(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월13일
(11) 등록번호 10-2178944
(24) 등록일자 2020년11월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/11 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61K 36/8988 (2006.01) *A61P 33/10* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/11 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0114631
(22) 출원일자 2019년09월18일
심사청구일자 2019년09월18일
(56) 선행기술조사문헌
Molecules, 19, 5898-5912, 2014.
US20120245112 A1
Sci. Rep., 7:14192, 2017.
Biomolecules and Therapeutics, 16(3), 231-236, 2008.

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
육재민
대전광역시 중구 문화로 266, 감염생물학 123호(문화동)
이진아
대전광역시 중구 문화로 266, 감염생물학 123호(문화동)
(74) 대리인
김원준

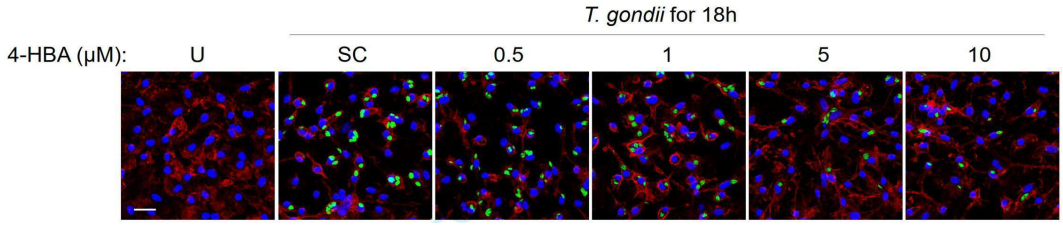
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 **4-하이드록시벤즈알데하이드를 포함하는 톡소포자충 감염증의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)의 감염 및 세포 내 증식을 억제하는 효과가 있어, 약제나 건강식품, 동물 사료 등에 유용하게 사용할 수 있는 톡소포자충 감염증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 4-하이드록시벤즈알데하이드를 유효성분으로 함유하는 톡소포자충 감염증의 예방 또는 치료/증상 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61K 36/8988 (2013.01)
A61P 33/10 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2250/21 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2018M2A2B3A02072071
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 방사선기술개발사업(R&D)
연구과제명 신규화합물 적용 난치성 염증질환 전임상적 치료 효능 연구
기 여 율 40/100
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2018.07.18 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017R1A5A2015385
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터지원사업(MRC)
연구과제명 감염 제어 컨버전스 연구센터
기 여 율 35/100
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2017.06.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2019R1C1C1004431
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업신진연구
연구과제명 세포내 기생병원체 톡소포자충과 마이코박테리움 압세수스 복합체의 감염에 대한 SIRT1의 숙주방어기전 규명과 이를 활용한 치료적 적용가능성 분석
기 여 율 25/100
과제수행기관명 충남대학교(의대)
연구기간 2019.03.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

4-하이드록시벤즈알데하이드를 유효성분으로 함유하는 톡소포자충 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 4-하이드록시벤즈알데하이드는 천마 추출물에 함유되어 있는 형태인 것을 특징으로 하는 톡소포자충 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

포유동물, 어류 또는 가금류에 적용되는 것을 특징으로 하는 톡소포자충 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

4-하이드록시벤즈알데하이드를 유효성분으로 함유하는 톡소포자충 감염증의 예방 또는 증상 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 4-하이드록시벤즈알데하이드는 천마 추출물에 함유되어 있는 형태인 것을 특징으로 하는 톡소포자충 감염증의 예방 또는 증상 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

청구항 4 또는 청구항 5에 있어서,

포유동물, 어류 또는 가금류에 적용되는 것을 특징으로 하는 톡소포자충 감염증의 예방 또는 증상 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)의 감염 및 세포 내 증식을 억제하는 효과가 있어, 약제나 건강식품, 동물 사료 등에 유용하게 사용할 수 있는 톡소포자충 감염증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 톡소포자충은 세계적으로 가장 광범위한 인수공통 병원체 중 하나이다. 톡소포자충은 고양이를 종숙주로 하며,

