

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0103833  
(43) 공개일자 2023년07월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 14/47* (2006.01) *A23K 20/147* (2016.01)  
*A23L 33/18* (2016.01) *A61K 38/00* (2006.01)  
*A61P 25/28* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C07K 14/4711* (2013.01)  
*A23K 20/147* (2016.05)
- (21) 출원번호 10-2022-0040355  
 (22) 출원일자 2022년03월31일  
 심사청구일자 2022년03월31일
- (30) 우선권주장  
 1020210192521 2021년12월30일 대한민국(KR)

- (71) 출원인  
 고려대학교 산학협력단  
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- (72) 발명자  
 김준곤  
 서울특별시 서초구 서운로 104, 204동 1802호  
 임동준  
 서울특별시 성북구 안암로 145, 아산이학관 246호
- (74) 대리인  
 정은열, 김태훈

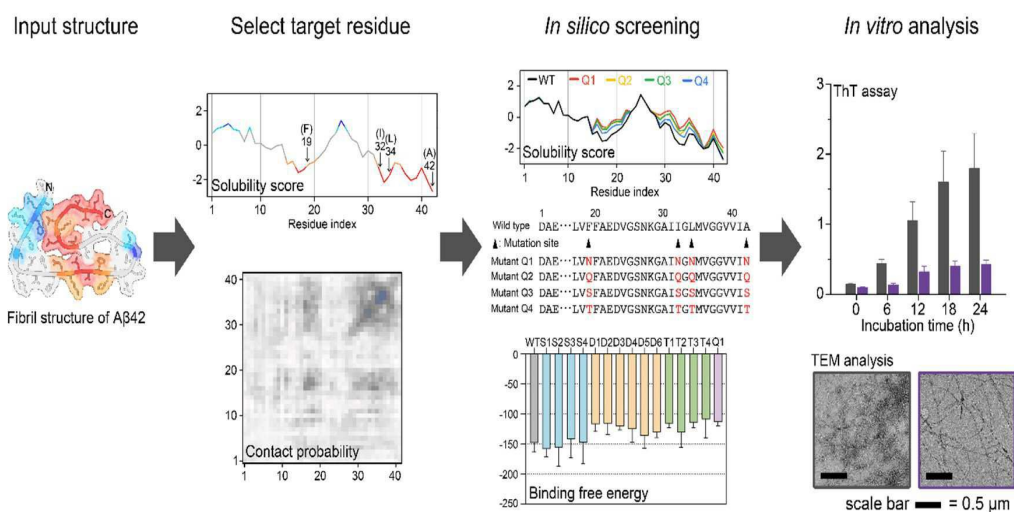
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 신규한 단백질 변이체 및 이를 이용한 신경퇴행성 질환 치료용 조성물

## (57) 요약

본 발명은 아밀로이드 베타 섬유화를 제어하는 신규한 단백질 변이체 및 이를 이용한 신경퇴행성 질환 치료용 조성물에 관한 것이다.

## 대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**A23L 33/18** (2016.08)

**A61K 38/00** (2013.01)

**A61P 25/28** (2018.01)

**A23V 2002/00** (2013.01)

**A23V 2200/316** (2013.01)

**A23V 2200/322** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                          |
|-------------|------------------------------------------|
| 과제고유번호      | 1711141249                               |
| 과제번호        | 2019R1A2C2086193                         |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                                |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                                   |
| 연구사업명       | 개인기초연구(과기정통부)(R&D)                       |
| 연구과제명       | 복잡계 내 아밀로이드성 단백질 응집의 정량 분석 기반 속도론적 제어 연구 |
| 기 여 율       | 3/5                                      |
| 과제수행기관명     | 고려대학교                                    |
| 연구기간        | 2021.03.01 ~ 2022.02.28                  |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                         |
|-------------|-------------------------|
| 과제고유번호      | 1711137718              |
| 과제번호        | 2021R1A4A1032114        |
| 부처명         | 과학기술정보통신부               |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                  |
| 연구사업명       | 집단연구지원(R&D)             |
| 연구과제명       | 단일세포 분석화학               |
| 기 여 율       | 2/5                     |
| 과제수행기관명     | 고려대학교                   |
| 연구기간        | 2021.06.01 ~ 2022.02.28 |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 1의 N-말단으로부터 19번 및 32번의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 단백질 변이체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단백질 변이체는 야생형 단백질 대비 아밀로이드 베타 섬유 형성이 억제된 것인, 단백질 변이체.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 다른 아미노산은 극성이고 전하를 띄지 않는 아미노산인 것인, 단백질 변이체.

#### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 다른 아미노산은 아스파라긴(N), 글루타민(Q), 세린(S) 또는 트레오닌(T)인 것인, 단백질 변이체.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 다른 아미노산은 아스파라긴(N)인 것인, 단백질 변이체.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

추가로 서열번호 1의 N-말단으로부터 34번 아미노산 및 42번 아미노산으로 구성된 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것인, 단백질 변이체.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 신규 단백질 변이체는 서열번호 2 내지 8로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 단백질 변이체.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 단백질 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 9

제8항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

#### 청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 단백질 변이체; 또는 제9항의 벡터를 포함하는, 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 11

제10항에 있어서,

상기 신경퇴행성 질환은 알츠하이머인 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 12

제10항의 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료방법.

#### 청구항 13

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 단백질 변이체; 또는 제9항의 벡터를 포함하는, 신경퇴행성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

#### 청구항 14

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 단백질 변이체; 또는 제9항의 벡터를 포함하는, 신경퇴행성 질환 예방 또는 개선용 사료 조성물.

#### 청구항 15

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 단백질 변이체; 또는 제9항의 벡터를 포함하는 아밀로이드 베타의 섬유화 제어용 조성물.

#### 청구항 16

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 단백질 변이체; 또는 제9항의 벡터를 분리된 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 아밀로이드 베타의 섬유화 제어 방법.

#### 청구항 17

제16항에 있어서,

상기 세포는 신경모세포인 것인, 아밀로이드 베타의 섬유화 제어 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 아밀로이드 베타 섬유화를 제어하는 신규한 단백질 변이체 및 이를 이용한 신경퇴행성 질환 치료용 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 본래 특정한 구조를 갖지 않는 아밀로이드 베타 단백질은 자가조립 과정을 통해 베타 평판 구조 형태로 배열되면서 단백질의 4차 구조로 이루어진 긴 섬유를 형성한다. 아밀로이드 베타 단백질의 자가조립 과정을 통해 형성된 섬유는 퇴행성 신경질환인 알츠하이머병의 주요 표지 물질이며, 병의 발병 기전과 연관되어 있다.

[0004] 최근 기존 알츠하이머병 치료의 한계를 극복하기 위해 알츠하이머병의 주요 표지 물질인 아밀로이드 베타를 표적으로 하는 항체치료제가 도입되었다. 하지만 아밀로이드 베타 단백질은 그 자체로 자가조립 과정의 구성 단위이며, 동시에 중간체 및 섬유의 형태로도 존재할 수 있고, 자가조립이 진행 중인 다른 아밀로이드 베타에 의해 섬유화가 촉진되기도 한다. 이로써 생체 환경에서 다양한 형태로 존재하는 아밀로이드 베타 단백질의 특징으로 인해 섬유 형태의 아밀로이드 베타를 표적으로 제거하는 치료제의 대다수는 기대만큼의 효과를 보지 못하고 있다.

[0005] 이에 따라, 단순히 특정 상태의 아밀로이드 단백질을 제거하는 것이 아닌, 아밀로이드성 단백질의 섬유가 형성되는 과정을 억제하는 방법이 대안이 될 수 있다. 아밀로이드 베타의 생성 빈도를 증가시켜 알츠하이머 치매를 일으킨다고 알려진 아밀로이드 전구 단백질에 발생한 스웨덴 돌연변이를 유전자 치료를 통해 교정하려는 시도가 최근 보고된 바 있다. 즉, 유전자 가위를 이용하여 문제를 유발하는 유전자를 제거하는 기술을 통해 유전자 치료를 시도한 방법이다.

[0006] 이러한 방법은 돌연변이에 의해 증가한 아밀로이드 베타 단백질의 개체 수를 다시 감소시키는 것으로 좋은 시도 이기는 하나, 정상적인 수준으로 아밀로이드 베타 단백질이 발현되어도 알츠하이머병 발병 위험이 있으므로 적용 범위가 한정적이라는 한계가 있다.

