

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2017-0041644 (43) 공개일자 2017년04월17일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C07K 14/47 (2006.01) C07D 487/22 (2006.01) D01F 4/00 (2006.01) (52) CPC특허분류 C07K 14/4711 (2013.01) C07D 487/22 (2013.01) (21) 출원번호 10-2016-0129776 (22) 출원일자 2016년10월07일 심사청구일자 2016년10월07일 (30) 우선권주장 1020150141160 2015년10월07일 대한민국(KR)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가) (72) 발명자 김준곤 서울특별시 서초구 사임당로 130, 7동 806호 최태수 경기도 김포시 유현로 19, 111동 1505호 (74) 대리인 정은열	

전체 청구항 수 : 총 9 항

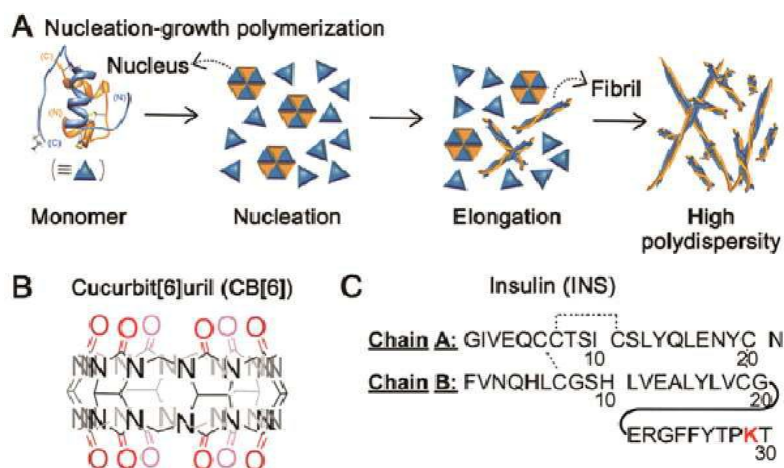
(54) 발명의 명칭 **쿠커비투릴[6]을 이용한 아밀로이드 섬유의 길이 조절 방법**

(57) 요약

본 발명은 쿠커비투릴[6]을 이용한 아밀로이드 섬유의 길이 조절 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 포름산 용매에 용해된 아밀로이드성 단백질의 섬유화 반응 시 쿠커비투릴[6]를 이용하여 아밀로이드 섬유화 과정을 제어함으로써 아밀로이드 섬유의 길이를 조절하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 아밀로이드성 단백질의 아밀로이드 섬유화 반응 수행시 쿠커비투릴[6], 포름산 용매의 농도 및 교반 속도 조절을 통해 아밀로이드 섬유의 길이를 조절할 수 있으며, 균일한 길이와 크기를 가진 아밀로이드 섬유를 제공함으로써 아밀로이드 섬유의 고유 기능성을 최적화할 수 있다. 또한, 아밀로이드 섬유의 생성과정에서 발생하는 부산물인 비정형 응집체의 형성을 억제함으로써 아밀로이드 섬유의 형성을 효율적으로 유도할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
D01F 4/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

포름산 용매에 용해된 아밀로이드성 단백질의 섬유화 반응 시 쿠커비투릴[6]을 혼합 및 교반시키는 것을 특징으로 하는 아밀로이드 섬유의 길이 조절 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 포름산 용매의 농도 또는 쿠커비투릴[6]의 농도를 조절하여 아밀로이드 섬유의 길이를 조절하는 것을 특징으로 하는 아밀로이드 섬유의 길이 조절 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 포름산 용매의 농도는 0.1 내지 15%(v/v)인 것을 특징으로 하는 아밀로이드 섬유의 길이 조절 방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 쿠커비투릴[6]의 농도는 아밀로이드성 단백질 농도의 1 내지 1000배인 것을 특징으로 하는 아밀로이드 섬유의 길이 조절 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 교반 속도는 100 내지 500 rpm인 것을 특징으로 하는 아밀로이드 섬유의 길이 조절 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 쿠커비투릴[6]은 상기 아밀로이드성 단백질의 라이신(Lysine, Lys) 잔기에 선택적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 아밀로이드 섬유의 길이 조절 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 아밀로이드성 단백질은 인슐린, 리소자임, 아밀로이드 베타 40, 아밀로이드 베타 42, 아밀린, 인간 섬 아밀로이드 폴리펩타이드로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 아밀로이드 섬유의 길이 조절 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 아밀로이드 섬유의 길이는 10 nm 내지 10 μ m 범위 내에서 조절되는 것을 특징으로 하는 아밀로이드 섬유의 길이 조절 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 아밀로이드 섬유 길이의 다분산지수(Polydispersity index, PDI)는 1.2 내지 1.6인 것을 특징으로 하는

아밀로이드 섬유질의 길이 조절 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 쿠키비투릴[6]을 이용한 아밀로이드 섬유의 길이 조절 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 포름산 용매에 용해된 아밀로이드성 단백질의 섬유화 반응 시 쿠키비투릴[6]를 이용하여 아밀로이드 섬유화 과정을 제어함으로써 아밀로이드 섬유의 길이를 조절하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 아밀로이드 섬유는 단백질의 사차구조로 이루어진 물질로서, 아밀로이드성 단백질들의 자가조립을 통해 만들어진 다. 아밀로이드성 단백질들은 자가조립 과정에서 베타 평판 구조의 형태로 배열됨으로써 길다란 형태의 섬유를 만들게 된다.

[0003] 이러한 아밀로이드 섬유화는 단백질의 준안정적(metastable) 특성에 기인하는 대표적인 현상이다(비특허문헌 1). 단백질의 기본적인 구조는 펼쳐진 폴리펩티드 체인으로부터 자발적으로 형성되며(비특허문헌 2), 이는 상기 구조가 단일 단백질의 고립된 시스템 내에서 열역학적으로 안정한 상태를 암시한다(비특허문헌 3). 그러나, 단백질-단백질 상호작용의 존재하에서 아밀로이드성 단백질의 대부분은 단백질이 아밀로이드 섬유로 자가조립되는 과정에서 준안정 상태로 전환된다(비특허문헌 4). 이러한 섬유화 과정은 단백질 미스폴딩 질환(비특허문헌 5)과 생물의 생물학적 활성(비특허문헌 6)을 초래하는바 단백질의 준안정성과 아밀로이드 섬유화 사이의 상관관계에 대한 관심 및 관련 연구가 늘어나고 있다(비특허문헌 1, 7, 8).

[0004] 대표적인 예로서 아밀로이드성 단백질의 섬유화로 인한 자가조립 현상은 퇴행성 질환과 연관이 있으며, 예를 들어 이형 당뇨병과 연관된 아밀린, 알츠하이머 병과 연관된 아밀로이드 베타, 파킨슨 병과 연관된 알파 시누클린 및 타우 단백질의 응집현상 등이 있다. 또한, 최근 연구에 의하면 아밀로이드 섬유가 질병에만 연관되지 않고 특정 생물체의 생체기능에 필요한 단단한 막의 역할을 하는 경우들이 보고되고 있다. 대표적인 예로써 박테리아 세포의 외벽에 존재하는 아밀로이드 섬유는 외부의 침입에 대항하는 수단으로 쓰이고 있으며 포유류의 멜라닌 색소가 아밀로이드 섬유로 구성된 부분에 고정되어 색소로서의 기능을 한다는 것이 알려져 있다.

[0005] 이러한 섬유화 과정의 병리학적 및 생물학적 관련성 외에도, 그들의 조립구조 연구를 통해 다양한 기능을 가진 바이오소재로서의 아밀로이드 섬유의 잠재성이 큰 관심을 받고 있으며(비특허문헌 9, 10), 최근에는, 자연에서 아밀로이드 섬유가 견고한 구조체로써 쓰이는 점에 착안하여, 아밀로이드 섬유를 새로운 종류의 나노소재로써 사용하려는 연구들이 많이 진행되어 왔다. 아밀로이드 섬유의 장점 중 하나는 섬유의 강도가 거미줄의 강도와 매우 유사한 수준을 나타낸다는 것으로, 이는 또한 강철이 가지는 것과 유사한 수준에 해당한다(거미줄 0.9-1.5 GPa, 강철 0.6 -1.8 GPa, 아밀로이드 0.2-14 GPa).

[0006] 이처럼 강도가 우수한 아밀로이드 물질의 골격을 얻기 위해서는 섬유 조립체의 조각이 매우 중요한바, 섬유 조립체를 조작하는 많은 시도가 이루어지고 있다(비특허문헌 11, 12). 그러나, 단백질의 준안정성 및 조립 이질성(assembly heterogeneity)으로 인한 아밀로이드 섬유화의 복잡성은 상기 섬유화의 엄격한 조절을 방해한다. 아밀로이드 섬유에 대한 이러한 연구들은 모두 섬유 조립체의 조절과 관련된 공통적인 문제를 가지는바, 아밀로이드 섬유화의 다음 과제는 아밀로이드 조립의 조절을 위한 합리적인 전략을 개발하는 것이 될 것이다.

[0007] 한편, 아밀로이드성 단백질의 자가조립 현상을 조절하기 위해서 그동안 시도된 방법 중 하나는 주인-손님 화학을 이용하는 것이다. 구체적으로 아밀로이드성 단백질의 특정 잔기와 합성 수용체가 서로 주인-손님 상호작용을 일으키게 되면, 아밀로이드 섬유의 형성이 억제되는 방식을 이용하는 것인데, 현재까지 관련 연구로서, 베타-싸이클로텍스트린 유도체, 라이신 특이적인 분자집게, 쿠키비투[6]릴, 쿠키비투[7]릴 등의 합성 수용체가 아밀로이드성 단백질의 페닐알라닌이나 라이신과 상호작용하는 경우들이 보고되고 있다. 그러나 이들 연구의 주요 목표는 아밀로이드성 단백질들의 자가조립을 궁극적으로 억제하여 퇴행성 질환의 치료 전략 수립에 한정되어 있다.

[0008] 앞에서 살펴본 바와 같이, 현재 다양한 기능을 가진 아밀로이드 섬유들이 합성되어 사용되고 있으며, 이로 인하여 앞으로는 섬유의 각 단위체를 이루는 단백질이 점점 복잡한 구조를 가지게 될 것으로 예상된다. 이처럼 단백질의 구조가 복잡해질수록 아밀로이드 섬유의 형성 메커니즘 또한 복잡해져 섬유의 형태나 길이를 조절할 수 없어 원하지 않는 형태의 부산물 또는 응집체가 생성될 가능성이 높다. 따라서, 아밀로이드의 섬유화를 제어하여

아밀로이드 섬유의 형태와 길이를 조절하는 기술에 대한 개발이 절실히 요구되고 있으나, 현재까지 이와 관련된 효율적인 방법은 개발되어 있지 않은 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009]

(비특허문헌 0001) P. Ciryam, R. Kundra, R. I. Morimoto, C. M. Dobson, M. Vendruscolo, Supersaturation is a major driving force for protein aggregation in neurodegenerative diseases. Trends Pharmacol. Sci. 36, 72-77 (2015).

(비특허문헌 0002) C. M. Dobson, Protein folding and misfolding. Nature 426, 884-890 (2003).

(비특허문헌 0003) F. U. Hartl, A. Bracher, M. Hayer-Hartl, Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. Nature 475, 324-332 (2011).

(비특허문헌 0004) F. U. Hartl, M. Hayer-Hartl, Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. Nat. Struct. Mol. Biol. 16, 574-581 (2009).

