(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0018171
(43) 공개일자 2021년02월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/202 (2006.01) *A23L 33/12* (2016.01)
A23L 33/17 (2016.01) *A61K 38/43* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 33/02* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/202 (2013.01)
A23L 33/12 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0153128(분할)
(22) 출원일자 2020년11월16일
심사청구일자 2020년11월16일
(62) 원출원 특허 10-2019-0094887
원출원일자 2019년08월05일
심사청구일자 2019년08월05일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
육재민
대전광역시 중구 문화로 266, 감염생물학 123호(문화동)
임규
대전광역시 중구 문화로 266, 감염생물학 123호(문화동)
이은진
대전광역시 중구 문화로 266, 감염생물학 123호(문화동)
(74) 대리인
김원준

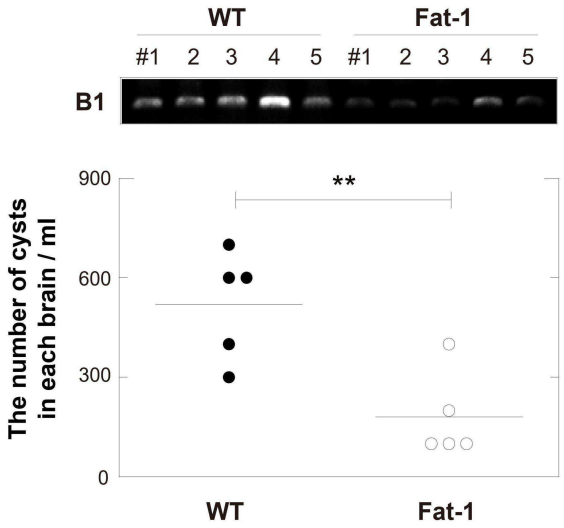
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **오메가-3 지방산으로의 전환을 유도하는 Caenorhabditis elegans fat-1효소를 포함하는 항톡소포자충 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)의 증식 및 생존을 억제하는 효과가 있어, 약제나 건강식품, 동물 사료 등에 유용하게 사용할 수 있는 항톡소포자충 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 오메가-6 지방산에서 오메가 3-지방산으로의 전환을 유도하는 효소인 *Caenorhabditis elegans* fat-1을 유효성분으로 함유하는 항톡소포자충 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
A23L 33/17 (2016.08)
A61K 38/43 (2013.01)
A61K 48/005 (2013.01)
A61P 33/02 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711111501
과제번호 2017R1A5A2015385
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터지원사업(MRC)
연구과제명 감염제어컨버전스연구센터
기 여 율 1/2
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2017.06.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711107624
과제번호 2019R1C1C1004431
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구-신진연구
연구과제명 세포내 기생병원체 톡소포자충과 마이코박테리움 압세수스 복합체의 감염에 대한 SIRT1의 숙주방어기전 규명과 이를 활용한 치료적 적용가능성 분석
기 여 율 1/2
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2019.03.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

오메가-6 지방산에서 오메가-3 지방산으로의 전환을 유도하는 효소인 *Caenorhabditis elegans* fat-1을 유효성분으로 함유하는 항톡소포자충 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 효소를 코딩하는 유전자의 형태로 제공되는 것을 특징으로 항톡소포자충 약학 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 유전자는 발현벡터 내에 포함된 형태로 제공되는 것을 특징으로 하는 항톡소포자충 약학 조성물.

청구항 4

오메가-6 지방산에서 오메가-3 지방산으로의 전환을 유도하는 효소인 *Caenorhabditis elegans* fat-1을 유효성분으로 함유하는 항톡소포자충 건강기능식품 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

동물용 항톡소포자충 건강기능식품 조성물인 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)의 증식 및 생존을 억제하는 효과가 있어, 약제나 건강식품, 동물 사료 등에 유용하게 사용할 수 있는 항톡소포자충 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 오메가-3 다중불포화 지방산(ω3-PUFAs, omega-3 polyunsaturated fatty acids, 이하, '오메가-3 지방산'이라 함)은 건강 및 신체 항상성 유지를 위해 반드시 필요하지만 체내에서는 합성되지 않고 음식물로 섭취하여야만 하는 필수 영양소이다. 오메가-3 지방산은 인체 내에 존재하는 양은 극소량이나, DHA(docosahexaenoic acid)와 EPA(eicosapentaenoic acid)가 다양한 생리활성을 갖는 것으로 알려지면서 많은 관심을 받고 있다. 이들을 제외한 오메가-3 지방산은 생리활성이 매우 낮거나 존재하지 않는 것으로 알려져 있다. DHA와 EPA로 특징되는 오메가-3 지방산이 많은 관심을 받으면서, 임상 및 역학 연구에서 우울증, 주의력 결핍 과다 활동 장애, 편집증 및 치매와 같은 다양한 정신 질환을 비롯하여 망막 퇴행성 질환, 자가면역 질환, 신장 및 비뇨기 질환, 남성형 탈모증, 당뇨 및 과트리글리세라이드 혈증, 유아발달, 암, 심혈관 질환에 유익한 효과가 있음이 보고되었다(공개특허 제10-2012-0039521호).

