(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0005240
(43) 공개일자 2012년01월16일

(51) Int. Cl.
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 15/86* (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0065876
(22) 출원일자 2010년07월08일
심사청구일자 2010년07월08일

(71) 출원인
한양대학교 산학협력단
서울특별시 성동구 왕십리로 222, 한양대학교 내 (행당동, 과학기술관A동)
(72) 발명자
채영규
서울특별시 성동구 성수일로8길 47, 롯데캐슬파크 107-2202 (성수동2가, 경비실-1)
백미나
서울특별시 금천구 독산로24길 29 (시흥동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다울

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 제2알데하이드 탈수소효소의 발현을 억제하는 인공 마이크로 RNA 및 이의 이용

(57) 요 약

본 발명은 제2알데하이드 탈수소효소(ALDH2)의 발현 또는 작용을 억제하는 인공 마이크로 RNA(amiRNA) 및 이의 이용에 관한 것이다. 본 발명에 따른 amiRNA 를 이용한 RNA 간섭(RNA interference) 현상을 통해, 알코올 분해와 관련이 있는 ALDH2 유전자의 발현 또는 ALDH2 단백질의 작용을 억제함으로써 알코올 의존 질환을 치료 및/또는 예방할 수 있다.

대 표 도 - 도2

(72) 발명자

이형태

충청남도 연기군 전동면 금이로 109-18

정경화

경기도 안산시 상록구 한양대학로 86 (사동)

최미란

경기도 성남시 분당구 이매로123번길 12, 101동 201호 (이매동, 이매포스파크)

최인근

서울특별시 서초구 방배중앙로 207-10, 아크로리버 101동 601호 (방배동, 방배아크로리버)

박경선

경기도 안산시 단원구 선부광장1로 9, 주공아파트 1411동 206호 (선부동, 군자주공아파트)

이병철

서울특별시 강남구 자곡동 440-53

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 3200900000000694

부처명 보건복지가족부

연구관리전문기관

연구사업명 보건의료기술연구개발사업

연구과제명 siRNA 기술을 이용한 알코올 의존 관련 유전자의 기능 분석

기여율

주관기관 보건복지가족부(한림대학교산학협력단)

연구기간 2009년 04월 01일 ~ 2010년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

제2알데하이드 탈수소효소(ALDH2)의 발현 또는 작용을 억제하는, 서열번호 1 내지 4로 구성되는 군으로부터 선택되는 인공 miRNA(amiRNA).

청구항 2

제1항의 amiRNA를 코딩하는 유전자.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 5 내지 8로 구성되는 군으로부터 선택되는 DNA인 유전자.

청구항 4

제1항의 amiRNA를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 5 내지 8로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인, 재조합 발현벡터.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 발현벡터는 렌티바이러스벡터, 레트로바이러스벡터 및 아데노바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 재조합 발현벡터.

청구항 7

제4항의 재조합 발현벡터로 형질전환된 세포.

청구항 8

제2알데하이드 탈수소효소(ALDH2)의 발현 또는 작용 억제제를 유효성분으로 포함하는 알코올 의존 예방 및 치료용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 ALDH2의 발현 또는 작용 억제제는 i) ALDH2 유전자의 전사 또는 번역을 억제하는 amiRNA 또는 ii) 상기 amiRNA를 코딩하는 유전자인, 알코올 의존 예방 및 치료용 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 ALDH2의 발현 또는 작용 억제제는 ALDH2 특이적 siRNA 또는 shRNA인, 알코올 의존 예방

및 치료용 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 ALDH2유전자의 전사 또는 번역을 억제하는 amiRNA는 서열번호 1 내지 4로 구성되는 군으로부터 선택되는 amiRNA인, 알코올 의존 예방 및 치료용 조성물.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 amiRNA를 코딩하는 유전자는 서열번호 5 내지 8로 구성되는 군으로부터 선택되는 DNA인, 알코올 의존 예방 및 치료용 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 제2알데하이드 탈수소효소(Aldehyde dehydrogenase-2; ALDH2)의 발현 또는 작용을 억제하는 인공 마이크로 RNA 및 이를 이용하여 알코올 의존 질환을 예방 및/또는 치료하는 것에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은, RNA 간섭 기술(또는 microRNA 기술)을 이용하여 알코올 분해와 관련이 있는 ALDH2의 발현 또는 작용을 억제함으로써 알코올 의존을 예방 및/또는 치료하기 위한 유전자 치료제에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 알코올 의존(alcohol dependence)이란 지속적이고 반복적인 과도한 음주로 인해 신체적, 정신적 및 사회적 기능이 손상되는 만성 질환을 의미하며, 알코올 의존은 질병의 한 종류로 간주된다.

[0003] 알코올 의존은 정신분열증, 우울증과 더불어 병상 점유율이 높으며, 치료받은 알코올 의존 환자의 30-50%가 3개월 내에 재발하는 질환이다. 특히 우리나라의 알코올 중독 평생 유병률은 21.98%로 다른 나라보다 높은 실정이다(송현종, 보건복지부, 2004).

[0004] 알코올 의존 환자 치료를 위해 화학적 약물이 주로 사용되고 있다. 예를 들면, 다이설피람(Disulfiram)은 체내에서 알코올을 분해하여 생성되는 아세트알데하이드를 분해하는 효소인 알데하이드 디하이드로제나아제(aldehyde dehydrogenase)의 활성을 저해하는 저해제이다. 효소 활성의 결과로 생성되는 아세트알데하이드가 체내에 축적되어 빈맥, 홍조, 오심, 구토 등의 부작용이 나타난다. 즉, 다이설피람은 아세트알데하이드에 의한 부작용을 극대화시켜, 자발적인 음주 행위를 억제시킨다. 이를 "알코올 혐오 치료"라고 한다. 그러나 다이설피람은 간독성이 있어 최근에는 그 사용이 급격하게 줄어들고 있는 추세이다.

[0005] 또 다른 알코올 중독 치료제인 날트렉손(Naltrexone)이나 아캄프로세이트(Acamprosate)는 다이설피람에 비해 효과는 좋으나 부작용이 보고되어 있어 알코올 의존 환자들에게 제한적으로 사용되고 있다.

[0006] 보다 원천적이고 항구적인 알코올 의존 질환의 치료 방법을 개발해야 하는 필요성이 대두되고 있다. 즉, 부모로부터 전달받은 고유한 유전자의 발현을 인위적으로 낮추어 줌으로써, 원천적인 알코올 치료 효과를 나타내는 것이다.

[0007] 알코올이 체내에 섭취되면 ADH(alcohol dehydrogenase)에 의해 알코올이 아세트알데하이드로 분해되고, 이 아세트알데하이드는 미토콘드리아에서 ALDH2에 의해 아세테이트로 분해된다. 이 ALDH2*2 유전자를 가지고 있는 사람들의 경우, 아세트알데하이드 분해가 활발하지 못하여, 아세트알데하이드가 체내에 많이 남기 때문에 아세트알데하이드의 독성 영향으로 많은 양의 음주를 못하게 된다. 이러한 유전인자를 갖는 사람들의 경우, 알코올 섭취를 많이 못하기 때문에 궁극적으로 알코올 남용이나 알코올 중독과 같은 알코올 의존 질환 발생 확률이 정상인보다 약 6배 정도 낮다고 보고되어 있다(Kim et al., *Human Molecular Genetics*, 2008, Vol. 17, No. 6, 854-858; Edenberg & Foroud, *Addiction biology*, 2006, sep;11(3-4), 386-396).

