-562 및 HL-60이었다.

활성 측정시 시료는 디메틸설폭시드(DMSO)에 각 농도별로 적정량씩 녹여 1.5 ml 에펜돌프 튜브(Eppendorf tube)에 분주한 후 사용하였다. 세포 배양을 위해서 실험에 사용될 암세포는 10% FBS(Fetal Bovine Serum)와 카나마이신 (kanamycin) 20 μg/ml가 들어있는 RPMI 1640 배양액을 사용하여, 25 cm²의 표면적을 갖는 플라스크에서 37℃, 5% CO₂가 유지되는 배양기 내에서 배양하였다. 세포독성 측정시에는 세포를 원심분리하여 세척한 후 새로운 배양액에 2×10⁴ cell/ml로 부유시켜 사용하였다.

MTT 측정법은 다음과 같이 실시하였다: 대수기에 도달한 암세포 배양액을 96 웰 (well) 플레이트에 0.1 ml 접종하고 시료를 각각 10배씩 연속 희석, 0.1 ml씩 첨가하여 최종 부피가 0.2 ml가 되게 한 후, 37℃, 5% CO₂가 유지되는 배양기에서 4일간 배양하였다. 배양이 끝난 후 증류수에 녹인 MTT 용액 (1mg/ml)을 각각의 웰에 50 μl씩 가해주고 4시간 동안 추가 배양하였다. 배양 상등액을 제거하고 살아있는 세포의 환원 효소에 의하여 형성된 포르마존 (formazone) 결정을 0.15 ml의 DMSO에 녹인 다음 540 nm의 광학필터(optic filter)를 이용하여 마이크로플레이트 판독기(microplate reader)로 측정하였다.

시료를 처리하지 않은 세포에서는 진한 보라색으로 나타나고 암세포가 모두 죽은 경우에는 거의 투명한 용액으로 결과가 나타나, 흡광도에 따라 살아있는 세포의 수를 측정할 수 있었다. 측정의 정확도를 높이기 위하여 모든 시료는 3배수로 실

험하였으며, 흡광도가 기준의 50%에 달하는 농도를 IC₅₀로 정의 하였다. 실험 결과, 세포내 환원효소에 의한 MTT 환원에 따른 생세포수 측정방법으로 측정하였을 때, 본 발명에 따른 상기 반고형 조추출 항암활성 물질은 인체의 백혈병 세포인 leukemia cell-line K-562 및 HL-60에 대하여 각각 49.6과 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 의 저해활성 (IC₅₀)을 나타내었다.

발명의 효과

이상에서 살펴 본 바와 같이, 본 발명에 따르면 인체의 백혈병 세포에 대한 항암물질을 생산하는 새로운 방선균 (actinomycetes) 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCCM-10664P 균주를 제공할 수 있다. 이를 통하여, 이것의 배양물 및 배양여과액으로부터 얻어지는 조추출 항암활성 물질은, 생리 활성 실험 결과 인체의 백혈병과 같은 암세포에 대하여 강한 독성을 나타내는 효과가 있다.

이러한 본 발명에 의하는 경우, 항암물질을 생산하는 방선균 스트렙토마이세스 속 균주 뿐만 아니라, 이것을 분리하는 방법, 이로부터 반고형 추출물을 제조하는 방법, 이로부터 유래한 반고형 추출물 및 이를 이용한 항암제 조성물을 제공할 수 있어서, 향후 항암제 용도로 다양하게 개발될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따라 방선균 분리용 한천 배지(ISP-4)에서 7일 동안 배양된 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 균주의 사진이고,

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 변형된 벤넷(modified Bennett's) 배지에서 3일 동안 배양된 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 균주의 포자 형태를 나타내는 주사전자현미경 사진이고,