고양이의 배설물을 통해 외부로 퍼진다. 고양이의 분변에 포함된 난포낭(oocyst)으로 오염된 물, 야채, 과일 등을 직접 섭취하거나, 이를 먹고 감염된 돼지, 양, 소 등을 중간숙주로 하여 인체에 감염된다. 전 세계적으로 10~30%의 감염률을 보이며 특히 유럽과 북미에서 높은 유행이 보고되었다. 우리나라에서도 혈청검사에서 일반 국민의 2~8%가 항체양성인 것으로 보고되고 있다.

[0003] 톡소포자충의 주요 침범 조직은 림프선, 망막, 뇌 등으로 인체에 감염되면 망막변성, 뇌수막염, 림프절염 등을 일으킬 수 있으나, 약독주 감염의 경우에는 우려할 만한 임상적인 증상을 나타내지 않고 장기간 경과할 수 있다. 그러나 면역이 결핍되어 있는 임산부, 어린아이, 장기이식 및 혈액이식 환자, AIDS 환자에게는 심각한 전신성 기회감염성 질환을 일으킨다. 임산부가 임신 제2 또는 제3분기에 톡소포자충에 의해 일차 감염되었을 때 충체가 태반을 통해 태아를 감염시키고 태아에게 선천적 톡소포자충증을 일으킨다. 신생아 시기에 무증상으로 지낼 수도 있으나, 수년 후 중추 신경계 침범의 합병증이 나타나기도 한다. 일부 임산부의 경우에는 사산, 조산 또는 유산되는 경우도 있다.

[0004] 톡소포자충은 인간 수지상 세포나 대식세포, 호중구와 같은 선천 면역세포에서도 생존 및 복제가 가능하도록 숙주의 면역 방어 반응을 회피하는 다양한 전략을 발전시켜왔다. 이 때문에 현재까지 톡소포자충 감염에 대한 만족스러운 약제는 아직 알려져 있지 않으며, 스피라마이신(spiramycin) 또는 항말라리아제인 피리메타민(pyrimethamine)과 설파제인 설폰아미드(sulfonamide)를 병용 투여하여 호전을 기대한다. 그러나 스피라마이신은 효과가 약하여 치료보다는 예방 목적으로 쓰이고 있다. 피리메타민은 임산부에게는 투여가 금지되어 있고, 골수부전이나 간독성 같은 잠재적 부작용이 보고되어 있으며, 설폰아미드와 병용 투여 시 혈소판이 감소하거나, 표피와 점막의 박리를 주요 증상으로 하는 스티븐스 존슨 증후군이 부작용으로 나타날 수 있어 보다 안전한 치료제의 개발이 시급하다. 이에, 보다 안전한 톡소포자충 감염증의 예방 및 치료를 위하여 천연물을 이용한 약제의 개발이 활발하게 이루어지고 있다.

[0005] 4-하이드록시벤즈알데하이드(4-HBA)는 한방에서 약초식물로 사용되는 천마(Gastrodiae Rhizoma)의 생활성 성분 중 하나이다. 천마는 우리나라를 비롯하여 중국, 일본에 분포하는 다년생 초본으로, 주로 덩이줄기를 약재로 사용하며 적전, 즉 줄기도 약으로 쓰는 경우가 있다. 4-HBA는 항당뇨(공개특허 제10-2011-0006921호), 항산화(공개특허 제10-2018-0086807호), 혈행 개선(등록특허 제10-1625476호) 및 인지기능 활성화(공개특허 제10-2013-0083544호) 효과를 갖는 것이 알려져 있다. 본 발명자들은 DSS(dextran sodium sulfate)에 의해 유도된 대장염에 대해 4-HBA가 면역 관용과 과다 염증 반응을 조절하는 것에 의해 예방 효과를 나타냄을 보고한 바 있다(Cell Physiol Biochem, 2019. 52(5): p. 1117-1138).

