

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0047657
(43) 공개일자 2016년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/437* (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0143477

(22) 출원일자 2014년10월22일
심사청구일자 2015년08월06일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자
이주용
대전광역시 유성구 어은로 57, 102동 905호 (어은동, 한빛아파트)
박송이
대전광역시 유성구 대학로 55-35, 스카이뷰 307호 (봉명동)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
이처영, 장제환

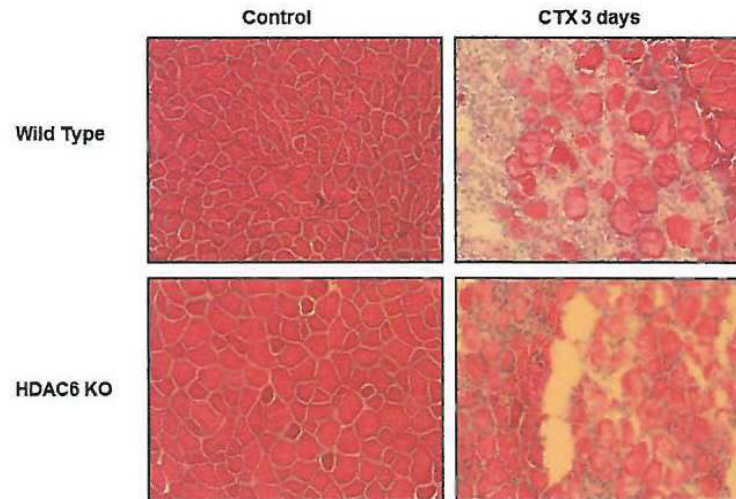
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 HDAC6 억제제를 유효성분으로 포함하는 근염의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 HDAC6 억제제를 유효성분으로 포함하는 근염의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 HDAC6 억제에 의해 근세포의 미토콘드리아 기능을 보호할 수 있는 근염의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 HDAC6 억제제를 유효성분으로 포함하는 근염의 예방 또는 치료용 조성물은 면역시스템과 직접관련이 없는 HDAC6 억제를 통하여, 근세포의 미토콘드리아 기능을 보호할 수 있어, 면역억제제의 부작용 없이 근염을 효과적으로 치료할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김은혜

대전광역시 유성구 온천북로33번길 36-26, 세종타운 906호 (봉명동)

최수진

대전광역시 유성구 대학로81번길 42, 킹스타운 211호 (궁동)

김학준

대전 유성구 상대남로 26, 918동 2503호 (상대동, 트리폴시티아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711001652

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발사업

연구과제명 중간엽줄기세포를 이용한 심혈관계 및 근골격계 질병의 세포치료 최적화를 위한 대사제어

연구

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2013.10.01 ~ 2014.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

HDAC6 유전자의 발현 억제제 또는 HDAC6 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 근염의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자의 발현 억제제는 HDAC6에 특이적인 siRNA인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단백질의 활성 억제제는 HDAC6에 특이적인 억제제인 Tubastatin A인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 HDAC6 유전자의 발현 억제제 또는 HDAC6 단백질 활성 억제제는 미토콘드리아 기능 손상을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 근염은 자가면역성 근염인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

다음 단계를 포함하는 근염의 예방 또는 치료제를 스크리닝하는 방법:

