

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0051173 (43) 공개일자 2012년05월22일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 36/282 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01)	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스내 (서천동, 경희대학교)	
(21) 출원번호 10-2010-0112466	(72) 발명자	
(22) 출원일자 2010년11월12일	정성현	
심사청구일자 2010년11월12일	서울특별시 서초구 신반포로 270, 111동 1701호 (반포동, 반포자이)	
	황파	
	서울특별시 동대문구 이문로35아길 21 (이문동)	
	(74) 대리인	
	안소영	

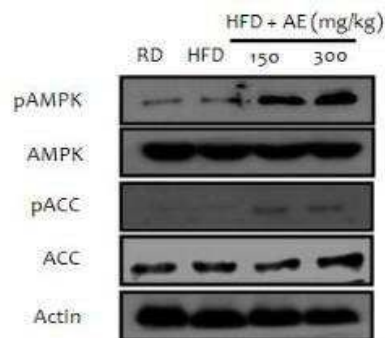
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 AMPK 활성화제

(57) 요약

본 발명은 인진 추출물을 유효성분으로 함유하는 AMPK(5' 아데노신 모노포스페이트-활성화 단백질 카이네이즈) 활성화제와 인진 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만, 당뇨, 대사증후군, 퇴행성 질환 또는 암 중에서 선택된 하나 이상의 증세 또는 질병의 치료, 개선 또는 예방용 조성물을 제공한다. 본 발명의 활성화제는 AMPK 활성화에 효과적이며, 본 발명의 조성물은 비만, 당뇨, 대사증후군, 퇴행성 질환 또는 암 중에서 선택된 하나 이상의 증세 또는 질병의 치료, 개선 또는 예방에 효과적이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

인진 추출물을 유효성분으로 함유하는 AMPK(5' 아데노신 모노포스페이트-활성화 단백질 카이네이즈) 활성화제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 추출물은 물추출물인 AMPK 활성화제.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 활성화제는 비만, 당뇨, 대사증후군, 퇴행성 질환 또는 암 중에서 선택된 하나 이상의 증세 또는 질병의 치료, 개선 또는 예방용인 AMPK 활성화제.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 약학조성물 또는 식품조성물인 AMPK 활성화제.

청구항 5

인진 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만, 당뇨, 대사증후군, 퇴행성 질환 또는 암 중에서 선택된 하나 이상의 증세 또는 질병의 치료, 개선 또는 예방용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 추출물은 물추출물인 조성물.

청구항 7

제5항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 약학조성물 또는 식품조성물인 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 AMPK 활성화제에 관한 것으로, 보다 상세하게는 비만, 당뇨, 대사증후군, 퇴행성질환 및 암의 치료 또는 예방에 효과적인 AMPK활성화제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] AMPK 활성화제는 AMPK(5'AMP-활성화 단백질 카이네이즈; 5' 아데노신 모노포스페이트-활성화 단백질 카이네이즈)의 활성을 증가시키는 물질로, AMPK는 세포 에너지 항상성에 중요한 역할을 하는 효소이다. AMPK를 활성화 시킴으로써, 당뇨, 대사증후군, 비만, 암, 퇴행성질환(치매) 등의 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다는 것이 알려져 있어, AMPK 활성화제에 대한 연구가 지속되고 있다{AMPK and the biochemistry of exercise: Implications for human health and disease. Biochem J 418(2), 261-275 (2009), Mechanisms linking obesity, chronic kidney disease, and fatty liver disease: the roles of fetuin-A, adiponectin, and AMPK. J Am Soc Nephrol 2010 Mar.; (21) 3: 406-12}.

[0003] 한편, 인진(茵陳; Artemisia capillaries)과 관련하여 AMPK활성화 효과는 전혀 알려진 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명이 해결하고자 하는 하나의 기술적 과제는 AMPK활성화제를 제공하는 것이다.

[0005] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 하나의 기술적 과제는 비만, 당뇨, 대사증후군, 퇴행성질환 또는 암 중에서

선택된 하나 이상의 증세 또는 질병의 치료, 개선 또는 예방용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0006] 본 발명은 인진(茵陳; *Artemisia capillaries*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 AMPK(5' adenosine monophosphate-activated protein kinase; 5' 아데노신 모노포스페이트-활성화 단백질 카이네이즈) 활성화제를 제공한다.
- [0007] 상기 인진 추출물은 메탄올 또는 에탄올과 같은 알콜 또는 물 등 중에서 선택된 하나 이상의 용매추출물로, 바람직하게는 물 추출물일 수 있으며, 열수추출법 등 공지된 방법으로 추출하거나, 구입한 것일 수 있다.
- [0008] 상기 인진 추출물은 활성화제 총 중량에 대하여 1~10 중량%로 포함할 수 있으며, 1 중량% 미만에서 효과가 충분하지 않을 염려가 있고, 10 중량%초과에서 효과가 더 이상 커지지 않을 가능성이 있다.
- [0009] 본 발명의 AMPK 활성화제는 이로써 제한되는 것은 아니나, 구체적으로 비만, 당뇨, 대사증후군, 퇴행성 질환, 또는 암 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 또는 예방용일 수 있다. 상기 당뇨는 2형 당뇨일 수 있으며, 상기 퇴행성 질환은 치매, 바람직하게는 알츠하이머형 치매일 수 있다{AMPK and the biochemistry of exercise: Implications for human health and disease. *Biochem J* 418(2), 261-275 (2009), Mechanisms linking obesity, chronic kidney disease, and fatty liver disease: the roles of fetuin-A, adiponectin, and AMPK. *J Am Soc Nephrol* 2010 Mar.; (21) 3: 406-12 참조}.
- [0010] 또한, 본 발명은 인진 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만, 당뇨, 대사증후군, 퇴행성 질환, 또는 암 중에서 선택된 하나 이상의 증세 또는 질병의 치료, 개선 또는 예방용 조성물을 제공한다. 상기 인진 추출물은 메탄올 또는 에탄올과 같은 알콜 또는 물 등 중에서 선택된 하나 이상의 용매추출물로, 바람직하게는 물 추출물일 수 있으며, 열수추출법 등 공지된 방법으로 추출하거나, 구입한 것일 수 있다. 상기 당뇨는 2형 당뇨일 수 있으며, 상기 퇴행성 질환은 치매, 바람직하게는 알츠하이머형 치매일 수 있다.
- [0011] 상기 인진 추출물은 조성물 총 중량에 대하여 1~10 중량%로 포함할 수 있으며, 1 중량% 미만에서 효과가 충분하지 않을 염려가 있고, 10 중량% 초과에서 효과가 더 이상 커지지 않을 가능성이 있다.
- [0012] 상기 치료, 개선 또는 예방은 AMPK 활성화에 의할 수 있다.
- [0013] 본 발명의 AMPK 활성화제 또는 조성물은 약학 조성물 또는 식품조성물일 수 있다. 상기 식품조성물은 건강기능식품일 수 있으며, 제형은 통상의 방법에 따라 제조하며, 담체와 함께 건조한 후 캡슐화하거나 기타 정제, 과립, 분말, 음료, 죽 등의 형태로 제형화한 것일 수 있으며, 상기 기재한 것 외에도 모든 식품 형태일 수 있다. 상기 약학 조성물은 비만, 당뇨, 대사증후군, 퇴행성 질환, 또는 암 중에서 선택된 하나 이상의 증세 또는 질병의 치료 또는 예방용일 수 있으며, 상기 식품 조성물은 비만, 당뇨, 대사증후군, 퇴행성 질환, 또는 암 중에서 선택된 하나 이상의 증세 또는 질병의 개선 또는 예방용일 수 있다.
- [0014] 상기 인진추출물은 AMPK 활성화 효과 및/또는 비만, 당뇨, 대사증후군, 퇴행성 질환, 또는 암 중에서 선택된 하나 이상의 증세 또는 질병의 치료, 개선 또는 예방 효과를 나타낸다.
- [0015] 따라서, 본 발명은 인진추출물의 AMPK 활성화 용도 및/또는 인진추출물의 비만, 당뇨, 대사증후군, 퇴행성 질환, 또는 암 중에서 선택된 하나 이상의 증세 또는 질병의 치료, 개선 또는 예방 용도를 제공한다.
- [0016] 또한, 인진추출물의 AMPK 활성화제 제조 및/또는 인진추출물의 비만, 당뇨, 대사증후군, 퇴행성 질환, 또는 암 중에서 선택된 하나 이상의 증세 또는 질병의 치료, 개선 또는 예방제 제조를 위한 용도를 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 인진추출물을 필요로 하는 포유류(인간을 포함함)에게 투여하는 단계를 포함하는 AMPK 활성화방법 및/또는 비만, 당뇨, 대사증후군, 퇴행성 질환, 또는 암 중에서 선택된 하나 이상의 증세 또는 질병의 치료, 개선 또는 예방법을 제공한다.
- [0018] 별도의 언급이 없는 한, 본 발명의 AMPK 활성화제, 본 발명의 조성물, 용도, 방법에서 언급된 내용은 서로 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.
- [0019] 상기 인진추출물과 그를 포함하는 AMPK 활성화제 및/또는 조성물은 인간을 포함한 포유류에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며, 유효성분을 약학적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 제제화하여 투여할 수 있다. 제제화할 경우 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 인진 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스, 및