(비특허문헌 0005) F. Chiti, C. M. Dobson, Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. Annu. Rev. Biochem. 75, 333-366 (2006).

(비특허문헌 0006) D. M. Fowler, A. V. Koulov, W. E. Balch, J. W. Kelly, Functional amyloid - from bacteria to humans. Trends Biochem. Sci. 32, 217-224 (2007).

(비특허문헌 0007) M. So, D. Hall, Y. Goto, Revisiting supersaturation as a factor determining amyloid fibrillation. Curr. Opin. Struct. Biol. 36, 32-39 (2016).

(비특허문헌 0008) A. Patel et al., A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. Cell 162, 1066-1077 (2015).

(비특허문헌 0009) C. M. Rufo et al., Short peptides self-assemble to produce catalytic amyloids. Nat. Chem. 6, 303-309 (2014).

(비특허문헌 0010) M. Nishijima et al., Supramolecular photochirogenesis with functional amyloid superstructures. Chem. Commun. 49, 8916-8918 (2013).

(비특허문헌 0011) T. P. J. Knowles, M. J. Buehler, Nanomechanics of functional and pathological amyloid materials. Nat. Nanotechnol. 6, 469-479 (2011).

(비특허문헌 0012) G. Lee et al., Self-assembled amyloid fibrils with controllable conformational heterogeneity. Sci. Rep. 5, (2015).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010]

본 발명은 상술한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 본 발명에서는 포름산 용매에 용해된 아밀로이드성 단백질의 섬유화 반응 시 쿠커비투릴[6]을 이용하여 아밀로이드 섬유의 길이를 조절하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011]

본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0012]

포름산 용매에 용해된 아밀로이드성 단백질의 섬유화 반응 시 쿠커비투릴[6]을 혼합 및 교반시키는 것을 특징으로 하는 아밀로이드 섬유의 길이 조절 방법을 제공한다.

[0013]

본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 포름산 용매의 농도 또는 쿠커비투릴[6]의 농도를 조절하여 아밀로이드 섬

유의 길이를 조절할 수 있다.

[0014] 이때, 상기 포름산 용매의 농도는 0.1 내지 15%(v/v)일 수 있다.

[0015] 또한, 상기 쿠커비투릴[6]의 농도는 아밀로이드성 단백질 농도의 1 내지 1000배일 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 교반 속도는 100 내지 500 rpm일 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 쿠커비투릴[6]는 상기 아밀로이드성 단백질의 라이신(Lysine, Lys) 잔기에 선택적으로 결합할 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 아밀로이드성 단백질은 인슐린, 리소자임, 아밀로이드 베타 40, 아밀로이드 베타 42, 아밀린, 인간 섬 아밀로이드 폴리펩타이드로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 아밀로이드 섬유 길이는 10 nm 내지 10 μ m 범위 내에서 조절될 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 아밀로이드 섬유 길이의 다분산지수(Polydispersity index, PDI)는 1.2 내지 1.6일 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따르면 아밀로이드성 단백질의 아밀로이드 섬유화 반응 수행시 쿠커비투릴[6], 포름산 용매의 농도 및 교반 속도 조절을 통해 아밀로이드 섬유의 길이를 조절할 수 있으며, 균일한 길이와 크기를 가진 아밀로이드 섬유를 제공함으로써 아밀로이드 섬유의 고유 기능성을 최적화할 수 있다. 또한, 아밀로이드 섬유의 생성과정에서 발생하는 부산물인 비정형 응집체의 형성을 억제함으로써 아밀로이드 섬유의 형성을 효율적으로 유도할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 아밀로이드 섬유화의 메커니즘을 나타낸 도면으로, A)는 핵생성-성장 중합 과정을 나타내고, B)는 CB[6]의 구조를 나타내며, C)는 단일 라이신(Lys) 잔기를 포함하는(빨간색으로 표시) 인슐린(INS)의 구조를 나타낸다.

도 2는 INS 섬유 형성시 교반과 CB[6]의 영향을 나타낸 도면으로, A)는 5%(v/v) 포름산(formic acid, FA) 용액에서 형성된 INS 섬유들의 TEM 이미지이다. INS 및 CB[6]의 농도는 각각 50 μ M 및 5 mM이었다. B)는 도 2A의 INS 섬유들의 평균 길이를 나타낸다.

도 3은 다양한 FA 농도(%)에서의 INS 섬유의 길이를 나타낸 도면으로, A)는 다양한 농도의 FA에서의 INS 섬유의 TEM 이미지이다. Ref는 CB[6]의 부존재하에서 형성된 INS 섬유의 대표적인 이미지이다. 이미지 내에 기재된 숫자는 각 FA 농도에서 CB[6]의 존재하에 형성된 섬유들에 대응한다. 모든 섬유들은 교반 속도 200 rpm, INS 및 CB[6]의 농도 각각 50 μ M 및 500 Mm의 조건하에서 제조되었다. B)는 도 3A의 TEM 이미지로부터 결정된 섬유의 평균 길이를 나타낸다.

도 4는 CB[6]에 의해 유도되는 INS의 상전이를 나타낸 도면으로, A)는 INS-CB[6] 용액의 원심분리 공정을 나타낸다. B)는 5%(v/v) FA 용액하에서 CB[6]의 농도에 따른 INS의 농도 변화를 나타낸다. C)는 5 mM의 CB[6] 존재하에서 다양한 FA 농도(%)에 따른 INS의 농도를 나타낸다. D)는 INS의 상전이와 섬유 조립 사이의 공존을 나타낸다. CB[6]에 의한 INS의 상전이는 핵생성에서 INS 단량체의 농도를 제어한다. INS의 농도는 50 μ M이다.

도 5는 CB[6]에 의해 제어되는 INS 섬유화의 메커니즘을 나타낸 도면으로, A)는 다양한 CB[6]의 농도에 따른 INS 섬유화의 운동에 대한 ThT 분석을 나타낸다. INS의 농도는 50 μ M이었다. 용액에서 CB[6]의 탁도(turbidity)로 인해 5 mM의 CB[6] 조건은 제외되었다. B)는 핵형성-성장 중합에서 CB[6]에 의해 매개되는 운동 조절의 개략도이고, C)는 섬유의 길이와 단량체:핵의 비율 간의 상관관계를 나타낸다. CB[6]의 양이 감소(왼쪽) 또는 증가(오른쪽)함에 따라 섬유길이는 각각 짧아지거나 길어진다.

도 6은 다양한 아밀로이드 형성 단백질에 CB[6] 혼합시 효과를 나타낸 도면으로, A)는 hIAPP, LYZ, A β 42, 및 A β 40 섬유들의 TEM 이미지이다. B)는 CB[6]에 의해 조절되는 아밀로이드 섬유의 길이를 나타낸다. LYZ의 농도는 50 μ M, hIAPP, A β 42 및 A β 40의 농도는 10 μ M 이다.

도 7의 A)는 다양한 CB[6] 농도에서 5% FA 용액에서 형성된 INS 섬유의 TEM 이미지이다. B)는 A)의 INS 섬유의

평균 길이이다. INS의 농도는 50 μM 이고 교반은 200 rpm이었다.

도 8은 INS 섬유의 평균 두께이다. 오차 범위 내에서 큰 변화는 관찰되지 않았다.

도 9의 A)는 다양한 FA 농도(%)에서 형성된 INS 섬유의 SEM이미지이다. B)는 도 9A의 INS 섬유의 평균 길이이다. 0.1, 3, 및 30%(v/v) FA 조건에서는 섬유가 관찰되지 않았다. 모든 섬유화는 교반 없이 진행하였으며 INS의 농도는 50 μM 이었다.

도 10은 INS 용액의 Native-PAGE 결과이다. 별표는 INS에 결합된 CB[6] 유닛의 수를 암시한다. INS의 농도는 50 μM 이었다

도 11은 INS 및 INS-CB[6]의 ESI-MS 스펙트럼이다. 사각형 내부의 숫자는 CB[6]의 2차 결합을 암시한다. INS는 4+ 내지 6+ 차지(charge)를 보여주었다. INS-CB[6] 복합체 피크는 동일한 차지 상태로 검출되었다. 1:1의 INS-CB[6] 복합체는 주요 종으로 관찰되었고, CB[6] (INS-2CB[6])와의 복합체는 작은 부분으로 검출되었다(도 10). INS와 CB[6]의 약간의 상호작용은 단백질((N-terminus, histidine, and arginine)의 양 전하 잔기의 존재시에 발생하는 것으로 나타났다.

도 12는 CB[6]의 A) INS, B) INSB1, and C) INSB2와의 ITC 측정 결과를 나타낸다. D)는 CB[6] with INS와 그들의 B-chain 단편이 결합된 CB[6]의 K_a 값을 나타낸다. INS와 그들의 B-chain 단편(INSB1)은 각각 3.0×10^3 및 $2.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 로 유사한 K_a 값을 나타내었다. INSB1에서 Lys의 효과를 시험하기 위해 INSB2에서 Lys는 Ala로 변이시켰고, 그 결과 INSB2에서 K_a 값은 $1.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 로 감소하였다. 이러한 ITC 결과는 Lys가 INS와 CB[6] 사이의 상호작용에 매우 중요함을 나타낸다.

도 13의 A)는 INS-CB[6] 복합체의 ESI-MS² 스펙트럼이다. 별표는 CB[6]와 복합화된 단편을 나타낸다. B)는 INS-CB[6]의 MS² 단편화 경로를 나타낸다. 채워진 원을 가진 막대는 CB[6]와 복합화된 INS 단편을 나타내고, 채워진 원이 없는 막대는 INS 단편만을 나타낸다. 복합체의 단편화 경로는 INS B-Chain C-말단의 y-type 단편 및 INS B-Chain N-말단의 b-type 단편을 나타낸다. C-말단의 y-type 단편 대부분은 CB[6]와 복합체를 형성하였으나, N-말단의 b-type 단편은 CB[6]와 복합체를 형성하지 않았다. C)는 m/z 549(5)에서 CB[6]와 결합된 Lys-선택된 단편이다(S. W. Heo *et al.*, Host-Guest Chemistry in the Gas Phase: Selected Fragmentations of CB[6]-Peptide Complexes at Lysine Residues and Its Utility to Probe the Structures of Small Proteins. *Anal. Chem.* **83**, 7916-7923 (2011).).

도 14는 교반 존재 또는 부존재시 INS 섬유화의 운동에 대한 ThT 분석이다. INS의 농도는 50 μM 이었다.

도 15는 초분자적 체인-성장 중합 과정(chain-growth polymerization)의 대표적인 개략도이다.

도 16은 A) 무처리된 INS 섬유의 IR 스펙트럼이고, B)는 CB[6] 및 비섬유종을 세척한 후의 INS 섬유의 IR 스펙트럼이다.

도 17은 다양한 CB[6] 농도 및 다양한 FA 농도(%)하에서의 INS의 섬유 길이를 나타낸다. INS의 농도는 50 μM 이었다.

