



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0163582
(43) 공개일자 2022년12월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) G01N 21/31 (2006.01)
G01N 33/553 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6896 (2013.01)
G01N 21/31 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0071894
(22) 출원일자 2021년06월03일
심사청구일자 2021년06월03일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
윤대성
서울특별시 강남구 광평로10길 6, 101-201 (일원
동, 한솔마을아파트)
이동택
서울특별시 성북구 장월로1길 28, 113동 2104호
(상월곡동, 동아에코빌아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

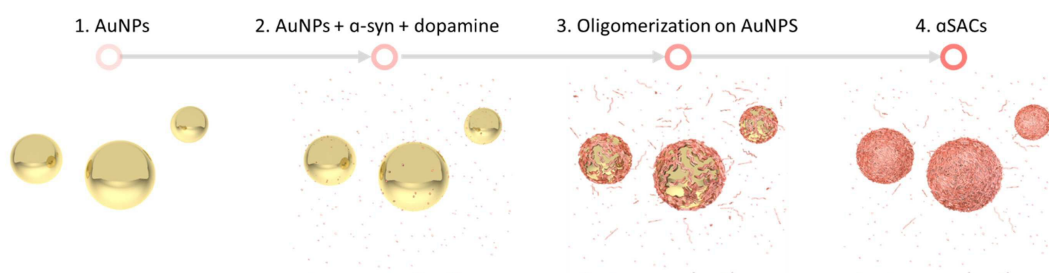
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체, 이의 제조방법 및 이를 이용한 약물 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 알파시뉴클레인 올리고머가 코팅된 금나노입자를 포함하고, 상기 알파시뉴클레인 올리고머는 도파민이 결합된 것인, 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체를 제공하는 것이다. 상기 복합체는 종래 알파시뉴클레인 응집체의 제조방법보다 단시간에 합성될 수 있으며, 퇴행성질환의 약물 스크리닝에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/553 (2013.01)

G01N 2333/4709 (2013.01)

G01N 2500/02 (2013.01)

(72) 발명자

정효기

서울특별시 동대문구 안암로18가길 20, B동 403호
(제기동)

박동성

서울특별시 강남구 논현로26길 24-5 좋은집, 301호

이규도

세종특별자치시 조치원읍 섭골길 59, 102동 704호
(e-편한세상 세종)

홍지혜

서울특별시 동작구 상도로54길 52, sw드림빌 404호
(상도동)

김용환

서울특별시 송파구 성내천로 103, 102동 2005호 (오금동, 송파두산위브)

이상원

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 서울캠퍼스하나과학관 (안암동5가)

장재원

서울특별시 성북구 고려대로 28-7, 202호 (안암동2가)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711128612

과제번호 2018M3C1B702072221

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 (원천)자연모사혁신기술개발사업

연구과제명 고효율성 저농도 시간차 다중약물 전달 시스템 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 고려대학교

연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711113219

과제번호 2019R1A2B5B0107061712

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 (이공)중견후속연구(연평균연구비 1억원 이내)

연구과제명 그래핀 센서 소자 기반 퇴행성 뇌질환 관련 약물 스크리닝 기술 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 고려대학교

연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

알파시뉴클레인 올리고머가 코팅된 금나노입자를 포함하고,
상기 알파시뉴클레인 올리고머는 도파민이 결합된 것인, 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 알파시뉴클레인 올리고머는 알파시뉴클레인 모노머가 6 내지 18 mer로 응집하여 2 내지 10 nm의 길이를 이루어 형성된 것인, 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 금나노입자는 10 내지 100 nm의 직경을 갖는 것인, 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 알파시뉴클레인 올리고머는, 알파시뉴클레인 및 도파민이 1:30 내지 1:100의 몰비율로 혼합되어 제조된 것인, 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 복합체는 알파시뉴클레인 및 금나노입자가 1:100 내지 1:500의 몰비율로 혼합되어 제조된 것인, 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 복합체는, 금나노입자 표면에 알파시뉴클레인 아밀로이드 코로나가 형성된 것을 특징으로 하는, 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체.

청구항 7

알파시뉴클레인 용액 및 금나노입자를 혼합한 후 인큐베이션하는 단계(S1); 및
상기 인큐베이션 후 도파민을 첨가하여 혼합용액을 제조하고, 다시 인큐베이션하여 알파시뉴클레인 올리고머가 코팅된 금나노입자를 제조하는 단계(S2)를 포함하는, 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 알파시뉴클레인 용액은, 인산완충생리식염수 및 증류수를 포함하는 용매를 포함하는 것인, 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 혼합 용액은, 알파시뉴클레인을 1 내지 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 포함하는 것인, 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 인산완충생리식염수 및 증류수는 1:5 내지 1:20의 부피비로 혼합된 것인, 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 알파시뉴클레인 올리고머는 알파시뉴클레인 모노머가 6 내지 18 mer로 응집하여 2 내지 10 nm의 길이를 이루어 형성된 것인, 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 금나노입자는 10 내지 100 nm의 직경을 갖는 것인, 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 13

제7항에 있어서,

상기 S2 단계에서 도파민은, 알파시뉴클레인 및 도파민이 1:30 내지 1:100의 몰비율로 혼합되도록 첨가되는 것인, 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 14

제7항에 있어서,

상기 S1 단계에서 알파시뉴클레인 및 금나노입자는 1:100 내지 1:500의 몰비율로 혼합되는 것인, 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 15

제7항에 있어서,

상기 S1 단계의 인큐베이션은, 30 내지 45℃에서 300 내지 1000 rpm으로 30 내지 120분 동안 수행되는 것인, 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 16

제7항에 있어서,

상기 S2 단계의 인큐베이션은, 30 내지 45℃에서 300 내지 1000 rpm으로 6시간 내지 20시간 동안 수행되는 것인, 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 17

제1항의 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체를 포함하는 용액에 후보 약물을 처리하는 단계; 및

상기 용액의 흡광도 변화를 확인하는 단계를 포함하는, 퇴행성질환의 치료 또는 예방을 위한 약물 스크리닝 방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 퇴행성질환은 루이체치매, 파킨슨병, 및 알츠하이머로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 퇴행성질환의 치료 또는 예방을 위한 약물 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체, 이의 제조방법 및 이를 이용한 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 평균 수명이 증가함에 따라 국내의 고령화 사회가 가속화되고 있으며 2050년 총 예상 인구수 약 4,774만 명 중 65세 이상 노인 인구수는 약 1,900만 명에 이를 것이며, 총인구수의 39.8%로 현재보다 2배 이상 차지할 것으로 예상된다. 가속화되는 고령화 사회에서, 퇴행성 뇌 질환이 있는 인구도 비례하여 증가하고 있다. 2018년 기준 65세 이상 전국 노인 인구 약 750만 명 중 10%에 해당하는 약 75만 명이 퇴행성 뇌 질환 진단을 받은 바 있다.

[0004] 이러한 추세에 맞추어 국내외 퇴행성 뇌 질환 치료제 시장도 가파르게 증가하고 있다. 글로벌 치매 치료제 시장은 2014년 128억 5,980만 달러 규모에서 연평균 8.5%로 성장하였으며, 2020년에는 211억 5,480만 달러, 2024년에는 4배 이상 성장한 약 126억 달러 시장을 형성할 것으로 예측된다. 국내 치매 치료제 시장은 2012년 4000억 원의 규모에서 2020년에는 약 1조 4000억 원 수준으로 향후 연평균 20% 성장률이 전망된다.