[0008] 만약 부모로부터 정상적으로 물려받은 ALDH2를 RNA 간섭기술을 이용하여 인위적으로 낮게 발현시키면 알코올 의존을 치료할 수 있을 것이다. 즉 인위적으로 건강한 사람의 ALDH2를 ALDH2*2 형태로 만들어, 알코올 의존을 치료할 수 있을 것이다.

[0009] 포스트 게놈 시대에 작은 RNA(small RNAs)는, 새로운 유전자 발현 조절 인자로 각광받고 있다. 작은 RNA는 단백질을 암호화시키지 않는 쓰레기 DNA 서열로 여겨지던 부위에서 생성된다. 작은 RNA는 단백질을 생성하지 않고 그 분자 자체가 RNAi(RNA interference, RNA 간섭) 또는 microRNA 수행 조절(micro RNA-mediated regulation)로 알려진 기작에 의해 서열 특이적으로 타겟 유전자의 발현을 억제한다. 그리하여 이러한 RNA 간섭 또는 microRNA 기술은 새로운 유전자 치료법으로 관심을 받고 있는 기술 중의 하나이다.

[0010] 대표적인 작은 RNA인 siRNA와 miRNA는 dsRNA(double strandRNA)-특이적 endonuclease인 RNase III 그룹에 속하는 다이서(Dicer) 효소가 dsRNA 전구체를 잘라내는 과정에서 생성된다.

[0011] siRNA는 약 21개의 뉴클레오티드로 구성된 dsRNA로 약 19개의 염기쌍과 3' 쪽에 존재하는 2개의 뉴클레오티드 돌출 부위들로 구성된다. 이 3' 돌출 부위는 RNAi 과정에서 중간 매개체로 기능한다. siRNA는 트랜스포존(transposon), 바이러스 또는 생체 내 유전자로부터 길이가 긴 dsRNA가 만들어지거나 외부에서 인위적으로 dsRNA를 세포 내로 주입했을 때 생성된다.

[0012] miRNA는 세포 내에서 자연적으로 만들어지는데, 단백질을 생성하는 유전정보를 갖지 못한 RNA이다. miRNA의 형성 과정은 다음과 같다. 핵에서 유전자에 의해 일차 miRNA(primary miRNA)로 전사된 후 드로샤(drosha)에 의해 절단되어 짧은 머리핀(short hairpin) 형태의 전구체 miRNA(precursor miRNA)가 되고, 이후 핵에서 세포질로 이동한다. 세포질 내에서 리보뉴클라아제의 일종인 다이서(dicer) 효소에 의하여 전구체 miRNA의 작은 줄기 루프가 절단되면서 단일가닥의 miRNA로 성숙된다.

[0013] siRNA는 RISC(RNA-Induced Silencing Complex)를 통해 RNA의 분해를 유도하여 유전자 기능을 억제하는 반면, miRNA는 mRNA의 번역을 방해하는 과정-표적 mRNA의 3'-UTR(untranslated region)의 염기서열에 상보적으로 결합하여 리보솜에서 mRNA가 단백질로 번역되는 과정을 억제-을 통해 유전자 기능을 억제한다.

[0014] 초기의 RNAi관련 연구는 대부분 합성 siRNA(double stranded RNA oligonucleotide)를 이용하였는데, 합성 siRNA를 이용한 RNAi는 시험관 내에서 표적 염기서열에 대한 dsRNA를 직접 세포에 핵산전달 감염(transfection)시킴으로써 단시간 내에 특정 핵산서열에 의한 유전자 발현 억제 효과를 스크리닝할 수 있다는 장점이 있다. 그러나 합성 siRNA는 반감기가 짧아 유전자 발현 억제 효과가 2~3일 정도만 유지되므로, 지속적인 항바이러스 효과를 나타내기 위해서는 다량의 합성 dsRNA를 반복 주입하여야 하는 문제점이 있다.

[0015] shRNA(short hairpin RNA)를 이용한 RNAi의 경우, 합성 dsRNA를 직접 주입하는 대신 헤어핀 구조의 단일가닥 RNA를 전사하는 플라스미드 DNA를 이용하며, 세포 안으로 주입된 DNA로부터 전사된 shRNA는 microRNA와 유사한 처리 과정을 거쳐 최종적으로 siRNA로 변환된다. 구체적으로 shRNA를 이용한 RNAi의 경우, RNA 폴리머라아제 III 프로모터로 조절되는 플라스미드가 표적세포의 핵에서 pre-miRNA와 유사한 루프를 가지는 단일 가닥 RNA로 전사된 후, Exportin-5에 의하여 세포질로 이동하여 다이서에 의한 처리 과정을 거치면서 siRNA로 변환된다.

[0016] 앞서 언급한 바와 같이, 상기 언급한 shRNA를 세포 내에서 발현시키기 위해, 인위적으로 상기 shRNA를 발현할 수 있는 DNA를 재조합하여 세포 내에 주입한다. 이후 세포 내에 존재하는 miRNA의 발현기작에 의해 이 shRNA가 세포 내에서 발현됨으로써 타겟 유전자의 발현이 억제된다. 이러한 RNA를 "인공 miRNA(artificial microRNA , 이하 'amiRNA'라고 함)"라 부르기도 한다.

[0017] shRNA의 경우, 세포 내에 주입된 DNA가 잔존하는 동안 계속적으로 shRNA의 전사가 일어나므로 siRNA보다 오래 RNAi가 유지된다. 그러나 네이키드 플라스미드(naked plasmid)로부터 shRNA가 전사되려면 표적 세포의 핵으로 플라스미드가 이동하여야 하므로, 활발히 분열하는 세포에서만 플라스미드의 핵 내 전달이 가능하다. 또한, 주입된 외래 DNA는 다양한 경로로 세포 내에서 비활성화되어 장기적인 발현을 기대하기 어려운 문제점이 있다.

[0018] RNA 간섭(또는 miRNA 기술)을 바탕으로 제작된 amiRNA는 종래의 shRNA에 비해 세포 독성이 적고, 타겟 유전자 이외에 다른 유전자 발현에도 영향을 미치는 부작용(off-target effect)도 줄여준다는 장점이 있다. 따라서 이러한 amiRNA는 새로운 유전자 치료법으로 활용될 수 있다. 또한 유전자 치료에 사용되는 바이러스 벡터를 RNAi에 응용한다면, 생체 내에서 핵산 전달의 효율이 높을 것이다.

[0019] 본 발명자들은 상기 언급한 문제점을 해결하고 유전자 치료제를 이용하여 알코올 의존을 예방 및/또는 치료하기 위한 연구를 계속하였다. 그 결과, RNA 간섭(또는 miRNA 기술)을 바탕으로 유전자 기법을 이용하여, 알코올 의

존을 예방 및/또는 치료하는 기술을 개발하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0020] 본 발명은 RNA 간섭 기술을 이용하여 알코올 분해에 관련된 ALDH2 유전자의 발현을 억제시킴으로써, 알코올 의존을 예방 및/또는 치료하기 위한 것이다.

[0021] 본 발명의 목적은 ALDH2의 발현을 억제하는 amiRNA, 이를 코딩하는 유전자, 이 유전자를 포함하는 발현벡터 및 상기 발현벡터로 형질전환된 세포를 제공하기 위한 것이다.

[0022] 본 발명의 다른 목적은 ALDH2의 발현 또는 작용 억제제를 유효성분으로 포함하는 알코올 의존 예방 및 치료용 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0023] 본 발명은 ALDH2의 발현을 억제하는 인공 miRNA(amiRNA)를 제공한다. 상기 amiRNA는 서열번호 1 내지 4로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0024] 상기 "ALDH2의 발현"이란, ALDH2 유전자의 유전 정보 전달 과정을 통해 ALDH2 단백질이 형성되는 것을 말한다.