도 18은 CB[6]의 존재 또는 부존재시 단백질의 ESI-MS 스펙트럼이다. 사각형에 있는 숫자는 단백질의 결합된 CB[6] 유닛의 수를 암시한다. A)는 hIAPP 및 hIAPP-CB[6]의 ESI-MS 스펙트럼이다. hIAPP 는 3+ 에서 5+ 차지 상태를 보여주었고, hIAPP-CB[6] 복합체도 동일한 차지상태를 보여주었다. hIAPP-CB[6]의 1:1 복합체는 주요 종이였으며, CB[6]과 더 복합화된 (hIAPP-2CB[6])는 소량 검출되었다. B)는 LYZ 및 LYZ-CB[6]의 ESI-MS 스펙트럼이다. LYZ 는 8+ 에서 10+ 차지 상태를 보여주었고, LYZ-CB[6]의 복합체도 동일한 차지상태를 보여주었다. LYZ-CB[6]의 1:1 복합체는 주요 종이였으며, CB[6]과 더 복합화된 (LYZ-2CB[6])는 소량 검출되었다. C)와 D)는 A β 펩타이드 및 A β -CB[6] 복합체의 ESI-MS 스펙트럼이다. A β 펩타이드는 3+ 에서 5+ 차지 상태를 보여주었고, A β -CB[6] 복합체도 동일한 차지상태를 보여주었다. A β -CB[6]의 1:1 복합체는 주요 종이였으며, CB[6]과 더 복합화된 (A β -2CB[6])는 소량 검출되었다.

도 19의 A)는 hIAPP-CB[6] 복합체의 ESI-MS² 스펙트럼이다. 별표는 CB[6]와 복합화된 단편을 암시한다. B)는 hIAPP-CB[6] 복합체의 ESI-MS3 스펙트럼이다. 별표는 CB[6]와 복합화된 단편을 암시한다. C)는 hIAPP-CB[6] 복

합체의 MS^2 및 MS^3 단편화 경로이다. 채워진 원을 가진 막대는 CB[6]와 복합화된 hIAPP 단편을 나타내고, 채워진 원이 없는 막대는 hIAPP 단편만을 나타낸다. D)는 m/z 549(5)에서 CB[6]와 결합된 Lys-선택된 단편이다. 이러한 결과는 Lys가 hIAPP 펩타이드에 결합하는 CB[6]의 가장 중요한 결합 영역임을 나타낸다.

도 20의 A)는 LYZ-CB[6] 복합체의 ESI- MS^2 스펙트럼이다. 별표는 CB[6]와 복합화된 단편을 암시한다. B)는 LYZ-CB[6] 복합체의 MS^2 단편화 경로이다. 채워진 원을 가진 막대는 CB[6]와 복합화된 LYZ 단편을 나타내고, 채워진 원이 없는 막대는 LYZ 단편만을 나타낸다. C)는 m/z 549(5)에서 CB[6]와 결합된 Lys-선택된 단편이다. LYZ의 분자량이 너무 커서 이온 트랩(LTQ velos)에서 충돌에너지를 발휘할 수 없기 때문에, LYZ의 Lys-선택된 단편은 qTOF instrument (Synapt G2)을 사용하여 획득하였다. 이러한 결과는 Lys가 LYZ 펩타이드에 결합하는 CB[6]의 가장 중요한 결합 영역임을 나타낸다.

도 21은 A β 42-CB[6](A) 및 A β 40-CB[6](B) 복합체의 ESI- MS^2 스펙트럼이다. 별표는 CB[6]와 복합화된 단편을 암시한다. C)는 A β 42-CB[6] 복합체의 MS^2 단편화 경로이고, D)는 A β 40-CB[6] 복합체의 MS^2 단편화 경로이다. 채워진 원을 가진 막대는 CB[6]와 복합화된 A β 단편을 나타내고, 채워진 원이 없는 막대는 A β 단편만을 나타낸다. E) 및 F)는 m/z 549에서의 Lys-선택된 단편이다. 이러한 결과는 Lys16 및 Lys28이 A β 펩타이드에 결합하는 CB[6]의 가장 중요한 결합 영역임을 나타낸다.

도 22는 5% FA 상등액에서의 단백질 농도이다. CB[6] 농도는 5 mM이었다.

도 23은 A β 40 섬유화의 ThT 분석이다. A β 40:CB[6] = 1:100 비율은 CB[6]에 의한 빛의 산란으로 인해 제외하였다. A β 40 용액은 50 °C, 200 rpm으로 교반하면서 인큐베이팅 하였다. A β 40의 농도는 10 μ M이었다.

도 24의 A)는 교반 없이 다양한 온도하에서 형성된 INS 섬유의 SEM 이미지이다. B)는 A)에서 형성된 섬유의 평균 섬유 길이이다. INS의 농도는 50 μ M이었다.

도 25는 KLONK image measurements로부터 측정된 대표적인 이미지이다. 이러한 이미지에서 INS 섬유는 0.1% FA(v/v), CB[6] 500 μ M 및 200 rpm의 교반 조건 하에서 인큐베이팅 되었다. 미가공 데이터는 왼쪽이고 가공된 데이터는 오른쪽이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0024] **물질 및 방법**

[0025] **단백질 섬유(Protein fibril) 제조**

[0026] 인간 재조합 인슐린(zinc free), 암탉 알 흰자위 리소자임(hen egg white lysozyme, LYZ), CB[6] 수화물 및 포름산(formic acid, FA)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. 인간 섬 아밀로이드 폴리펩타이드(Human islet amyloid polypeptide, hIAPP) 및 아밀로이드- β -1-40 펩타이드는 Pepton (Daejeon, Republic of Korea)에서 구매하였고, 아밀로이드- β -1-42 펩타이드는 Anygen (Jangheung, Republic of Korea)에서 구매하였다. 단백질 스톱 용액은 0.1% FA 용액에서 용해된 100 μ M 농도로 제조하였고, 50 mM CB[6] 스톱 용액은 50% FA 용액에서 용해시켜 제조하였다. 스톱 용액은 4 mL의 봉규산염 유리 병에 옮긴 뒤 최종 1 mL의 부피로 최종 희석하였다. 5%(v/v) FA 용액에서 인큐베이션 하기 전에 응집되는 것을 방지하기 위하여 인슐린과 리소자임의 농도는 50 μ M, 아밀로이드- β 및 인간 섬 아밀로이드 펩타이드의 농도는 10 μ M으로 조정하였다. 모든 단백질 용액은 50 °C에서 4일 동안 인큐베이팅 하였으며, 교반은 200 rpm에서 수행하였다. CB[6]가 수용액에서 난용성 성질을 가지기 때문에 용해도 한계 이상의 고체 CB[6]를 4 mL 병의 바닥에 정착시켰다. 또한, 교반없이 온도의 변화 효과를 테스트 하였으며, 이를 통해 섬유의 길이 생성의 균일성 향상에 온도는 중요한 요소가 아님을 확인하였다(도 24).

[0027] **TEM 분석을 위한 샘플 처리**

[0028] 포름바(Formvar)/탄소 코팅된 구리 그리드(400-mesh)는 Electron Microscopy Science (Hatfield, PA, USA)에서 구매하였다. 배양액(5 μ L)의 표본(Aliquots)이 그리드 상에서 3분 동안 발견되었으며, 마이크로피펫 팁을 이용

하여 제거하였다. 최종적으로, 물 중에 용해된 1 w/w% 우라닐 아세테이트 용액이 그리드 상에서 1분 동안 포착되었다. 그리드에 잔존하는 CB[6] 제거를 위해 5초 동안 한번에 5% FA로 처리하였다. 처리된 그리드는 JEM-1011 transmission electron microscope (JEOL, Japan) 및 Tecnai G2 F30ST (FEI, USA)를 이용하여 분석하였다.

[0029] **섬유 분석**

[0030] 섬유의 길이 및 두께는 'KLONK image measurement' 소프트웨어 (Denmark)를 이용하여 측정하였다. 섬유의 길이 및 두께는 각각 섬유의 종단 간 거리 및 폭으로 정의하였다. 500-2000 종류의 섬유 길이 및 200 종류의 섬유 두께를 측정하였다. KLONK를 이용하여 측정된 대표적인 예는 도 25에 도시되어 있다. 섬유의 평균 길이는 하기 도 3 및 도 17에 나타내었으며, 평균 길이의 표준 편차는 하기의 식을 사용하여 변환하였다.

[0031] [식 1]

[0032]
$$\Delta y = 1 / \ln 10 \cdot (\Delta x / x)$$

[0033] **티오플라핀 T (ThT) 분석**

[0034] ThT 분석은 섬유화 운동에 관한 정보를 획득하기 위해 수행하였다. ThT 스톱 용액 1 mg/mL 를 제조하였다. 형광 분석 전에 인큐베이션된 단백질 용액 표본 25 μ L, ThT 스톱 용액 25 μ L 및 5% FA 용액 450 μ L를 혼합하였다. ThT 의 여기 파장은 452 nm으로 설정하고, 발광은 460-490 nm로 스캔되었다. 482 nm에서의 발광은 섬유화 운동 모니터링에 사용하였다. CB[6]와 복합체 형성시 ThT 의 형광 강도가 증가하기 때문에, 기준선은 단백질이 없는 ThT-CB[6] 용액을 사용하여 수정하였다. 모든 데이터 포인트는 고정상(stationary phase)의 높이를 이용하여 정규화하였다.

[0035] **등온 적정 열량 측정(Isothermal titration calorimetry ,ITC)**

[0036] 인슐린과 CB[6]의 상호작용에 대한 평형 결합 상수(K_a)를 얻기 위하여, ITC calorimeter (Microcal, Worcestershire, UK)를 이용하여 ITC 실험을 수행하였다. 인슐린과 CB[6] 용액은 측정 전에 새로 준비 및 탈기 하였다. 기준 셀은 50% FA로 채우고, 50%(v/v) FA 용액에 용해된 인슐린 용액 100 μ M은 ITC 셀에 로딩하였다. CB[6] 용액 1 mM은 ITC 시린지를 통해 30회 주입하였다. 주입 간격은 3분 이었다. ITC 셀을 502 rpm 에서 교반 하고 25 $^{\circ}$ C로 유지하였다. 모든 데이터는 VP-ITC calorimeter의 Origin 7.0에 저장되어 있는 "single-set-of-sites" 를 이용하여 처리하였다.

[0037] **UV-vis 분광법**

[0038] CB[6] 첨가 또는 무첨가 단백질 용액을 준비하고, 용액의 단백질의 농도를 측정하였다. 용액을 1분 동안 혼합시킨 후, 18,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 원심분리 하였다. 원심분리된 용액의 상등액의 UV-visible 스펙트럼을 HP5520 UV-Vis spectrophotometer (HP, Santa Clara, CA, USA)을 이용하여 획득하였다. 인슐린의 농도는 280 nm에서 5,960 $M^{-1}cm^{-1}$ 의 흡광 계수를 이용하여 계산하였다. 인간 섬 아밀로이드 폴리펩타이드 및 아밀로이드- β 의 농도는 280 nm에서 1,490 $M^{-1}cm^{-1}$ 의 흡광 계수를 이용하여 계산하였다. 리소자임의 농도는 280 nm에서 37,970 $M^{-1}cm^{-1}$ 의 흡광 계수를 이용하여 계산하였다.

[0039] **전자분무이온화 질량분석(Electrospray ionization mass spectrometry)**

[0040] 전자분무이온화 질량 분석(ESI-MS) 및 충돌 유도 해리(CID)를 이용한 이중 질량 분석(MS^2)은 양이온 모드에서 ESI 소스를 구비한 LTQ velos dual ion trap mass spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. ESI 변수는 다음과 같이 설정하였다: 전자분무 전압: 3.5 kV; 모세관 온도 : 150 $^{\circ}$ C. [LYZ-CB[6]]⁹⁺의 CID 분석은 주행 이온 이동도 질량 분석기((TWIMS; Waters, Milford, MA, USA)를 갖춘 Synapt G2 HDMS quadrupole time of flight (qTOF) 장비를 이용하여 측정하였다. ESI 변수는 다음과 같이 설정하였다: 전자분무 전압: 1.5 kV; 모세관 온도 : 80 $^{\circ}$ C.