[0003] Fat1 형질전환 마우스는 오메가-6 지방산으로부터 오메가-3 지방산을 합성할 수 있도록 하는 오메가-3 지방산

불포화화 효소를 코딩하는 유전자 *Caenorhabditis elegans* fat-1을 발현한다. Fat1 형질전환 마우스에서 체내 생산되는 오메가-3 지방산 중에서 DHA와 EPA 및 알파리놀렌산(ALA)의 함량이 높은 것으로 알려져 있다. 이 마우스는 급성 폐 손상, 화학적으로 유도된 대장염, 간염 및 췌장염을 포함한 점막 장기 손상 모델에서 조직 내 오메가-3 지방산의 함량이 높은 것이 확인되었으며, 항염증 반응 역시 더욱 강력하다. 박테리아 및 바이러스에 의한 감염성 질환에서 오메가-3 지방산이 면역조절 활성을 갖는 것이 보고되기도 하였다.

[0004] 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. 전세계적으로 10~30%의 감염률을 보이며 특히 유럽과 북미에서 높은 유행이 보고되었다. 우리나라에서도 혈청검사에서 일반 국민의 2~8%가 항체양성인 것으로 보고되고 있다.

[0005] 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 일차감염되었을 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.

[0006] 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, 항말라리아제인 pyrimethamine과 설파제인 sulfonamide를 병용 투여하여 호전을 기대한다. 그러나 pyrimethamine은 임산부에게는 투여가 금지되어 있고, 골수부전이나 간독성 같은 잠재적 부작용이 보고되어 있으며, 병용 투여 시 표피와 점막의 박리를 주요 증상으로 하는 스티븐스 존슨 증후군이 부작용으로 나타날 수 있어 보다 안전한 치료제의 개발이 시급하다. 이에, 보다 안전한 톡소포자충의 감염 예방 및 치료를 위하여 생강 추출물(공개특허 제10-2012-0017971호), 차전초 추출물(등록특허 제10-1710588호)과 같이 천연물을 이용한 약제의 개발이 활발하게 이루어지고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 공개특허 제10-2012-0039521호

(특허문헌 0002) 공개특허 제10-2012-0017971호

(특허문헌 0003) 등록특허 제10-1710588호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 동물은 물론 인체에 안전성이 확보되어 있으면서도, 톡소포자충에 대한 직접적인 항원충 활성을 나타내어 항톡소포자충 감염으로 인한 질병의 예방 및 치료/증상개선용 조성물로 유용하게 사용할 수 있는 항톡소포자충 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 오메가-6 지방산에서 오메가-3 지방산으로의 전환을 유도하는 효소인 *Caenorhabditis elegans* fat-1을 유효성분으로 함유하는 항톡소포자충 약학 조성물에 관한 것이다.

[0010] 오메가-3 지방산은 톡소포자충의 분열증식을 억제하는 효능이 있어, 톡소포자충 감염 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

[0011] 오메가-3 지방산은 체내에서 생합성이 되지 않아 음식물로부터 섭취해야만 하는 필수 영양소이다. 본 발명의

항독소포자충 약학 조성물은 오메가-3 지방산 그 자체가 조성물에 함유될 수도 있으나, 체내에서 오메가-3 지방산의 생합성이 가능하도록 오메가-6 지방산에서 오메가-3 지방산으로의 전환을 유도하는 효소를 유효성분으로 함유하여도 좋다. 또는 *Caenorhabditis elegans* fat-1 유전자와 같이 상기 효소를 코딩하는 유전자의 형태로 제공될 수 있다. 상기 유전자는 DNA, RNA 또는 PNA를 포함한다. 상기 유전자는 발현벡터 내에 포함된 형태로, 상기 발현벡터를 당업계에서 공지된 다양한 방법으로 감염 또는 형질도입하여 발현형으로 표적 세포 내에 도입시킬 수 있다.