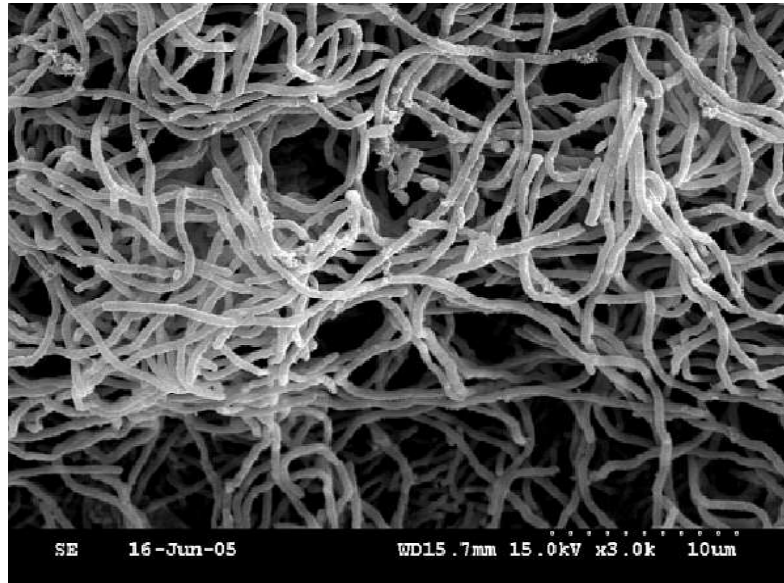
도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 방선균 스트렙토마이세스 속 KCCM-10664P 균주의 16S rDNA 유전자를 근간으로 작성한 계통수(phylogenetic tree)이다.

도면

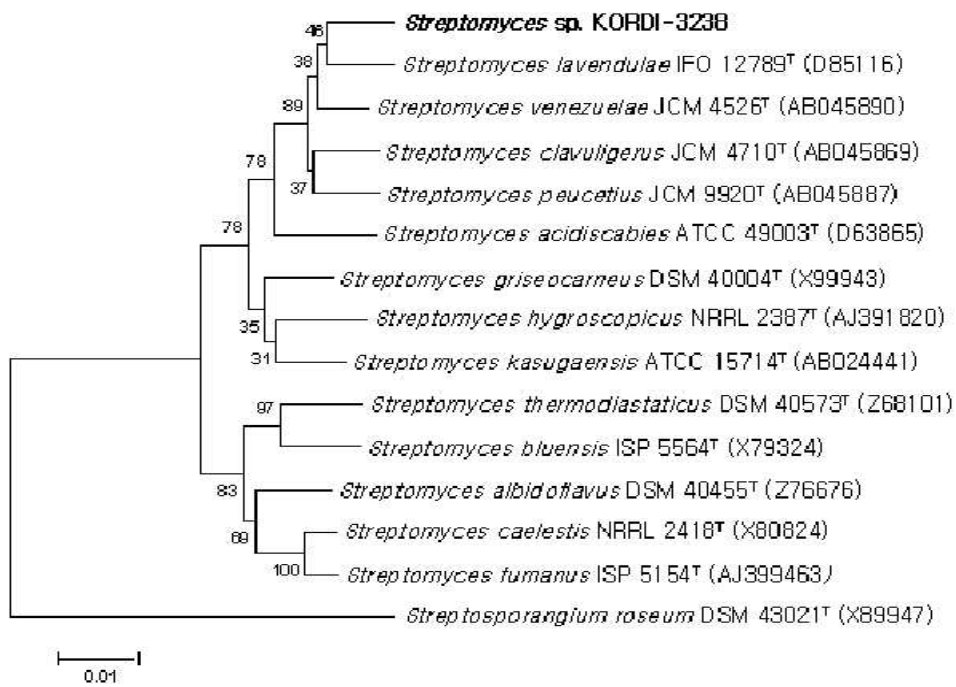
도면1



도면2



도면3



서열목록

- <110> Korea Ocean Research & Development Institute
- <120> Actinomycetes *Streptomyces* sp. Strain Producing Anticarcinogen, Isolating Method Thereof, Manufacturing Method of Semi-Solid Extract From The Same, Semi-solid Extracting From The Same and Anti-cancer Agent Composition Using The Same
- <130> 001

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 2874

<212> DNA

<213> Streptomyces sp.