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 공개특허 제10-2011-0006921호

(특허문헌 0002) 공개특허 제10-2018-0086807호

(특허문헌 0003) 등록특허 제10-1625476호

(특허문헌 0004) 공개특허 제10-2013-0083544호

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Cell Physiol Biochem, 2019. 52(5): p. 1117-1138

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 천연물 유래로 장기간 사용에 대한 안전성이 확보되어 있으면서, 톡소포자충의 감염 및 세포내 증식을 억제하는 활성이 있어 톡소포자충 감염증의 예방 또는 치료/증상개선에 유용하게 사용할 수 있는 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 4-하이드록시벤즈알데하이드(4-HBA, 4-hydroxybenzaldehyde)를 유효성분으로 함유하는 톡소포자충 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0010] 4-HBA는 톡소포자충의 감염과 세포 내 증식을 억제하는 효능이 있어, 톡소포자충 감염증의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다. 4-HBA는 천마의 주요 활성성분 중 하나로, 상기 4-HBA는 유기합성에 의해 제조되거나 천마와 같이 4-HBA를 함유하는 천연물로부터 분리/정제된 단일 화합물의 형태일 수 있다. 혹은 정제된 상태가 아닌 천마 추출물과 같이 4-HBA를 함유하는 천연물의 가공물로서 4-HBA가 함유된 조성물일 수도 있다.

[0011] 본 발명의 조성물로 치료할 수 있는 개체로는 인간을 비롯하여 고양이, 돼지, 소와 같은 포유류, 잉어 및 금붕어 등의 어류, 닭, 오리, 꿩 등의 가금류를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0012] 상기 약학 조성물은 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 발명에서 상기 '약제학적으로 유효한 양'이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 예방 또는 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 유효 용량 수준은 질병의 종류, 예방 또는 치료에 대한 투여의 목적, 질병의 중증도, 연령, 성별, 체중, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에서 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 단독 또는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 동시에 혹은 순차적으로 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있을 것이다.

[0013] 본 발명은 또한 4-HBA를 유효성분으로 함유하는 톡소포자충 감염증의 예방 또는 증상 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다. 건강기능식품 조성물 역시 분리/정제된 단일화합물의 형태인 4-HBA를 유효성분으로 함유할 수도 있으나, 정제된 상태가 아닌 천마 추출물과 같이 4-HBA를 함유하는 천연물의 가공물로서 4-HBA가 함유된 조성물일 수도 있다.

[0014] 본 발명의 건강기능식품이 적용될 수 있는 개체로는 인간을 비롯하여 고양이, 돼지, 소와 같은 포유류, 잉어 및 금붕어 등의 어류, 닭, 오리, 꿩 등의 가금류를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특히 종숙주인 고양이나, 중간숙주인 돼지, 소, 양 등에서 항톡소포자충 활성이 있는 본 발명의 조성물을 투여하는 경우, 단순히 동물의 질병을 줄이는 것 뿐 아니라, 이들로 인한 인체의 감염을 차단할 수 있어 매우 유용하다.

[0015] 본 발명의 조성물은 정제, 캡슐제, 분말제, 환제 또는 액제 등의 형태로 가공될 수 있으며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합체, 건강기능성 식품류, 동물용 사료, 사료보조제 등을 예로 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 건강기능식품 조성물의 유효용량은 상기 약학적 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있다.

발명의 효과

[0016] 이상과 같이 본 발명의 조성물은 대체의학에서 오랫동안 사용되어 오던 천마의 활성성분 중 하나인 4-HBA를 유효성분으로 하는 것으로 장기 안전성이 확보되어 있어, 보다 안전하게 사용할 수 있다.