[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 오메가-6 지방산에서 오메가 3-지방산으로의 전환을 유도하는 효소인 *Caenorhabditis elegans* fat-1을 유효성분으로 함유하는 항독소포자충 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태로 가공될 수 있으며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합체, 건강기능성 식품류 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. 본 발명의 조성물은 각종 식품을 통해 섭취해오던 오메가-3 지방산이 활성 성분이므로 장기간 복용시에도 부작용의 우려 없이 안전하게 사용할 수 있다.

[0014] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 인체 뿐 아니라 동물용 건강기능식품으로 사용될 수 있다. 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. 본 발명의 건강기능식품 조성물로 사용되는 경우 사료용 첨가제로 사료 제조 시 혼합하여 제조하거나, 혹은 별도의 제형으로 제조하여 사료와 혼합하여 투여하거나 사료의 탑 드레싱으로 제공할 수 있다.

발명의 효과

[0015] 이상과 같이 본 발명에 의하면 식품에 함유된 성분으로 장기간 복용에 따른 안전성이 확보된 오메가-3 지방산을 유효성분으로 작용하므로 임산부나 어린아이들에게도 안전하게 사용할 수 있다.

[0016] 또한 본 발명의 조성물에서 유효성분인 오메가-3 지방산은 종래 기술에 의해 알려진 오메가-3 지방산의 유용활성인 항염 활성 등에 의해 톡소포자충 감염으로 인한 질병의 증세를 완화하는 것에 그치지 않고, 톡소포자충의 분열 증식을 직접적으로 억제하므로 톡소포자충 감염으로 인한 질병을 보다 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 DHA의 시험관 내 항톡소포자충 활성을 보여주는 공초점 현미경 사진.

도 2는 DHA의 시험관 내 항톡소포자충 활성을 보여주는 그래프.

도 3은 DHA가 항톡소포자충 관련 단백질과 유전자의 발현에 미치는 영향을 보여주는 전기영동 사진 및 그래프.

도 4는 오메가-3 지방산의 시험관 내 항톡소포자충 활성을 보여주는 공초점 현미경 사진.

도 5는 오메가-3 지방산의 시험관 내 항톡소포자충 활성을 보여주는 그래프.

도 6은 오메가-3 지방산이 항톡소포자충 관련 단백질과 유전자의 발현에 미치는 영향을 보여주는 전기영동 사진 및 그래프.

도 7은 생체 내 실험에서 오메가-3 지방산의 항톡소포자충 활성을 보여주는 전기영동 사진 및 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 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.

[0019] **[실시예]**

[0020] **실시예 1 : 톡소포자충의 준비**

[0021] 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 GFP-RH strain의 Tachyzoites는 nutrient mixture F-12, 10% FBA, 1% Antibiotic-Antimycotic이 포함된 DMEM 배지를 이용하여 ARPE-19(adult retinal pigment epithellium cell line, ATCC, Manassas, VA, USA) 세포에서 5% CO_2, 37℃ 배양기에서 배양하며 유지하였다.

[0022] **실시예 2 : 세포배양 및 골수유래 대식세포의 분화**

[0023] 야생형 C57BL/6 마우스는 코아텍(평택, 한국)에서 구입하였으며, ω3-PUFAs을 발현하는 Fat1 형질전환 마우스는 Dr. J. X. Kang(Harvard Medical School, USA)에서 제공받았다. 각 마우스의 골수로부터 대식세포를 수집하고, 대식세포 콜로니 자극인자(macrophage colony-stimulating factor), 10% FBS, 1 mM 소디움 피루베이트(solium pyruvate), 50 U/mL 페니실린, 50 ㎍/mL 스트랩토마이신, 5×10^{-5}M 베타-머캅토에탄올이 포함된 배지에서 5~7일 배양하여 분화시켰다.

[0024] **실시예 3 : DHA의 항톡소포자충 활성 평가**

[0025] 골수유래 대식세포(BMDMs, Bone marrow-derived macrophages)를 숙주세포로 사용하여 녹색형광 단백질이 발현되는 톡소포자충 1개가 골수유래 대식세포 1개에 감염될 수 있도록 톡소포자충을 1 MOI로 2시간 처리한 후, DHA(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)를 각각 5, 10 또는 20 μM로 처리하여 배양하였다.