[0025] 본 발명에서, "인공 miRNA(amiRNA)"란, 타겟 유전자에 특이적으로 작용하도록 고안된 miRNA로서, 원하는 "인공 miRNA(amiRNA)"를 발현할 수 있는 DNA를 재조합하여 세포 내에서 주입하였을 때 miRNA의 발현/작용 기작으로 발현되는 RNA이다. 인공 miRNA는 타겟 유전자의 발현을 억제시키는 역할을 한다.

[0026] 본 발명에서 "특이적"이란, 세포 내에서 표적을 특이적으로 선택하거나, 표적과 특이적으로 결합 또는 반응하는 것을 의미한다. 본 발명은 ALDH2 유전자 특이적 amiRNA를 제공한다. 상기 amiRNA는 ALDH2 발현과 연관된 알코올 의존 질환을 예방, 개선 및 치료하는 데 이용될 수 있다.

[0027] 상기 ALDH2 서열에는 인간 및 동물의 공지된 서열이라면, 어느 것이나 포함될 수 있다. 구체적으로, 젠뱅크(GenBank) 액세션 넘버 NM_009656.3, NC_005111.2, AC_000080.1, AK035145.1, AK042326.1, AK043506.1, AK078626.1, AK079602.1, AK128913.1, AK146286.1, AK150233.1, AK150250.1, AK150920.1, AK150986.1, AK151763.1, AK151826.1, AK153128.1, AK160060.1, AK163452.1, AK165032.1, AK178107.1, AK184586.1, AK188389.1, AK189526.1, AK196319.1, AK201448.1, AK206041.1, AK207282.1, AK209308.1, AK210785.1, AK214596.1, AK214889.1, AK216794.1, AK219951.1, BC005476.1, S71509.1 및 U07235.1 등의 공지 서열을 포함하나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 상기 amiRNA는 서열번호 1 내지 4로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 이하 본 발명에서는 각각의 서열번호와 동일하게, 서열번호 1의 amiRNA는 "amiRNA1", 서열번호 2의 amiRNA는 "amiRNA2"와 같이 표시하기로 한다.

[0029] 상기 amiRNA는 20 내지21 nt로 이루어져 있고, 체내에서 만들어지는 miRNA의 형태와 유사한 작은 헤어핀 구조를 가진다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 amiRNA를 코딩하는 유전자를 제공한다. 상기 유전자는 서열번호 5 내지 8로 구성된 군으로부터 선택되는 DNA일 수 있다.

[0031] 상기 amiRNA를 제조하는 방법은 특별히 제한되지 않으나, RNA 올리고뉴크레오타이드를 화학적으로 합성하는 방법, 인 비트로 전사를 이용한 작은 RNA의 합성 방법 등을 예로 들 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명은 상기 amiRNA를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.

[0033] 상기 재조합 amiRNA의 뉴클레오티드 서열을 코딩(암호화)하는 유전자를 합성하여 발현벡터에 삽입할 수 있다.

[0034] 본 발명의 amiRNA가 세포 내에서 일시적, 또는 영구적으로 발현될 수 있도록 amiRNA 발현벡터를 세포 내로 형질전환 또는 감염(infection)시킬 수 있다. 본 발명의 재조합 발현벡터는 당해 분야에 공지된 재조합 DNA 방법에

의해 구성될 수 있다.

[0035] 상기 발현벡터는 포유류 세포 또는 그 밖의 표적 세포 유형의 복제 및 발현에 이용되는, 당해 분야에 공지된 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택하여 사용할 수 있다. 본 발명에서는 특히 바이러스 벡터들이 바람직하다. 그 이유는, 바이러스 벡터들이 생체 내에서 핵산 전달의 효율이 높기 때문에 RNAi에 응용하면 그 효과가 높을 것이라고 생각된다.

[0036] 본 발명에서는 특히 렌티바이러스를 사용하는 것이 가장 바람직하다. 렌티바이러스는 레트로바이러스 벡터의 일종으로 분열하지 않는 세포도 형질도입(transduction)이 가능하며 주입된 유전자는 수개월 이상 발현이 가능하므로(Kafri T, et al., *Nat Genet* 1997; 17:314-317.), RNAi를 장기간 유지시키는 데 유리한 장점을 가진다.

[0037] 또한, 본 발명은 상기 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 제조된 형질전환 세포를 제공한다.

[0038] 상기 amiRNA 서열을 암호화하는 유전자를 삽입한 발현벡터는 이 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 알려진 방법으로 숙주세포에 도입될 수 있다. 도입 방법으로는 일렉트로포레이션(electroporation) 및 리포펙션(lipofection) 등이 있으나 이에 한정된 것이 아니며, 당해 분야에 공지된 방법을 선택할 수 있다.

[0039] 본 발명에 사용할 수 있는 세포로는 대장균, 효모, 심장 세포, 림프구, 간 세포, 혈관내피 세포, 비장 세포, 암세포, CHO, Cos7, NIH3T3 같은 동물 세포주, 곤충세포로 이루어진 군에서 선택할 수 있으나, 이에 한정된 것은 아니며 가능한 모든 세포는 숙주 세포로 사용이 가능하다.

[0040] 또한 본 발명은 ALDH2의 발현 또는 작용 억제제를 유효성분으로 포함하는 알코올 의존 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0041] 본 발명에서 "알코올 의존"이란, 지속적이고 반복적인 과도한 음주로 인해 신체적, 정신적, 사회적 기능이 손상되는 만성 질환을 의미한다. 본 발명에서 "알코올 의존"이란 용어는 알코올 중독, 알코올 남용 등 알코올과 관련된 모든 질환을 포함하여 사용한 것이다.

[0042] 본 발명에서 "ALDH2의 발현 또는 작용 억제제"란, ALDH2의 단백질의 발현을 위한 전사, 번역 등을 억제하거나 또는 단백질이 만들어지는 과정 중에 나타나는 분자생물학 수준에서의 작용들을 억제하는 조성물을 의미한다.

[0043] 상기 ALDH2 발현 또는 작용 억제제는, i) ALDH2 유전자의 전사 또는 번역을 억제하는 amiRNA 또는 ii) 상기 amiRNA를 코딩하는 유전자일 수 있다.

[0044] 상기 ALDH2의 발현 또는 작용 억제제는 ALDH2 특이적 siRNA 또는 shRNA일 수 있다.

[0045] 상기 ALDH2유전자의 전사 또는 번역을 억제하는 amiRNA는 서열번호 1 내지 4로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0046] 상기 amiRNA를 코딩하는 유전자는 서열번호 5 내지 8로 구성되는 군으로부터 선택되는 DNA일 수 있다.

[0047] 본 발명의 알코올 의존 및 치료용 조성물은, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 공지된 기술을 이용하여 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.

[0048] 본 발명의 조성물은 알코올 의존과 관련이 있는 질병, 구체적으로 알코올 의존성 질환을 앓고 있는 개체의 치료에 이용될 수 있다. 본 발명의 조성물의 투여가 가능한 개체는 인간뿐만 아니라 새, 가금류, 가축 등의 동물도 포함한다. 본 발명에서, 치료는 알코올 의존의 발병을 예방하거나, 질환과 관련된 증상을 감소, 경감, 역전시키는 것을 포함한다.