[0007] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 아밀로이드 베타 단백질 특정 위치의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 단백질 변이체가 야생형 아밀로이드 베타 대비 아밀로이드 베타 섬유 형성을 억제 및 제어하고, 신경모세포에 처리 시 세포독성이 감소되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 1의 N-말단으로부터 19번 및 32번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 단백질 변이체를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 단백질 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질 변이체 또는 상기 벡터를 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질 변이체 또는 상기 벡터를 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료용도

를 제공하는 것이다.

- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질 변이체 또는 상기 벡터를 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질 변이체 또는 상기 벡터를 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질 변이체 또는 상기 벡터를 포함하는 아밀로이드 베타의 섬유화 제어용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질 변이체; 또는 상기 벡터를 분리된 세포에 처리하는 단계를 포함하는 아밀로이드 베타의 섬유화 제어 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0020] 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.
- [0021] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0022] 아울러, 본원의 명세서 전체에 있어서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0024] 이하, 본 발명을 보다 자세히 설명한다.
- [0026] 본 발명은 서열번호 1의 N-말단으로부터 19번 및 32번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 단백질 변이체를 제공한다.
- [0027] 상기 서열번호 1의 단백질은 아밀로이드 베타 단백질로 자연형 또는 야생형 아밀로이드 베타 단백질로 기재할 수 있으며, 아밀로이드 전구체 단백질 유래일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [0028] 본 발명에서 용어, "아밀로이드 베타 단백질"은 알츠하이머 환자의 뇌에서 발견되는 아밀로이드 플라크의 주성분으로서 알츠하이머 병에 결정적으로 관여하는 36-43개의 아미노산 펩티드를 의미하는 것으로서, 본 발명에서는 아밀로이드 베타 42일 수 있다.
- [0029] 본 발명에서는 비록 아밀로이드 베타 단백질의 대표예로 서열번호 1의 단백질을 기재하였으나, 서열번호 1의 아미노산 앞뒤로의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 잠재성 돌연변이 (silent mutation)를 제외하는 것이 아니며, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 서로 동일 또는 상응하는 활성을 가지는 경우라면 본원의 단백질에 해당됨은 당업자에게 자명하다.
- [0030] 구체적인 예를 들어, 본원의 아밀로이드 베타 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 80%, 90%, 95%, 또는 97% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열로 구성되는 단백질일 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 발명의 변이 대상이 되는 단백질의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [0031] 즉, 본 발명에서 '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드', '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질 또는 폴리펩티드'라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 발명에서 사용될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, '서열번호

1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드'는, 이와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 '서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드'에 속할 수 있음은 자명하다.