[0026] DHA 처리 18시간 후, 공초점 현미경(confocal micoscopy)을 이용하여 골수유래 대식세포에 감염된 녹색형광 단백질이 발현되는 톡소포자충의 개체수를 확인하였다. 도 1과 도 2는 그 결과를 도시한 것으로, 골수유래 대식세포에서 DHA가 농도 의존적으로 톡소포자충의 증식을 억제함을 확인할 수 있었다.

[0027] DHA 처리 48 시간 후, Immunity 2015, 43, 80-91에 기재된 방법에 따라 톡소포자충의 p30 막 단백질 TP3의 발현을 웨스턴 블랏으로, SAG1(surface antifen 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

[0028]

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

[0029] 도 3은 면역블랏 및 qPCR 분석 결과를 나타낸 것으로, DHA 처리 농도가 증가함에 따라 TP3 단백질 및 SAG1 mRNA의 발현이 감소하여 DHA가 세포 내 톡소포자충의 분열 증식을 억제함을 확인할 수 있었다.

[0030] **실시예 4 : Fat1 형질전환 마우스를 이용한 오메가-3 지방산의 *in-vitro* 항톡소포자충 활성평가**

[0031] Fat1 형질전환 마우스와 야생형의 마우스의 골수로부터 각각 수집하여 분화한 골수유래 대식세포에 녹색형광 단백질이 발현되는 톡소포자충을 1MOI의 농도로 감염시켰다. 이후 배양 시간에 따라 공초점 현미경으로 골수유래 대식세포에 감염된 녹색형광 단백질이 발현되는 톡소포자충의 개체수를 확인하고 그 결과를 도 4와 도 5에 도시

하였다. 도 4와 도 5에서 확인할 수 있듯이 야생형 마우스에서 수집하여 배양한 골수유래 대식세포에서 보다 Fat1 형질전환 마우스에서 수집하여 배양한 골수유래 대식세포에서 톡소포자충의 개체수가 유의적으로 적은 것을 확인할 수 있었다.

[0032] 톡소포자충의 감염 후 실시예 3과 동일한 방법에 의해 배양 시간에 따라 면역블랏 분석 및 qPCR을 통해 톡소포자충의 분열 증식을 확인하였다. 도 6은 면역블랏과 qPCR 분석 결과를 도시한 것으로, 도 4 및 도 5의 결과와 마찬가지로 야생형에 비해 Fat1 마우스 유래의 골수유래 대식세포에서 TP3 단백질 및 SAG1 mRNA의 발현이 감소한 것을 확인할 수 있다. 이는 오메가-3 지방산이 세포 내 톡소포자충의 분열 증식을 억제함을 보여준다.

[0033] **실시예 5 : Fat1 형질전환 마우스를 이용한 오메가-3 지방산의 *in-vivo* 항톡소포자충 활성평가**

[0034] 야생형 마우스와 Fat1 형질전환 마우스 각각 5마리에 톡소포자충(typw II ME49 strain)의 포낭(cyst) 40개를 복강내 주사하였다. 3주 후 각각의 마우스의 뇌규질 현탁액(brain homogenates)에서 G-DEXTM IIc for Cell/Tissue Genomic DNA Extraction Kit(iNtRON)를 사용하여 사용자 매뉴얼에 따라 genomic DNA를 추출하고 톡소포자충의 특이적인 유전자인 B1 유전자의 발현을 하기 표 2의 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭하는 한편, 톡소포자충 포낭의 개수를 확인하였다.

표 2

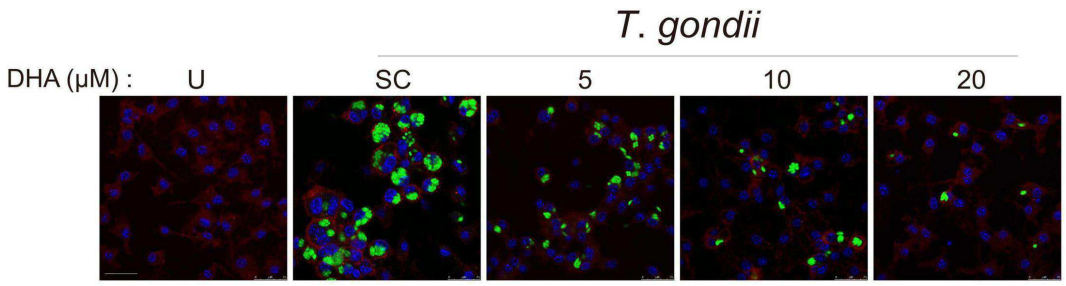
[0035]

forward	5'-GGAACTGCATCCGTTCATGAG-3'	서열번호 3
reverse	5'-TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3'	서열번호 4