젤라틴 등을 첨가하여 제조한다. 또한, 마그네슘, 탈크 등 윤활제도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 주사가 가능한 액제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 비강세척제 및 좌제가 포함된다. 주사가 가능한 액제, 현탁제, 유제는 물, 비수성용제나 현탁용제와 유효성분을 혼합하여 제조할 수 있으며, 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사가 가능한 에스테르 등일 수 있다.

[0020] 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등의 사용될 수 있다. 상기 인진 추출물, 그를 포함하는 AMPK 활성화제 또는 조성물은 비경구 투여시 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사로 투여가능하다.

[0021] 본 발명의 AMPK 활성화제, 조성물, 용도 및 방법에 있어서, 인진 추출물 기준으로 성인 기준 1일 150~300 mg/kg의 용량으로 사용가능하다.

[0022] 상기 인진 추출물은 약학적으로 또는 식품학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제 등을 첨가하여 제제화할 수 있으며, 제제화에 관한 내용은 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA 등의 문헌을 참조할 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 AMPK 활성화제는 AMPK 활성화 효과가 뛰어나며, 본 발명의 조성물은 비만, 당뇨, 대사증후군, 퇴행성질환, 암 등의 예방 또는 치료에 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 AMPK 및 ACC의 활성의 발현을 Western blot 방법으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 RT-PCR 실험결과를 나타낸 도이다.

도 3은 실시예 1-2.의 실험종료시 실험동물의 내장 지방량을 확인하기 위한 개복 전, 후의 사진(A)과 실시예 1-2.의 실험동물에 대한 체중 변화를 나타낸 그래프(B)이다.

도 4는 실시예 1-2.의 <지방형태관찰> 실험결과인 지방세포를 촬영한 사진(A)과 지방세포 크기별 분포를 나타낸 그래프(B)이다.

도 5는 AMPK 및 ACC의 활성의 발현을 Western blot 방법으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 lipolysis에 관여하는 유전자인 CPT-1 및 발열반응에 관여하는 유전자인 UCP2의 발현량을 확인한 결과이다.

도 7은 실시예 2-2.의 실험동물에 대한 체중 변화를 나타낸 그래프이다.

도 8은 실시예 2-2.의 <지방형태관찰> 실험결과인 지방세포를 염색하여 촬영한 사진(A)과, 지방세포 크기별 분포를 나타낸 그래프(B)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 실시예 및 제조예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명하나, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐으로 본 발명의 내용이 하기 실시예나 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0026] 하기 실시예에서 데이터의 통계처리는 SPSS 14.0 통계 프로그램을 이용하여 산출한 평균±표준편차로 $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 수준에서 일원배치 분산분석법 (one-way analysis of variance)을 시행하고 LSD(최소유의차검정법)로 각 실험군 평균치간의 유의성을 검정하였다.

[0027] <실시예 1> 인진 추출물의 AMPK 활성화 효과(비만 예방 등 효과) 확인

[0028] 1-1. 인진 추출물의 준비

[0029] 인진(Artemisia capillaries)의 지상부(경동시장, 서울, 대한민국) 100g당 물 1L 분량의 열수(섭씨 100도)로 추출하고, 여과한 여과액을 감압농축(섭씨 60도)한 후, 동결건조기(EYELA, FDV-1200)로 동결건조하여 인진 추

출물을 준비하였다.

[0030] 상기 추출물을 동물실험의 경우 3차증류수(DDW)에 용해시켜 사용하였다.