[0017] 또한 본 발명의 조성물의 유효성분인 4-HBA는 톡소포자충의 감염 뿐 아니라, 일단 감염되었을 경우 세포 내 증식을 억제하기 때문에 단순히 감염증의 증세를 완화하는 것에 그치지 않고, 톡소포자충 감염증을 근본적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 4-HBA의 세포독성의 평가 결과를 보여주는 그래프.

도 2는 4-HBA의 항톡소포자충 활성을 보여주는 공초점 현미경 사진.

도 3은 4-HBA의 톡소포자충 감염 억제 활성을 보여주는 그래프.

도 4는 4-HBA의 세포 내 증식 억제 활성을 보여주는 그래프.

도 5는 4-HBA의 톡소포자충 관련 유전자 발현에 대한 영향을 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0020] **[실시예]**

[0021] **실시예 1 : 세포배양 및 골수유래 대식세포의 분화**

[0022] 야생형 C57BL/6 마우스는 코아텍(평택, 한국)에서 구입하였다. 마우스의 골수로부터 대식세포를 수집하고, 대식세포 콜로니 자극인자(macrophage colony-stimulating factor), 10% fetal bovine serum(FBS), 1% Antibiotic-Antimycotic(Gibco™ Antibiotic-Antimycotic (100X); Gibco BRL)가 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 5~7일 배양하여 분화시켰다.

[0023] 인간 망막 색소 상피세포주인 ARPE-19(ATCT, Manassas, VA, USA)는 10% FBS와 1% Anbitiotic-Antimycotic이 함유된 DMEM/F-12(Welgene) 배지에서 배양하였다.

[0024] **실시예 2 : 톡소포자충의 준비**

[0025] 녹색 형광 단백질이 발현되는 tachyzoites 단계의 톡소포자충(GFP-RH strain)은 Dr. Yoshifumi Nishikawa(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan)에서 제공받았다. 톡소포자충 강독주인 RH strain 또는 톡소포자충 GFP-RH strain의 tachyzoites는 ARPE-19세포에 5 MOI로 감염시킨 후 5% CO_2, 37℃ 배양기에서 2~3일간 배양하였다. 숙주세포의 파열이 일어나면 숙주세포 파편과 톡소포자충을 PBS(phosphate buffered saline)을 이용하여 씻어주었다. 최종 펠렛을 차가운 DMEM 배지에 현탁시킨 후 26 게이지 바늘과 5 ㎛ pore size polycarbonate membrate(Millipore, Billerica, MA, USA)을 수차례 통과시켜 ARPE-19 세포를 제거하였다.

[0026] **실시예 3 : 4-HBA의 세포독성 평가**

[0027] 실시예 1에서 준비한 골수유래 대식세포(5×10^4 cells/well, BMDMs, Bone marrow-derived macrophages)에 배지를 교환한 후 실험군으로 4-HBA(Sigma-Aldrich)를 10, 50, 100, 500 또는 1000 μM 농도로 처리하거나 대조군으로서 에탄올을 0.1% 농도로 처리하여 18 또는 48시간 동안 5% CO_2, 37℃ 배양기에서 배양하였다. 이하 실시예에서 4-HBA 시료는 최소량의 에탄올에 용해시켜 스톡용액을 제조한 후 배지로 희석하여 준비하였다. 배양된 세포는 Cell Count Kit(CCK, Dojindo Molecular Technologies) 8을 이용하여 제조자의 매뉴얼에 따라 비색 분석법에 의해 세포 생존율을 측정하였다. 도 1은 그 결과를 보여주는 그래프로 50μM 이상을 처리하는 경우에는 세포 생존력이 유의하게 감소하였으나, 10 μM 농도에서는 세포독성을 나타내지 않아 안전하게 사용할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0028] **실시예 4 : 공초점 현미경을 이용한 4-HBA의 항톡소포자충 활성 평가**

[0029] 22 mm glass coverslip에 분화된 골수유래 대식세포(1.6×10^5 cells/well)을 접종시킨 후 배지를 교환하고, 톡소포자충 GFP-RH strain을 1MOI로 감염시켜 2시간 처리하였다.