[0005] 루이체 치매 및 파킨슨병은 알츠하이머병 다음으로 많은 경우를 차지하고 있는 퇴행성 뇌 질환의 종류이다. 이러한 퇴행성 뇌 질환들은 알파-시뉴클레인(α -synuclein, α -syn) 단백질의 misfolding protein(단백질 접힘 현상)에 의해 발병되는 것으로 밝혀져 있으며, α -syn을 대상으로 하는 치료제 개발이 활발하게 진행되고 있다. 그러나 α -syn은 고가이고 (\$350/25ug), in vitro 상에서 인위적인 단백질 합성을 하는 것은 어려운 한계가 있다. 또한, 약물의 타겟 물질인 α -syn oligomer를 합성하고 사용하는데 상당히 오랜 시간이 소요된다(최소 1주일).

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2007-0042566호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 전술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 퇴행성질환의 치료 약물 개발을 위한 타겟 물질을 빠르게 합성할 수 있는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0011] 본 발명은,

[0012] 알파시뉴클레인 올리고머가 코팅된 금나노입자를 포함하고,

[0013] 상기 알파시뉴클레인 올리고머는 도파민이 결합된 것인, 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은,

[0016] 알파시뉴클레인 용액 및 금나노입자를 혼합한 후 인큐베이션하는 단계(S1); 및

[0017] 상기 인큐베이션 후 도파민을 첨가하여 혼합용액을 제조하고, 다시 인큐베이션하여 알파시뉴클레인 올리고머가 코팅된 금나노입자를 제조하는 단계(S2)를 포함하는, 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체의 제조방법을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은,

[0020] 상기 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체를 포함하는 용액에 후보 약물을 처리하는 단계; 및

[0021] 상기 용액의 흡광도 변화를 확인하는 단계를 포함하는, 퇴행성질환의 치료 또는 예방을 위한 약물 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0023] 종래 퇴행성질환 치료제의 타겟물질로 활용되었던 α -syn 응집체는, 합성하는 시간이 상당히 긴 단점이 있었다 (oligomer 3일 이상, fibril 7일 이상). 본 발명의 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체는 상기 시간을 12시간 이하로 감축한 것이며, 기존 α -syn 응집체를 합성하는 농도보다 50배가량 적은 농도를 사용함으로써 소모되는 비용이 비약적으로 절약될 수 있다.

[0024] 본 발명의 알파시뉴클레인-나노복합체를 이용한 약물 스크리닝 방법은 실시간으로 흡광도의 변화를 관찰함으로써 약물의 효능을 확인할 수 있다. 즉 육안으로도 약물의 분해 효과를 관찰할 수 있으며, 흡광도 변화를 측정할 수 있는 장비만 있으면 공간의 제약을 받지 않고 어디 서든지 정량적인 약물 성능이 측정 가능한 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 본 발명의 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체 제조방법을 도식화한 것이다.
- 도 2는 본 발명의 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체를 이용한 스크리닝 방법을 도식화한 것이다.
- 도 3은 도파민을 넣지 않고 만든 α -SAC의 TEM 이미지를 나타낸 것이다.
- 도 4는 도파민을 넣어서 만든 α -SAC의 TEM 이미지를 나타낸 것이다.
- 도 5는 A) α -syn을 코팅하지 않은 bare AuNP와 도파민의 유무에 따른 α -SAC의 DLS 측정 결과, B) α -syn을 코팅하지 않은 bare AuNP와 도파민의 유무에 따른 α -SAC의 AFM 측정 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 A) 그래핀 센서 모식도, B) α -syn을 코팅하지 않은 bare AuNP와 도파민의 유무에 따른 α -SAC의 그래핀 센서의 신호 변화, 211은 α -syn monomer와 반응하는 신호 변화, 02는 α -syn oligomer와 반응하는 신호 변화를 나타낸 것이다.
- 도 7은 A) α -syn 농도 최적화를 위한 salt resistance test, UV-absorbance spectrum 파장 변화로 관찰, B) Bare 한 금 나노입자와 α -SAC의 XPS 분석 결과, c) Bare한 금 나노입자와 α -SAC의 UV-absorbance spectrum을 나타낸 것이다.
- 도 8은 Bare 한 금 나노입자와 α -SAC의 A) zeta potential, B) DLS 측정결과, C) α -SAC의 전기 염동 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 Bare AuNP와 α -SAC을 얼리기 전과 후의 DLS 및 UV-spectrum 측정결과를 나타낸 것이다.
- 도 10은 Protease XIV를 활성화하거나 denature 시켜서 농도별로 α -SAC와 반응시킨 실험결과를 나타낸 것이다.
- 도 11은 본 발명의 복합체를 적용한 다양한 약물 후보군 테스트 결과를 나타낸 것이다.
- 도 12는 α -SAC과 반응한 A) necrostatin-1, B) rosmarinic acid, C) tannic acid의 TEM image을 나타낸 것이다.
- 도 13은 도파민 및 알파시뉴클레인의 혼합비율에 따른 복합체의 안정성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 14는 도파민을 넣어서 만든 SAC, 도파민 없이 제조한 SAC 및 bare 금나노입자의 topographic 및 surface potential (Kelvin probe force microscopy (KPFM) image를 나타낸 것이다.
- 도 15는 도파민을 넣어서 만든 SAC, 도파민 없이 제조한 SAC 및 bare 금나노입자의 Topographic 및 KPFM 삼차원 이미지 및 이에 대한 line profile 데이터를 나타낸 것이다.
- 도 16은 도파민을 넣어서 만든 SAC, 도파민 없이 제조한 SAC 및 bare 금나노입자의 surface potential을 확인한 결과 및 나노입자 표면 구성에 대한 도식화를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 본 발명은 다양한 변형을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다.
- [0028] 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0029] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다.
- [0030] 본 발명에서, "포함한다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0032] 알파시뉴클레인 올리고머가 알츠하이머의 주요 원인물질로 알려져 있으나, 알파시뉴클레인 올리고머만을 타겟하

는 기술은 알려지지 않았다. 대부분의 알파시뉴클레인 약물 스크리닝 기술이 알파시뉴클레인 분해제가 아닌 응집 저해제에 초점이 맞춰져 있다. 이러한 응집 저해제 같은 경우 파킨슨 및 루이체 치매의 근본적인 치료제가 될 수 없으며, 병의 진행을 늦추는 정도일 것으로 예상된다. 그러나 알파시뉴클레인 올리고머가 파킨슨 및 루이체 치매 진행에 핵심적인 역할을 하는 것이 밝혀짐에 따라, 알파시뉴클레인 올리고머 타겟 약물 후보군 발굴이 상당히 중요하게 여겨지고 있다.