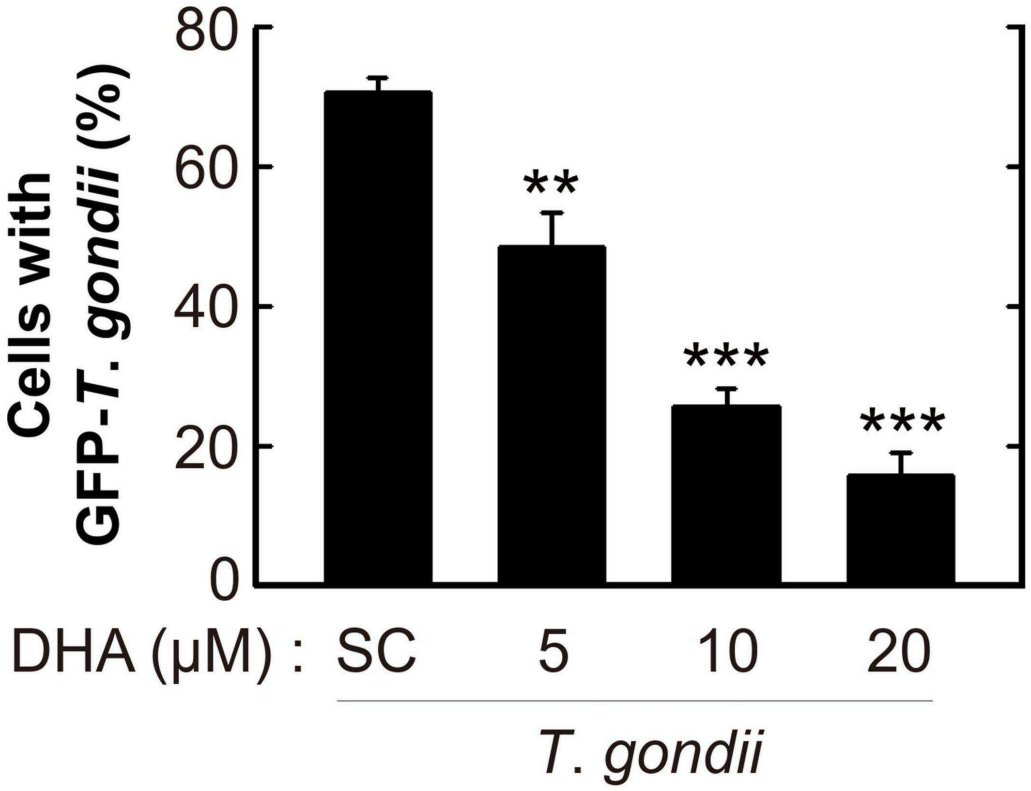
[0036] 도 7은 그 결과를 도시한 것으로 Fat1 형질전환 마우스에서 B1 유전자의 genomic DNA 발현과 톡소포자충의 포낭수가 야생형 마우스에 비해 현저하게 감소한 것을 보여준다.