[0049] 본 발명의 조성물은 기존의 세포독성제, 화학요법제 등의 다양한 치료제와 병합 투여될 수 있으며, 이 경우 동시 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0050] 본 발명의 조성물은 표면에 전달하는 임의의 방식으로 개체에게 투여될 수 있다. 적합한 비경구 투여 경로는 혈관내 투여(예, 정맥 내 볼루스 주사, 정맥 내 주입, 동맥 내 볼루스 주사, 동맥 내 주입, 맥관 내로의 카테터 점적주입), 피하 주입을 포함하는 피하 주사 또는 침착(deposition)(예를 들면 삼투압 펌프 이용), 조직 주위 및 조직 내 투여(예: 종양주위 및 종양내 주사) 또는 침착 등을 포함한다.

[0051] 본 발명의 약제학적 조성물의 유효량은 개체의 성별, 연령, 건강상태, 체중, 투여 방법과 횟수, 표적 조직이나 세포 등 다양한 요인을 고려하여 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정할 수 있다. 상기 유효량은 ALDH2 발

현을 억제시키기에 충분한 양 또는 ALDH2 작용을 억제하기에 충분한 양이다. 각 치료에 요구되는 총 용량은 수회 용량 또는 일회량으로 투여될 수 있다.

[0052] 본 발명과 같이, 바이러스 벡터를 이용하여 amiRNA를 세포 내에 전달하는 경우, 세포 내에 amiRNA를 직접 주입하는 것보다 안정성이 매우 뛰어나다. 지금까지 주로 사용된 siRNA 또는 shRNA의 세포 내 전달 방법은 세포 외에서 세포 내로 직접 주입하는 방법인데, 이 방법을 사용하면 세포가 쉽게 변형되는 단점이 있다. 본 발명은 이러한 단점을 극복하고 amiRNA의 세포 전달에 있어서 안정성을 확보하고자 바이러스 벡터 시스템을 이용하였다.

[0053] 또한, 종래의 합성 siRNA, 합성 shRNA, 그리고 안티센스 올리고뉴클레오타이드들은 반감기가 짧아 유전자 발현 억제 효과가 2~3일 정도만 유지된다. 따라서 이 합성 siRNA 등이 세포 내에서 지속적인 효과를 나타내기 위해서는 다량의 합성 siRNA(dsRNA 등)을 반복 주입하여야 하는 문제점이 있다.

[0054] 본 발명은 이러한 단점을 극복하기 위해, 본 발명의 amiRNA가 세포 내에서 일시적, 또는 영구적으로 발현될 수 있도록 amiRNA 발현벡터를 세포 내로 형질전환 또는 감염(infection)시켰다. 이렇게 세포 내로 형질전환 또는 감염된 amiRNA는 세포 내에서 지속적인 효과를 나타낼 수 있다.

발명의 효과

[0055] 본 발명의 ALDH2 특이적인 amiRNA는 체내에서 안정적이고 지속적으로 발현하여 ALDH2의 발현을 억제시키는 효과가 있다. 본 발명은 ALDH2의 발현을, RNA 간섭(RNA interference)을 이용하여 조절함으로써, 개체가 흡수하는 알코올의 양을 감소시킬 수 있다. 따라서 본 발명의 amiRNA를 포함하는 ALDH2 발현 또는 작용억제제를 개체에 처리함으로써 알코올 의존 질환을 치료, 개선 및 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1 및 2는 본 발명에 따른 amiRNA의 디자인을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 amiRNA를 발현할 수 있는 벡터 지도를 나타낸 것이다.

도 4 는 렌티바이러스 감염 후 한 달간의 블라스티시딘(blasticidin) 항생제 선별 과정을 거쳐 ALDH2 mRNA의 유전자 발현 변화를 실시간 RT-PCR와 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타낸 것으로, 데이터는 ±SE값이다(이후 기재된 데이터도 ±SE값임).

도 5는 본 발명의 amiRNA4 포함 렌티바이러스와 음성대조군(NC) 렌티바이러스 복강주사 후 알코올 섭취량의 변화 측정한 그래프이다: (A)는 렌티바이러스 주사 후 음성 대조군과 amiRNA4 주사 그룹의 알코올 섭취량 변화를, (B)는 물 섭취량의 변화를 나타낸 것임.

도 6은 amiRNA4 포함 렌티바이러스와 음성대조군(NC) 렌티바이러스 복강 주사 후 20일이 경과한 생쥐 간의 ALDH2 유전자 발현 변화를 리얼 타임 RT-PCR을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 amiRN4 포함 렌티바이러스와 음성대조군(NC) 렌티바이러스 꼬리 정맥 주사 후 알코올 섭취량의 변화 측정한 그래프이다: (A)는 렌티바이러스 주사 후 음성 대조군과 amiRNA 4 주사 그룹의 알코올 섭취량을, (B)는 물 섭취량의 변화를 나타낸 것임.

도 8은 amiRNA4 포함 렌티바이러스와 음성대조군(NC) 렌티바이러스 정맥 주사 후 20일이 경과한 생쥐 간의 ALDH2 유전자 발현 변화를 나타낸 것이다.

도 9는 ALDH2 특이적 siRNA4 꼬리 정맥 주사 후 알코올 섭취량의 변화 측정한 그래프이다: (A)는 siRNA4 주사 후 음성 대조군과 siRNA4주사 그룹의 물 섭취량을, (B)는 물 섭취량의 변화를 나타낸 것임.

도 10은 ALDH2 특이적 siRNA4 꼬리 정맥 주사 후 20일이 경과한 생쥐 간의 ALDH2유전자 발현 변화를 리얼 타임 RT-PCR(좌측 도면)과 웨스턴 블랏을 이용하여 측정(우측 도면)하여 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 이 기술분야의 통상의 기술자에게 있

어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.

[0058] 실시예 1: amiRNAs 디자인과 렌티바이러스의 합성

[0059] 1-1: 세포배양

[0060] 흰쥐의 간세포 Hepa-1c1c7 세포(한국세포주은행에서 구입)와 인간 간세포인 HepG2 세포(한국세포주은행에서 구입)는, 10% FBS(Invitrogen™, Carlsbad, CA), 100 유닛의 페니실린과 100 μg의 스트렙토마이신(PS, Invitrogen™, Carlsbad, CA)이 첨가된 MEM 배지(Invitrogen™, Carlsbad, CA)에서 37℃, 5 % CO_2 에서 배양하였다.

[0061] 1-2: amiRNAs 디자인과 렌티바이러스의 합성

[0062] ALDH2 유전자의 발현을 억제하기 위하여 도 1 및 2와 같이 ALDH2 유전자의 mRNA에 대한 네 부분의 스템-루프 구조 amiRNA를 고안하였다. ALDH2 mRNA(NCBI Reference Sequence: NM_009656.3를 타겟으로 하는 서열은 BLOCK-iT RNAi Designer (http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/)를 이용하여 고안하였다. 고안된 서열정보는 하기 표 1 에 정리하였다.

표 1

[0063]

명칭	개시 사이트	서열	서열번호
amiRNA1	585	GCAGUGAAGGCUGCUCGUGCA	1
amiRNA2	1140	GGAGGUUGGUCACCUAAUCCA	2
amiRNA3	1430	AGGUGGAUGAAACUCAGUUUA	3
amiRNA4	1861	AGUGAAGACGGUUACUGUCAA	4
amiRNA1 코딩 DNA	585	CGTCACTTCCGACGAGCACGT	5
amiRNA2 코딩 DNA	1140	CCTCCAACCAGTGGATTAGGT	6
amiRNA3 코딩 DNA	1430	TCCACCTACTTTGAGTCAAAT	7
amiRNA4 코딩 DNA	1861	TCACTTCTGCCAATGACAGTT	8

[0064] 고안된 amiRNA서열은 BLAST를 이용해 상동성 유무를 확인을 하였고, amiRNA 서열은 스템-루프 구조를 가지게 고안하였다. ALDH2 mRNA를 타겟으로 하는 amiRNA 서열이 발현되게 하는 벡터를 제작하기 위하여, amiRNA 서열을 plenti6.2-GW/EmGFP-miR 벡터(Invitrogen사)에 삽입하였고, BLOCK-iT™ HiPerform™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System (Invitrogen사)을 이용하여 제조사의 실험지침서 방법에 따라 클로닝하였다. 클로닝된 amiRNA는 최종적으로 plenti6.4/R4R2/V5-DEST MultiSite Gateway® 벡터에 넣어 렌티바이러스 벡터를 만들었다(도 3 참고). 음성 대조군 벡터는 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-neg 컨트롤 플라스미드(Invitrogen사)를 이용하여 클로닝하였다.