<400> 1

acatgcaagt cgagcgatga agcccttcgg ggtggattag tggcgaacgg gtgagtaaca	60
acatgtangt cgaacgatga agcccttcgg ggtggattag tggcgaacgg gtgagtaaca	120
cgtgggcaat ctgcccttca ctctgggaca agccctggaa acgggggtcta ataccggata	180
cgtgggcaat ctgcccttca ctctgggaca agccctggaa acgggggtcta ataccggata	240
gcactctgtc ctgcatggga cggggttgaa agctccggcg gtgaaggatg agcccgcggc	300
ccactcctgc ccgcatgggc gggggttgaa agctccggcg gtgaaggatg agcccgcggc	360
ctatcagctt gttggtgggg taatggccta ccaaggcgac gacgggtagc cggcctgaga	420
ctatcagctt gttggtgggg taatggccca ccaaggcgac gacgggtagc cggcctgaga	480
gggcgaccgg ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtgg	540
gggcgaccgg ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtgg	600
ggaatattgc acaatgggcg aaagcctgat gcagcgacgc cgcgtgaggg atgacggcct	660
ggaatattgc acaatgggcg aaagcctgat gcagcgacgc cgcgtgaggg atgacggcct	720
tcgggttgta aacctctttc agcaggaag aagcgcaagt gacggtacct gcagaagaag	780
tcgggttgta aacctctttc agcaggaag aagcgaaagt gacggtacct gcagaagaag	840
cgccggctaa ctacgtgcca gcagccgcg taatacgtag ggcgcaagcg ttgtccgaa	900
cgccggctaa ctacgtgcca gcagccgcg taatacgtag ggcgcaagcg ttgtccgaa	960
ttattgggcg taaagagctc gtaggcggct tgtcacgtcg gatgtgaaag cccggggctt	1020
ttattgggcg taaagagctc gtaggcggct tgtcacgtcg gatgtgaaag cccgaggctt	1080
aacccgggt ctgcattcga tacgggctag ctagagtgtg gtaggggaga tcggaattcc	1140
aacctcgggt ctgcattcga tacgggctag ctagagtntg gtaggggaga tcggaattcc	1200
tgggtgtagc gtgaaatgcg cagatatcag gaggaacacc ggtggcgaag gcggatctct	1260

tgggtgtagcg gtgaaatgcg cagatatacag gaggaacacc ggtggcgaag gcg gatctct 1320
 gggccattac tgacgctgag gagcgaaagc gtggggagcg aacaggatta gataccctgg 1380
 gggccattac tgacgctgag gagcgaaagc gtggggagcg aacaggatta gataccctgg 1440
 tagtccacgc cgtaaactggt gggaaactagg tgttggcgac attccacgtc gtcggtgccg 1500
 tagtccacgc cgtaaactggt gggaaactagg tgttggcgac attccacgtc gtcggtgccg 1560
 cagctaacgc attaagttcc ccgcctgggg agtacggccg caaggctaaa actcaaagga 1620
 cagctaacgc attaagttcc ccgcctgggg agtacggccg caaggctaaa actcanagga 1680
 attgacgggg gcccgcaaaa gcagcggagc atgtggctta attcgacgca acgcaagaa 1740
 attgacgggg gcccgcaaaa gcggcggagc atntggctta attcgacgca ncgngaagaa 1800
 ccttaccaag gcttgacata taccgaaaag catcagagat ggtgcccccc ttgtggtcgg 1860
 ccttaccaag gcttgacata taccgaaaag nattagagat agtgcccccc ttgtggtcgg 1920
 tatacaggtg gtgcatggct gtcgtcagct cgtgtcgtga gatggtgggt taagtcccgc 1980
 natacaggtg gtgcatggct gtcgtcagct cgtgtcgtga gatggtgggt taagtcccgc 2040
 aacgagcgc acccttgttt tgtgttgcca gcatgccctt cggggtgatg gggactcaca 2100
 aacgngngca acccttgtcc tgtgttgcca gcatgccctt cggggtgatg gggactcaca 2160
 ggagactgcc ggggtcaact cggaggaagg tggggacgac gtcaagtcgt catgccctt 2220
 ggagaccgcc ggggtcaact cggaggaagg tggggacgac gtcaagtcgt catgccctt 2280
 atgtcttggg ctgcacacgt gctacaatgg ccggtacaat gagctgcat gccgcgaggc 2340
 atgtcttggg ctgcacacgt gctacaatgg ccggtacaat gagctgcat accgtgaggt 2400
 ggagcgaatc tcaaaaagcc ggtctcagtt cggattgggg tctgcaactc gaccccatga 2460
 ggagcgnatc tcaaaaagcc ggtntcagtt cggattgggg tctgcaactc gaccccatga 2520
 agtcggagtt gctagtaatc gcagatcagc attgctgagg tgaatacgtt cccgggcctt 2580
 agtcggagtc gctagtaatc gcagatcagc attgctgagg tgaatacgtt cccgggcctt 2640
 gtacacaccg cccgtcacgt cacgaaagtc ggtaacacc gaagccggtg gcccaacccc 2700
 gtacacaccg cccgtcacgt cacgaaagtc ggtaacacc gaagccggtg gcccaacccc 2760
 ttgtgggagg gagctgtcga aggtgggact ggcgattggg acgaagtcgt aacaaggtta 2820
 aggagggagc tgtcgaaggt gggactggcg attgggacga agtcgtaaca aggt 2874