[0030] 이후 실험군으로 4-HBA(Sigma-Aldrich)를 0.5, 1, 5, 또는 10 μM 농도로 처리하거나 대조군으로서 에탄올을 0.1% 농도로 처리하여 5% CO_2, 37℃ 배양기에서 배양하였다. 18시간 배양 후 상층액을 제거하고 coverslip을 PBS로 세척한 후 4% 파라포름알데하이드로 10분간 처리하여 세포를 고착시키고, 0.25% Triton X-100을 10분간 처리하여 투과성을 올려주었다. Texas Red®-X phalloidin(Life Technologies Corporation) 133과 4′ 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma)를 사용하여 세포 골격의 F-actin과 핵을 염색시킨 후 공초점 현미경(confocal laser scanning microscopy, Leica TCS SP8)을 이용하여 골수유래 대식세포에 감염된 톡소포자충의 개체수를 확인하였다.

[0031] 도 2는 공초점 현미경 관측 이미지이며, 도 3은 공초점 현미경을 통해 감염된 세포 수를 측정하여 나타낸 그래프이다. 도 4는 감염된 세포에서 1개, 2개, 4개, 8개 및 16개의 톡소포자충을 갖는 공포(vacuole)를 계산한 후

백분율로 나타낸 그래프이다. 공포 내 톡소포자충이 16개 이상 증식할 경우에는 2차 감염을 유도하는 것으로 알려져 있다.

[0032] 도 2와 도 3은 4-HBA를 5 μM 이상의 농도로 처리하면 톡소포자충에 감염된 세포가 유의하게 감소함을 보여준다. 도 4는 4-HBA를 10 μM 농도로 처리하였을 때 대조군과 비교하여 4개의 톡소포자충을 갖는 공포가 유의적으로 감소하고, 8개 및 16개의 톡소포자충을 갖는 공포는 관측되지 않음을 보여준다. 5 μM 농도로 처리하였을 때에도 16개의 톡소포자충을 갖는 공포는 관측되지 않았다. 이는 4-HBA가 골수유래 대식세포에서 톡소포자충의 감염은 물론 세포 내 톡소포자충의 증식에 대해서도 억제효과를 나타내고, 2차 감염을 예방할 수 있음을 시사한다.

[0033] **실시예 5 : qPCR을 이용한 4-HBA의 항톡소포자충 활성 평가**

[0034] 분화된 골수유래 대식세포(1×10^5 cells/well)을 접종시킨 후 배지를 교환하고, 톡소포자충 GFP-RH strain을 1MOI로 감염시켜 2시간 처리하였다.

[0035] 이후 실험군으로 4-HBA(Sigma-Aldrich)를 0.5, 1, 5, 또는 10 μM 농도로 처리하거나 대조군으로서 에탄올을 0.1% 농도로 처리하여 5% CO_2, 37℃ 배양기에서 배양하였다. 16시간 배양 후 상층액을 제거하고 세포에 Trizol을 500 ㎕ 넣고 에펜도르프 튜브에 옮긴 후 클로로폼을 100 ㎕ 첨가하여 10초간 볼텍스 믹싱하였다. 혼합액을 13000 rpm에서 10분간 원심분리하고, 상층액 200 ㎕를 새로운 튜브에 옮겨 담았다. 옮겨담은 상층액에 이소프로판올을 200 ㎕ 첨가하고 실온에서 10분간 방치한 후 13000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 펠렛에 70% 에탄올을 1 ㎖ 첨가하고 13000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 잔류하는 에탄올을 건조시켰다. 건조된 잔사에 DEPC(diethyl pyrocarbonate)로 처리된 물 40 ㎕를 넣어 RNA를 녹인 후 reverse transcriptase premix를 활용하여 cDNA를 합성하였다.