[0031] 1-2. 동물의 준비 및 처리

[0032] <동물의 준비 및 투여>

[0033] 5주령 수컷 ICR(Imprinting Control Region) 마우스((주) 오리엔트, 성남, 대한민국)를 플라스틱 마우스 케이지에 보관하여 동물실험실에서 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 명/암 사이클 (12/12 hr)의 조건하에서 사육하며, 물과 사료는 자유로이 섭취하도록 하여 실험시작 전 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 식사방법인 과식(overfeeding)과 에너지 과밀도 식사(energy dense diet)를 제공하여 비만을 유도하는 DIO(diet-induced obese) 모델로 변형시켰다. 실험군은 정상식이(10% Kcal% fat, Research DIETS)를 제공한 정상식이군(Regular Diet; 약하여 RD라 함), 고지방식이(45% Kcal% fat, Research DIETS)를 섭취시킨 고지방식이군(High Fat Diet; 약하여 HFD라 함), 고지방식이와 실시예 1-1의 인진 추출물(150mg/kg)을 투여한 실시예 1-1(150mg/kg) 투여군(약하여, HFD+AE150 또는 AE150이라 함), 고지방식이와 실시예 1-1의 인진 추출물(300mg/kg)을 투여한 실시예 1-1(300mg/kg) 투여군(약하여, HFD+AE300 또는 AE300이라 함)으로 나누었다. 각 실험 군은 6마리씩으로 나누었고, 실시예 1-1의 인진 추출물은 고지방식사와 함께 5주간 매일 경구로 투여하였으며, 체중과 혈당은 주 2회 측정하였다. 체중은 체중계(OHAUS, Adventure Pro AVG812)로 측정하였고, 혈당은 SMARTLAB(Erba, USA)기기로 측정하였다.

[0034] <혈액지표분석>

[0035] 혈액지표분석을 위한 혈액 채취는 30일간 시료투여 후, 12시간 절식 후 실시하였다. 채혈한 혈액은 5,000rpm에서 5분간 원심분리한 후 혈청을 분석에 사용하였다. 혈중 포도당, 중성지방, 총콜레스테롤, nonesterified fatty acid(NEFA), 고밀도지질단백 콜레스테롤(HDL-C), 간 지표지수인 sAST(serum alanine aminotransferase), sALT(serum aspartate aminotransferase)를 측정항목으로 하여 시판되는 측정 키트(Stanbio, USA)를 구입하여 생화학분석기(SMARTLAB, USA)로 제조사의 사용설명서에 따라 측정하였다. 혈중 인슐린농도는 마우스 insulin ELISA kit(Shibayagi, 일본)을 구입하여 ELISA reader(Labsystems, 핀란드)로 제조사의 사용설명서에 따라 측정하였다. 또한, 인슐린 저항성 지표인 HOMA-IR(homeostasis model assessment of insulin resistance)수치를 계산하였다. 그 계산 방법은 $\text{Insulin } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glucose (mM)} / 22.5$ 이다.

[0036] <지방형태관찰>

[0037] 실험종료시 실험동물에서 채취한 부고환 조직(epididymal adipose tissue)을 10% neutral buffered formalin을 사용하여 고정하고 탈수 및 포매과정을 거쳐 파라핀 블록을 제작하여 두께 $5\mu\text{m}$ 의 관상 절편으로 제작하였다. 이후 크실렌(xylene)을 사용하여 파라핀을 제거하고, 100%, 95%, 90%, 80%, 70%알코올로 친수화시킨 다음 헤마톡실린과 에오신으로 염색하고 다시 탈수과정을 거쳐 Canada balsam으로 봉입하고 광학현미경(Olympus, 일본)으로 관찰하였다.

[0038] 또한, 크기별 지방세포수를 IMAGE-PROPLUS 프로그램으로 계수하였다.

[0039] <RNA추출 및 RT-PCR>

[0040] 실험종료시 실험동물에서 채취한 부고환 조직(epididymal adipose tissue)에서 total RNA는 guanidine thiocyanate-water saturated phenol/chloroform 분리방법을 이용하여 분리하였다. 물 층에 있는 total RNA는 이소프로필알코올을 이용하여 침전시키고, 분리한 RNA는 260nm와 280nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 정량하였으며, 총 RNA $1\mu\text{g}$ 을 Moloney murine leukemia virus transcriptase와 Oligo(dT)15 primer를 이용하여 역전사하였다. 프라이머 종류와 서열은 하기 표 1에 표시한 바와 같다. 프라이머는 20mM Tris-HCl(pH 8.4), 50mM KCl, 1.5mM MgCl_2 , 0.5mM dNTP, 5 μL cDNA 그리고 2.5 unit의 Taq DNA polymerase가 포함되어 있는 25 μL 의 반응용액에 각각의 최종농도가 0.5 μM 이 되도록 첨가하였다. PCR조건은 섭씨 95도에서 1분 동안 변성, 30초 동안 붙임(상응한 붙임 온도는 하기 표 1에 표시함), 섭씨 72도에서 1분간 연장을 하여 총 30사이클 하였다. 이후, 반응 생성물을 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide로 염색된 1% 아가로스 겔을 이용하여 100V에서 전기영동하였다. 베타-액틴은 증폭된 유전자들의 대조군으로 사용되었다.

[0041] [표 1]

Gene	Forward primer (서열번호) (from 5' to 3')	Rverse primer (서열번호) (from 5' to 3')	Annealing temperature (°C)
PPAR- γ	GCGCTACCGGTCTTCTATCA (1)	TGCTGCCAAAAGACAAGCG (2)	57
C/EBP α	GATCCTGGAACGAGAACAC (3)	AGACTCGTGAACACGGTGGT (4)	57
aP2	CGAGGGTTGGTTGTGATCTGT (5)	ATAGCACTGTTGGCCCTGGA (6)	57
FAS	GGTAGTGGATACTCTGTCGTCCA (7)	CATCAGCAACATCATTCGGT (8)	66
SCD-1	CCCTGAACATCGAGTGTGCA (9)	CTTGCCAGAGATTGAGGTCCT (10)	57
β -actin	GTCGTACCACTGGCATTGTG (11)	GCCATCTCCTGCTCAAAGTC (12)	57

[0042]

[0043] <단백질 추출 및 웨스턴 블롯>

[0044]

실험종료시 실험동물에서 채취한 부고환 조직(epididymal adipose tissue)을 lysis buffer(50mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 0.25% sucrose, 0.4mg/ml digonin, 1.5mM PMSF)와 함께 균질화시킨 후 단백질을 섭씨 4도에서 20분간 12000rpm속도로 원심분리하였다. 단백질 정량은 Bio-Rad assay reagent(Bio-Rad, 미국)로 측정하였고, 분석한 단백질 30 μ g을 SDS-PAGE로 분리한 후 젤 멤브레인에 트랜스퍼하고 5% 스킴밀크(skim milk)로 상온에서 1시간 블럭킹(blocking)한 후 1:1000비율로 희석한 1차 항체(P-AMPK, Cell Signaling, 2531; AMPK, Cell Signaling, 2532; P-ACC, Cell Signaling, 3661; ACC, Cell Signaling, 3662)와 섭씨 4도에서 하룻밤 반응시켰다. 다음 Tris-buffered saline tween-20(TBST)로 3번 워싱한 후 1:2000비율로 희석시킨 2차 항체(Santa Cruz, sc-2313)와 상온에서 1시간 반응시켰다. 이 후 TBST로 3번 워싱하고 ECL solution(Amersham, 스웨덴)을 이용하여 X-ray 필름에 디벨로핑하였다.