- [0033] 본 발명에서 용어, "변이체(variant)"는 하나 이상의 아미노산이 보존적 치환(conservative substitution) 및/또는 변형(modification)에 있어서 상기 열거된 서열 (the recited sequence)과 상이하나, 상기 단백질의 기능(functions) 또는 특성(properties)이 유지되는 단백질을 지칭한다. 이러한 변이체는 일반적으로 상기 단백질의 아미노산 서열 중 하나 이상의 아미노산을 변형하고, 상기 변형된 단백질의 특성을 평가하여 식별될 수 있다. 즉, 변이체의 능력은 본래 단백질(native protein)에 비하여 증가되거나, 변하지 않거나, 또는 감소될 수 있다. 또한, 일부 변이체는 N-말단 리더 서열 또는 막전이 도메인(transmembrane domain)과 같은 하나 이상의 부분이 제거된 변이체를 포함할 수 있다. 다른 변이체는 성숙 단백질 (mature protein)의 N- 및/또는 C-말단으로부터 일부분이 제거된 변이체를 포함할 수 있다. 상기 용어 "변이체"는 변이형, 변형, 변이된 단백질, 변이형 폴리펩티드, 변이 등의 용어(영문 표현으로는 modification, modified protein, modified polypeptide, mutant, mutein, divergent, variant 등)가 사용될 수 있으며, 변이된 의미로 사용되는 용어라면 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 본 발명에서 용어 "보존적 치환(conservative substitution)"은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 상기 변이체는 하나 이상의 생물학적 활성을 여전히 보유하면서, 예를 들어 하나 이상의 보존적 치환을 가질 수 있다. 이러한 아미노산 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있다. 예를 들면, 전하를 띠는 결사슬(electrically charged amino acid)을 갖는 아미노산 중 양으로 하전된 (염기성) 아미노산은 알라닌, 리신, 및 히스티딘을, 음으로 하전된 (산성) 아미노산은 글루탐산 및 아스파르트산을 포함하고; 전하를 띠지 않는 결사슬(uncharged amino acid)을 갖는 아미노산 중 비극성 아미노산(nonpolar amino acid)은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린을 포함하고, 극성(polar) 또는 친수성(hydrophilic) 아미노산은 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴, 글루타민을 포함하고, 방향족 아미노산은 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신을 포함한다.
- [0035] 또한, 변이체는 폴리펩티드의 특성과 2차 구조에 최소한의 영향을 갖는 아미노산들의 결실 또는 부가를 포함할 수 있다. 예를 들면 폴리펩티드는 번역-동시에(co-translationally) 또는 번역-후에(post-translationally) 단백질의 이 전(transfer)에 관여하는 단백질 N-말단의 시그널 (또는 리더)서열과 컨쥬게이트 할 수 있다. 또한 상기 폴리펩티드는 폴리펩티드를 확인, 정제, 또는 합성할 수 있도록 다른 서열 또는 링커와 컨쥬게이트 될 수 있다.
- [0036] 상기 단백질 변이체는 야생형 단백질 대비 아밀로이드 베타 섬유 형성 억제 효과가 억제된 것일 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 용어, "아밀로이드 베타 섬유 형성 억제"는 아밀로이드 베타가 응집하는 것을 억제하는 것을 의미하는 것으로서, 섬유화 억제, 응집 억제, 섬유화 제어 또는 응집화 제어와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0039] 상기 '다른 아미노산으로 치환'은 치환 전의 아미노산과 다른 아미노산이면 제한되지 않는다. 구체적으로, 서열번호 1의 아미노산 서열의 N-말단으로부터 19번 및 32번의 아미노산을 다른 아미노산 잔기로 치환한 것이라면 제한되지 않는다.
- [0040] 추가로 상기 단백질 변이체는 34번 및 42번의 아미노산으로 구성된 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 것일 수 있다.
- [0041] 한편, 본 발명에서 '특정 아미노산이 치환되었다'고 표현하는 경우, 다른 아미노산으로 치환되었다고 별도로 표기하지 않더라도 치환 전의 아미노산과 다른 아미노산으로 치환되는 것임은 자명하다.
- [0042] 상기 단백질 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 19번 및 32번의 아미노산이 극성이고 전하를 띠지 않는 아미노산으로 치환된 것일 수 있으며, 구체적으로는 아스파라긴(N), 글루타민(Q), 세린(S) 또는 트레오닌(T)으로 치환된 것일 수 있고, 보다 구체적으로는 아스파라긴(N)으로 치환된 것일 수 있다.
- [0043] 본 발명의 서열번호 1의 N-말단으로부터 19번 및 32번의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 단백질 변이체는, 상기 19번 및 32번 위치에 상응하는 아미노산 외 다른 아미노산으로 치환된 단백질 변이체 또한 포함할 수 있다. 구체적으로는 34번 및 42번의 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산을 다른 아미노산, 즉, 아스

파라긴(N), 글루타민(Q), 세린(S) 또는 트레오닌(T)으로 치환한 것을 추가로 포함하는 것일 수 있으며, 그 외 다른 위치의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 것을 추가로 포함할 수 있다.