도면

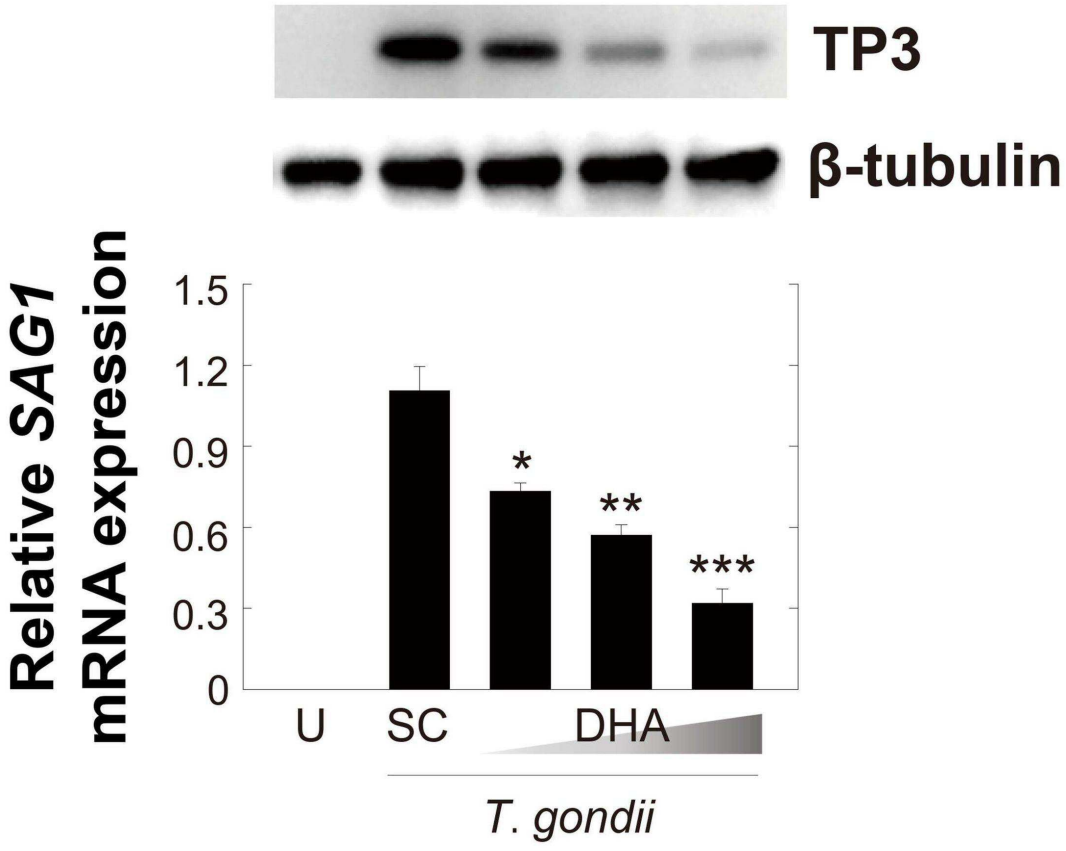
도면1



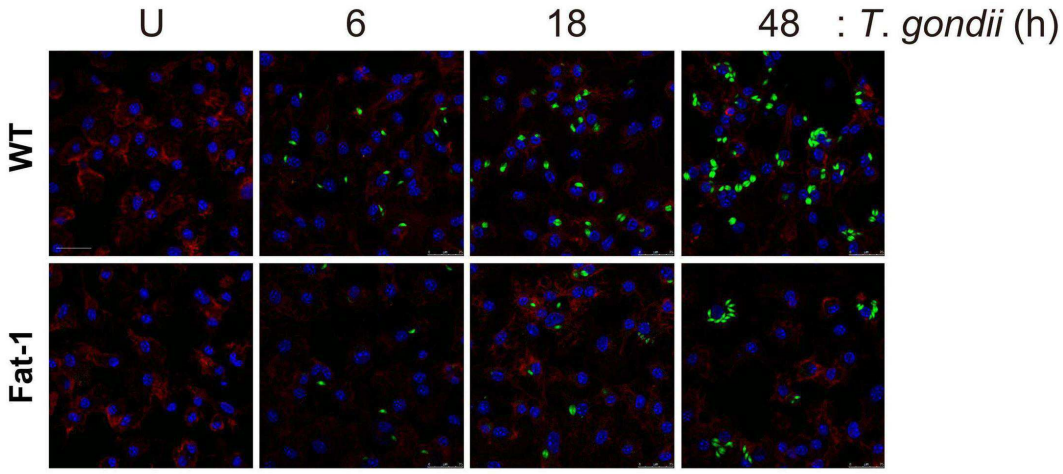
도면2


Cells with GFP-T. gondii (%)
80
60
40
20
0
**
***
***
DHA (μM) : SC 5 10 20
T. gondii