[0041] **적외선 분광법(Infrared spectroscopy)**

[0042] 적외선 스펙트럼은 Nicolet iS10 spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 각 샘플에 대한 총 128 개의 스펙트럼을 하나의 스펙트럼으로 평균화하여 4 cm^{-1} 의 해상도로 취득하였다. 세척하지 않은 샘플은 실리콘 웨이퍼 상에 직접 캐스팅하고, 하루 동안 공기중에서 건조시켰다. 세정된

샘플들은 Amicon 0.5 mL 100k centrifugal 필터(Millipore, Billerica, MA, USA)로 로딩하고 나서, 실리콘 웨이퍼상에 로딩하기 전에 5% FA(v/v)로 3회 세척하여 과량의 CB[6] 및 비섬유 종을 제거하였다. 모든 IR 스펙터럼은 1500-1900 cm^{-1} 범위에서 가장 높은 피크 강도를 이용하여 정규화하였다.

[0043] **다분산 지수(Polydispersity index, PDI)**

[0044] PDI(R. G. Gilbert *et al.*, Dispersity in polymer science (IUPAC Recommendations 2009) (vol 81, pg 351, 2009). *Pure Appl. Chem.* **81**, 779-779 (2009).)는 수평균 중합도(number average degree of polymerization) ($\overline{L_n}$)에 대한 질량평균 중합도(mass average degree of polymerization) ($\overline{L_w}$)의 비율이다(하기 식 2). 폴리머가 이상적으로 단분산일 경우 PDI 값은 1이다. PDI 값은 폴리머의 이질적인 분포로 인하여 일반적으로 1보다 크다.

[0045] [식 2]

$$\overline{L_w} = \frac{l_1^2 n_1 + l_2^2 n_2 + \dots + l_m^2 n_m}{l_1 n_1 + l_2 n_2 + \dots + l_m n_m}$$

$$\overline{L_n} = \frac{l_1 n_1 + l_2 n_2 + \dots + l_m n_m}{n_1 + n_2 + \dots + n_m}$$

$$\text{PDI} = \overline{L_w} / \overline{L_n}$$

[0046]

[0047] **결과**

[0048] 아밀로이드 섬유화는 일반적으로 도 1A에 도시된 핵생성-성장 중합 모델을 따른다(M. So, D. Hall, Y. Goto, Revisiting supersaturation as a factor determining amyloid fibrillation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **36**, 32-39 (2016).). 이러한 메커니즘은 섬유화가 모노머 단백질의 핵생성에 의해 시작되고 나서, 아밀로이드 섬유 형성을 위한 단량체 첨가의 의해 핵 신장(elongation)이 이루어짐을 암시한다. 신장 과정($k_{el} = \sim 10^4 - 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)은 핵생성 과정($k_{nu} = \sim 10^{-2} - 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) 보다 빠르다(C. C. Lee, A. Nayak, A. Sethuraman, G. Belfort, G. J. McRae, A three-stage kinetic model of amyloid fibrillation. *Biophys. J.* **92**, 3448-3458 (2007)). 핵 생성 속도가 느린 것은 준안정적인 단백질이 역학적으로 포획된 상태(trapped state)이기 때문이다(T. S. Choi, J. W. Lee, K. S. Jin, H. I. Kim, Amyloid Fibrillation of Insulin under Water-Limited Conditions. *Biophys. J.* **107**, 1939-1949 (2014)). 대조적으로, 단량체 첨가에 의한 핵의 신장은 핵의 템플릿 구조로 인하여 훨씬 빠르다(S. Chimon *et al.*, Evidence of fibril-like β -sheet structures in a neurotoxic amyloid intermediate of Alzheimer's β -amyloid. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 1157-1164 (2007)). 따라서, 조립 과정의 초기 단계에서 형성된 핵은 후반부에 형성된 핵에 비해 높은 조립 상태를 가지며(D. Pinotsi *et al.*, Direct Observation of Heterogeneous Amyloid Fibril Growth Kinetics via Two-Color Super-Resolution Microscopy. *Nano Lett.* **14**, 339-345 (2014)), 섬유 조립 상태의 분포 또한 다분산성을 가진다(D. H. Zhao, J. S. Moore, Nucleation-elongation: a mechanism for cooperative supramolecular polymerization. *Org. Biomol. Chem.* **1**, 3471-3491 (2003)). 따라서 미리 형성된 핵의 신장 동안의 추가적인 핵 생성을 억제하는 것은 섬유 조립체의 제어를 위한 하나의 전략이 될 수 있다.

[0049] 본 발명에서는 주인-손님 화학을 이용하여 아밀로이드 섬유의 길이와 낮은 이질성을 제어할 수 있는 아밀로이드 자가조립의 운동 제어를 입증하였다. 이러한 접근의 주요한 이점은 주인-손님 상호작용의 합리적인 디자인을 기반으로 단백질-수용체(protein-receptor)복합체의 형성을 예측할 수 있다는 것이다(H. H. Lee *et al.*, Supramolecular Inhibition of Amyloid Fibrillation by Cucurbit[7]uril. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 7461-7465 (2014)). 이러한 이유로, 주인-손님 상호작용은 단백질 인식(protein recognition)(J. M. Chinai *et al.*, Molecular Recognition of Insulin by a Synthetic Receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 8810-8813 (2011)), 기능 조절(function regulation)(D. T. Dang, H. D. Nguyen, M. Merkx, L. Brunsveld, Supramolecular Control of Enzyme Activity through Cucurbit 8 uril-Mediated Dimerization. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 2915-2919 (2013)), 단백질 조립(protein assembly)(Y. Bai, Q. Luo, J. Liu, Protein self-assembly via supramolecular strategies. *Chem. Soc. Rev.*, (2016)) 및 아밀로이드 억제 amyloid inhibition(S. Sinha *et al.*, Lysine-Specific Molecular Tweezers Are Broad-Spectrum Inhibitors of Assembly and Toxicity of Amyloid Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 16958-16969 (2011)) 등에 널리 적용되고 있다. 주인-손님 화학의

이점을 활용하여 본 발명에서는 단백질의 라이신 잔기에 결합하여 6개의 글리코루릴 반복 단위(Lagona, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, L. Isaacs, The cucurbit[n]uril family. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 4844-4870 (2005))로 구성된 거대 고리 분자인 쿠커비투릴[6](도 1B)을 이용하여 아밀로이드 섬유화를 제어하는 방법을 제공한다. 놀랍게도, 단백질과 CB[6]의 분자 상호 작용은 단백질을 수용성에서 불용성 상태로 전이를 유도한다. 이러한 과정은 핵 생성동안 단백질의 과도 안정성을 야기한다. 결과적으로, 본 발명에 따르면 형성되는 섬유의 길이를 수십 나노미터에서 십 마이크로미터 정도로 조절할 수 있으며, 1.2-1.6 정도의 낮은 다분산지수(polydispersity index, PDI)로 섬유의 길이를 균일하게 형성할 수 있다.

[0050] **CB[6]에 의한 낮은 다분산지수를 가지는 INS 섬유의 제어**

[0051] 본 발명에서는 우선 아밀로이드 섬유화에 대해 잘 정의된 모델 시스템인 인슐린 섬유의 형성에 대하여 조사하였다(도 1C). 인슐린 섬유는 50 °C에서 5%(v/v)의 포름산(formic acid, FA) 용액에 녹아있는 50 μM의 인슐린 용액을 이용하여 제조하였다. 또한 500-2000개의 섬유들의 평균 길이를 TEM(transmission electron microscopy)을 이용하여 측정하였으며, PDI value에 기초하여 섬유 길이의 이질성(heterogeneity)을 정량화하였다.

[0052] 교반과 CB[6]의 부재 하에, INS의 섬유 길이($2.3 \pm 3.0 \mu\text{m}$)는 PDI 지수가 대략 2.8로 광범위하게 분산되어 있으며(도 2A 및 표 1), 이는 정지조건(quiescent condition)하에서 인큐베이팅된 INS 용액은 불균일한 INS 섬유들의 형성을 가져온다는 것을 암시한다. 다음으로, INS 용액을 200 rpm으로 교반하였다. CB[6]의 부재 하에, 짧은 섬유($53 \pm 31 \text{ nm}$)들이 PDI 지수 1.3 정도로 얻어졌다(도 2A 및 표 1). 이는 교반 수행시 섬유들의 균질성은 개선되는 반면 섬유의 신장은 작아진다는 것을 암시한다. CB[6]의 존재 하에서, CB[6]의 농도가 증가함에 따라 섬유의 길이도 함께 증가한다(도 2B, 표 1 및 도 7). 예를 들어, INS의 농도에 비해 CB[6]의 농도가 100 배 이상 증가하면($[\text{CB}[6]] = 5 \text{ Mm}$), 섬유의 길이는 낮은 다분산지수($\text{PDI}=1.3$)를 유지하면서도 100배 이상($2.0 \pm 1.1 \mu\text{m}$) 증가하였다. 섬유의 두께는 교반 및 CB[6]에 대하여 비의존적이었다(도 8). 이러한 결과는 교반과 CB[6]을 이용하여 낮은 이질성을 가지는 아밀로이드 섬유를 제조할 수 있음을 나타낸다. 또한, 섬유의 길이 증가는 5%(v/v) FA 용액에서의 CB[6]의 용해도 한계를 초과했을 때에 관찰됨을 확인하였다(CB[6] 용해도: $80 \mu\text{M}$ in 5% FA). 이러한 사실로부터 섬유 길이의 중요한 변화는 CB[6]의 용해도 제한을 초과하는 CB[6]의 양과 상관 관계가 있음을 추측할 수 있다.

표 1

Agitation	+	-	-	-	-
INS:CB[6]	1:0	1:0	1:1	1:10	1:100
Avg length	$2.3 \pm 3.0 \mu\text{m}$	$53 \pm 31 \text{ nm}$	$59 \pm 31 \text{ nm}$	$0.16 \pm 0.12 \mu\text{m}$	$2.0 \pm 1.1 \mu\text{m}$
PDI	2.8	1.3	1.3	1.6	1.3

[0053]

[0054] 수용액에서 FA 용액의 % 농도(v/v)가 증가함에 따라 CB[6]의 용해도가 증가한다는 사실을 통해(표 2, H. J. Buschmann, K. Jansen, C. Meschke, E. Schollmeyer, Thermodynamic data for complex formation between cucurbituril and alkali and alkaline earth cations in aqueous formic acid solution. *J. Solution Chem.* **27**, 135-140 (1998)), 본 발명에서는 FA 용액의 농도 조절을 통해 낮은 분산지수를 유지하면서 아밀로이드 섬유의 조절 가능한 범위를 확장할 수 있는지에 대하여 실험하였다(도 3A). 다양한 FA 수용액 농도(%)하에서 INS 섬유의 모폴로지(morphologies)를 CB[6]의 존재 또는 부존재 하에서 관찰하였다. 용액에서 CB[6]의 양은 500 μM으로, 15%(v/v) FA 용액을 종래 보고된 각 FA 용액의 농도(%) (v/v)에서의 용해도 제한을 초과하였다(CB[6] 용해도: $20 \mu\text{M}$ in 0.1% FA, $80 \mu\text{M}$ in 5% FA, $550 \mu\text{M}$ in 15% FA). CB[6] 부존재하에서 섬유의 길이는 5%(v/v) FA 용액에서 거의 유사하게 $37-53 \text{ nm}$ 으로 나타난 반면, CB[6] 존재 시 섬유의 길이는 FA 농도가 감소함에 따라 수십 나노미터($37 \pm 19 \text{ nm}$)에서 대략 10 마이크로미터 크기($8.5 \pm 4.8 \mu\text{m}$)로 증가하였다(도 3B). 특히, PDI 값은 1.2-1.6의 범위에서 유지되었다(표 3). 결론적으로, 섬유의 길이에 대한 낮은 다분산지수는 용액의 연속적인 교반과 함께 용액에서의 용해도 제한을 초과하는 CB[6]의 양을 조절함으로써 제어할 수 있음을 알 수 있다.