[0045]

1-3. AMPK 활성화 효과 확인

[0046]

1-2.의 <단백질 추출 및 웨스턴 블롯>실험결과를 도 1에 나타내었다. 도 1은 AMPK 및 ACC의 활성의 발현을 Western blot 방법으로 확인한 결과를 나타낸 도이다. 도 1의 pAMPK는 인산화된 AMPK 단백질양을 의미하고, AMPK는 base level의 AMPK 단백질양을 의미한다. 마찬가지로 pACC는 인산화된 ACC 단백질양을 의미하고, ACC는 base level의 ACC 단백질양을 의미하며, Actin은 loading control로서 대조군 단백질을 의미한다. 도 1에서 보는 바와 같이 RD, HFD군에서 pAMPK, pACC 단백질은 거의 발현되지 않았으나 인진 추출물 투여군(AE150, AE300)에서 용량의존적으로 증가하는 것을 알 수 있다.

[0047]

상기 결과로부터 인진 추출물은 용량의존적으로 AMPK의 인산화를 증가시킴을 알 수 있다. 그 결과 인진 추출물은 AMPK를 활성화함을 알 수 있다. 한편 AMPK의 기질인 acetyl-CoA carboxylase(ACC)는 지방산 합성에 주요 효소이며 AMPK에 의해 인산화되면 활성이 억제된다. ACC는 미토콘드리아에서 지방산 산화 억제에 중요한 역할을 하는 malonyl-CoA합성을 조절하는 율속단계 효소로, AMPK활성화는 ACC를 억제하고 그 결과 malonyl-CoA가 줄어들게 되어 지방산 산화가 촉진된다.

[0048]

따라서, 인진추출물이 지방세포에서 AMPK 인산화를 촉진한 결과 지방산 산화를 일으켜 지방세포의 크기를 줄여줄 수 있음을 알 수 있으며, 그에 따라 항비만 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[0049]

또한, 인진추출물에 의한 상기 AMPK의 활성화에 의해, 지방산 합성에서 ACC 등 핵심 효소를 억제함으로써 ATP의 추가적 사용을 억제하여 그와 관련된 비만, 대사증후군, 2형 당뇨병과 같은 당뇨, 치매 바람직하게는 알츠하이머형 치매와 같은 퇴행성 질환, 암 등의 증세 또는 질환의 치료, 개선 또는 예방에 효과적임을 알 수 있다.

[0050]

1-4. 지방분화 관련 유전자 발현 억제 효과 확인

[0051]

1-2.의 <RNA추출 및 RT-PCR>실험결과를 도 2에 나타내었다. 지방세포가 분화 될 때 많은 유전자들이 발현된다고 알려져 있는데, 그 중 대표적인 전사인자로는 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ), CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α) 등이 있고 이들의 표적 유전자들로 fatty acid binding protein (aP2), lipoprotein lipase (LPL), fatty acid syntase (FAS), stearyl-CoA desaturase-1 (SCD-1) 등 유전자들이 알려져 있다. 상기 유전자들의 발현이 억제된다는 것은 지방세포 분화가 억제되는 것을 나타내

며, 그로 인해 항비만 효과가 나타난다.

[0052] 도 2는 지방분화 관련 유전자 발현량을 측정한 결과이다. 도 2에서 보는 바와 같이 HFD군은 RD군에 비하여 지방분화 관련 유전자들의 발현을 큰 폭으로 증가시킨 반면 AE150, AE300 투여 군에서는 HFD군에 비교시 유전자들의 발현을 용량 의존적으로 억제시켰다. 따라서, 인진추출물은 지방분화 관련 유전자 발현을 억제함을 알 수 있으며, 이로 인해 항비만 등의 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[0053] 1-5. 내장 지방량 및 체중 증가 억제 효과 확인

[0054] 1-2.의 실험동물을 실험종료시 개복하여 내장 지방량을 확인하였고, 사진으로 촬영하여 그 결과를 도 3(A)에 개복 전 사진과 함께 나타내었다. 또한, 1-2.의 실험동물에 대한 체중 변화를 도 3(B)에 나타내었다.

[0055] 도 3(A)에서 보는 바와 같이 고지방식이군(HFD)은 정상식이군(RD)에 비하여 개복했을 때 가장 많은 내장 지방을 보였다. 반면 인진 추출물 투여군 마우스는 고지방식이군에 비하여 낱싹하였고 내장 지방 또한 적었다. 또한, 도3(B)에서 보는 바와 같이, 고지방식이 유도 전 실험 군 간의 체중은 차이가 없었으나 급여 10일 후부터 정상식이군 보다 고지방식이군의 체중이 유의적으로 증가하기 시작하였으며 그 차이는 시간이 지나면서 더 크게 벌어졌다. 또한, 인진추출물투여군은 용량 의존적으로 체중이 감소함을 알 수 있다.

[0056] 따라서, 인진추출물은 고지방식이에 의해 유도된 비만을 예방하는 등 항비만 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[0057] 1-6. 항비만 등 효과 확인

[0058] 1-2.의 <지방형태관찰> 실험결과를 도 4에 나타내었다. 도 4(A)는 지방세포를 촬영한 사진이고, 도 4(B)는 지방세포 크기별 분포를 나타낸 그래프이다. 도 4(A)에서 보는 바와 같이 HFD 군에서 RD 군에 비하여 지방세포의 크기가 훨씬 커진 반면 AE150, AE300 투여 군에서는 HFD 군보다 지방세포가 용량 의존적으로 작아졌고, 면적 별 지방세포 수를 비교한 도 4(B)에서도 알 수 있듯이 HFD군에서는 RD군에 비하여 면적이 큰 지방세포 수가 많았지만 AE150, AE300 투여 군에서는 HFD 군보다 면적이 큰 지방세포 수가 적어졌음을 알 수 있었다. 이로부터 인진 추출물은 흰색 지방인 부고환지방의 사이즈를 줄여주어 체중 증가를 예방하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0059] 1-7. 당뇨 등 예방 효과 확인

[0060] 1-2.의 <혈액지표분석> 실험결과 중 혈중 포도당, 혈중 인슐린농도, HOMA-IR을 하기 표 2에 나타내었다.