- [0044] 상기 2개의 아미노산은 서열번호 1의 N-말단으로부터 19번째에 위치한 페닐알라닌(F) 및 32번째에 위치한 아이소류신(Ile)일 수 있으며, 또한 상기 단백질 변이체에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 19번째 및 32번째의 아미노산 이외에 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [0045] 구체적으로 본 발명의 단백질 변이체는, 서열번호 2 내지 8로 이루어진 군 중 어느 하나의 서열번호로 이루어진 것일 수 있으며, 구체적으로는 서열번호 2 내지 5로 이루어진 군 중 어느 하나의 서열번호로 이루어진 것일 수 있고, 보다 구체적으로는 서열번호 2 내지 4로 이루어진 군 중 어느 하나의 서열번호로 이루어진 것일 수 있다. 또한 본 발명의 단백질 변이체는 상기 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [0046] 본 발명에서 용어 '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [0047] 보존된 (conserved) 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나 (homologous) 또는 동일한 (identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 따라 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오타이드에서 코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오타이드 또한 고려된다.
- [0048] 임의의 두 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 예를 들어, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지된 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램 (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘 (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다. (GCG 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO ETA/.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.
- [0049] 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482 에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol.48 : 443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오타이드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 이진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스 (또는 EDNAFULL(NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티 (또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다.
- [0050] 또한, 임의의 두 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법(예컨대, J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.,

New York)으로 결정될 수 있다.

- [0052] 본 발명의 일 실시예에서는 아밀로이드 베타 단백질의 섬유화를 억제하기 위하여 구조를 기반으로 아밀로이드 베타 단백질의 19번 및 32번 위치의 아미노산을 소수성을 감소시키는 아스파라긴과 같은 다른 아미노산으로 치환하고, 상기 위치의 아미노산 외 추가로 34번 및/또는 42번 아미노산을 다른 아미노산으로 치환하여 단백질 변이체를 제조하였다. 이후 이러한 단백질 변이체를 이용하여 아밀로이드 베타 섬유화를 제어할 수 있는지 확인한 결과, 상기 단백질 변이체들이 자연형 아밀로이드 베타의 특성인 섬유 형성 속도를 지연시키고 아밀로이드 섬유화 과정에서 발생하는 세포 독성도 또한 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 기존 아밀로이드 섬유화 억제 방법과 달리, 아밀로이드 섬유의 형성 속도 및 길이 조절이 항체 및 나노입자 등 외부 첨가물이 아닌 아밀로이드 베타 단백질의 점 돌연변이체를 통해 제어할 수 있음을 확인할 수 있었다.
- [0054] 본 발명은 상기 단백질 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0055] 본 발명에서 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체가 공유결합에 의하여 길게 사슬 모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체로, 일반적으로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥을 의미하며 본 발명에서는 상기 단백질 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다.
- [0056] 본 발명에서 용어, "벡터"는 숙주 세포로 염기의 클로닝 및/또는 전이를 위한 임의의 매개물을 말한다. 벡터는 다른 DNA 단편이 결합하여 결합된 단편의 복제를 가져올 수 있는 복제단위(replicon)일 수 있다. "복제단위"란 생체 내에서 DNA 복제의 자가 유닛으로서 기능하는, 즉, 스스로의 조절에 의해 복제가능한, 임의의 유전적 단위(예를 들면, 플라스미드, 파지, 코스미드, 염색체, 바이러스)를 말한다. 용어 "벡터"는 시험관 내, 생체 외 또는 생체 내에서 숙주 세포로 염기를 도입하기 위한 바이러스 및 비 바이러스 매개물을 포함하며, 또한 미니구형 DNA를 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 벡터는 박테리아 DNA 서열을 갖지 않는 플라스미드일 수 있다. CpG 영역에서 풍부한 박테리아 DNA 서열의 제거는 전이유전자 발현 사일런싱을 감소시키고 플라스미드 DNA 벡터로부터 보다 지속적인 발현을 가져오기 위해 행해지고 있다(예를 들면, Ehrhardt, A. et al. (2003) HumGene Ther 10: 215-25; Yet, N. S. (2002) Mol Ther 5: 731-38; Chen, Z. Y. et al. (2004) Gene Ther 11 : 856-64). 또한, 상기 벡터는 트랜스포존(Annu Rev Genet. 2003; 37:3-29.), 또는 인공 염색체를 포함할 수 있다. 바람직하게는 pACYC177, pACYC184, pCL1920, pECCG117, pUC19, pBR322 및 pMW118 벡터 등을 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0057] 또한, 본 발명은 상기 단백질 변이체 또는 상기 벡터를 포함하는, 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0058] 본 발명에서 용어, "단백질 변이체", "벡터"는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0059] 본 발명에서 용어, "신경퇴행성 질환"은 신경변성질환이라고도 하며, 광의로는 신경세포(nerve cell)가 퇴행하는 병태 전부를 포함하지만 일반적으로는 허혈관장해, 외상(外傷), 대사이상 등 뚜렷한 신경계세포 외의 요인이 될 수 있는 것은 포함하지 않는다. 구체적으로, 상기 신경퇴행성 질환은 치매, 알츠하이머병, 파킨슨병(Parkinson's disease)이 포함될 수 있으며, 보다 구체적으로는 알츠하이머병일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0060] 상기 알츠하이머병은 치매를 일으키는 가장 흔한 신경퇴행성 뇌질환으로, 서서히 발병하여 인지기능의 악화가 점진적으로 진행되는 병이다. 기억력 감퇴, 언어능력 저하, 시공간 파악능력 저하, 판단력 및 일상생활 수행능력의 저하, 보행장애, 거동 장애 등의 인지장애 증상을 나타낸다.
- [0061] 본 발명에서 용어, "예방"은 상기 단백질 변이체 또는 상기 벡터의 투여로 신경퇴행성 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0062] 본 발명에서 용어, "치료"는 상기 단백질 변이체 또는 상기 벡터의 투여로 신경퇴행성 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0063] 본 발명의 약학 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 단백질 변이체 또는 벡터를 0.01 내지 80%, 구체적으로 0.01 내지 70%, 더욱 구체적으로 0.01 내지 60 중량%로 포함할 수 있으나, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료 효과를