표 2

%FA	mM
0	0.02
5	0.08
10	0.38
15	0.55
20	1.18
30	6.47

[0055]

표 3

%FA		0.1%	1%	3%	5%	15%	30%
w/ CB[6]	Avg length	8.5±4.8 μm	2.1±1.2 μm	1.3±0.9 μm	0.18±0.12 μm	0.10±0.07 μm	No fibril
	PDI	1.3	1.3	1.4	1.5	1.5	
w/o CB[6]	Avg length	43±36 nm	46±20 nm	52±23 nm	53±31 nm	37±19 nm	No fibril
	PDI	1.5	1.2	1.2	1.3	1.3	

[0056]

[0057] CB[6]에 의한 INS의 불수용성 상태 유도

[0058] 종래 보고를 통해 아밀로이드 형성 단백질과 합성 수용체간의 주인-손님 상호작용은 아밀로이드 섬유화의 억제

를 유도하는 것으로 나타났다(S. Sinha *et al.*, Lysine-Specific Molecular Tweezers Are Broad-Spectrum Inhibitors of Assembly and Toxicity of Amyloid Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 16958-16969 (2011)). 나아가 본 발명에서는 CB[6] 과 INS 사이의 주인-손님 상호작용을 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(PAGE) 및 전자분무이온화 질량분석법(ESI-MS)를 이용하여 확인하였다(도 10, 11). INS의 라이신과 CB[6]의 결합 또한 등은 적정 열량계(isothermal titration calorimetry, ITC)와 이중질량 분석법(tandem mass spectrometry, MS2)을 이용하여 확인하였다(도 12, 13)(S. W. Heo *et al.*, Host-Guest Chemistry in the Gas Phase: Selected Fragmentations of CB[6]-Peptide Complexes at Lysine Residues and Its Utility to Probe the Structures of Small Proteins. *Anal. Chem.* **83**, 7916-7923 (2011)). CB[6]와 INS 사이의 평형 결합 상수($K_{a,app}$)는 $3.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 로 종래 보고된 값과 유사하였다(M. V. Rekharsky *et al.*, Sequence recognition and self-sorting of a dipeptide by cucurbit[6]uril and cucurbit[7]uril. *Chem. Commun.*, 2236-2238 (2008)). 라이신은 단백질 자가조립에 매우 중요한 역할을 하기 때문에(K. E. Marshall *et al.*, Hydrophobic, Aromatic, and Electrostatic Interactions Play a Central Role in Amyloid Fibril Formation and Stability. *Biochemistry* **50**, 2061-2071 (2011)), 본 발명에서는 LYS-CB[6] 복합체의 주인-손님 상호작용이 섬유의 길이 조절에 반영될 것으로 기대하였다. 그러나 전술한 바와 같이 섬유 길이의 점진적인 변화는 그들의 용해도 제한을 초과하는 CB[6]의 양에 의존적이었다. 이러한 관찰은 섬유의 길이 변화가 단순히 INS와 CB[6] 사이의 주인-손님 상호작용에 의해 설명될 수 없다는 것을 의미한다.

[0059] INS에 대한 CB[6]의 용해도 한계 이상의 농도의 효과를 관찰하기 위해, 본 발명에서는 다양한 CB[6]의 농도와 다양한 농도(%)의 FA 용액하에서 용액에 용해된 INS의 농도를 측정하였다. 수득한 용액은 불용성 응집체와 같은 불순물 제거를 위해 18,000×g에서 원심 분리하였으며, 원심분리 후 280 nm에서 UV absorption를 이용하여 상등액에 존재하는 용해된 INS의 농도를 측정하였다. 5%(v/v) FA 수용액에서는 CB[6]의 양이 증가할수록 INS의 농도가 감소하는 반면(도 4B), CB[6]의 양이 5 mM로 일정한 경우에 FA의 농도(v/v)가 증가할수록 INS의 농도가 증가하였다(도 4C). 전반적으로 CB[6]의 양과 FA의 농도(v/v)를 조절하면, CB[6]가 용해도 한계를 초과할 경우에 INS가 수용성에서 불수용성으로의 상전이가 더욱 많이 일어남을 확인하였다. CB[6]에 의한 INS의 이러한 전이는 CB[6]가 주인-손님 복합체를 천천히 용액에 용해되어 열역학적으로 안정한 결정으로 재결정화되는 역학적으로 고립된 결정체로의 상전이를 유도하는(O. Danylyuk, V. P. Fedin, V. Sashuk, Kinetic trapping of the host-

guest association intermediate and its transformation into a thermodynamic inclusion complex. *Chem. Commun.* **49**, 1859-1861 (2013)), 작은 손님-CB[6] 복합체의 결정화 공정과 유사하다. 따라서 INS의 상전이는 CB[6]와의 주인-손님 상호작용에 의해 유도될 수 있고, 불용성에서 수용성으로의 역전이 또한 가능할 것으로 예상된다. 결국 INS의 상전이가 섬유 조립에 수반하여 발생하고(도 4D), 핵 생성 동안 용액에서의 INS 단량체의 농도에 영향을 미치는 것으로 볼 수 있다. 이에, INS의 상전이를 통한 INS 단량체의 농도를 조절하기 위해서는 CB[6]의 용해도 한계 이상의 양이 중요하다는 것을 알 수 있다.

[0060] CB[6]에 의한 섬유 자가조립의 운동 제어

[0061] 도 2-4로부터 섬유화 동안의 교반 및 CB[6]에 의한 INS의 전이가 섬유의 길이 제어 및 낮은 분산성에 매우 중요하다는 가설을 세웠다. 이러한 가설을 입증하기 위해, 티오폴라핀 T(ThT) assay(14) 이용하여 5%(v/v) FA에서 교반(도 14) 및 CB[6](도 5A)가 섬유화 운동에 미치는 효과를 모니터링하였다. 도 14는 INS 용액의 교반이 교반이 없는 대조군과 비교시 섬유화의 lag phase를 감소시킨다는 것을 의미한다. 교반을 통해 형성된 섬유는 교반 없이 형성된 섬유($2.3 \pm 3.0 \mu\text{m}$, PDI = 2.8)에 비해 짧고 낮은 다분산지수($53 \pm 31 \text{ nm}$, PDI = 1.3)를 가지는데, 이는 교반에 의한 충돌이 핵 생성 속도를 전반적으로 향상시키고 따라서 핵의 빠른 생성 및 균일성을 유도한다는 것을 암시한다. 그러나 교반 동안의 섬유 신장은 단량체의 빠른 소비로 인해 제한된다. INS 용액에서 CB[6]의 양이 증가함에 따라(도 5A), lag phase 또한 증가하였다. 용액에서 CB[6]의 양이 증가할수록 섬유의 길이도 증가하는 반면, 교반에 의한 낮은 분산도(PDI 1.3-1.5)는 유지되었다(도 7). 이러한 결과에 기초하여 다음과 같은 결론을 도출할 수 있다: 1) CB[6]의 용해도 제한을 초과한 양은 단량체의 핵 형성을 억제한다; 2) 핵 형성의 억제에 의해 단량체:핵의 높은 비율은 유지된다; 3) CB[6]에 의해 추가적인 핵 형성이 억제되는 반면 미리 형성된 핵은 길고 균일한 섬유로 신장된다(도 5B). 핵이 형성되는 동안 CB[6]의 용해도 제한을 초과하는 양은 형성되는 INS 섬유의 길이에 연관되는 단량체:핵의 비율을 결정한다(도 5C).

[0062] 섬유화 과정은 체인의 길이가 개시제와 단량체의 비율에 따라 균일하게 제어되는 초분자적 연쇄-성장 중합(supramolecular chain-growth polymerization)과 유사하다(도 15)(J. Kang *et al.*, A rational strategy for the realization of chain-growth supramolecular polymerization. *Science* **347**, 646-651 (2015)). 그러나 CB[6]의 역할은 중합 과정을 촉진하는 개시제와는 상반된다. CB[6]는 INS의 전이를 통해 핵 생성 공정을 억제하는 역할을 수행한다(도 4D); 또한, 섬유 조립시 수용성 상태의 INS의 활성 농도가 감소할 때, 불용성 상태의 INS는 활발한 섬유 형성을 위해 CB[6]로부터 해리되어 용액에 재용해된다(P. Narayan *et al.*, The extracellular chaperone clusterin sequesters oligomeric forms of the amyloid-beta(1-40) peptide. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 79-U97 (2012)). 따라서, 재용해된 INS는 INS 섬유의 신장을 위해 형성된 핵과 상호작용하는 단량체 역할을 수행한다. 적외선 측정을 통해 CB[6] 존재 및 부존재 시 형성된 섬유가 유사한 흡수 패턴을 보이는 것으로부터 이러한 추측을 지지할 수 있다(도 16). 그러나 CB[6]의 과도한 도입에 의해 불용성 상태가 확장될 경우 섬유의 신장은 제한된다. 다양한 농도(%)의 FA 용액에서 CB[6] 농도에 따른 INS 섬유들을 검사할 때, 0.1 및 1%(v/v) FA 용액에서 CB[6]의 농도가 5 mM인 경우 섬유의 길이는 CB[6]의 농도가 500 μM 인 경우와 비교하여볼 때, 확장되지 않았다(도 17). 이러한 결과는 만약 INS의 큰 부분이 CB[6]의 과량에 의해 수용성에서 불용성으로 전환될 경우(도 4), CB[6]는 섬유 신장 동안 INS의 단백질-단백질 상호작용을 방해한다는 것을 암시한다. 따라서, 수용성과 불용성 상태의 전이 사이에 존재하는 준안정 상태는 핵 형성과 신장 사이의 균형에 중요한 것임을 알 수 있다.

[0063] CB[6]에 의한 다양한 아밀로이드성 단백질의 섬유 길이 조절

[0064] 다양한 아밀로이드 형성 단백질을 이용하여 CB[6]의 섬유 길이 조절의 일반적인 적용가능성을 조사하였다(도 6A). CB[6]의 부존재 및 교반 하에서 인간 섬 아밀로이드 폴리펩타이드(human islet amyloid polypeptide (hIAPP))를 사용할 경우 짧은 섬유가 형성된 반면($35 \pm 15 \text{ nm}$, PDI = 1.2), 교반 없이 (hIAPP)를 인큐베이팅 할 경우에는 아밀로이드 섬유의 혼합물 및 구형 응집체가 관찰되었다. CB[6]의 부존재 및 교반 하에서 암달 알 흰자위 리소자임(Hen egg white lysozyme, LYZ)을 인큐베이팅할 경우에는 작은 무정형의 응집체가 형성되었으나, 교반의 부재 하에서는 응집체가 관찰되지 않았다. CB[6] 첨가 시에는 단백질:CB[6]의 비율이 증가함에 따라 hIAPP 및 LYZ 섬유의 길이도 증가하였다(PDI: 1.2-1.5, 도 6B, 표 4). 이러한 결과는 낮은 이질성을 가진 hIAPP 및 LYZ 섬유의 길이는 교반 및 CB[6]를 이용하여 제어할 수 있음을 암시한다. hIAPP의 대조군으로부터 획득한 혼합물은 낮은 이질성을 가진 원하는 섬유를 형성하는 것으로 개선되었다. CB[6] 및 교반 하에서 형성된 LYZ 섬유의 PDI 값은 그들의 대조군에 맞먹지 않았으나, 그들은 이전에 연구된 다른 섬유들에 비해서는 낮았다(P. Arosio, M. Beeg, L. Nicoud, M. Morbidelli, Time evolution of amyloid fibril length distribution described by a population balance model. *Chem. Eng. Sci.* **78**, 21-32 (2012), T. Doussineau *et al.*, Mass

Determination of Entire Amyloid Fibrils by Using Mass Spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 2340-2344 (2016)).