[0061] [표 2]

Group	glucose (mmol/l)	insulin (μU/ml)	HOMA-IR
RD	4.9 ±2.0	48.3 ±3.2	10.5 ±1.6
HFD	12.5 ±3.2 ^{†††}	101.2 ±11.7 ^{†††}	56.2 ±2.8 ^{†††}
HFD + AE150	7.8 ±2.6 ^{**}	89.1 ±6.2 ^{**}	30.9 ±4.3 ^{**}
HFD + AE300	7.0 ±1.3 ^{**}	64.7 ±4.6 ^{***}	20.1 ±2.7 ^{***}

표에서 데이터는 평균±표준편차, ^{†††} $p<0.001$ vs. 정상식이군, ^{**} $p<0.01$,

[0062] ^{***} $p<0.001$ vs. 고지방식이군을 의미한다.

[0063] 혈중 포도당의 경우 HFD군은 RD군과 비교 시 255% 증가한 반면 AE150, AE300 투여 군은 HFD군에 비해 혈당이 각각 37.6%, 44%씩 유의적으로 감소하였다. 인슐린 수치도 마찬가지로 HFD군은 RD 군에 비하여 유의적으로 증가하였으며 AE150, AE300 투여 군에서는 HFD 군에 비하여 인슐린수치가 각각 12%, 36.1%씩 용량 의존적으로 감소하였다. 고지방식이 투여군은 정상식이 투여 군에 비해 인슐린 저항성 지수(HOMA-IR)가 5.4배나 증가한 반면 인진 추출물 투여군은 용량 의존적으로 각각 45.1%, 64.3% 감소하는 효과를 보여주었다. 이 결과는 고지방식이 급여로 인해 급격하게 증가되는 인슐린 저항성이 인진 투여 군에서는 매우 효과적으로 차단됨을 알 수 있었다.

[0064] 따라서, 인진 추출물은 혈당 감소, 혈중 인슐린 농도 감소, 인슐린 감수성 개선 등에 의해 2형 당뇨와 같은 당뇨, 대사증후군, 치매 바람직하게는 알츠하이머형 치매와 같은 퇴행성 질환 등의 예방에 효과적임을 알 수 있다.

[0065] 1-8. 혈중 지질 증가 등 억제 효과 확인

[0066] 1-2.의 <혈액지표분석> 실험결과 중 NEFA, 중성지방(TG), 총콜레스테롤, 간 기능을 나타내는 효소인 sAST, sALT측정 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

[0067] [표 3]

Group	RD	HFD	HFD + AE (mg/kg)	
			150	300
NEFA (mg/dL)	1285.3 ±44.7	2628.6 ±200.0 ⁺⁺⁺	1932.6 ±131.4*	1325.8 ±147.7**
Cholesterol (mg/dL)	151.5 ±12.7	191.8 ±4.1 ⁺⁺	164.0 ±19.2	157.0 ±27.0
TG (mg/dL)	78.7 ±11.7	183.7 ±11.0 ⁺⁺⁺	121.6 ±16.1*	106.0 ±11.7**
sAST (U/L)	10.2 ±12.3	60.4 ±14.9 ⁺⁺⁺	59.6 ±19.2	44.8 ±13.5*
sALT (U/L)	20.6 ±12.6	82.1 ±7.2 ⁺⁺⁺	33.5 ±5.6***	28.1 ±6.5***

표에서 데이터는 평균±표준편차, ⁺⁺ $p<0.01$, ⁺⁺⁺ $p<0.001$ vs. 정상식이군,

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. 고지방식이군을 의미한다.

[0068]

[0069] 혈중 NEFA농도의 경우 HFD 군은 RD군에 비해 204% 증가한 반면 AE150, AE300 투여 군에서는 HFD군보다 각각 26.5%, 49.6% 감소하는 경향을 보였다. 콜레스테롤의 경우 HFD군은 RD군에 비하여 26% 유의적으로 증가하였으나 AE150, AE300 투여 군에서는 HFD군에 비해 각각 14.5%, 18.2% 감소하는 경향을 나타내었다. 중성지방의 경우 HFD군은 RD군에 비해 233% 현저한 증가를 보인 반면 AE150, AE300 투여 군에서는 HFD군보다 각각 33.9%, 42.3% 감소하여 용량 의존적으로 감소하는 경향을 보였다. 간 기능을 나타내는 지표인 sAST와 sALT의 경우 sAST는 고지방식이 투여군이 정상식이군에 비해 5.9배 큰 폭으로 증가하였고, AE300 투여 군에서 고지방식이 투여 군과 비교 시 25.9% 유의적으로 낮아지는 경향을 나타내었다. sALT의 경우는 HFD군에 비해 AE150, AE300 투여군에서 각각 59.2%, 65.8%씩 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다.

[0070] 따라서, 인진추출물은 metabolic sensor에 해당하는 단백질인 AMPK의 활성화와 그로 인한 지방산 산화촉진, 혈당치 및 지질 프로파일이 개선되는 활성 등을 나타내어, 그와 관련된 비만, 2형 당뇨병과 같은 당뇨, 대사증후군, 치매 바람직하게는 알츠하이머형 치매와 같은 퇴행성 질환 및 암 등의 예방에 효과적임을 알 수 있다.

[0071] <실시에 2> 인진 추출물의 AMPK 활성화 효과(비만 치료 등 효과) 확인

[0072] 2-1. 인진 추출물의 준비

[0073] 실시예 1-1.과 동일한 방법으로 인진 추출물을 준비하고, 사용하였다.

[0074] 2-2. 동물의 준비 및 처리

[0075] <동물의 준비 및 투여>

[0076] 5주령 수컷 ICR(Imprinting Control Region) 마우스((주) 오리엔트, 성남, 대한민국)를 플라스틱 마우스 케이지에 보관하여 동물실험실에서 $23\pm2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm10\%$, 명/암 사이클 (12/12 hr)의 조건하에서 사육하며, 물과 사료는 자유로이 섭취하도록 하여 실험시작 전 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 고지방식이(45% Kcal% fat, Research DIETS)를 4주간 제공하여 비만을 유도한 후, 고지방식이(45% Kcal% fat, Research DIETS)를 섭취시킨 고지방식이군(High Fat Diet; 약하여 HFD라 함)과 고지방식사와 실시예 1-1.의 인진 추출물(300mg/kg)을 투여한 실시예 2-1(300mg/kg) 투여군(약하여, HFD+AE300 또는 AE300이라 함)으로 나누었다. 각 실험 군은 6마리씩으로 나누었고, 실시예 1-1.의 인진 추출물은 고지방식사와 함께 5주간 매일 경구로 투여하였으며, 체중과 혈당은 주 2회 측정하였다. 체중은 체중계(OHAUS, Adventurer Pro AVG812)로 측정하였고, 혈당은 SMARTLAB(Erba, USA)기기로 측정하였다.