[0036] PowerUP SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)를 사용하여 제조자의 매뉴얼에 따라 cDNA로부터 SAG1(surface antigen 1) mRNA의 발현을 실시간 중합효소 연쇄반응 분석(qPCR)을 통해 분석하여 톡소포자충의 분열 증식을 확인하였다. SAG1 mRNA 발현의 분석을 위해 사용한 프라이머의 서열은 다음 표 1과 같다.

표 1

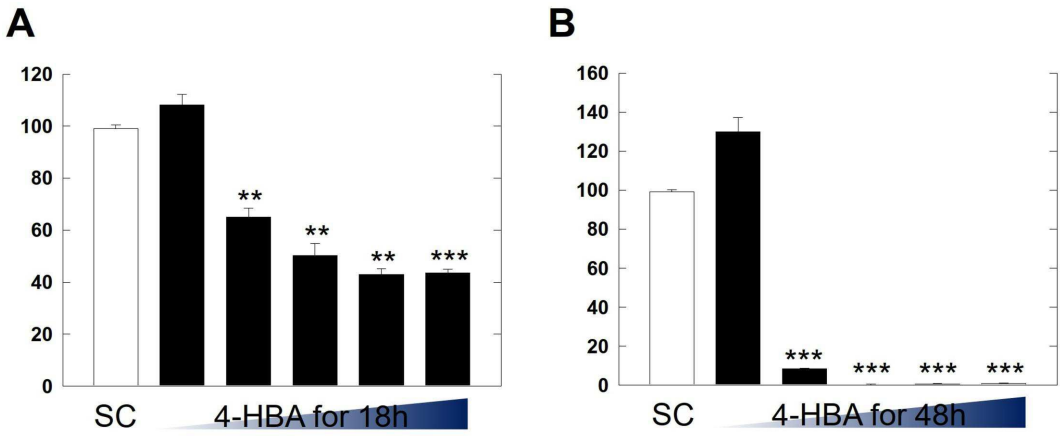
[0037]

forward	5′-ATCGCCTGAGAAGCATCACT-3'	서열번호 1
reverse	5′-GCGAAAATGGAAACGTGACT-3′	서열번호 2

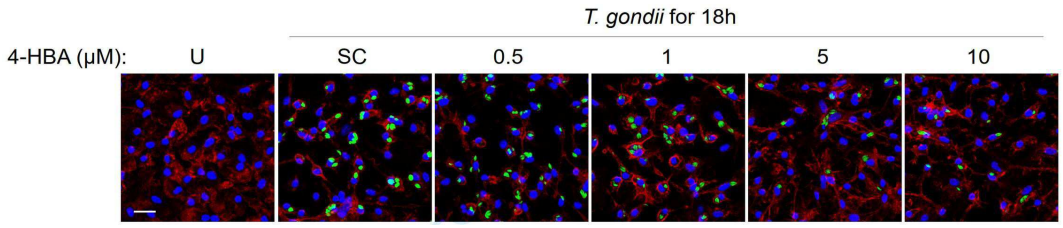
[0038] 도 5는 qPCR 분석 결과를 나타낸 그래프로, 4-HBA 처리농도에 의존적으로 SAG1 mRNA의 발현이 감소하였으며, 공초점 현미경을 이용한 실시예 4의 결과와 마찬가지로 4-HBA 처리 농도가 5 μM 이상인 경우 유의적인 감소를 나타내었다.