- (a) HDAD6을 발현하는 세포에 HDAD6 유전자의 발현 억제 또는 HDAD6 단백질의 활성 억제 후보물질을 처리하여, HDAD6 유전자의 발현 또는 HDAD6 단백질의 활성을 측정하는 단계;
- (b) 상기 HDAD6 유전자의 발현 억제 또는 HDAD6 단백질의 활성 억제 후보물질 처리군의 미토콘드리아 단백질의 발현을 측정하는 단계: 및
- (c) 후보물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여, HDAD6 유전자의 발현 또는 HDAD6 단백질의 활성은 억제되고, 미토콘드리아 단백질의 발현은 억제되지 않은 후보물질을 근염의 예방 또는 치료제로 선별하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 HDAC6 억제제를 유효성분으로 포함하는 근염의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 HDAC6 억제에 의해 근세포의 미토콘드리아 기능을 보호할 수 있는 근염의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 근염(myositis)이란 근육에 염증이 일어난 것을 말하며, 근육섬유(muscle fiber)에 손상을 주어 근육 수축 능력이 저하되게 된다. 특발성 염증성 근병증은 염증의 원인을 모르는 근육질환으로 피부근염, 다발성근염, 봉입체근염으로 나누게 된다. 다발성근염과 피부근염의 원인은 자가면역질환으로 분류하고 있고, 봉입체근염은 근육에 아밀로이드(amyloid)라는 비정상적인 단백질의 축적 때문인 것으로 보고 있다. 알츠하이머성 치매의 원인이 뇌에 축적되는 아밀로이드 단백질에 의한 것인데, 봉입체근염 역시 같은 원인인 것으로 보고 있다. 피부근염 환자의 10~20% 정도가 암환자로 판명되며, 또 다른 자가면역질환인 전신 홍반성 낭창(루프스병)과 퇴행성 전신 경화증은 다발성근염이나 피부근염과 유사한 증세를 나타낸다.
- [0003] 이러한, 자가면역성 근염을 치료하기 위해서 주로 항염증제를 투여하는 방법이 사용되고 있으나, 전체 면역체계를 억제하여 2차 감염 등의 부작용이 상당하다.
- [0004] HDACs(Histone deacetylases)는 보조억제자(corepressors)나 다중-단백질 전사복합체(multi-protein transcriptional complexes)들에 의해 유전자 프로모터에 붙을 수 있으며, 그곳에서 DNA에 직접 결합하지 않고 크로마틴(chromatin) 변형을 통해 전사를 조절한다(Thiagalingam *et al.*, *Ann N Y Acad Sci.* 983:84-100, 2003). 암호화된 사람 HDACs는 18개가 있으며, 이들은 클래스 I (HDAC 1, 2, 3 및 8), 클래스 II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9 및 10), 클래스 III (SIRT 1-7), 및 클래스 IV (HDAC11) 효소들로 분류된다(Yang *et al.*, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:206-218, 2008). 히스톤 아세틸화 효소(acetyltransferases) 및 HDACs 모두 세포 증식, 분화 및 세포주기 조절에 관여한다는 사실이 알려져 있다(Witt *et al.*, *Cancer Lett.* 277:8-21, 2009). 또한, HDACs의 병리학적 활성 및 조절감소(deregulation)가 암, 면역질환, 및 근이영양증(muscular dystrophy)과 같은 여러 질병들을 야기할 수 있다는 사실이 보고되었다(Yang *et al.*, *Oncogene.* 26:5310-5318, 2007).
- [0005] HDAC6는 HDACs의 클래스 IIb 패밀리 멤버이고, 미세소관(MTs)과 관련 있는 세포질내 탈아세틸화효소(cytoplasmic deacetylase)로 작용하며, 알파-튜블린(α -tubulin)을 탈아세틸화시킨다(Hubbert *et al.*, *Nature* 417:455-458, 2002). HDAC6는 여러 핵심적인 세포 기능 조절을 통해 여러 암들의 상피-중간엽 전이(epithelial-mesenchymal transition)를 조절하는 것으로 보고되었으며(Lee *et al.*, *Cancer Res* 68:7561-7569, 2008; Shan *et al.*, *J Biol Chem* 283:21065-21073, 2008), HDAC6의 발현이 종양 변환(oncogenic transformation), 비정착적 증식(anchorageindependent proliferation), 및 종양 공격성(tumor aggressiveness)과 관련이 있다고 알려져 있다. 또한, 유전적 제거 또는 특정 siRNA 단편에 의한 HDAC6의 불활성화는 종양 변환에 대한 저항성을 증가시키고 시험관 및 생체 내 실험 모두에서 사람 유방 및 자궁암 세포주의 성장을 감소시킨다고 보고되었다(Sakuma *et al.*, *Int J Oncol* 29:117-124, 2006).
- [0006] 하지만, 아직까지 HDAC6 억제를 통한 자가면역성 근염의 예방 및 치료 효과에 대해서는 알려진 바가 없다.
- [0007] 이에, 본 발명자들은 정상 면역시스템을 유지하면서 효과적인 근염 치료제를 개발하고자 예의 노력한 결과, HDAC6 유전자의 발현 억제 및 단백질의 활성을 억제하면 근세포의 미토콘드리아 기능이 보호되는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0008]