[0077] <혈액지표분석>

[0078] 실시예 1-2.의 실험동물 대신 상기 2-2.의 실험동물을 사용한 것을 제외하고, 실시예 1-2.의 <혈액지표분석>과 동일한 방법으로 실시하였다.

[0079] <지방형태관찰>

[0080] 실시예 1-2.의 실험동물 대신 상기 2-2.의 실험동물을 사용한 것을 제외하고, 실시예 1-2.의 <지방형태관찰>과 동일한 방법으로 실시하였다.

[0081]

<RNA추출 및 RT-PCR>

[0082]

실시에 1-2.의 실험동물 대신 상기 2-2.의 실험동물을 사용하고, 표 1 대신 표 4에 기재된 프라이머를 사용하여, 불임온도에서 실시한 것을 제외하고, 실시예 1-2.의 <RNA추출 및 RT-PCR>과 동일한 방법으로 실시하였다.

[0083]

[표 4]

Gene	Forward primer (서열번호) (from 5' to 3')	Rverse primer (서열번호) (from 5' to 3')	Annealing temperature (°C)
CTP1	CCTGGGCATGATTGCAAAG (13)	ACAGACTCCAGGTACCTGCTCAC (14)	55
UCP2	GCAAGCTCAATGTTGGTGTCTT (15)	ACTCTGCAGATAGACAGGCCTG (16)	50
β-actin	GTCTGACCACTGGCATTGTG (17)	GCCATCTCCTGCTCAAAGTC (18)	57

[0084]

[0085]

<단백질 추출 및 웨스턴 블롯>

[0086]

실시에 1-2.의 실험동물 대신 상기 2-2.의 실험동물을 사용한 것을 제외하고, 실시예 1-2.의 <단백질 추출 및 웨스턴 블롯>과 동일한 방법으로 실시하였다.

[0087]

2-3. AMPK 활성화 효과 확인

[0088]

2-2.의 <단백질 추출 및 웨스턴 블롯>실험결과를 도 5에 나타내었다. 도 5는 AMPK 및 ACC의 활성화 발현을 Western blot 방법으로 확인한 결과를 나타낸 도이다. 도 1의 pAMPK는 인산화된 AMPK 단백질양을 의미하고, AMPK는 base level의 AMPK 단백질양을 의미한다. 마찬가지로 pACC는 인산화된 ACC 단백질양을 의미하고, ACC는 base level의 ACC 단백질양을 의미하며, Actin은 loading control로서 대조군 단백질을 의미한다. 도 5에서 보는 바와 같이 pAMPK, pACC 단백질은 HFD군에 비해 인진 추출물 투여군(AE300)에서 발현량이 증가하는 것을 알 수 있다.

[0089]

상기 결과로부터 인진 추출물은 AMPK의 인산화를 증가시킴을 알 수 있다. 그 결과 인진 추출물은 AMPK를 활성화함을 알 수 있다. 한편 AMPK의 기질인 acetyl-CoA carboxylase(ACC)는 지방산 합성에 주요효소이며 AMPK에 의해 인산화되면 활성이 억제된다. ACC는 미토콘드리아에서 지방산 산화 억제에 중요한 역할을 하는 malonyl-CoA합성을 조절하는 율속단계 효소로, AMPK활성화는 ACC를 억제하고 그 결과 malonyl-CoA가 줄어들게 되어 지방산 산화가 촉진된다.

[0090]

따라서, 인진추출물이 지방세포에서 AMPK 인산화를 촉진한 결과 지방산 산화를 일으켜 지방세포의 크기를 줄여줄 수 있음을 알 수 있으며, 그에 따라 항비만 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[0091]

또한, 인진추출물에 의한 상기 AMPK의 활성화에 의해, 지방산 합성에서 ACC 등 핵심 효소를 억제함으로써 ATP의 추가적 사용을 억제하여 그와 관련된 비만, 대사증후군, 2형 당뇨병과 같은 당뇨, 치매 바람직하게는 알츠하이머형 치매와 같은 퇴행성 질환, 암 등의 증세 또는 질환의 치료, 개선 또는 예방에 효과적임을 알 수 있다.

[0092]

2-4. 지방산화 관련 유전자 발현 증가 효과 확인

[0093]

2-2.의 <RNA추출 및 RT-PCR>실험결과를 도 6에 나타내었다. 도 6은 lipolysis에 관여하는 유전자인 CPT-1 및 발열반응에 관여하는 유전자인 UCP2의 발현량을 확인한 결과이다.

[0094]

도 6에서 보는 바와 같이, lipolysis에 관여하는 유전자인 CPT-1, 발열반응에 관여하는 유전자인 UCP2등의 발현이 인진추출물에 의해 현저히 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 상기 결과로부터 인진추출물은 lipolysis와 발열반응에 의해 비만 치료 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있다.

[0095]

2-5. 체중 증가 억제 효과 확인

[0096]

2-2.의 실험동물에 대한 체중 변화를 도 7에 나타내었다.

[0097]

도7에서 보는 바와 같이 고지방식이군(HFD)은 체중의 변화가 거의 없었지만 인진 추출물 투여군(AE300)의 체중은 고지방식이군에 비해 18.7% 유의적으로 감소되었다. 이는 인진 추출물이 고지방식으로 유도된 체중증가를 감소시키는 효과가 있음을 나타내는 것이다. 따라서, 인진추출물은 고지방식에 의해 유도된 비만을 치료

하는 등 항비만 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[0098] 2-6. 항비만 등 효과 확인

[0099] 2-2.의 <지방형태관찰> 실험결과를 도 8에 나타내었다. 도 8(A)는 지방세포를 촬영한 사진이고, 도 8(B)는 지방세포 크기별 분포를 나타낸 그래프이다. 도 8(A)에서 보는 바와 같이 AE300 투여 군에서 HFD 군보다 지방세포의 크기가 작았고 면적 별 지방세포 수를 비교한 도 8(B)에서 보는 바와 같이 AE300 투여 군에서는 HFD 군보다 면적이 큰 지방세포 수가 적어졌음을 알 수 있었다. 이 결과에서 인진 추출물이 부고환지방의 사이즈를 줄여주는 효과가 있음을 알 수 있었다. 이로부터 인진 추출물은 흰색 지방인 부고환지방의 사이즈를 줄여주어 증가된 체중을 감소시켜 비만을 치료하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0100] 2-7. 당뇨 등 예방 효과 확인

[0101] 2-2.의 <혈액지표분석> 실험결과 중 혈중 포도당(glucose), 혈중 인슐린(insulin)농도, HOMA-IR을 하기 표 5에 나타내었다.