나타내는 한, 이에 제한되지 않는다.

- [0064] 또한, 상기 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 약학 적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있고, 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 구체적인 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0065] 또한, 상기 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 정제, 환제, 산제, 과립 제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁 제, 유제, 동결 건조제 및 좌제으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제 형을 가질 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경 우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제 된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환 제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 사용될 수 있으며, 상기 고형제 제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤 라틴 등이 사용될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제 등이 사 용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감 미제, 방향제, 보존 제 등이 사용될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제 제 또는 좌제 등이 사용될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌 제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0067] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료방법에 대해 제공한다.
- [0068] 본 발명에서 용어, "단백질 변이체", "백터", "신경퇴행성 질환", "예방" 및 "치료"는 상기에서 설명한 바와 같 다.
- [0069] 본 발명의 용어, "투여"는 적절한 방법으로 개체에게 상기 약학 조성물을 도 입하는 것을 의미한다.
- [0070] 본 발명에서 용어, "개체"는 신경퇴행성 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등 의 모든 동물을 의미한다. 구체적인 예로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.
- [0072] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.
- [0073] 상기 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기 에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개 체 종류 및 증정도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민 감도, 투여 시간, 투 여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야 에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0074] 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투 여할 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여할 수 있다. 또한, 단일 또는 다중 투여할 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 있다.
- [0075] 또한, 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투 여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복 강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시 간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 구체적인 예로, 상기 약학적 조성물은 일 반적으 로 0.001 내지 1000 mg/kg, 더욱 구체적으로 0.05 내지 200 mg/kg, 가장 구 체적으로 0.1 내지 100 mg/kg의 양 을 4주 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있으나, 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