[0065] 이들 렌티바이러스의 제조는, 293FT 세포 및 Invitrogen사의 바이러 파워 패키징 믹스(ViraPower™ packaging mix)를 이용하여 제조사의 실험 지침서에 따라서 만들었다. 293FT 세포에서 렌티바이러스를 만들기 위해, amiRNA 서열을 포함하는 3 ug의 plenti6.4/EF1α/MSGW/EmGFP-miR 발현 플리스미드 DNA 와 9 ug 바이러파워 패키징 믹스를 준비하였다. 준비된 DNA와 바이러 파워믹스를 리포펙타민(Lipofectamine) 2000과 섞고 상온에서 20분간 반응시켜 DNA-리포펙타민2000 컴플렉스(DNA-Lipofectamine 2000 complex)를 만들었다. 293FT 세포($6x10^6$ total cells)를 준비하고 DNA-리포펙타민2000 컴플렉스를 섞어 CO_2 배양기에서 하룻동안 배양하였다. 배양 후 세포 플레이트의 배지를 제거하고 소듐피루베이트(sodium pyruvate)가 들어간 DMEM 배지를 넣어주어 CO_2 배양기

에서 48 시간 동안 배양하였다. 48시간 후, 바이러스가 포함된 배지를 거두어 원심분리한 후, 상층액 만을 취해 바이러스를 얻었다. 얻어진 바이러스를 Hepa-1c1c7 세포에 감염시켜 한달(30일) 동안 항생제(blasticidin S 5 ug/ml)를 이용하여 바이러스가 감염된 세포를 선택하였다. 티터(titer)가 좋은 바이러스를 선택하기 위해 크리스탈 바이올렛 염색을 하여 확인하였다.

[0066] 실시예 2: Hepa-1c1c7 세포주에 바이러스 감염

[0067] Hepa-1c1c7 세포에 각각의 ALDH2 amiRNAs 서열(서열번호 1 내지 4)을 가지고 있는 렌티바이러스를 감염시키고, 3~4일에 한번씩 블라스티시딘(blasticidine) S(5 ug/ml)가 첨가된 DMEM 배지로 갈아주었다. 30일이 지난 후 렌티바이러스가 감염된 세포만을 선택하여 Hepa-1c1c7 세포에서 안정적으로 ALDH2 amiRNAs 서열을 발현하는 세포주를 확립하였다.

[0068] 실시예 3: 세포 내에서의 amiRNA 효율 검증

[0069] 각각의 ALDH2 amiRNAs 유전자를 발현하는 세포에 Trizol(invitrogen사)을 처리하여 전체 RNA를 분리하고, 역전사 효소(Superscript III , Invitrogen사)와 oligo dT를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 구체적인 방법은 제조사의 매뉴얼을 따랐다. 실시간 RT-PCR은 Applied Biosystems사의 7500 패스트 리얼 타임 PCR(fast real-time PCR) 시스템을 사용하였다. Applied Biosystems사의 프라이머 익스프레스(Primer Express)를 이용하여 얻은 ALDH2 유전자의 프라이머와 2X SYBR Green PCR Master Mix (Takara Bio Inc., Shiga, Japan), 2 ug cDNA를 반응 버퍼와 함께 최종 용량 25 ul로 하여 실험하였다. 사용한 ALDH2 프라이머 염기서열은 다음과 같다.

[0070] 서열번호 9(ALDH2 forward primer): 5'- GACGCCGTCAGCAGGAAAA-3

[0071] 서열번호 10(ALDH2 reverse primer): 5'- CGCCAATCGGTACAACAGC-3

[0072] GAPDH 유전자를 사용하여 데이터를 표준화 하였고, 각 사이클의 생성물은 두 가닥 DNA에 결합하는 SYBR green의 증가되는 양을 이용하여 측정하였다. 모든 데이터는 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법을 이용하여 유전자의 발현 증감을 분석하였다(K.J. Livak *et al.*, *Methods*. 25 (2001) 402-408). 각각의 ALDH2 amiRNAs 서열을 발현하는 세포의 단백질의 발현양상을 웨스턴 블롯팅을 이용하여 확인하였다. ALDH2 amiRNAs 서열을 포함하는 렌티바이러스가 감염된 Hepa-1c1c7 세포를 RIPA 라이시스 버퍼(Sigma사) 와 1% 프로테아제 인히비터(Calbiochem사)를 섞은 반응액을 이용하여 세포를 용해시킨 후, 단백질을 분리하였고, BCA Protein Assay Reagent(PIERCE)을 이용하여 정량하였다. 정량된 단백질 20 ug을 10% SDS-PAGE를 수행한 후 PVDF 막으로 단백질을 이동시켰다. PVDF 막으로 단백질을 이동 시킨 후, 5% 스킴-밀크 용액에서 2 시간 동안 블라킹(blocking)하였다. 각 단백질의 항체를 이용하여 반응시키고 난 뒤 HRP가 결합된 이차 항체(Pierce)로 반응시킨다. 1차 항체는 Santa Cruz사의 래빗 항-ALDH2를 1:3000(sc-15323)으로 희석, Sigma사의 고트 항-베타 액틴(A5316)을 1:5000으로 희석하여 4℃에서 하루 동안 반응시켰다. 항체 반응 후 ECL 키트(Pierce)를 이용하여 각 단백질을 확인하였다.

[0073] 실시예 4: ALDH2 의 세포 내 발현 확인

[0074] ALDH2의 세포 내 발현률을 확인하기 위해, ALDH2 유전자를 발현하는 Hepa-1c1c7 세포에서 전체 RNA와 단백질을 분리하여 실시간 RT-PCR과 웨스턴 블랏팅을 통해 Hepa-1c1c7유전자 발현을 확인하였다. 도 4에서와 같이, 본 발명의 amiRNAs는 음성 대조군에 비해 유전자 발현이 감소됨을 알 수 있다. 특히 amiRNA4의 경우, 유전자 발현이 80% 이상 현저하게 감소되었고 단백질 발현 역시 같은 결과를 나타냄을 확인하였다.

[0075] 실시예 5: 생쥐의 알코올 섭취량 변화 측정

[0076] <u>5-1: ALDH2 특이적 amiRNA 서열을 가지는 렌티바이러스의 복강 주사</u>

[0077] ALDH2 특이적 amiRNA4 서열을 가지는 렌티바이러스와 음성 대조군(NC) 렌티바이러스 각각 15 ㎕를, 생쥐에 복강

주사(Intraperitoneal injection)하였고, 케이지에 물과 5% 알코올을 주어 4일 동안 몸무게와 물 및 알코올 소비량을 측정하였다. 그리고 4일 마다 생쥐에게 주는 알코올의 농도를10%, 15%, 20%로 올려주었고 알코올 농도를 올려주는 날에 몸무게와 물, 알코올 소비량을 측정하였다. 그 결과 도 5에 나타난 것과 같이, 알코올 농도가 증가할수록 렌티바이러스를 복강주사한 쥐의 알코올 섭취량이 음성 대조군보다 적게 나타남을 알 수 있다.