- [0033] 이에 본 발명은, 퇴행성 뇌질환의 후보 약물의 스크리닝에 활용될 수 있는 타겟 물질인 알파시뉴클레인 올리고머(α -syn oligomer)를 빠르게 합성하기 위한 방식을 연구하던 중, 금 나노입자와 도파민(Dopamine)을 이용한 방식을 적용하여 복합체를 제조할 경우, 스크리닝에 활용될 수 있는 독성을 가짐과 동시에, 빠르게 합성될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0034] 즉, 본 발명은 알파시뉴클레인 올리고머가 코팅된 금나노입자를 포함하고,
- [0035] 상기 알파시뉴클레인 올리고머는 도파민이 결합된 것인, 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체를 제공한다.
- [0036] 또한, 본 발명은 도 1에 나타난 것과 같이, 알파시뉴클레인 용액 및 금나노입자를 혼합한 후 인큐베이션하는 단계(S1); 및
- [0037] 상기 인큐베이션 후 도파민을 첨가하여 혼합용액을 제조하고, 다시 인큐베이션하여 알파시뉴클레인 올리고머가 코팅된 금나노입자를 제조하는 단계(S2)를 포함하는, 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체의 제조방법을 제공한다.
- [0038] 아울러, 본 발명은 상기 알파시뉴클레인-금나노입자 복합체를 포함하는 용액에 후보 약물을 처리하는 단계; 및
- [0039] 상기 용액의 흡광도 변화를 확인하는 단계를 포함하는, 퇴행성질환의 치료 또는 예방을 위한 약물 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0041] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0043] 본 발명에서 알파시뉴클레인 올리고머는 알파시뉴클레인 모노머가 6 내지 18 mer로 응집하여 2 내지 10 nm의 길이를 이루어 형성된 것이다. 상기 알파시뉴클레인 올리고머는 도파민이 결합된 것으로서, 실제 퇴행성뇌질환 환자의 알파시뉴클레인 올리고머 형성과정을 모사한 것이다. 본 발명의 실시예에서 도파민 유래 알파시뉴클레인 올리고머는 (+) charge를 띄는 도파민이 결합됨으로써 알파시뉴클레인의 (-) charge가 상쇄되는 원리를 이용하여 실제 체내에서의 도파민이 결합된 알파시뉴클레인 올리고머와의 유사성이 검증되었다. 본 발명에 의해 체외에서(in vitro) 합성된 알파시뉴클레인 올리고머는 체내에서 독성을 보이는 실제 알파시뉴클레인 올리고머와 길이 및 charge와 유사한 것으로, 본 발명의 퇴행성질환 약물의 스크리닝에 활용될 수 있는 것이다.
- [0044] 기존 문헌들(Movement Disorders, 2019, 34(2), 167-179, Metallomics, 2(3), 186-194 및 Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1863(6), 1454-1463 등)에서, α -syn 가 응집되는 과정에서, α -syn 올리고머가 실질적인 독성이 있음을 알 수 있다. 특히 도파민이나 니코틴 같이 체내 물질과 응집되어 형성된 α -syn 올리고머가 강한 세포독성이 있음이 알려져 있다.
- [0045] 따라서, 본 발명은 상기 올리고머의 세포독성을 가질 수 있도록 도파민-유도 알파시뉴클레인 올리고머를 제조한 것이다. 상기 알파시뉴클레인 올리고머는, 알파시뉴클레인 및 도파민이 1:30 내지 1:100의 몰비율로 혼합되어 제조되는 것으로서, 보다 바람직하게는 1:50 내지 1:70의 몰비율로 혼합될 수 있다. 본 발명에서는 상기 비율 범위에서 혼합된 알파시뉴클레인 올리고머에서 우수한 안정성을 확인한바 있다(도 13). 이처럼 본 발명은 복합체 제조시 도파민을 이용하여 골드입자 표면 위의 α -syn 응집체 형성을 2차적으로 촉매하면서 복합체끼리 뭉치지 않도록 할 수 있다(aggregation 방지).
- [0046] 본 발명에서 금 나노입자는 α -syn 응집체 합성에 촉매 역할을 하여 기존의 합성 농도보다 100배 이상의 적은 농도만으로 α -syn 응집체를 합성할 수 있게 하는 것이다. 상기 금나노입자는 10 내지 100 nm의 직경을 갖는 것이 바람직하다. 본 발명에서 알파시뉴클레인 및 금나노입자가 1:100 내지 1:500의 몰비율로 혼합되어 제조된다. 상기 금나노입자는 올리고머의 길이를 고려하여 15 내지 25 nm의 직경을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0047] 이와 같이 금나노입자 및 도파민을 활용할 경우 복합체가 하루 이내로 합성되며, 도파민과 결합된 α -syn 응집체는 금 나노입자의 표면을 감싸고 응집하지 않도록 하는 입체적 안정제 (Steric stabilizer) 역할을 할 수 있다. 즉, 본 발명의 복합체는, 금나노입자 표면에 알파시뉴클레인 올리고머가 코팅되면서, 아밀로이드 코로나가 형성되는 것이다.
- [0048] 상기 S2 단계에서 혼합용액은, 알파시뉴클레인을 1 내지 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 2 내지 6 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 포함될 수 있다. 상기 알파시뉴클레인은 1 $\mu\text{g/mL}$ 미만으로 포함될 경우 약물의 반응이 충분히 일어나지 않을 수 있고, 10 $\mu\text{g/mL}$ 를 초과하는 것은 알파시뉴클레인이 고가임을 고려할 때 바람직하지 않다.
- [0049] 본 발명의 일구현예로, 알파시뉴클레인 용액은, 인산완충생리식염수(PBS) 및 증류수를 포함하는 용매에 알파시뉴클레인이 첨가된 것일 수 있다. 상기 알파시뉴클레인은 알파시뉴클레인 펩타이드를 분주한 후 이를 사용한 것이다. 상기 분주된 알파시뉴클레인에 첨가되는 PBS는 금 나노입자 표면에서 정전기적 안정제 (electrostatic stabilizer) 역할을 하는 시트르산염 (citrate)을 어느 정도 제거해 α -syn이 금 나노입자 표면에 잘 달라붙게 할 수 있다.
- [0050] 상기 PBS 및 증류수는 1:5 내지 1:20의 부피비로 혼합될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 S1 단계의 인큐베이션은, 30 내지 45 $^{\circ}\text{C}$ 에서 300 내지 1000 rpm으로 30 내지 120분 동안 수행되는 것일 수 있고, 상기 S2 단계의 인큐베이션은, 30 내지 45 $^{\circ}\text{C}$ 에서 300 내지 1000 rpm으로 6시간 내지 20시간 동안 수행되는 것일 수 있다. 이와 같이, 본 발명의 복합체 제조방법은 24시간 내로 이루어지는 것이다.
- [0052] 이렇게 합성된 복합체에 α -syn을 분해하는 약물 후보군을 처리하게 되면 α -syn 분해 효과에 따라 금 나노입자의 표면이 드러나게 되며, 금 나노입자의 응집이 일어난다. 즉 응집 효과에 따라 금 나노입자의 광학적 특성에 변화가 일어나게 되어 흡광도가 적색이동 (red shift)하게 되고, 색이 붉은색에서 보라색으로 변하게 되며, 이러한 흡광도 변화를 통해 약물의 효능을 실시간으로 관찰할 수 있으며 고속으로 약물 스크리닝이 가능해지는 것이다. 이처럼 본 발명은 알파시뉴클레인 응집체에 의해 발생하는 질환의 약물 스크리닝 방법을 제공할 수 있다. 상기 질환은 퇴행성질환, 특히 퇴행성뇌질환일 수 있다. 상기 퇴행성뇌질환은 보다 구체적으로 파킨슨병, 루이체치매, 또는 알츠하이머 등일 수 있다.
- [0054] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 보다 상세히 설명한다.
- [0055] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.
- [0057] <실시예>
- [0058] 본 실시예에서는, 타겟 물질 (α -syn oligomer)를 빠르게 합성하기 위해, 금 나노입자와 도파민 (Dopamine)을 이용한 방식을 개발하였다(도 1). 금 나노입자는 α -syn 응집체 합성에 촉매 역할을 하며 기존의 합성 농도보다 100배 이상의 적은 농도만으로 α -syn 응집체를 합성할 수 있다. 추가로, 도파민을 이용하여 골드입자 표면 위의 α -syn 응집체 형성을 2차적으로 촉매하면서 복합체끼리 뭉치지 않도록 한다(aggregation 방지). 또한, 하루 이내로 합성된 α -syn 응집체는 금 나노입자의 표면을 감싸고 응집하지 않도록 하는 입체적 안정제 (Steric stabilizer) 역할을 한다. 이렇게 합성된 복합체에 α -syn을 분해하는 약물 후보군을 처리하게 되면 α -syn 분해 효과에 따라 금 나노입자의 표면이 드러나게 되며, 금 나노입자의 응집이 일어나게 된다. 응집 효과에 따라 금 나노입자의 광학적 특성에 변화가 일어나게 되어 흡광도가 적색이동 (red shift)하게 되고, 색이 붉은색에서 보라색으로 변하게 된다. 이러한 흡광도 변화를 통해 약물의 효능을 실시간으로 관찰할 수 있으며 고속으로 약물 스크리닝이 가능하다. 이는 도 2에 나타난 것과 같이 새로운 약물 후보 선정하는데 드는 막대한 시간과 비용의 절감효과를 가져올 수 있으며, 파킨슨 및 루이체 치매 약물 스크리닝 기술 분야에 세계적 선두 위치를 확보할 수 있을 것으로 예상된다.
- [0060] 실시예 1. 금 나노입자 합성 및 알파시뉴클레인(α -syn)의 분주