[0065] Amyloid- β 1-42 및 1-40 (A β 42 및 A β 40) 또한 단백질:CB[6] = 1:0의 비율로 교반과 함께 배양하였으며, 각각 $2.3 \pm 1.7 \mu\text{m}$ and $3.1 \pm 2.2 \mu\text{m}$ 의 섬유 길이와, 1.6 및 1.5의 PDI가 측정되었다(도 6A, 표 4). 교반 존재 하에서도 섬유의 길이 및 PDI 수치는 유사하게 관찰되었다($1.7 \pm 1.3 \mu\text{m}$, PDI = 1.6 (A β 42), $2.0 \pm 2.3 \mu\text{m}$, PDI = 2.3 (A β 40)). CB[6]의 양 증가는 A β 섬유 길이의 감소를 가져오고 PDI 값은 1.5-2.1의 범위로 유지되었다(도 6B, 표 4). A β 42 및 A β 40의 섬유 길이는 hIAPP 및 LYZ 섬유와는 반대일뿐만 아니라 더 높은 분산도를 가졌다.

표 4

hIAPP:CB[6]	1:0	1:1	1:10	1:100
Avg length	$35 \pm 15 \text{ nm}$	$86 \pm 58 \text{ nm}$	$0.29 \pm 0.23 \mu\text{m}$	$1.3 \pm 0.9 \mu\text{m}$
PDI	1.2	1.2	1.3	1.5
LYZ:CB[6]	1:0	1:1	1:10	1:100
Avg length	Worm-like aggregates	$0.23 \pm 0.14 \mu\text{m}$	$0.67 \pm 0.39 \mu\text{m}$	No fibril
PDI	m	1.4	1.3	
A β 42:CB[6]	1:0	1:1	1:10	1:100
Avg length	$2.3 \pm 1.7 \mu\text{m}$	$1.9 \pm 1.5 \mu\text{m}$	$1.2 \pm 1.3 \mu\text{m}$	$0.28 \pm 0.22 \mu\text{m}$
PDI	1.6	1.6	2.1	m
A β 40:CB[6]	1:0	1:1	1:10	1:100
Avg length	$3.1 \pm 2.2 \mu\text{m}$	$3.1 \pm 2.4 \mu\text{m}$	$1.6 \pm 1.5 \mu\text{m}$	$1.2 \pm 0.9 \mu\text{m}$
PDI	1.5	1.6	1.9	1.6

[0066]

[0067] 이러한 4 종류의 단백질의 섬유화의 차이점을 증명하기 위하여 CB[6]와 단백질의 라이신(Lys) 간의 상호작용을 ESI-MS (도 18) 및 MS² (도 19-21)을 이용하여 확인하였다. 또한, CB[6]에 의한 단백질의 상전기도 확인하였다(도 22). 이러한 결과들은 CB[6]와의 상호작용들이 4 종류의 단백질들에서 공통적으로 나타나기 때문에 섬유화의 차이는 그들의 본질적 특성에 기인하는 것임을 암시한다. 따라서, 단백질의 핵 형성 속도(k_{nu})와 CB[6]의 1차 아민과의 복합화 속도($k_{\text{CB[6]}}$)를 비교하였다. $k_{\text{CB[6]}}$ ($\sim 10^0 - 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)는 INS 섬유화에서의 k_{nu} ($\sim 10^{-2} - 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) 값보다 높은 반면, A β 펩타이드에 대한 k_{nu} 는 $k_{\text{CB[6]}}$ 는 동일한 정도였다($\sim 100 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for A β 40, $> 100 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for A β 42) (13, 36). hIAPP의 섬유화는 A β 40 보다 대략 100배 이상 느렸고, LYZ 섬유화는 다른 단백질의 섬유화에 비해 느리게 발생하였다(V. N. Uversky, A. L. Fink, Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **1698**, 131-153 (2004)). A β 40 섬유화의 ThT 분석은 다른 단백질과는 대조적으로 A β 펩타이드의 핵 형성은 A β 펩타이드의 조립보다 A β -CB[6] 복합체 형성이 느리기 때문에 그들의 원래 경로를 통해 진행되므로, CB[6]가 A β 40의 핵 형성을 중단시킬 수 없다는 것을 암시한다(도 23). 그러나 CB[6]의 양이 증가할 경우 A β 의 단백질-단백질 상호작용은 섬유 신장동안 CB[6]에 의해 중단되었다. 따라서, CB[6] 존재하에서 PDI 값은 개선되지 않지만 A β 섬유의 길이는 감소하였다.

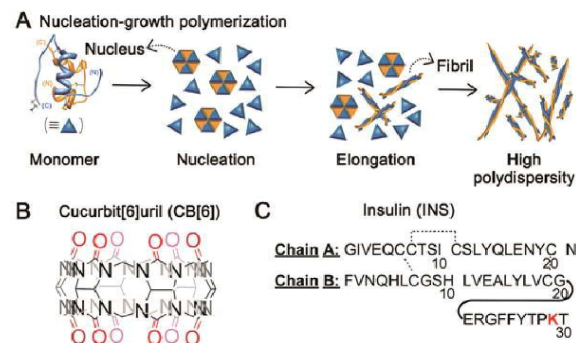
[0068] 요약하면, 본 발명에서는 CB[6]의 도입에 의한 섬유 조립의 운동 제어를 통해 다양한 아밀로이드 형성 단백질의 아밀로이드 섬유를 조절할 수 있다. 단백질의 상전이는 단량체와 핵의 비율을 역학적으로 조절하고 따라서 낮은 분산도를 유지하면서 섬유의 길이를 연쇄-성장 중합 방식과 유사하게 조절할 수 있다. 지금까지 생체 외 및 생체 내에서 아밀로이드 섬유들은 아밀로이드증 억제에 대하여만 특징되어 왔지만, 생물학적 기능이나 소프트 물질 응용에는 정확한 섬유 조립의 제어가 요구되었다. 본 발명에서는 합성 수용체에 의한 단백질의 상 전이에 기초한 아밀로이드 섬유의 초분자적 제어의 합리적인 전략에 대한 통찰력을 제공한다. 이러한 접근법은 생물 시스템에서 일어나는 단백질 자가 조립을 이해할 수 있을 뿐만 아니라 재료 응용을 위한 기능성 아밀로이드 섬유 취득에 이용될 수 있다.

[0069]

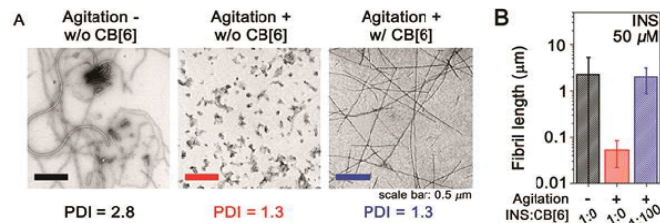
결론적으로, 본 발명에서와 같이 아밀로이드 섬유화를 일으키는 아밀로이드성 단백질(인슐린, 리소자임, 아밀로이드 베타 40, 아밀로이드 베타 42, 아밀린, 인간 섬 아밀로이드 폴리펩타이드)이 포함되어 있는 용액에 쿠커비투[6]를 첨가하였을 때 섬유화 반응의 결과물이 달라지는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 종래 아밀로이드 섬유화 방법과 달리 본 발명에 따르면 포름산 용매의 농도 및 교반 속도 조절을 통해 아밀로이드 섬유의 길이를 자유롭게 조절할 수 있으며, 균일한 형태 및 길이 분포를 가지는 아밀로이드 섬유를 얻을 수 있음을 확인하였다. 또한 아밀로이드 섬유의 생성과정에서 발생하는 부산물인 비정형 응집체의 형성을 억제함으로써 아밀로이드 섬유의 형성을 효율적으로 유도할 수 있음을 확인하였다.