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 HDAC6 유전자의 발현 억제제 또는 HDAC6 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 근염의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 근염의 예방 또는 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 HDAC6 유전자의 발현 억제제 또는 HDAC6 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 근염의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명은 또한, (a) HDAC6을 발현하는 세포에 HDAC6 유전자 발현 억제 또는 HDAC6 단백질의 활성 억제 후보물

질을 처리하여, HDAD6 유전자 발현 또는 HDAD6 단백질의 활성을 측정하는 단계; (b) 상기 HDAD6 유전자 발현 억제 또는 HDAD6 단백질의 활성 억제 후보물질 처리군의 미토콘드리아 단백질의 발현을 측정하는 단계; 및 (c) 후보물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여, HDAD6 유전자 발현 또는 HDAD6 단백질의 활성은 억제되고, 미토콘드리아 단백질의 발현은 억제되지 않은 후보물질을 근염의 예방 또는 치료제로 선별하는 단계를 포함하는 근염의 예방 또는 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 HDAC6 억제제를 유효성분으로 포함하는 근염의 예방 또는 치료용 조성물은 면역시스템과 직접 관련이 없는 HDAC6 억제를 통하여, 근세포의 미토콘드리아 기능을 보호할 수 있어, 면역억제제의 부작용 없이 근염을 효과적으로 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 HDAC6를 발현하는 생쥐(WT)와 발현하지 않는 생쥐(KO)에서 근육 손상에 의한 염증을 확인한 결과이다.
 도 2는 HDAC6를 발현하는 생쥐(WT)와 발현하지 않는 생쥐(KO)에서 근육 손상 및 염증에 의한 근세포 미토콘드리아 DNA 수를 비교한 결과이다.
 도 3은 HDAC6를 발현하는 생쥐(WT)와 발현하지 않는 생쥐(KO)에서 근육 손상 및 염증에 의한 근세포 미토콘드리아 단백질 발현을 확인한 결과이다.
 도 4는 손상된 C2C12 근육세포에 HDAC6 특이적 억제제인 Tubastatin A를 처리한 후, 미토콘드리아 단백질 발현을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0016] 본 발명에서는 HDAC6 유전자의 발현을 siRNA 또는 화합물로 억제하거나, HDAC6 특이적인 억제제인 Tubastatin A를 이용하여 효소 기능을 억제한 결과, 근세포의 미토콘드리아 기능이 손상되지 않고, 동시에 염증이 억제되는 것을 확인하였다. 이는, 현재 근염 치료에 사용되고 있는 면역억제제와는 달리 면역시스템과 직접 관련이 없는 HDAC6 유전자 억제를 통하여 근육 세포 미토콘드리아를 보호함으로써 정상 면역시스템을 유지하면서 근염 치료가 가능하다. 현재 근염 치료에 사용되는 면역억제제의 경우 전체 면역체계를 억제하여 부작용이 상당하다. 그러나, 본 발명의 HDAC6 억제는 완전히 제거해도 큰 문제가 없이 안전한 근염 치료가 가능하다.

[0017] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 HDAC6 유전자의 발현 억제제 또는 HDAC6 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 근염의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 유전자의 발현 억제제는 HDAC6에 특이적인 siRNA인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 단백질의 활성 억제제는 HDAC6에 특이적인 억제제인 Tubastatin A인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명에 있어서, 상기 HDAC6 유전자의 발현 억제제 또는 HDAC6 단백질 활성 억제제는 미토콘드리아 기능 손상을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 근염은 자가면역성 근염인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0022] 본 발명은 다른 관점에서, (a) HDAD6을 발현하는 세포에 HDAD6 유전자 발현 억제 또는 HDAD6 단백질의 활성 억제 후보물질을 처리하여, HDAD6 유전자 발현 또는 HDAD6 단백질의 활성을 측정하는 단계; (b) 상기 HDAD6 유전자 발현 억제 또는 HDAD6 단백질의 활성 억제 후보물질 처리군의 미토콘드리아 단백질의 발현을 측정하는 단계;

및 (c) 후보물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여, HDAC6 유전자 발현 또는 HDAC6 단백질의 활성은 억제되고, 미토콘드리아 단백질의 발현은 억제되지 않은 후보물질을 근염의 예방 또는 치료제로 선별하는 단계를 포함하는 근염의 예방 또는 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

[0023] **[실시예]**

[0024] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0025] **실시예 1: HDAC6 발현 억제를 통한 근육손상에 의한 염증 억제**

[0026] 본 실시예에서는 HDAC6 발현이 억제된 마우스(Lee *et al.*, *EMBO J.* 3;29(5):969-80, 2010)의 근육을 손상시켜 염증 반응을 분석함으로써, HDAC6이 근육 손상에 의한 염증 반응에 미치는 영향을 확인하였다.