[0078] ALDH2 특이적 amiRNA4 서열을 가지는 렌티바이러스와 NC 렌티바이러스 복강 주사 후 20일이 지났을 때, ALDH2의 발현을 확인하기 위해 생쥐의 간을 적출하였다. 간에서 RNA를 추출한 후 ALDH2 유전자의 발현 변화를 리얼 타임 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. 그 결과 도 6에 나타난 것과 같이, NC에 비해 ALDH2 amiRNA4 서열을 가지는 렌티바이러스를 주사한 생쥐의 ALDH2 유전자 발현이 10% 이상 감소한 것을 확인하였다.

[0079] 5-2: ALDH2 특이적 amiRNA 서열을 가지는 렌티바이러스의 생쥐 꼬리 정맥 주사

[0080] ALDH2 특이적 amiRNA4 서열을 가지는 렌티바이러스와 NC 렌티바이러스를 각각 100 ㎕를 생쥐에 꼬리 정맥 주사(Intravenous injection-tail vein) 한 후 케이지에 물과 5% 알코올을 주어 4일 동안 몸무게와 물, 알코올 소비량을 측정하였다. 4일 마다 10%, 15%, 20%로 알코올 농도를 올려주었고 알코올 농도를 올려주는 날에 몸무게와 물, 알코올 소비량을 측정하였다. 그 결과 도 7에 나타난 것과 같이, 5% 알코올에서는 두 그룹의 알코올 섭취량이 큰 차이를 보이지 않았지만 알코올 농도가 증가 할수록 두 그룹이 차이를 나타나는 것을 확인하였다. 즉, ALDH2 특이적 amiRNA4에 의해 생쥐 내의 ALDH2의 발현이 감소되어, 생쥐의 물 섭취량에서는 큰 차이를 보이지 않았으나 생쥐의 알코올 섭취량은 감소하는 것을 확인하였다.

[0081] ALDH2 특이적 amiRNA4 서열을 가지는 렌티바이러스와 NC amiRNA 렌티바이러스 정맥 주사 20일 후 ALDH2의 발현을 확인하기 위해 간을 적출하였다. 간에서 RNA를 추출한 후 ALDH2 유전자의 발현 변화를 리얼 타임 RT-PCR을 이용하여 확인 하였다. 그 결과 도 8에 나타난 것과 같이, NC에 비해 ALDH2의 유전자 발현이 50% 이상 감소한 것을 확인할 수 있다.

[0082] 상기 실시예는 amiRNA4를 가지는 렌티바이러스를 생쥐에 1회 주사 후 생쥐의 알코올 섭취량 변화를 확인한 것이다. 그 결과 amiRNA4를 가지는 렌티바이러스를 단 1회만 주사하여도 생쥐의 알콜 섭취량을 감소하였고, ALDH2의 발현이 감소하였다. 이러한 결과를 통해, 본 발명의 amiRNA는 종래의 siRNA가 체내에서 쉽게 분해되는 단점을 극복한, 생체 내에서 안정적으로 그리고 지속적으로 발현되는 amiRNA임을 알 수 있다.

[0083] 5-3: ALDH2 특이적 siRNA의 생쥐 꼬리 정맥 주사

[0084] ALDH2 특이적인 siRNA(서열번호 4의 amiRNA와 동일한 서열을 가짐-본 실시예에 사용되는 siRNA는 서열번호 4의 amiRNA와 동일한 서열을 가지지만, 세포 외에서 체내로 RNA 형태로 직접 주입되므로, 세포 내에서 miRNA 발현 기작에 의해 발현되는 amiRNA와 구별하기 위해, 이하에서는 'siRNA4'로 칭함)를 렌티바이러스를 이용하여 형질전환시키지 않고, siRNA 자체를 생쥐 꼬리에 직접 정맥주사하여 생체 내 효능을 평가하였다. ALDH2 특이적 siRNA4의 생체 내 효능 평가를 위하여 ALDH2 특이적 siRNA4와 NC siRNA4 15 ㎕를 각 생쥐에 꼬리 정맥 주사(intravenous injection-tail vein) 방법을 이용하여 주사하였다. siRNA의 경우 생체 내에서 분해되기 때문 4일에 한 번씩 반복하여 주사하였다. 케이지에 물과 5% 알코올을 주어 4일 동안 몸무게와 물, 알코올 소비량을 측정하였다. 4일 마다 10%, 15%, 20%로 알코올 농도를 올려주었고 알코올 농도를 올려주는 날에 몸무게와 물, 알코올 소비량을 측정하였다. 그 결과 도 9에 나타난 것과 같이, 5%, 10% 알코올에서는 두 그룹의 알코올 섭취량이 큰 차이를 보이지 않았지만 15% 이상 알코올 농도가 증가할수록 두 그룹의 섭취량이 차이 나는 것을 관찰하였다. 즉, ALDH2 특이적 siRNA4에 의해 생쥐 내의 ALDH2의 발현이 감소되어, 생쥐의 물 섭취량에서는 큰 차이를 보이지 않았으나 생쥐의 알코올 섭취량은 감소하는 것을 확인하였다.

[0085] ALDH2 특이적 siRNA4와 NC 주사 20일 후 ALDH2의 발현을 확인하기 위해 간을 적출하였다. 간에서 RNA를 추출한 후 ALDH2 유전자의 발현 변화를 리얼 타임 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. 그 결과 도 10의 그래프에 나타난 것과 같이, NC에 비해 ALDH2의 유전자 발현이 20% 정도 감소하는 것을 확인하였다. 또한, 각각 4마리 쥐의 간 단백질을 웨스턴 블롯팅한 결과를 통해서 ALDH2의 단백질 발현이 감소하는 것을 확인하였다(도 10 우측).

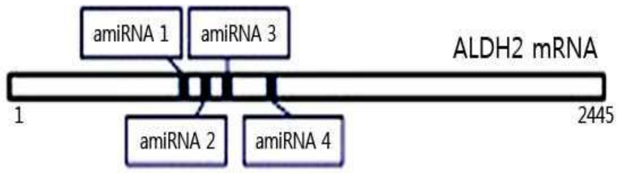
[0086] 상기 실시예를 통해, 본 발명의 ALDH2 특이적 amiRNA는 체내에서 안정적이고 지속적으로 발현되어 ALDH2의 발현 또는 작용을 억제함을 알 수 있다.

산업상 이용가능성

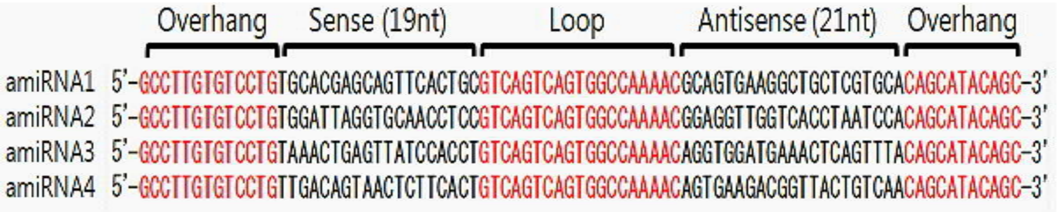
[0087] ALDH2 의 발현을 억제하는 본 발명의 amiRNA, 알코올 의존과 관련된 질환의 예방, 개선 및 치료를 위해 의학 분야에 이용될 수 있다.