도면

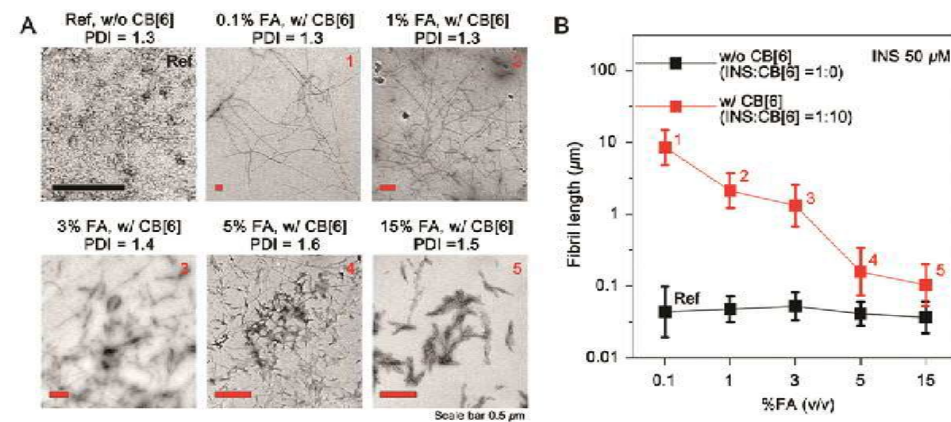
도면1



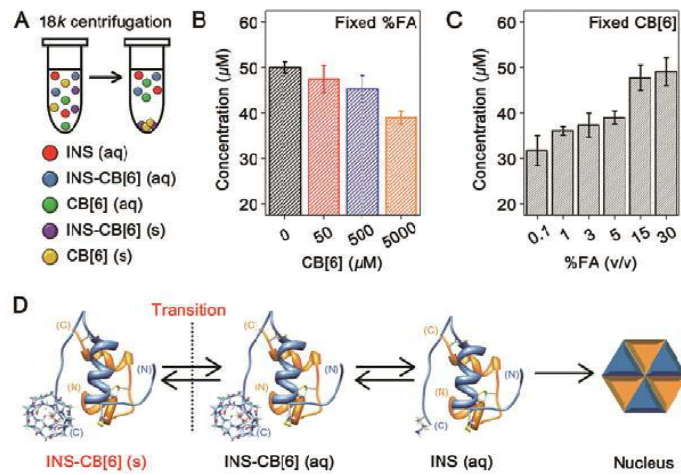
도면2



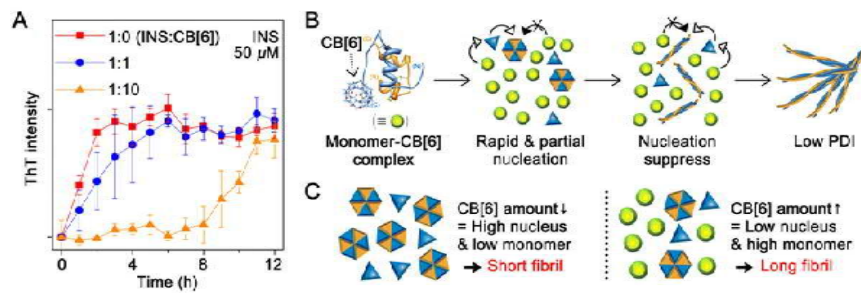
도면3



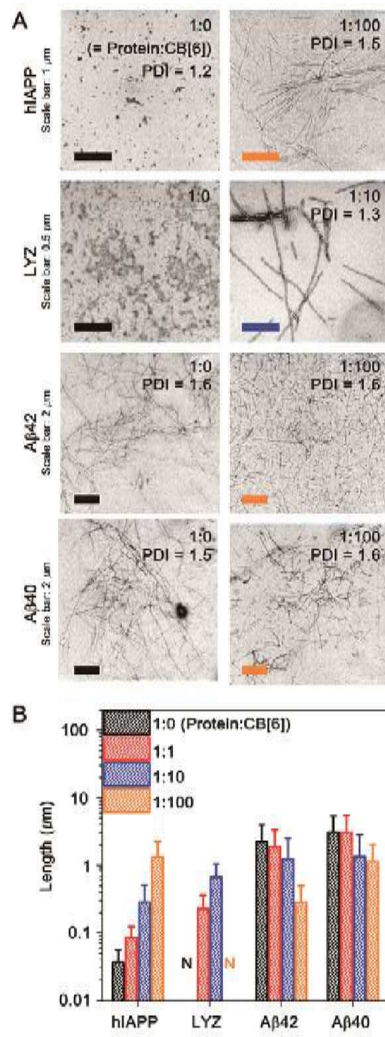
도면4



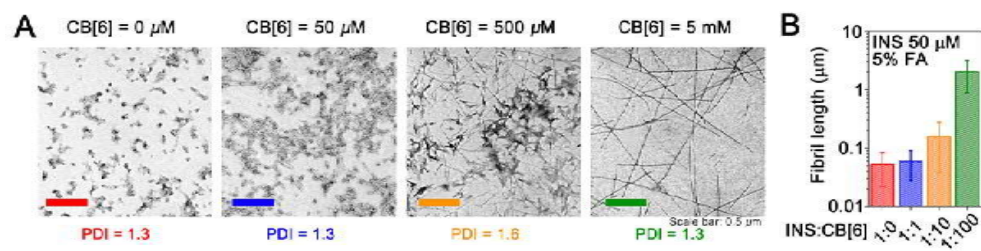
도면5



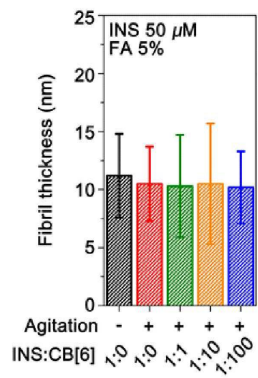
도면6



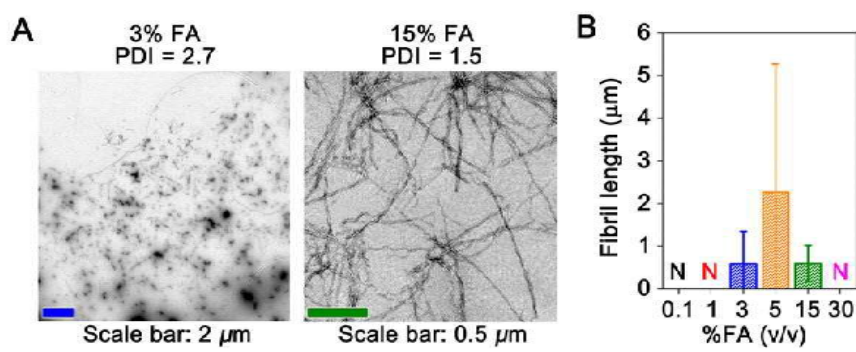
도면7



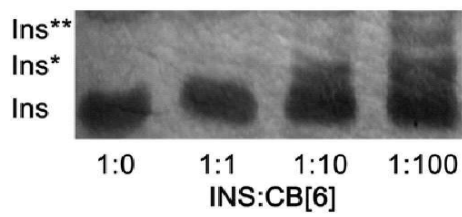
도면8



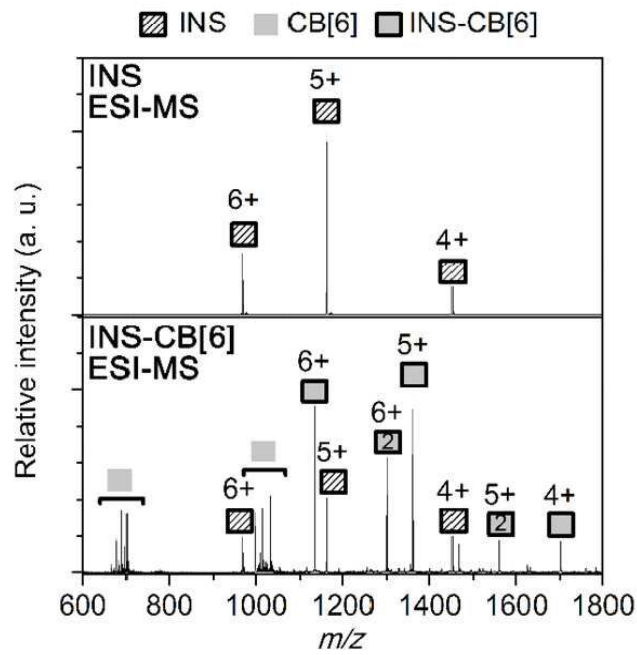
도면9



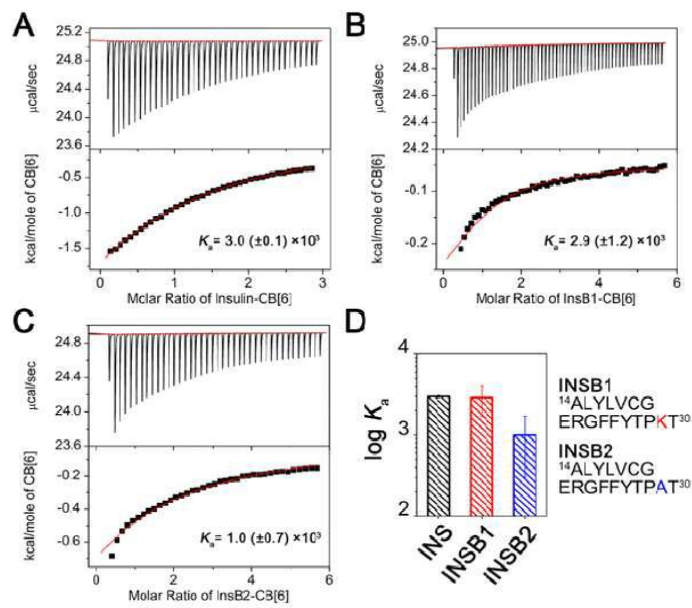
도면10



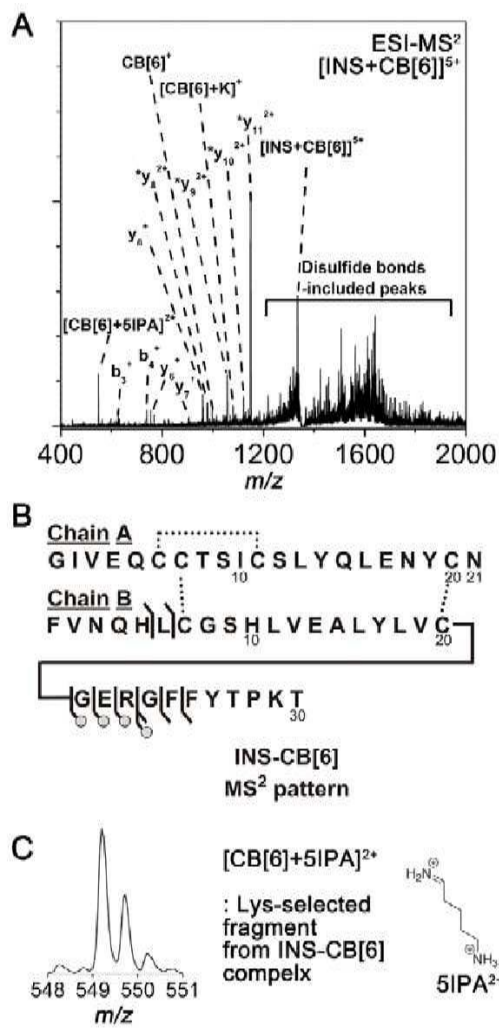
도면11