도면

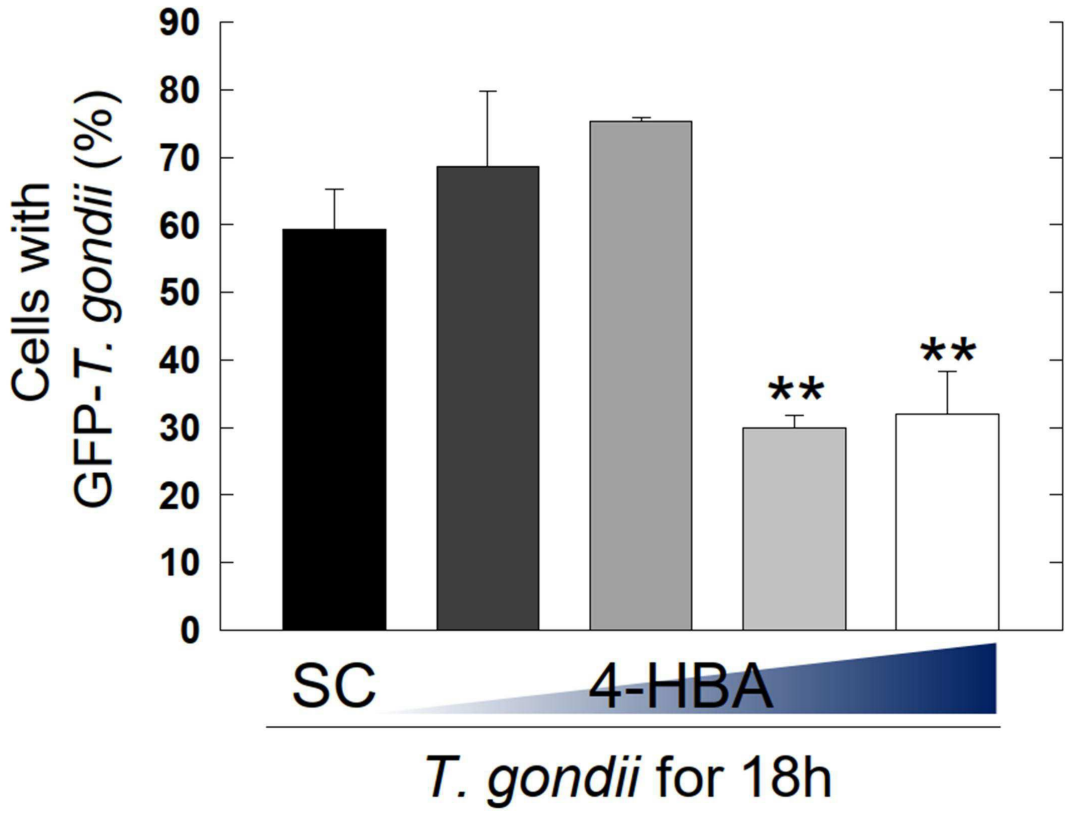
도면1



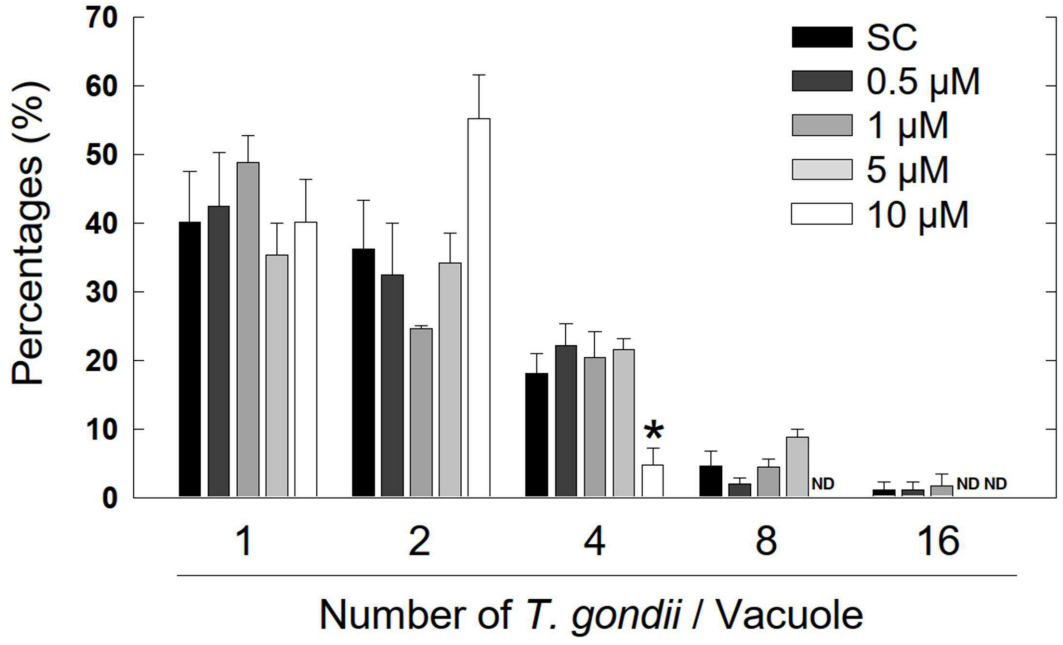
도면2



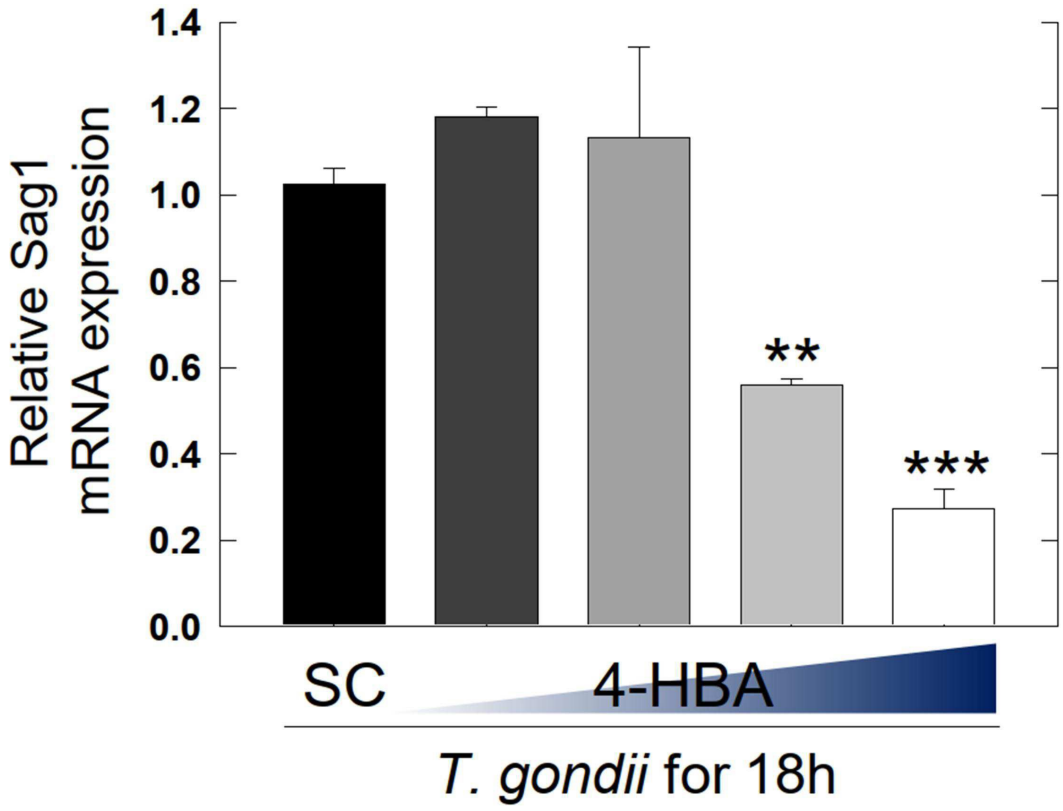
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록

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

<120> Composition for Preventing or Treating Toxoplasma gondii Infection Comprising 4-hydroxybenzaldehyde

<130> P0919-401

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

atcgcctgag aagcatcact 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

gcgaaaatgg aaacgtgact 20