[0027] 마우스 20g의 무게당 7.5mg의 Avertin (#T4840-2, Sigma-Aldrich)으로 HDAC6 Wild type(WT)과 Knock-out(KO) 마우스를 마취하여 1 μ M의 Cardiotoxin (CTX) (C9759, Sigma)을 각각 앞 정강근육(Tibialis anterior: TA)에 찔러, 근육 손상에 의한 염증을 유도한 3일후에 TA 근육을 취해 100 mg의 TA 근육 당 2 ml의 10% 포르말린 용액에 보관하였다.

[0028] TA 근육을 Histo cassette에 넣고 1시간 넘게 흐르는 물에 포르말린 용액을 씻어준 다음, 조직 프로세서 장비를 이용하여 하루 동안 파라핀을 침투를 시켰다. 포매(embedding)된 TA 근육을 포매(embedding) 센터 장비를 이용하여 틀에 파라핀을 가득 채워 포매된 TA 근육을 고정시켜 굳히면서 파라핀 블록을 제작하고, 마이크로톰 장비를 이용하여 파라핀 블록을 절편하여 40 $^{\circ}$ C 물에 두어 절편한 TA 근육을 꺼준 다음, 슬라이드 글라스에 건져서 물기를 말린 후에, 60 $^{\circ}$ C plate에 슬라이드 글라스를 올려 30분 동안 파라핀을 녹였다. 헤마톡실린(hematoxylin)과 에오신(eosin) 염색 (헤마톡실린-1% 암모니아-에오신-70% 에탄올-85% 에탄올-100% 에탄올-50% 자일렌-100% 자일렌의 단계)을 하고 커버 슬라이드에 마운팅 용액을 한 방울 떨어뜨리고 조직이 있는 슬라이드 글라스를 덮은 후, 염색을 한 TA 근육을 역상 현미경으로 관찰하였다.

[0029] 그 결과, WT 마우스에 비해 HDAC6 유전자가 녹아웃된 KO 마우스에서 염증이 억제된 것을 확인할 수 있었다(도 1).

[0030] **실시예 2: HDAC6 발현 억제를 통한 미토콘드리아 기능 분석**

[0031] 본 실시예에서는 HDAC6 발현 억제가 근육내 미토콘드리아 기능을 보호함으로써, 근육 손상에 의한 염증이 억제되는 것을 확인하였다.

[0032] **2-1 : 미토콘드리아 DNA 분석**

[0033] 상기 실시예 1과 같이, HDAC6 WT과 KO 마우스를 CTX로 근육을 손상시킨 후, 염증이 유도된 마우스의 TA 근육을 취하여 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 또한, 대조군으로 근육이 손상되지 않은 HDAC6 WT과 KO 마우스의 TA 근육을 사용하였다.

[0034] 페놀-클로로포름 DNA 추출법으로 TA 근육으로부터 총 DNA(genomic DNA 및 미토콘드리아 DNA)를 추출하고, Nucleo DNA 프라이머(서열번호 1: 5'-ATGGAAGCCTGCCATCATG-3' 및 서열번호 2: 5'-TCCTTGTGTTTCAGGATCAC-3')와 미토콘드리아 DNA 프라이머(서열번호 3: 5'-CCTATCACCTTGCCATCAT-3' 및 서열번호 4: 5'-GAGGCTGTGCTGTGTGAC-3')를 사용하여 실시간 PCR로 DNA의 수를 측정하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C 10분 (Pre-denaturation) 후, 95 $^{\circ}$ C 10초 (Denaturation), 60 $^{\circ}$ C 20초(Annealing), 72 $^{\circ}$ C 30초(Extension)를 40 cycle 수행하고, 72 $^{\circ}$ C 5분으로 반응시켰다.