- [0061] 왕수처리를 한 two neck flask에 47.5 ml의 millipore water를 넣고 5.88 mM의 염화금 수용액을 2.5 ml 첨가하였다. 그 후 용기를 가열하며 용액이 끓기 시작하면 30 mM sodium citrate를 0.9 ml 넣어주고, 계속 용액을 끓여 20 nm 사이즈의 금 나노입자를 제조하였다.
- [0062] α -syn 분주를 위해 동결건조된 α -syn peptide 1 mg을 Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 1 ml에 용해하였다. α -syn를 충분히 녹이기 위해 상온에서 1시간 동안 보관하고 0.05 ml α -syn solution을 micro-centrifuge tube 20개에 분주를 하고 이를 흡 후드 안에서 overnight 동안 dry 시켜 DMSO를 증발시켜주었다. 이렇게 분주한 α -syn은 -20 °C에서 보관했다.
- [0063]
- [0064] **실시예 2. 알파시뉴클레인(α -syn) 코팅 금 나노입자 제조**
- [0065] 합성한 20 nm 금 나노입자를 10,500 rpm, 16분 30초 동안 원심분리를 한 뒤 상층액을 제거해 최종 부피 60 μ l로 만들어 주었다. 분주된 α -syn 0.05 mg에 PBS와 DW를 1:10의 비율로 넣어 α -syn가 최종 농도 19.5 μ g/ml가 되도록 하였다. 이후 상층액이 제거된 금 나노입자와 α -syn을 1:250 몰비율로 섞어 200 μ l를 만들어 주고, 500rpm, 37 °C에서 한 시간 동안 incubation 하였다. 한 시간 동안 incubation한 α -syn 용액에 α -syn와 도파민을 1:65 몰비율이 되도록 도파민을 넣어주고 고르게 섞어준 뒤 300rpm, 37 °C에서 12시간 동안 incubation 하여, 금 나노입자 표면에 알파 시뉴클레인 아밀로이드 코로나(alpha synuclein amyloid corona, α -SAC)가 형성되도록 하였다.
- [0066] α -SAC을 만드는 과정에 첨가되는 PBS는 금 나노입자 표면에서 안정제 역할을 하는 citrate를 어느 정도 제거해 α -syn이 금 나노입자 표면에 잘 달라붙게 하는 것이다. 또한, 도파민은 금 나노입자 표면에 달라붙는 α -syn을 oligomer 형태의 amyloid corona로 잘 합성시켜주기 위해 첨가하였다. 도파민의 유무에 따라 α -SAC이 합성된 결과는 도 3 및 도 4에서 확인할 수 있다.
- [0067] 도 3 및 도 4에서 확인할 수 있듯이 동일한 α -syn 농도이지만, 도파민을 넣어서 합성한 α -SAC에 α -syn이 훨씬 더 두껍게 amyloid corona를 형성하고 있는 것을 확인할 수 있다. 이를 정량적으로 표현하기 위해 DLS로 hydrodiameter를 측정하고 AFM으로 height를 측정한 결과는 도 5와 같다. 그 결과 dopa를 넣어서 합성한 α -SAC의 크기가 더 크다는 것을 알 수 있으며, α -syn의 amyloid corona 형성이 더욱 잘 이루어졌다는 것을 알 수 있다.
- [0068] 도파민의 유무에 따라 합성한 α -SAC에 형성된 amyloid corona의 형태를 살펴보기 위해 그래핀 센서를 사용하여 확인한 결과를 도 6에 나타내었다. 그래핀 센서에 α -syn monomer antibody인 211과 α -syn oligomer antibody인 O₂를 부착시켜 실험하였다. 각 antibody에 반응하는 물질이 붙으면 그래핀 센서에 전류를 흘렸을 때 저항값의 변화율이 증가하게 되면서 신호가 감지된다. 도 6A에서 확인할 수 있듯이 α -syn monomer의 경우 211과는 반응하여 그래핀 센서에 신호가 감지되었으나, O₂와는 반응하지 않아 그래핀 센서에 신호가 감지되지 않았다. α -syn oligomer의 경우 211과는 반응하지 않지만, O₂와 반응하여 그래핀 센서에서 신호가 감지된다. 그 결과 도파민을 첨가하지 않고 합성한 α -SAC은 monomer antibody와 oligomer antibody 신호가 차이가 없는 반면, 도파민을 넣고 합성한 α -SAC은 monomer antibody보다 oligomer antibody에서 훨씬 큰 신호가 감지되는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 도파민을 넣고 합성한 α -SAC에 형성된 α -syn amyloid corona가 oligomer 형태로 합성된 것을 확인할 수 있다. 즉, 본 발명에서 합성한 α -SAC이 뇌 속에서 toxic 한 영향을 끼치는 α -syn의 oligomer 형태를 잘 모방하고 있음을 확인한 것이다.
- [0070] **실시예 3. α -SAC 성질 분석**
- [0071] 도 7A와 같이 α -SAC을 합성하는데 가장 적합한 α -syn의 농도를 찾고 최적화하기 위해 α -syn의 농도별로 α -SAC을 합성하고 24시간 동안 PBS에서 salt resistance test를 진행하였다. 금 나노입자 표면에 α -syn amyloid corona가 잘 형성되지 않으면 PBS에서 금 나노입자가 불안정해지면서 서로 응집되며, UV absorbance에서 525nm 부근 파장의 신호(A525)가 감소하고 650nm 부근 파장의 신호(A650)가 증가하게 된다. 따라서 α -syn amyloid corona가 잘 형성되지 않을수록 PBS를 견디지 못하게 되며 A650/A525가 증가하게 된다. 그 결과 도 7A와 같은 결과를 얻을 수 있었으며, 전체 용액 1ml 기준 가장 안정하면서 적은 농도의 α -syn를 사용하여 약물을 반응시키기 적절한 농도는 3.125 μ g/ml임을 알 수 있다. 따라서 이 농도로 α -SAC을 합성하였다.