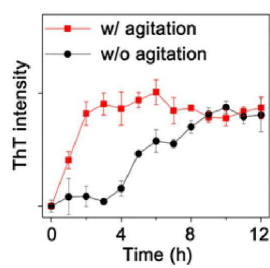
도면12



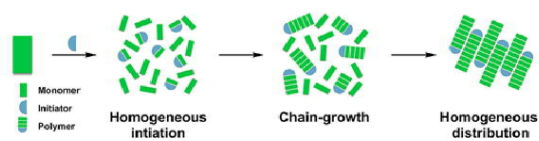
도면13



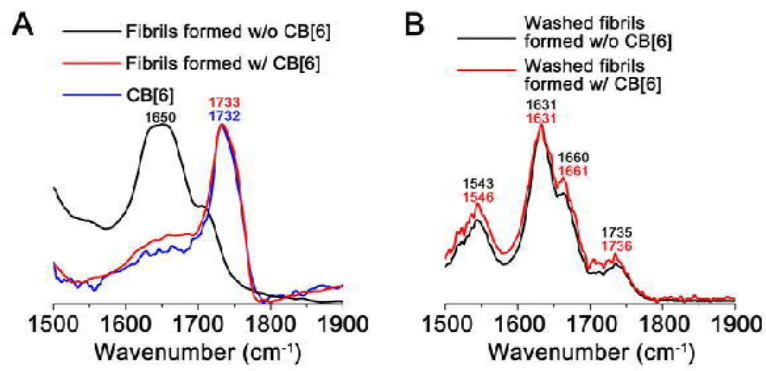
도면14



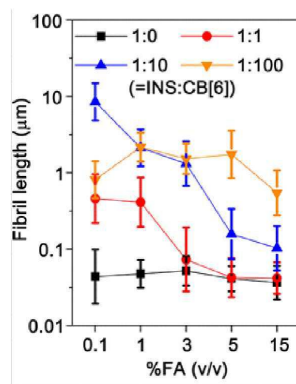
도면15



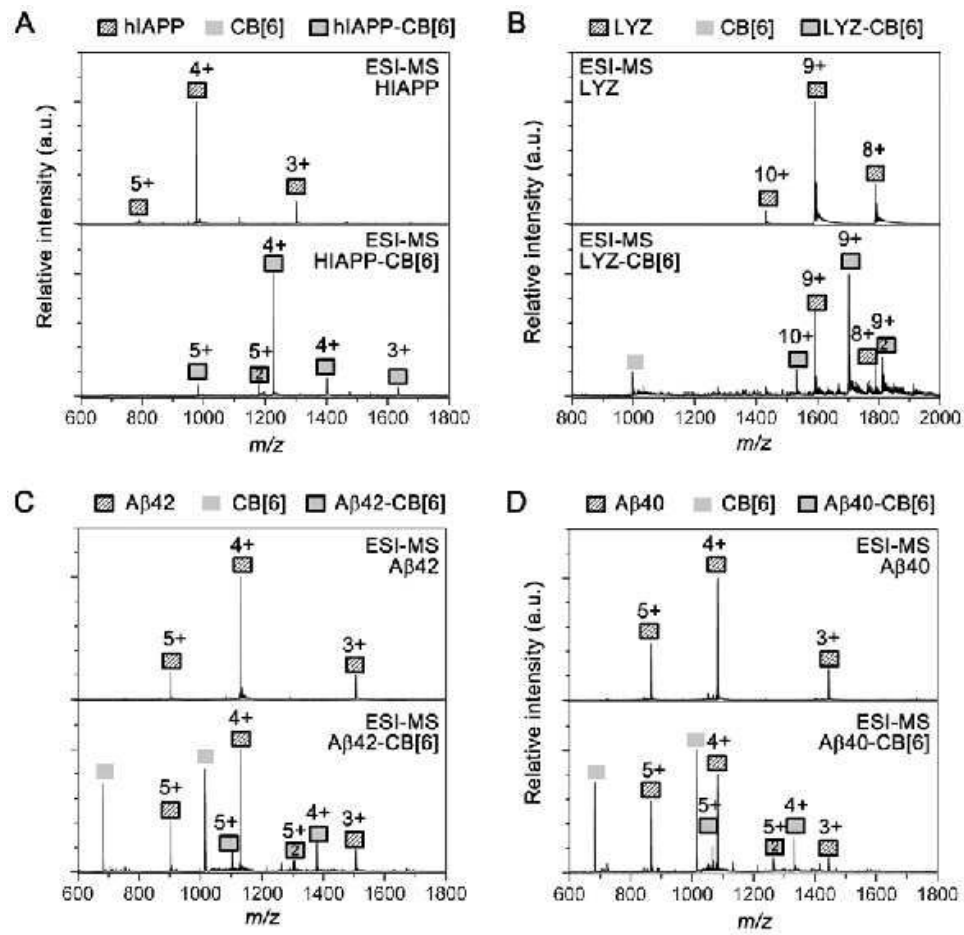
도면16



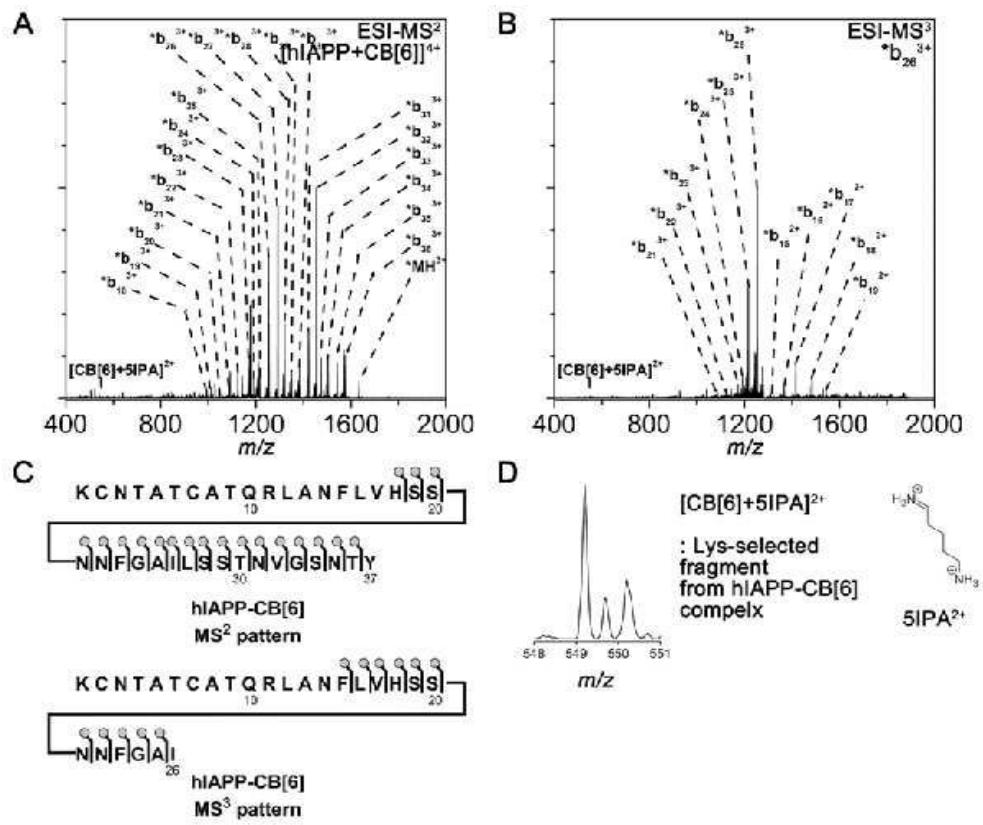
도면17



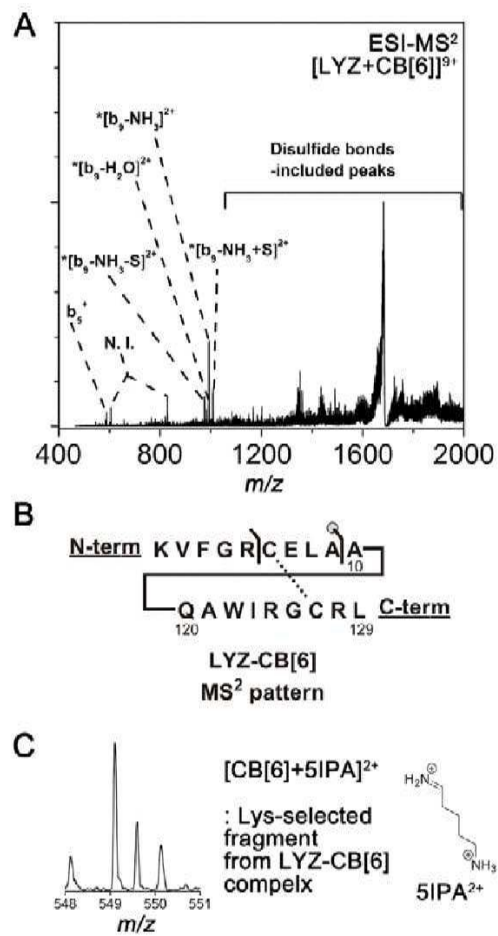
도면18



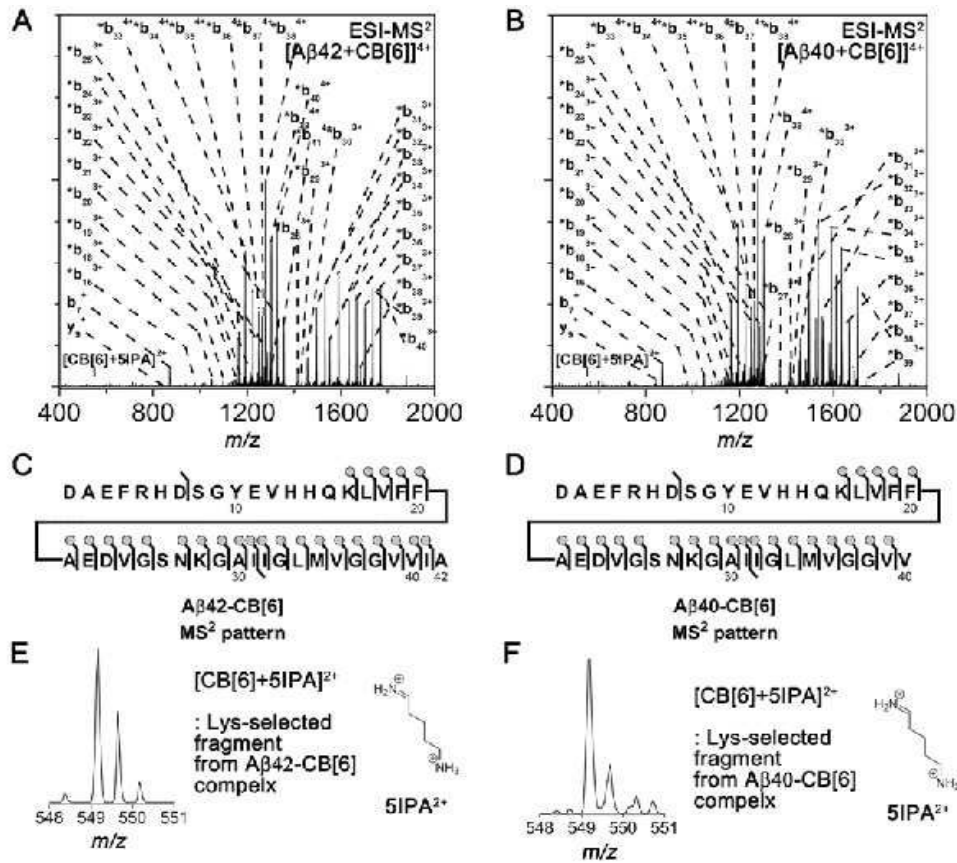
도면19



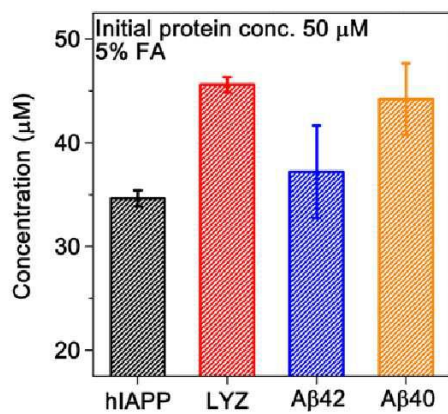
도면20



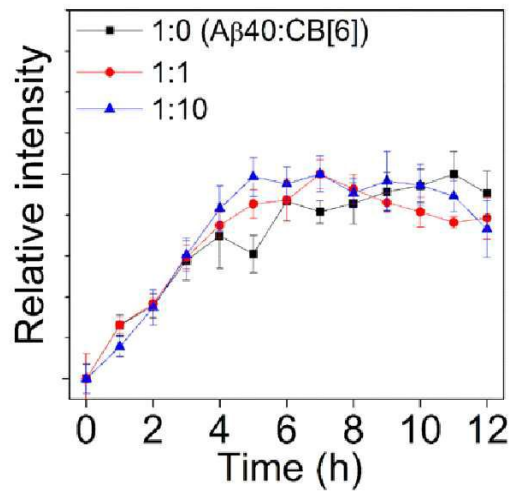
도면21



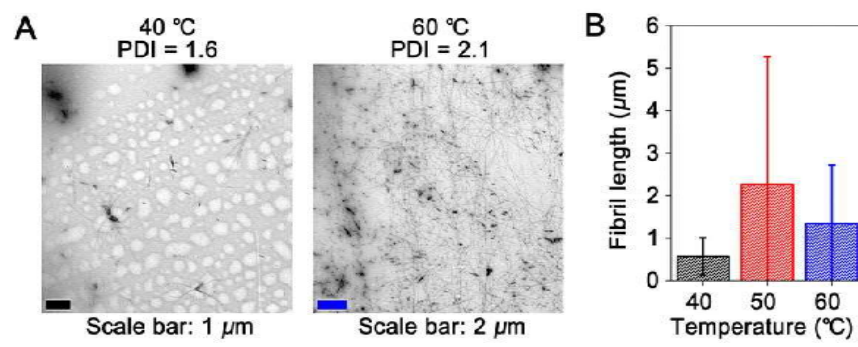
도면22



도면23



도면24



도면25