[0035] 그 결과, CTX로 염증이 유도된 WT 마우스가 HDAC6 KO마우스에 비해, 미토콘드리아 DNA 수가 훨씬 감소한 것을 확인하였다. 즉, HDAC6 억제가 미토콘드리아 DNA 감소를 억제하여 근육 손상에 의한 염증 또한 억제하는 것을

확인하였다(도 2).

[0036] **2-2 : 미토콘드리아 단백질 분석**

[0037] 상기 실시예 2-1의 -80℃에 보관되어 있는 HDAC6를 발현하는 마우스(WT) 및 HDAC6 KO 마우스의 TA 근육을 1X PBS, 100X 포스파타제 저해제, 100X 프로테아제 저해제 버퍼와 비드(1.0mm)를 이용하여 균질화(homogenize)를 시켰다. 상등액을 취한 뒤, 상등액의 1/10의 양으로 10X Detergent (1% SDS, 10% NP-40)을 넣고 4℃에서 15분 동안 rolling시키며 반응시켰다. 10% SDS-PAGE 겔에서 80V로 30분 후, 100V로 1시간 동안 전기영동을 하였다. 전기영동 한 10% SDS-PAGE 겔을 PVDF 멤브레인으로 100V 에서 1시간 동안 트랜스퍼하고 미토콘드리아 항체 (MS604, Abcam)로 4℃에서 1차 반응을 하루 동안 수행하고, 1X PBT로 10분 간격으로 3번 세척한 뒤, 항-마우스 항체 (18-8817-33, Rockland)로 1시간 동안 2차 반응을 수행한 후, 다시 1X PBT로 10분 간격으로 3번 세척한다. 상기와 같은 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하여 미토콘드리아 단백질 발현을 확인하였다.

[0038] 그 결과, HDAC6가 억제되면 근육 손상에도 불구하고, 미토콘드리아 단백질 complex I~V의 발현에 변화 없이 근육내 미토콘드리아 기능이 보호되는 것을 확인하였다(도 3). 즉, 근육내 미토콘드리아 기능 보호에 의해 염증이 억제되었다.

[0039] **실시예 3: HDAC6 발현이 억제된 근육세포에서 손상에 의한 미토콘드리아 단백질 발현 분석**

[0040] 본 실시예에서는 근육세포에 HDAC6 억제제를 처리한 후, 근육 손상에 의한 세포내 미토콘드리아 발현 변화를 측정하였다.

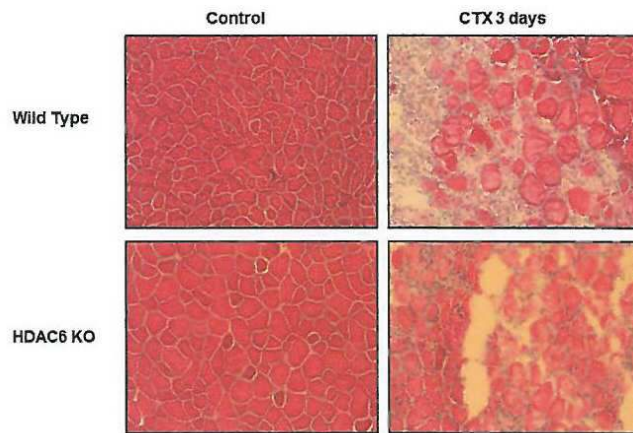
[0041] 10% FBS, 1% Antibiotic-Antimycotic(15240-062, Gibco)가 포함된 DMEM Media (SH30243.01, Hyclone)로 배양한 C₂C₁₂ 근육세포 그룹(Lane 1-4), 3일 동안 2% horse serum (Donor equine serum 0250, SH30074.03, Hyclone)과 1% Antibiotic-Antimycotic(15240-062, Gibco)가 포함된 DMEM Media로 배양하여 분화시킨 C₂C₁₂ 근육세포 그룹(Lane 9-12) 및 상기 조건으로 분화시키는 동안 배양 2일째 HDAC6 특이적 억제제인 Tubastatin A를 1μM 처리한 C₂C₁₂ 근육세포 그룹 (Lane5-8)으로 나누어 배양하였다. 상기 3가지 그룹에 1μM CTX을 시간 별로 처리하여 근육세포를 손상시켰으며, C₂C₁₂ 근육세포를 150mM NETN buffer (4M NaCl, 1M Tris (pH8.0), 0.5M EDTA, 0.5% NP-40)로 Lysis 한 뒤, 실시예 2-2의 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하여 미토콘드리아 complex I~V 단백질의 발현을 확인하였다.