- [0077] 또한, 본 발명은 상기 단백질 변이체 또는 상기 벡터를 포함하는, 신경퇴행성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0078] 또한, 본 발명은 상기 단백질 변이체 또는 상기 벡터를 포함하는, 신경퇴행성 질환 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.
- [0079] 본 발명에서 용어, "단백질 변이체", "벡터", "신경퇴행성 질환", 및 "예방"은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0080] 본 발명에서 용어, "개선"은 상기 단백질 또는 상기 벡터의 투여로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0081] 본 발명의 용어, "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따 른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, '기능성'은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학 적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 한편, 건강식 품은 일반 식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품은 건강 보조 목적의 식품을 의미하는데, 경우에 따라, 건강기능식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용될 수 있다.
- [0082] 본 발명의 신규 단백질 변이체 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 그대로 첨가되거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0083] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조 시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 구체적으로, 상기 건강기능식품 조성물은 생리학 적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.
- [0084] 또한, 상기 건강기능식품 조성물은 방부제, 살균제, 산화방지제, 착색제, 발색제, 표백제, 조미료, 감미료, 향료, 팽창제, 강화제, 유화제, 증점제, 피막제, 감기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물을 포함할 수 있다. 상기 첨 가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.
- [0085] 또한, 상기 건강기능식품의 제형은 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고 휴대성이 뛰어나므로, 본 발명의 식품은 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.
- [0086] 본 발명의 신규 단백질 변이체 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선 효과를 나타낼 수 있다면 건강기능식품 조성물에 다양한 중량%로 포함될 수 있다. 구체적으로, 건강기능식품 조성물의 총 중량 대비 0.00001 내지 100 중량% 또는 0.01 내지 80 중량%로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 건강 및 위생을 목적으로 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 함량을 포함할 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0088] 본 발명의 용어, "사료"는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미한다.
- [0089] 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근 과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성 류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [0090] 본 발명의 사료용 조성물은 당업계의 공지된 다양한 형태로 제조 가능하다. 또한, 영양소 보충 및 체중감소 예방, 사료 내 섬유소의 소화 이용성 증진, 유질 개선, 번식장애 예방 및 수태율 향상, 하절기 고온 스트레스 예방 등 다양한 효과를 나타내는 물질을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 탄산수소나트륨, 벤토나이트(bentonite), 산화마그네슘, 복합광물질 등의 광물질제제, 아연, 구리, 코발트, 셀레늄 등의 미량 광물질인 미네랄제제, 케로틴, 비타민 E, 비타민 A, D, E, 니코 틴산, 비타민 B 복합체 등의 비타민제, 메티오닌, 리이산 등의 보호아미노산제, 지 방산 칼슘염 등의 보호지방산제, 생균제(유산균제), 효모배양물, 곰팡이 발효물 등의

생균, 효모제 등이 추가로 포함될 수 있다.

- [0092] 또한, 본 발명은 상기 단백질 변이체 또는 상기 벡터를 포함하는, 아밀로이드 베타의 섬유화 제어용 조성물을 제공한다.
- [0093] 또한, 본 발명은 단백질 변이체; 또는 제8항의 벡터를 분리된 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 아밀로이드 베타의 섬유화 제어 방법을 제공한다.
- [0094] 본 발명에서 용어, "단백질 변이체", "벡터", "아밀로이드 베타", 및 "섬유화"는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0095] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 아밀로이드 섬유화를 일으키는 아밀로이드 베타 (1-42)의 구조를 기반으로 한 본 발명의 단백질 변이체가 자연형 아밀로이드 베타의 특성인 섬유 형성 속도를 지연시키고, 아밀로이드 섬유화 과정에서 발생하는 세포 독성도 또한 감소시키는 것을 확인하였으며, 또한, 기존 아밀로이드 섬유화 억제 방법과 달리, 아밀로이드 섬유의 형성 속도 및 길이 조절이 항체 및 나노입자 등 외부 첨가물이 아닌 아밀로이드 베타 단백질의 점 돌연변이체를 통해 제어할 수 있음을 확인할 수 있었다.

### 발명의 효과

- [0097] 본 발명에 따르면 단백질의 구조와 동역학에 대한 이해를 바탕으로 고안된 점 돌연변이를 통해 아밀로이드 베타 (1-42) 단백질의 섬유 형성을 속도론 적으로 지연함으로써 섬유 형성을 억제할 수 있으며, 야생형 아밀로이드 베타 (1-42)와 혼재하는 경우 함께 상호작용하여 섬유 형성을 지연시키고 섬유가 갖는 세포 독성을 감소시킬 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0099] 도 1은 아밀로이드 베타 (1-42)의 구조 및 동역학적 특성을 기반으로 한 섬유 형성 반응을 억제할 수 있는 점 돌연변이체 선정 단계를 나타낸 도이다.
- 도 2는 아밀로이드 베타 (1-42)의 섬유화 반응 시 자연형(야생형)과 본 발명의 단백질 변이체 각각의 아밀로이드 섬유 형태와 길이 변화를 확인한 도이다.
- 도 3은 아밀로이드 베타 (1-42)의 섬유화 반응 시 자연형과 섬유 형성 억제에 성공한 본 발명의 단백질 변이체가 혼합되어 있을 때, 단백질 변이체 비율에 따른 섬유의 형태와 길이 및 세포 독성 변화를 확인한 도이다.
- 도 4는 페닐알라닌 19, 아이소류신 32, 류신 34 및 알라닌 42를 모두 아스파라긴으로 치환한 변이체의 세포 독성 감소를 확인한 도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0100] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