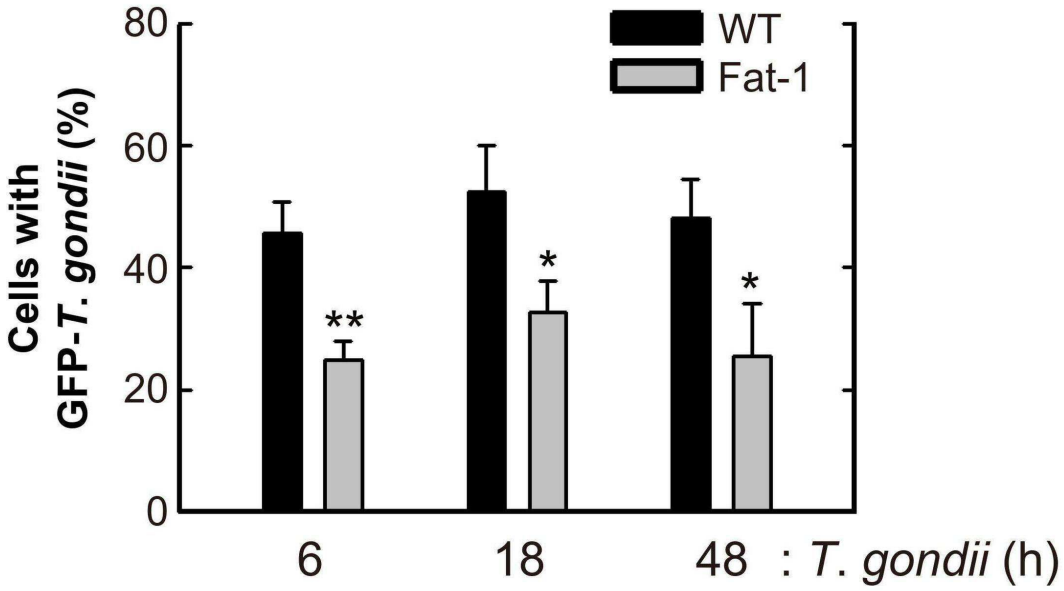
도면3


TP3
β-tubulin
Relative SAG1 mRNA expression
1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0
*
**
***
U SC DHA
T. gondii