- [0072] 도 7B에서 bare한 금 나노입자와 α -SAC의 XPS 분석 결과 α -SAC 에서는 아미노산에 나타나는 N 1s peak가 형성된 것을 알 수 있고, 이는 α -syn이 표면에 코팅되어 있다는 것을 의미하는 것이다. 도 7C에서는 bare한 금 나노입자에 비해 α -SAC의 UV-absorbance spectrum이 오른쪽으로 7~8 nm 이동한 것을 알 수 있으며 이는 α -syn가 금 나노입자 표면에 코팅되어 크기가 커졌다는 것을 알 수 있다.
- [0073] 도 8A에서 bare한 금 나노입자와 α -SAC의 zeta potential 값을 알 수 있으며, α -SAC의 zeta potential이 -30mV 보다 작으므로 용액 상에서 안정한 상태로 존재한다는 것을 알 수 있다. 도 8B에서 DLS 측정결과 금 나노입자에 α -syn가 코팅되어 만들어진 α -SAC의 크기가 더 크다는 것을 알 수 있으며, 도 8C에서 여러 개의 α -SAC를 전기영동한 결과 띠가 동일함으로 α -SAC이 안정된 상태로 일정하게 제조되는 것을 알 수 있다.
- [0074] α -SAC을 얼렸다가 녹였을 때의 변화를 bare한 금 나노입자와 비교한 실험 결과는 도 9에 나타내었다. 도 9A 및 도 9B에서 bare AuNP와 α -SAC을 얼리기 전과 후 DLS를 측정한 경우 bare AuNP는 얼릴 때 구조적 안정성이 붕괴되어 서로 응집되어 크기가 측정되지 않았다. 그러나 α -SAC는 구조적 안정성을 유지하여 서로 응집되지 않아 크기가 거의 유지됨을 확인할 수 있다. 이와 같은 특성은 제작된 α -SAC이 동결보관이 가능하다는 뜻이고, 이로 인해 단백질 변성에 대한 문제를 막을 수 있다(상업화에 도움이 될 것이라 예상). 도 9D 및 도 9E에서 bare AuNP와 α -SAC을 얼리기 전과 후 UV-spectrum을 측정한 경우 α -SAC의 absorbance는 그대로 유지되지만 bare AuNP는 응집되어 absorbance가 사라짐을 확인할 수 있다. 이를 파장대 수치로 나누어 표현한 값이 도 9C로, 상기 결과로부터 α -SAC은 얼렸다가 녹여도 크기 및 흡광도 변화가 없으며 구조적 안정성이 뛰어나다는 것을 알 수 있다.
- [0075] α -SAC을 이용한 약물 스크리닝 메커니즘이 잘 작동되는지 확인하기 위해 PBS 버퍼에서 다종의 소화효소 복합체인 protease XIV를 이용한 test를 진행하였다(도 10). Protease XIV는 기본적으로 대부분 단백질을 분해할 수 있는 성질을 가지고 있다. α -SAC도 AuNP 표면에 단백질인 α -syn가 코팅되어 있으므로 protease XIV와 반응 시 코팅된 α -syn가 분해되면서 금 나노입자 표면이 노출되게 되고, PBS 상에서는 표면이 노출된 금 나노입자들끼리 응집이 일어나게 된다. 즉 금 나노입자가 응집되면 UV-spectrum 측정 시 absorbance에서 525nm 파장대 신호가 감소하고 650nm 파장대 신호가 증가하게 된다.
- [0076] 도 10A와 같이 protease XIV의 농도가 높을수록 α -SAC을 더욱 잘 응집시키는 것을 알 수 있으며, protease XIV의 농도에 따라 dose-response 그래프가 그려짐을 확인할 수 있다. 도 10B에서 90° C, 2시간 denature 시킨 protease XIV는 α -SAC에 반응하지 않음을 확인할 수 있다.
- [0078] **실시예 4. 약물 스크리닝**
- [0079] 본 발명에서 제조한 복합체를 통해 개발한 약물 스크리닝 방식을 α -syn과 관계있는 약물들에 적용한 UV-vis spectrum 결과를 도 11A에 나타내었다. 각 그래프는 약물 0mM, 1mM, 3mM, 5mM, 7mM 그리고 10mM을 α -SAC와 6시간 동안 반응시켜 측정한 UV-absorbance 그래프이다. α -syn의 oligomer를 분해하는 능력이 뛰어나도록 약물의 농도가 증가함에 따라 525nm 파장대 신호가 감소하고 650nm 파장대 신호가 증가하는 것을 알 수 있다. 도 11B는 위 약물들 중 polyphenol계열 약물의 농도별 효능을 나타내는 약물농도-반응 상관관계 그래프 (dose-response curve)이며, 도 11C는 위 약물들 중 polyphenol계열이 아닌 약물의 dose-response 그래프이다. 상기 결과와 같이, 본 발명의 복합체는 α -syn의 oligomer를 분해하는 약물의 효능을 실시간으로 흡광도 변화를 통해 빠르고 정확하게 확인할 수 있다.
- [0080] 도 11에서 각 약물의 효능을 나타내는 지표인 EC50을 정리한 것은 하기 표 1과 같다. α -syn의 oligomer를 분해하는 약물의 효능은 EC50이 tannic acid와 rosmarinic acid가 각각 3.167 mM, 2.501 mM로 가장 우수한 것을 확인할 수 있다. necrostatin-1과 nordihydroguaiaretic acid도 어느 EC50이 4.705 mM, 3.397 mM로 정도 효능이 있음을 확인할 수 있다. 특히, rosmarinic acid와 necrostatin-1은 기존에 α -syn의 oligomer를 분해한다고 알려져 있지 않은 약물이나 이번 실험을 통해 그 효능을 찾을 수 있다.

표 1

[0082]

약물 이름	EC50 (mM)	Maximal efficacy	R square
Acetaminophen	N/A	-	-
Sinomenine	N/A	-	-

Acetylcholine chloride	N/A	-	-
Caffein	N/A	-	-
Puerarin	N/A	-	-
EGCG	N/A	-	-
Resveratrol	N/A	-	-
EPPS	N/A	-	-
Caffeic acid	8.142	0.3608	0.9523
Ibuprofen	8.836	0.4359	0.9994
Necrostatin-1	4.705	0.05568	0.9236
Nordihydroguaiaretic acid	3.397	0.5951	0.9317
Tannic acid	3.167	0.9707	0.9821
Rosmarinic acid	2.501	1.12892	0.9941

[0084] 이를 확실히 교차 검증하기 위해 α -SAC과 약물의 반응을 TEM으로 관찰한 결과를 도 12에 나타내었다. 도 12A, 12B, 및 12C는 각각 α -SAC와 반응한 necrostatin-1, rosmarinic acid, tannic acid의 TEM image를 나타낸 것으로, 그 결과 α -SAC 겔에 있던 amyloid corona가 얇아지고 금 나노입자끼리 응집되었다는 것을 관찰할 수 있고, 이는 약물이 작용하였다는 것을 확인할 수 있다.

[0086] 실시예 5. 도파민 및 알파시뉴클레인의 혼합비율에 따른 안정성 확인

[0087] 본 실시예에서는, 실시예 2에서 제시된 도파민 및 알파시뉴클레인의 혼합비율에 따른 안정성을 분석하였다. 1X (65 μ M) 기준으로 총 9개의 dopa 농도로 비교실험을 수행하여, 도 13에 나타내었다. 상기 도 13의 각 그래프에서 빨간색 동그라미가 1X 농도를 나타내는 것이다. 위 비율로 만들어진 금나노입자-도파민-알파시뉴클레인 복합체를 PBS(salt condition)에 넣고 24h동안 안정성 검사를 진행하였다. 또한 Bare AuNP는 DW상에서 US-spectrum 비교를 위한 control로 측정하였다. 1X는 α -syn (1 μ M)와 65 : 1의 물 비율을 의미하는 것이다.