[0102] [표 5]

Group	glucose (mmol/l)	insulin (μU/ml)	HOMA-IR
HFD	19.5 ± 2.3	120.1 ± 12.2	104.1 ± 1.6
HFD + AE300	5.3 ± 0.1**	80.9 ± 10.5**	19.1 ± 3.2***

표에서 데이터는 평균±표준편차, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. 고지방식이군을

의미한다.

[0103]

[0104] 혈중 포도당의 경우 AE300 투여 군은 HFD군에 비해 혈당이 72.9% 유의적으로 감소하였고 인슐린 수치도 AE300 투여 군에서는 HFD 군에 비하여 32.7% 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 인슐린 저항성지수 (HOMA-IR)도 역시 AE300 투여 군에서는 HFD군에 비하여 81.7% 감소하여 유의적인 감소경향을 보였다.

[0105] 이 결과는 고지방식이 급여로 인해 급격하게 증가된 인슐린 저항성이 인진 투여 군에서는 매우 효과적으로 차단됨을 알 수 있었다.

[0106] 따라서, 인진 추출물은 혈당 감소, 혈중 인슐린 농도 감소, 인슐린 감수성 개선 등에 의해 2형 당뇨와 같은 당뇨, 대사증후군, 치매 바람직하게는 알츠하이머형 치매와 같은 퇴행성 질환 등의 예방 또는 치료에 효과적임을 알 수 있다.

[0107] 2-8. 혈중 지질 증가 등 억제 효과 확인

[0108] 2-2.의 <혈액지표분석> 실험결과 중 NEFA, 중성지방(TG), 총콜레스테롤(cholesterol), 간 기능을 나타내는 효소인 sAST, sALT측정 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

[0109] [표 6]

Group	HFD	HFD + AE (mg/kg)
		300
NEFA (mg/kg)	593.0 ± 37.3	249.0 ± 19.5***
Cholesterol (mg/dL)	153.3 ± 9.5	65.1 ± 3.1***
TG (mg/dL)	90.9 ± 5.6	37.6 ± 3.2***
sAST (U/L)	155.7 ± 10.6	32.4 ± 2.4***
sALT (U/L)	55.1 ± 4.3	19.6 ± 9.6***

표에서 데이터는 평균±표준편차, *** $p < 0.001$ vs. 고지방식이군을 의미한다.

[0110]

[0111] 혈중 NEFA농도의 경우 AE300 투여 군에서는 HFD군과 비교 시 58.1% 유의적으로 감소하는 경향을 보였고, 총콜레스테롤농도의 경우 AE300 투여 군에서는 HFD군과 비교 시 57.6% 유의적으로 감소하는 경향을 보였으며 TG의 경우 AE300 투여 군에서는 HFD군과 비교 시 58.7% 감소하여 유의적인 감소경향을 보였다. 간 기능을 나타내는

지표인 sAST 와 sALT의 경우 HFD 군에 비해 각각 79.3%, 64.5% 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다.

[0112] 따라서, 인진 추출물은 metabolic sensor에 해당하는 단백질인 AMPK의 활성화와 그로 인한 지방산 산화촉진 혈당치 및 지질 프로파일이 개선되는 활성 등을 나타내어, 그와 관련된 비만, 2형 당뇨와 같은 당뇨, 대사증후군, 치매 바람직하게는 알츠하이머형 치매와 같은 퇴행성 질환 및 암 등의 예방 또는 치료에 효과적임을 알 수 있다.

[0113] <제조예 1> 약학 조성물의 제조

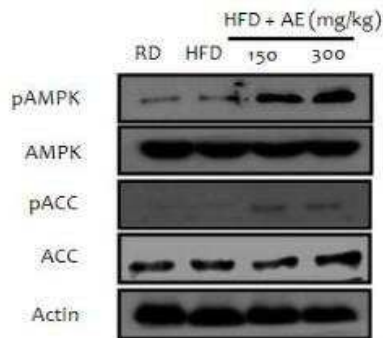
[0114] 실시예 1-1의 인진 추출물 300mg, 옥수수 전분 100mg, 유당 100mg, 스테아린산 마그네슘 2mg을 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0115] <제조예 2> 식품 조성물의 제조

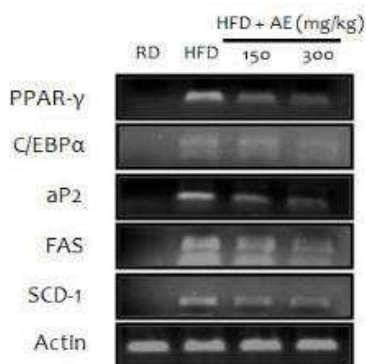
[0116] 실시예 1-1의 인진 추출물(4중량 %), 액상과당(0.5중량%), 올리고당(2중량%), 설탕(2중량%), 및 식염(0.5중량 %)에 물을 추가하여 잔량을 맞춘 후 균질하게 배합하여 순간 살균을 하여 건강음료를 제조하였다.