도면

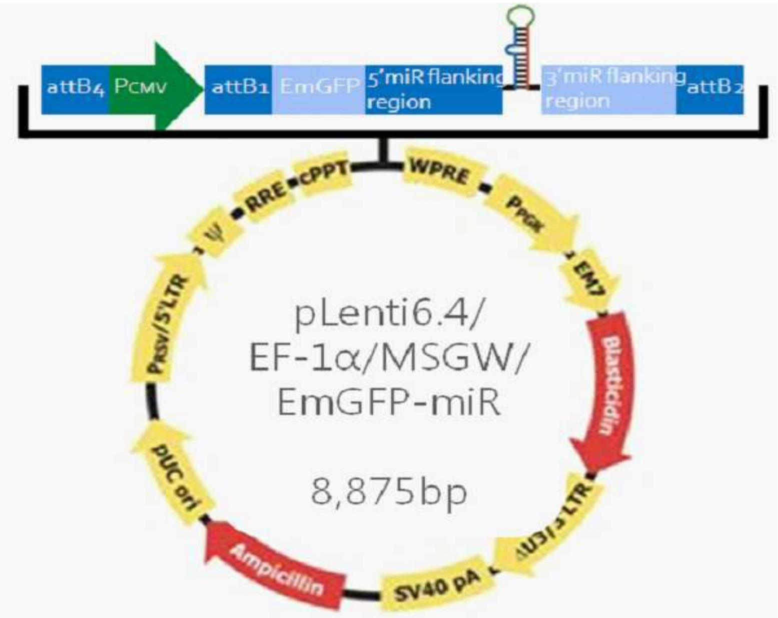
도면1



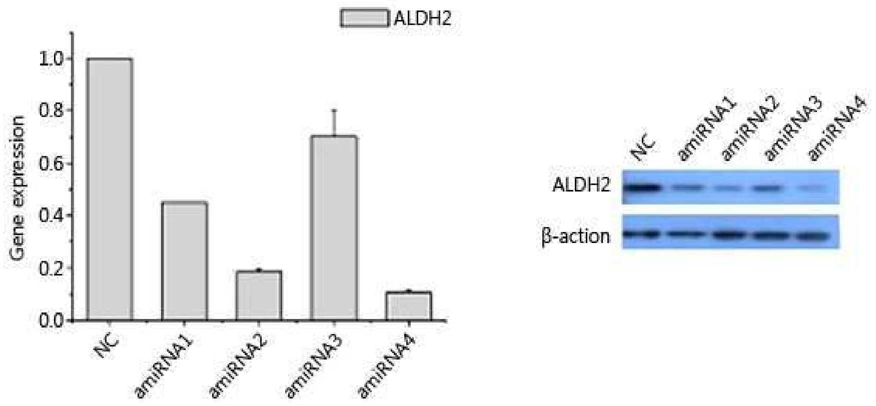
도면2



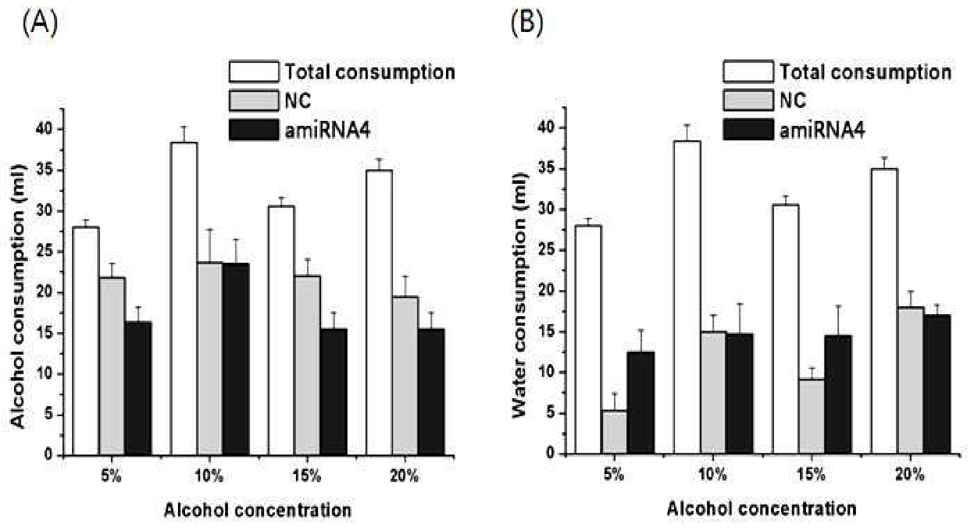
도면3



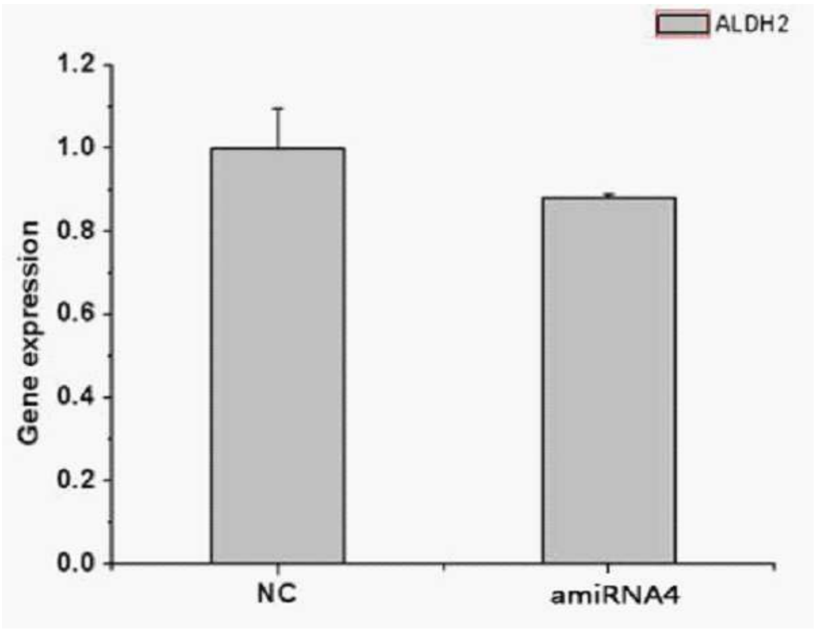
도면4


ALDH2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Gene expression
NC
amiRNA1
amiRNA2
amiRNA3
amiRNA4
ALDH2
β-action

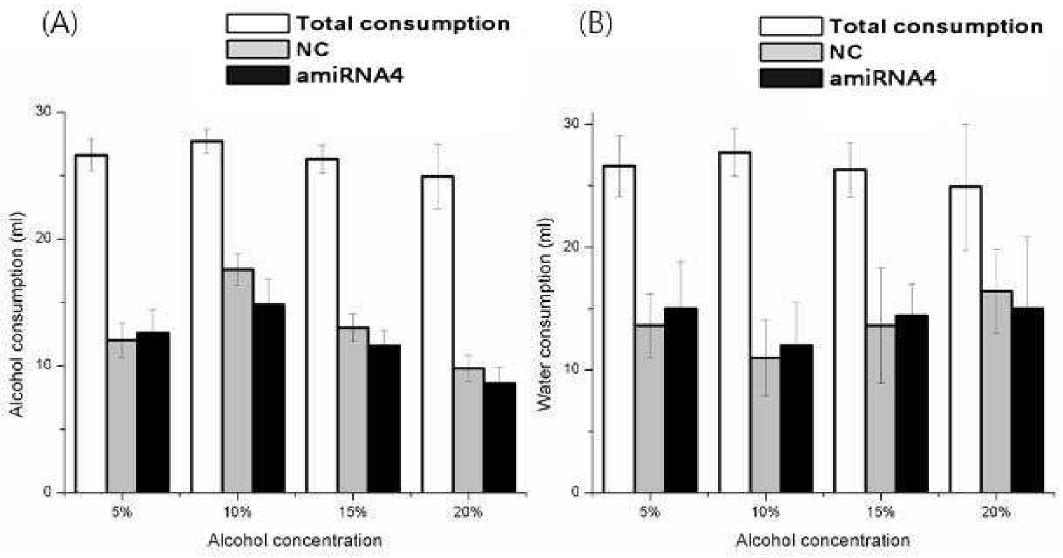
도면5


(A)
Total consumption
NC
amiRNA4
Alcohol consumption (ml)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
5%
10%
15%
20%
Alcohol concentration
(B)
Total consumption
NC
amiRNA4
Water consumption (ml)
Alcohol concentration