[0088] 그 결과 도 13 좌측 UV-spectrum 결과에서, 5X 농도부터 peak shift 및 높은 파장대 영역(>600nm)의 수치가 상대적으로 높음을 알 수 있다. 이를 통해 금나노입자끼리 salt를 견디지 못하고 어느 정도 뭉쳐졌다는 것을 알 수 있으며, 이는 만들어진 입자가 불안정하다는 것을 의미하는 것이다. 이를 수치적으로 표현하기 위하여 흡광도의 비 (A650/A525)로 표현하면 도 13 우측에 나타내었다. 그 결과, 1X의 농도 (65 μ M)가 가장 안정적이면서도 dopa가 α -syn에 작용할 수 있는 최적의 농도임을 확인하였다.

[0090] 실시예 6. 알파시뉴클레인 올리고머의 크기에 따른 독성 확인

[0091] 본 실시예에서는 기존 문헌들이 독성을 갖는 알파시뉴클레인 올리고머의 크기 범위를 2 내지 10 nm임을 제시하였음을 고려하여(Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(28), 7230-7235 및 Biophysical chemistry, 255, 106272), 알파시뉴클레인 올리고머의 크기를 측정하였다.

[0092] 도 4 및 도 5 등의 결과를 통해 본 발명에서 금 나노입자 표면에 코팅된 α -syn 올리고머의 평균 크기는 4.84 $\pm$ 0.67 nm 라는 것을 알 수 있다. 특히 도 4의 TEM image 상으로도 코팅된 α -syn 올리고머 크기가 5 nm 이상으로 나타나며, 도 5와 같이 DLS 측정 시 α -SAC: 32.55 $\pm$ 0.67 nm, Bare AuNP diameter : 22.87 $\pm$ 0.47 nm 로 나타난 바 있다. 이에 보다 명확하게 확인하기 위하여, 도파민을 넣어서 만든 SAC, 도파민 없이 제조한 SAC 및 bare 금 나노입자의 magnified KPFM image를 도 14에 나타내었고, 3D 이미지 역시 도 15에 나타내었다. Height는 Bare AuNP에 비해 α -syn 올리고머가 코팅된 금 나노입자가 더 크다는 것을 확인할 수 있다(Dried sample 이기 때문에 DLS 결과와 차이가 있음).

[0093] 또한, 상기 나노입자들의 surface potential을 확인하여 도 16에 나타내었다. 상기 도 16의 결과를 통해, Dopa를 넣고 만든 α -syn 올리고머의 경우 dopa를 넣지 않고 만든 α -syn 올리고머보다 charge의 크기가 작음을 확인할 수 있었다. 이는 (+) charge를 띄는 dopa의 영향으로 인하여 α -syn 올리고머의 (-) charge가 상쇄되기 때문으로 판단된다.

[0094] α -syn 의 isoelectric point는 4.67 이기때문에 α -syn 올리고머가 산성과 중성 용액(pH 2, 5.4, 7)에서

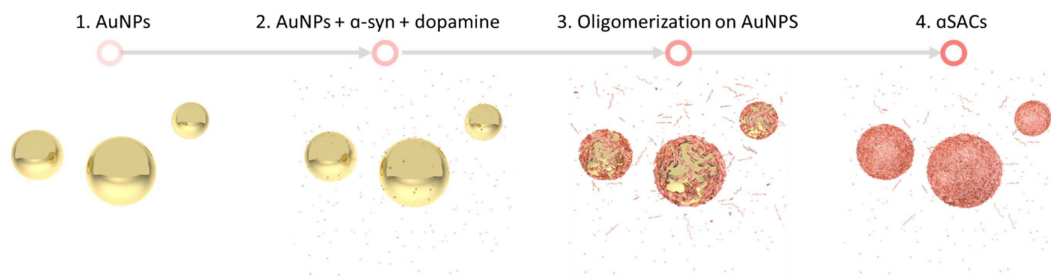
washing된 후에는 (-) charge를 띄어야하나, (+) charge를 띄는 결과들이 나왔으며, 중성 용액이 아닌 pH 9 이상의 용액으로 washing해야만 (-) charge를 띄는 것으로 확인되었다. 이는 Dopa 분자의 isoelectric point가 9.7이라는 사실과 관련 있는 것으로, 이를 통해, Dopa 분자들이 직접적으로 α -syn 올리고머에 결합되어 있다는 것을 알 수 있으며, 본 발명의 복합체에서 포함되는 알파시뉴클레인 올리고머는 체내의 toxic한 Dopa-induced α -syn oligomer임을 확인하였다.

[0096]

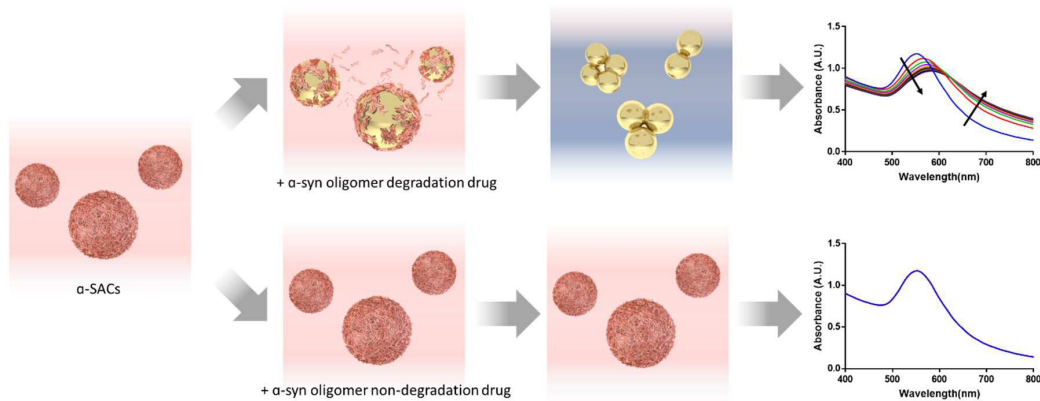
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