도면

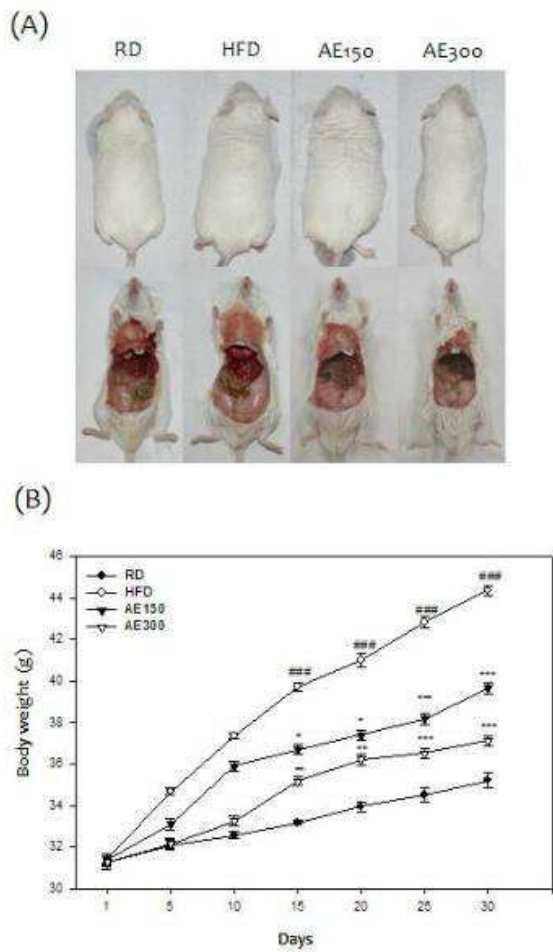
도면1



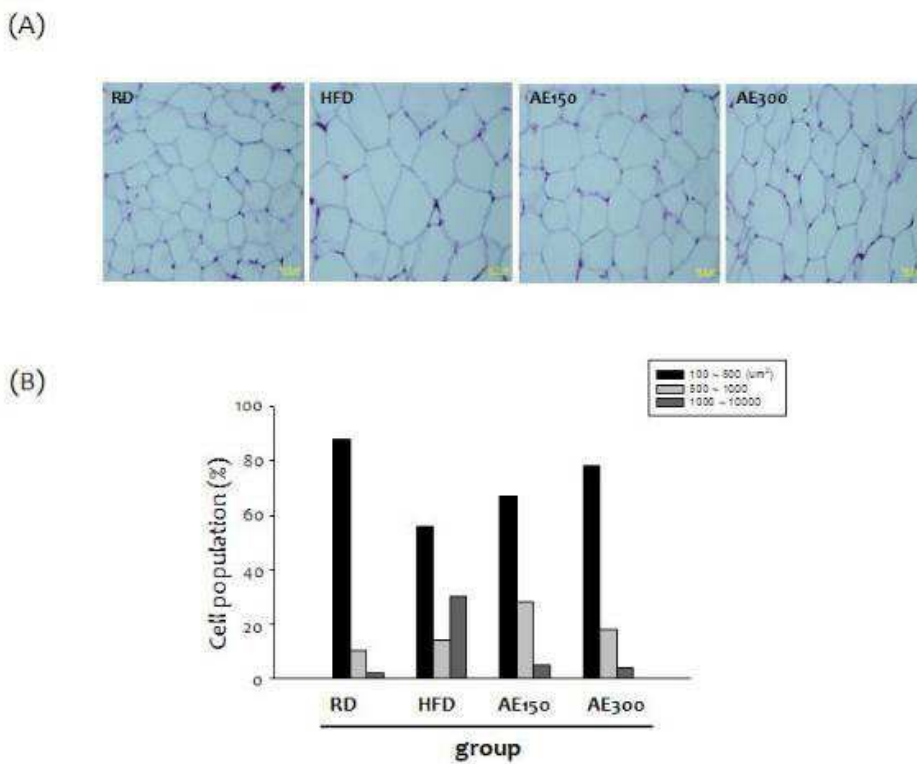
도면2



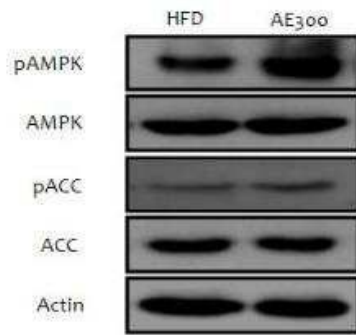
도면3



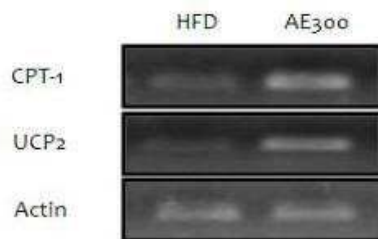
도면4



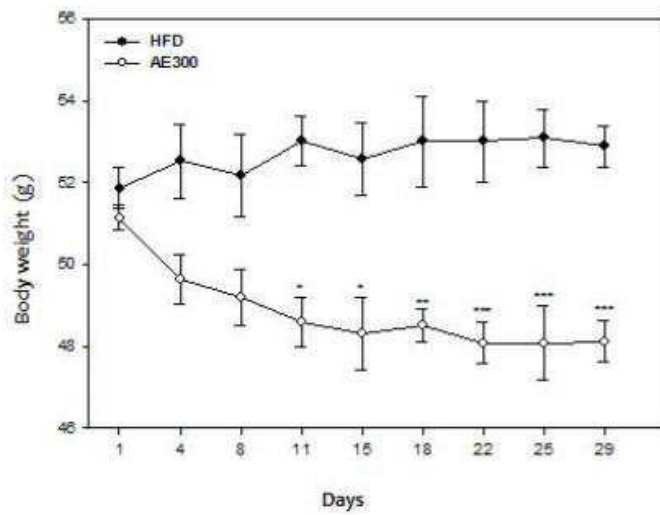
도면5



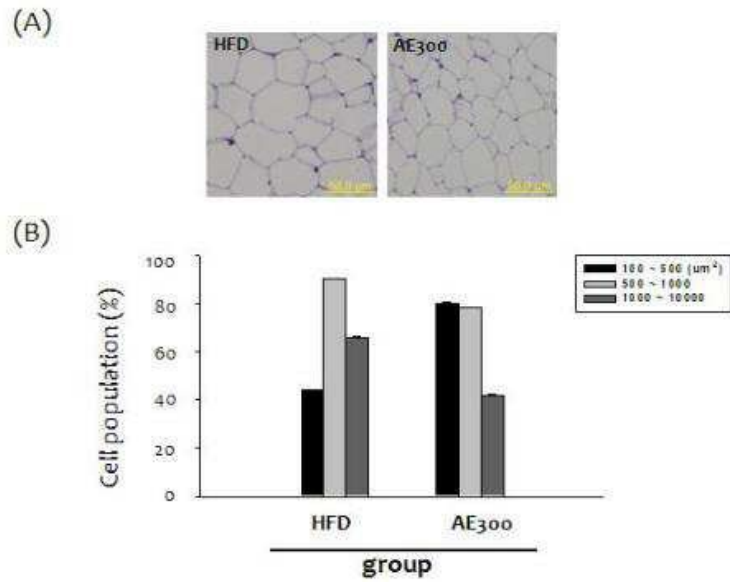
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Activator for AMPK

<130> P10-094-KHU

<160> 18

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

gcgctaccgg tcttctatca

20

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

tgctgcaaaa agacaagcg

19

<210> 3

<211> 19

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	3	
	gatacctggaa cgagaacac	19
<210>	4	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	4	
	agactcgtgg aacacggtgg t	21
<210>	5	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	5	
	cgagggttgg ttgttgatct gt	22
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	6	
	atagcactgt tggccctgga	20
<210>	7	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	7	
	ggtagtggat actctgtcgt cca	23
<210>	8	
<211>	20	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 catcagcaac atcattcgg 20

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 ccctgaacat cgagtgtcga 20

<210> 10
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10
 ctgcccaga gatttgaggt cct 23

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 11
 gtcgtaccac tggcattgtg 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 gccatctcct gctcaaagtc 20

<210> 13

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 13
 cctgggcatg attgcaaag 19
 <210> 14
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 14
 acagactcca ggtacctgct cac 23

 <210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 15
 gcaagctcaa tgttggtgct tt 22
 <210> 16
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 16
 actctgcaga tagacaggcc tg 22
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 17
 gtcgtaccac tggcattgtg 20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 18
gccatctcct gctcaaagtc

20