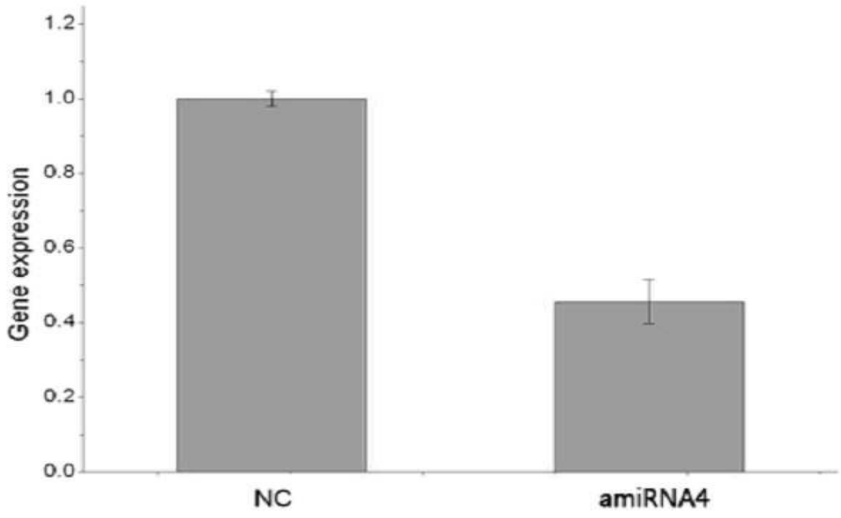
도면6


ALDH2
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Gene expression
NC
amiRNA4

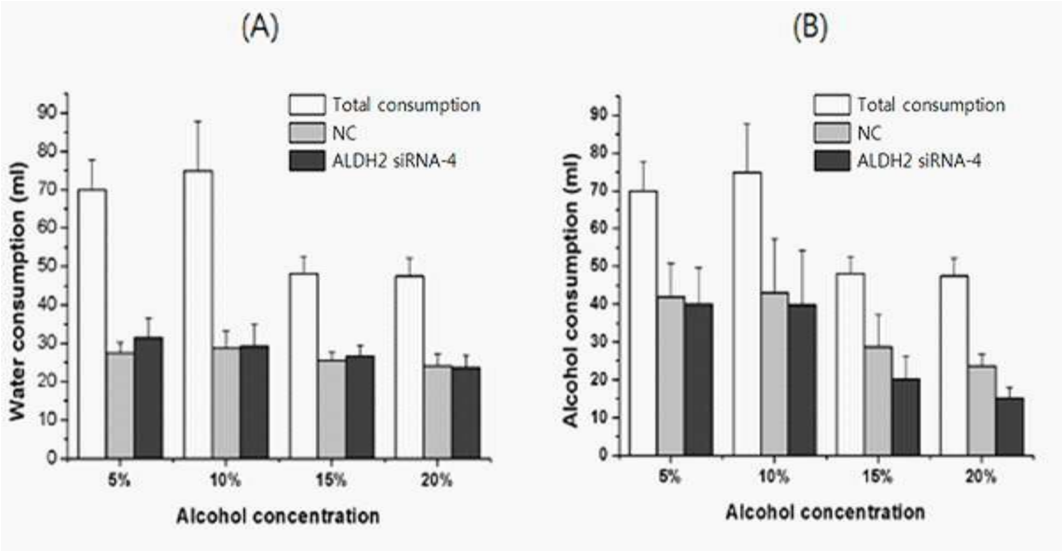
도면7


(A)
Total consumption
NC
amiRNA4
Alcohol consumption (ml)
30
20
10
0
5%
10%
15%
20%
Alcohol concentration
(B)
Total consumption
NC
amiRNA4
Water consumption (ml)
30
20
10
0
5%
10%
15%
20%
Alcohol concentration

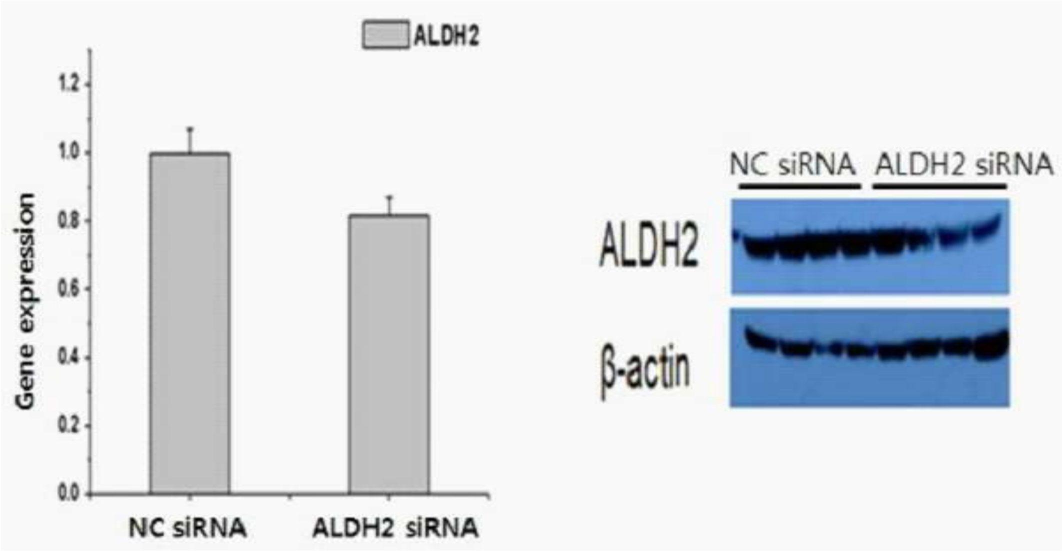
도면8


Gene expression
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
NC
amiRNA4

도면9



도면10



서 열 목 록

<110> Industry-University Cooperation Foundation Hanyang University

<120> ARTIFICIAL MICRORNA FOR INHIBITION OF ALDEHYDE DEHYDROGENASE-2 GENE EXPRESSION AND ITS USES

<160> 10

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> amiRNA1 for ALDH2

<400> 1

gcagugaagg cugcucgugc a 21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> amiRNA2 for ALDH2

<400> 2

ggagguuggu caccuaaucc a 21

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> amiRNA3 for ALDH2

<400> 3

agguggauga aacucaguuu a 21

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> amiRNA4 for ALDH2

<400> 4

agugaagacg guuacuguca a 21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA of amiRNA1

<400> 5

cgtcacttcc gacgagcacg t 21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA of amiRNA2

<400> 6

cctccaacca gtggattagg t 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA of amiRNA3

<400> 7

tccacctact ttgagtcaaa t 21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA of amiRNA3

<400> 8

tcacttctgc caatgacagt t 21

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ALDH2 forward primer

<400> 9

gacgccgtca gcaggaaaa 19

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ALDH2 reverse primer

<400

> 10

cgccaatcgg tacaacagc 19