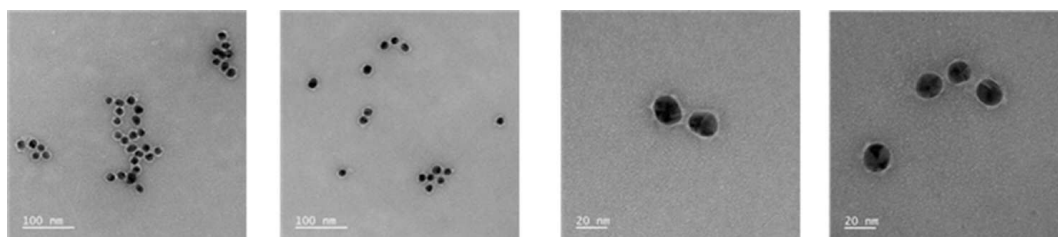
도면1



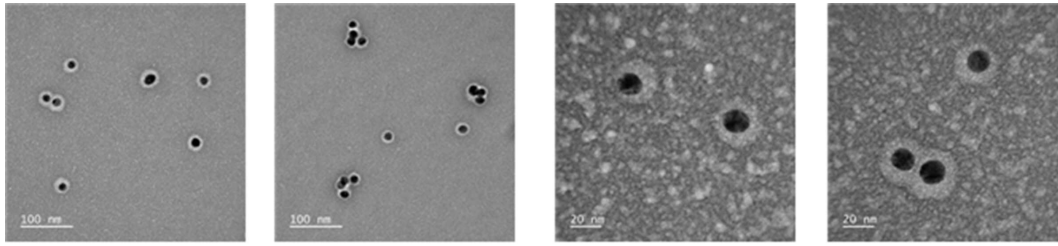
도면2



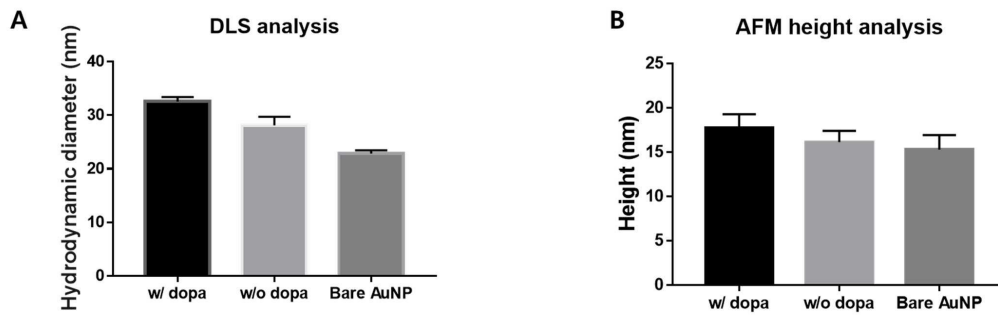
도면3



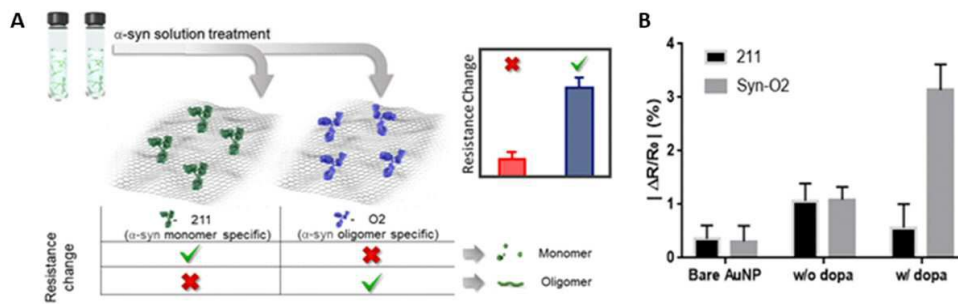
도면4



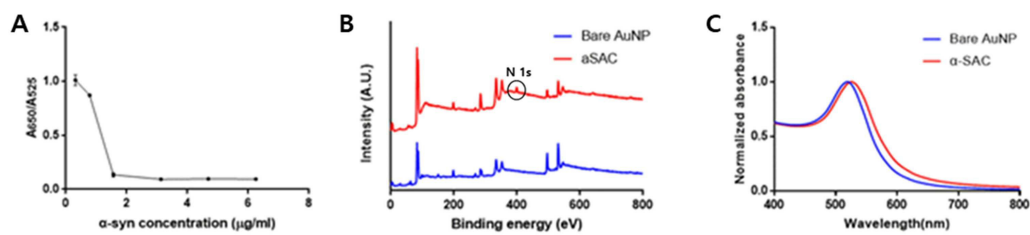
도면5



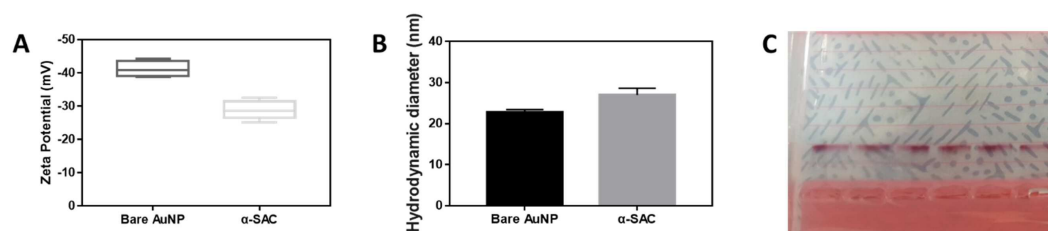
도면6



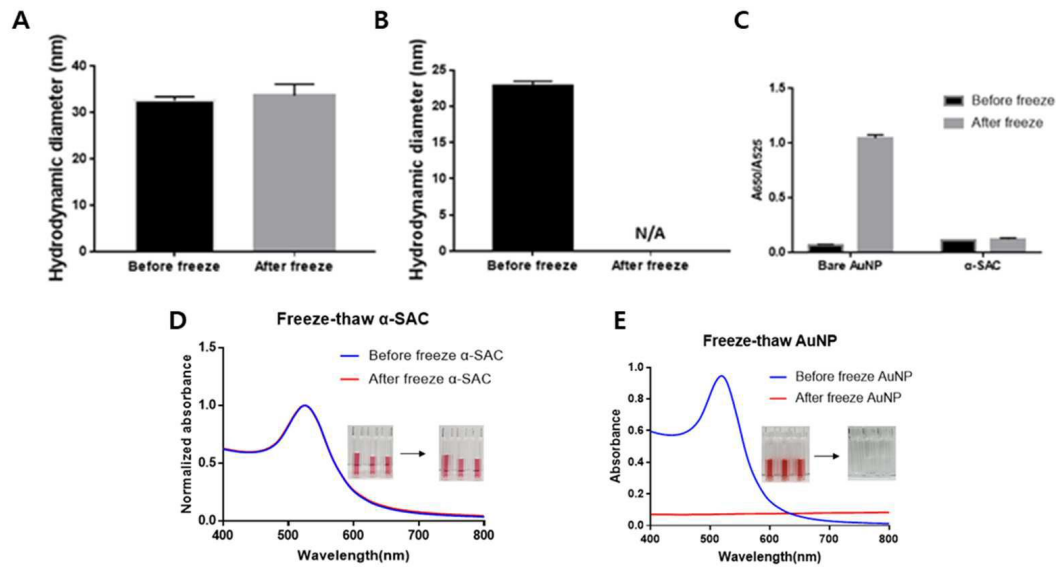
도면7



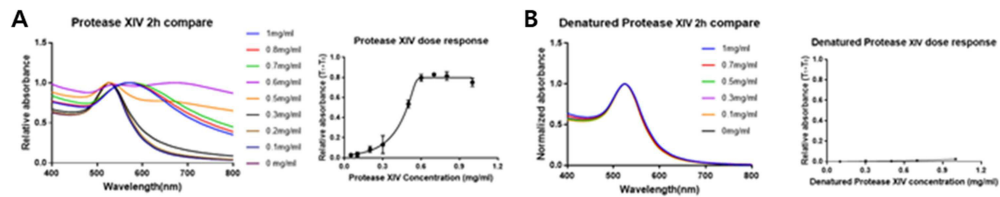
도면8