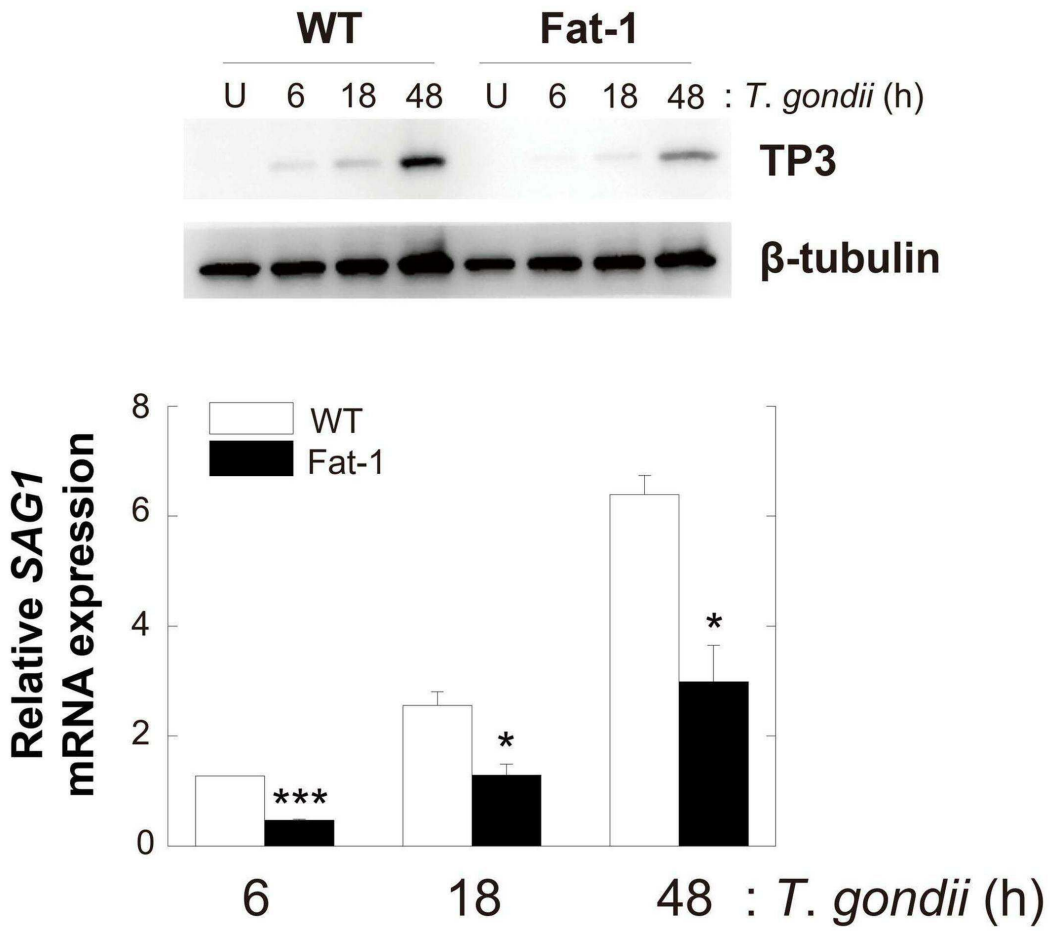
도면4


U
6
18
48 : T. gondii (h)
WT
Fat-1

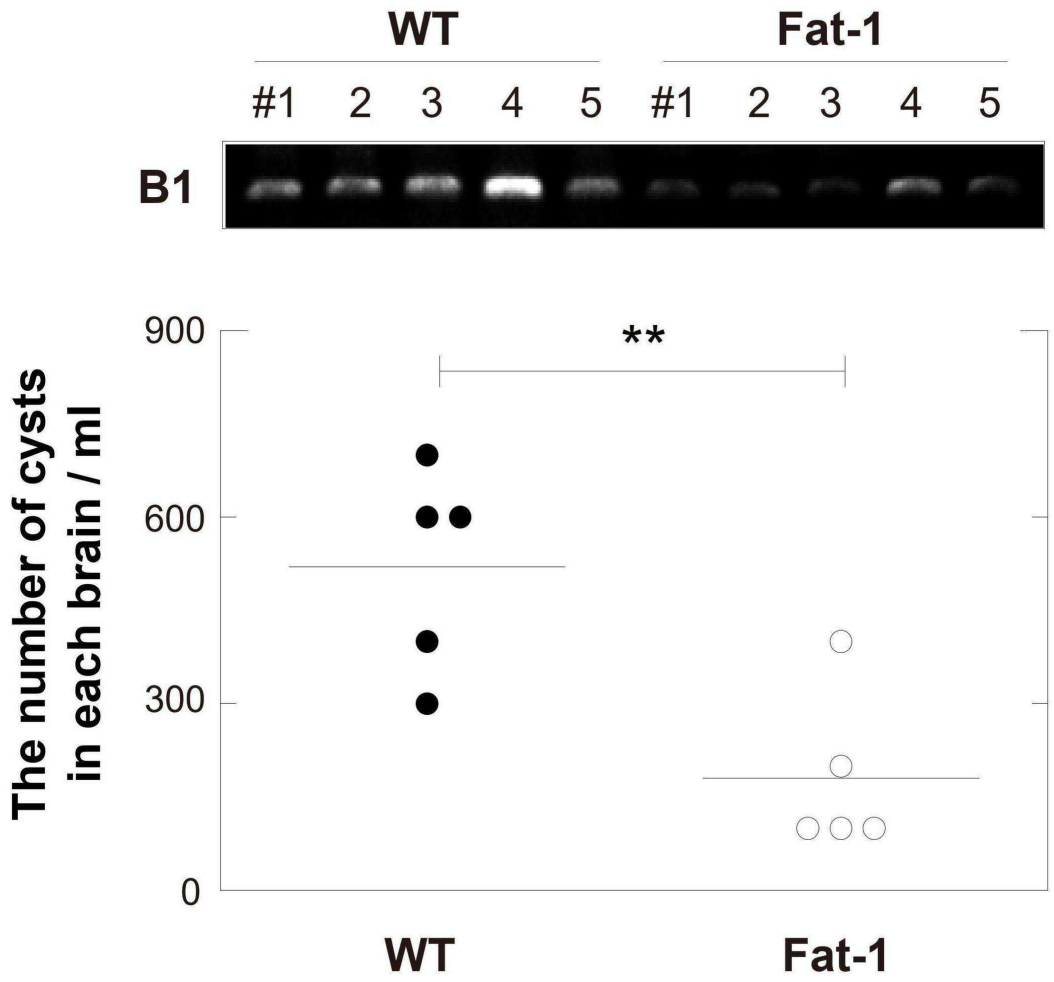
도면5


Cells with GFP-T. gondii (%)
80
60
40
20
0
WT
Fat-1
**
*
*
6
18
48 : T. gondii (h)

도면6


WT
Fat-1
U 6 18 48 U 6 18 48 : T. gondii (h)
TP3
β-tubulin
Relative SAG1 mRNA expression
WT
Fat-1
8
6
4
2
0
***
*
*
6
18
48 : T. gondii (h)

도면7



서 열 목 록

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

<120> Anti-Toxoplasma Composition Comprising Caenorhabditis elegans fat-1 which Induces Conversion to Omega-3 Fatty Acid

<130> P1120-393

<160> 4

<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

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

ggaactgcat ccgttcatga g 21

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

tctttaaagc gttcgtggtc 20