[0042] 그 결과, HDAC6 특이적 억제제인 Tubastatin A를 처리하지 않고 분화시킨 C₂C₁₂ 근육세포 그룹(Lane 9-12)에서는 미토콘드리아 단백질 발현이 감소한 것으로 나타났으나, HDAC6 특이적 억제제인 Tubastatin A를 처리한 그룹 (Lane5-8)은 미토콘드리아 단백질 발현에 변화가 없는 것을 확인 할 수 있었다(도 4). 즉, HDAC6가 억제되면 근육 손상에도 불구하고, 미토콘드리아 단백질 complex I~V의 발현에 변화 없이 근육내 미토콘드리아 기능이 보호되는 것을 알 수 있었다.

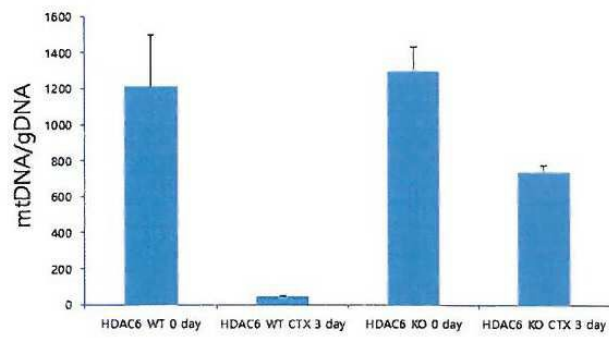
[0043] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

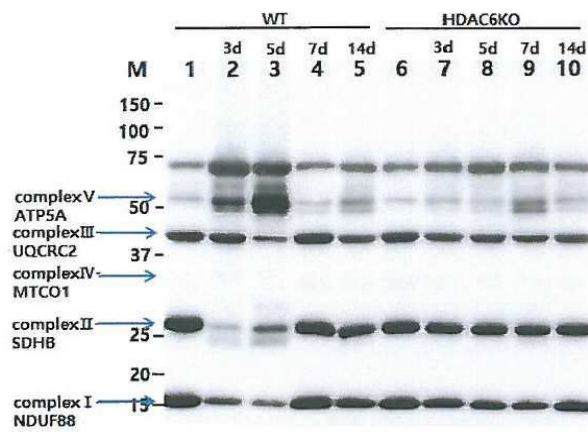
도면1



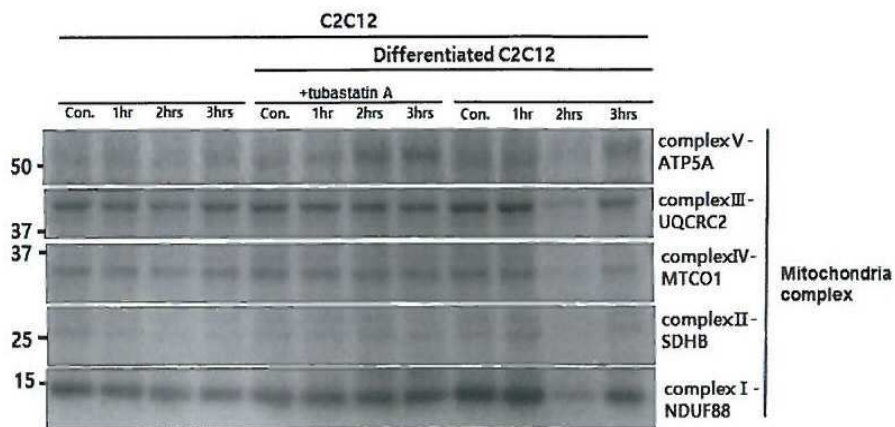
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Composition for Preventing or Treating Myositis Comprising HDAC6 Inhibitor

<130> P14-B282

<160> 4

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nDNA f

<400> 1

atggaaagcc tgccatcatg 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nDNA r

<400> 2

tccttggtgt tcaggatcac 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mtDNA f

<400> 3

cctatcaccc ttgccatcat

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mtDNA r

<400> 4

gaggctgttg cttgtgtgac

20