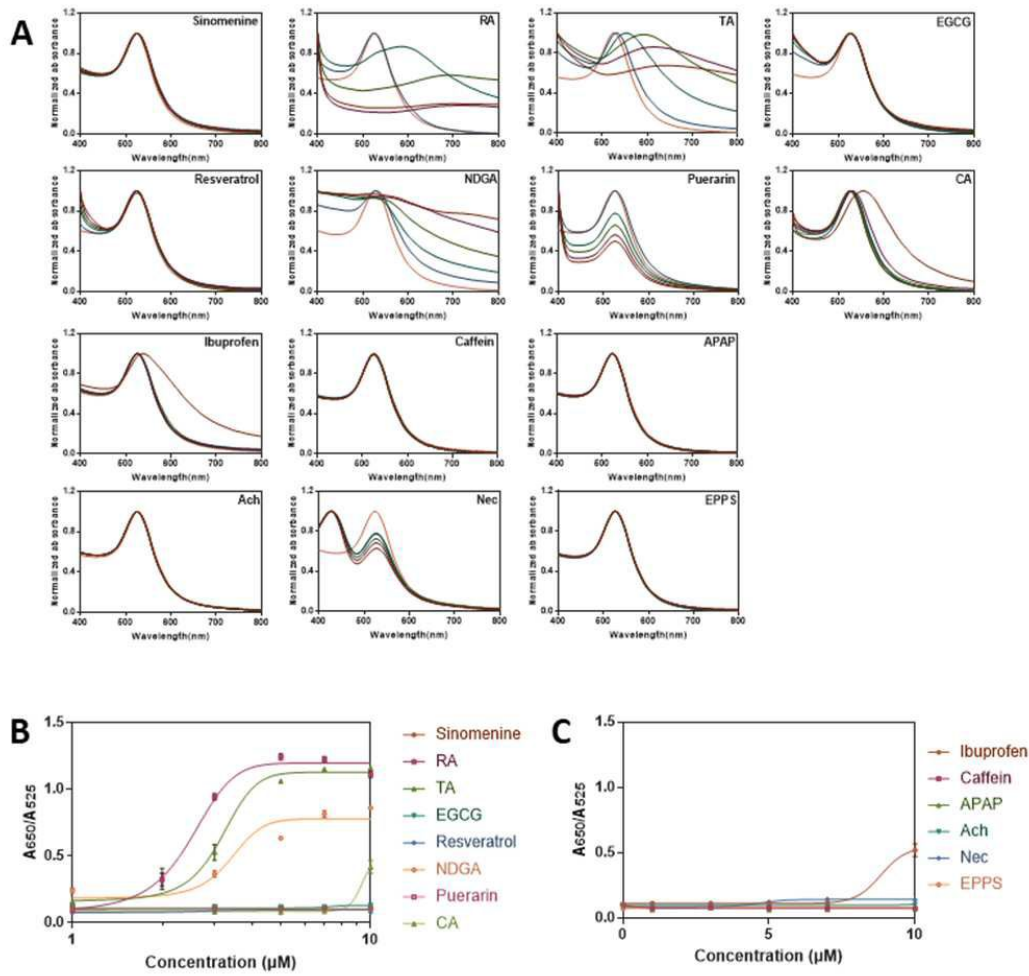
도면9



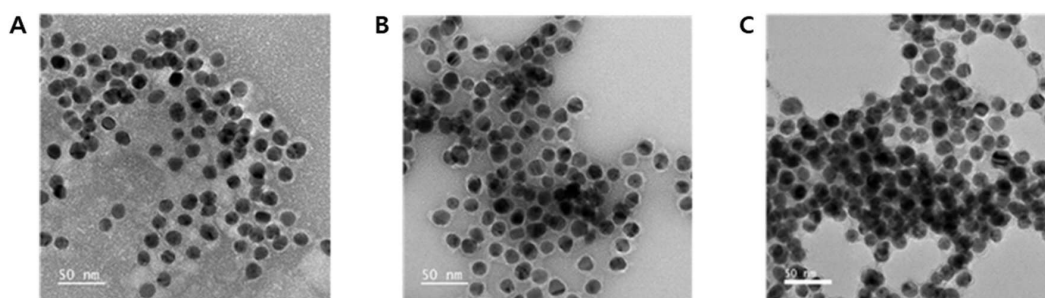
도면10



도면11

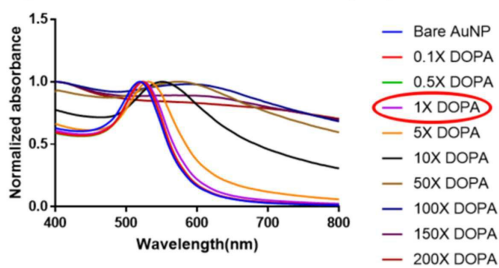


도면12

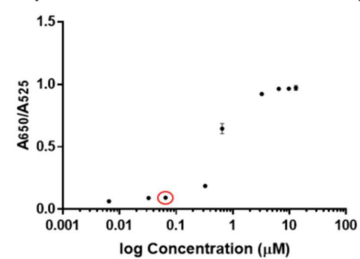


도면13

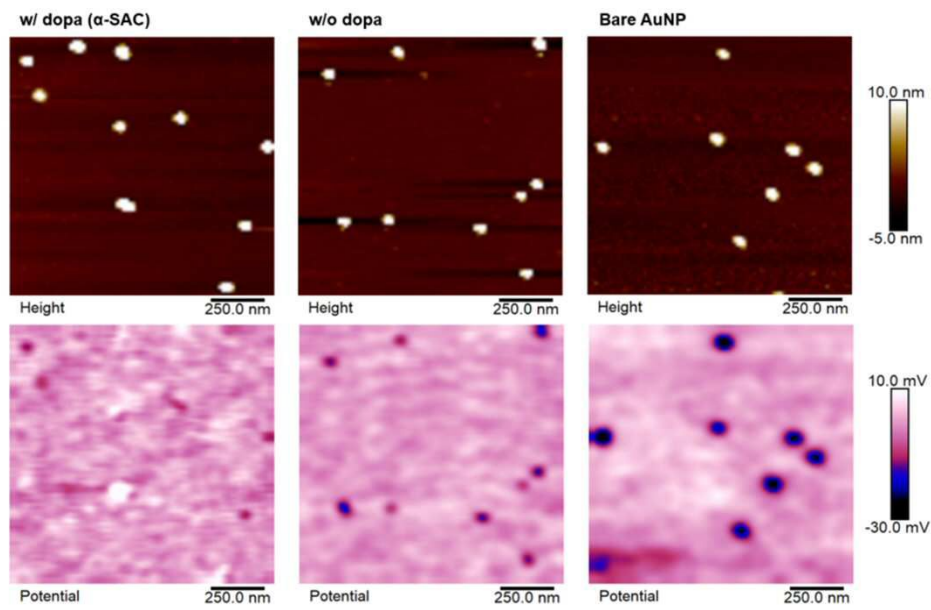
Dopa concentration salt resistance test (24h)



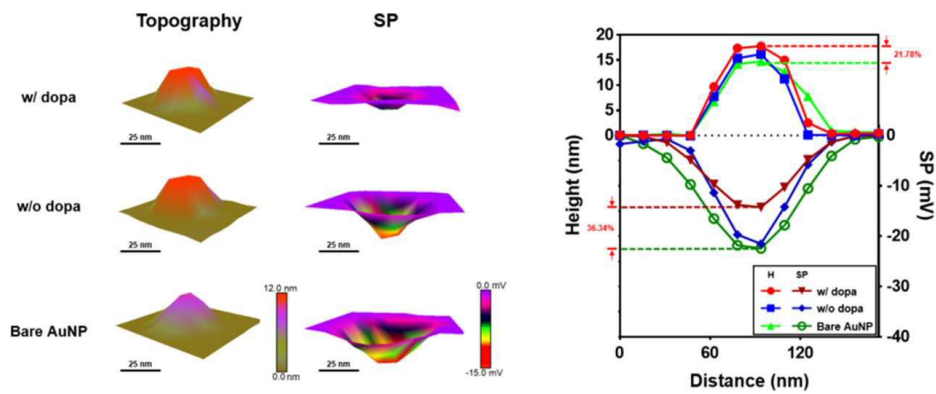
Dopa concentration salt resistance test (24h)



도면14



도면15



도면16