### [0102] 실험예

#### [0103] 실험예 1: 컴퓨팅 계산 및 구조를 기반으로 한 단백질 변이체 선별

- [0104] 점 돌연변이가 단백질의 용해도에 미치는 영향을 알아보기 위해, 중성 pH 조건에서 치환 전후의 용해도 점수를 캠솔 웹 서버(CamSol web server)로 계산했다 (<http://www.vendruscolo.ch.cam.ac.uk/camsolmethod.html>).
- [0105] 분자 동역학 전산모사를 시행하기 위해, 그로맥스(GROMACS) 2020.4 및 그로맥스(GROMACS) 4.5.5를 사용하였다. 또한, 시뮬레이션을 위해 CHARMM36m 포스필드 (Huang, J.; Rauscher, S.; Nawrocki, G.; Ran, T.; Reig, M.; de Groot, B. L.; Grubmuller, H.; MacKerell, A. D. Nature Methods 2017, 14 (1), 71-73.)를 사용하였다.
- [0106] 아밀로이드 베타 단백질의 초기 구조는 공개된 PDB 구조 (PDB code: 5QV)를 이용하여 확인하였다. 향상된 구조

샘플링을 위해 400K와 500K 온도 사이에서 레플리카 익스체인지(replica exchange) 분자 동역학 전산모사를 수행하였다. 20ns 계산으로 5개의 레플리카(replica)에서 총 10,000개의 구조를 획득 후, 앙상블 최적화 방법(ensemble optimization method, EOM)으로 용액상 x선 소각산란 실험 결과와 연관하여 용액상에서 존재할 가능성이 큰 구조 50개를 선별하였다.

[0107] 상기 선별된 50개의 구조에서 용액상 회전반경이 가장 큰 확장된 구조를 기준으로 해당 구조를 두 개로 복제하여 이합체의 동역학을 전산모사하였다. 400ns의 계산을 총 48개의 레플리카(replica)에서 시행하여 도합 19.2  $\mu$ s의 계산을 하였고, 평형 상태에 도달한 이합체의 구조를 관측하였다.

[0108] pH 7 조건에서 TIP3P 큐빅 워터 박스(cubic water box)를 제작하여 소듐과 염소 이온을 20 mM 농도로 첨가하였다. 그로맥스(GROMACS) 2020.4 프로그램의 SHAKE 알고리즘을 이용해 2fs 간격으로 계산하였다. 정전기적 상호작용은 particle mesh Ewald (PME) 방법론으로 1.2nm의 컷오프(cutoff)를 사용해 계산하고, 반데르발스(van der Waals) 상호작용은 1.2nm 컷오프로 지정하였다. 이 때 Velocity-rescaling thermostat을 사용하였다. 또한, REMD는 48개의 레플리카에서 300K부터 400K 온도 사이의 교환으로 진행하였다. 이 때 교환은 2ps마다 시도하였고 평균 교환 확률은 0.3이다.

## [0110] 실험예 2: 재료

[0111] 본 명세서에서 언급되어 있지 않은 모든 실험 재료는 통상적으로 구매 가능한 공급 업체를 통해 구매하였다.

[0112] 합성된 아밀로이드 베타 42 자연형과 점 돌연변이체 (순도 95% 이상)는 애니젠(Anygen; Gwangju, Republic of Korea)에서 구매하였다. 단백질의 농도는 UV-visible (UV-Vis) 분광 광도계를 이용하여 결정하였다 ( $\epsilon_{280nm} = 1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). 트리스(히드록시메틸)아미노메테인-염화수소 표준 용액 (1M, pH 7.4)은 바이오세상(Biosesang; Daejeon, Republic of Korea)에서 구매하였다. 용매는 HPLC-등급 물 (JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA)을 사용하였다.

## [0114] 실험예 3: 세포 배양

[0115] SH-SY-5Y 신경모세포종 세포를 한국 세포주 은행(서울, 대한민국)에서 구입 후 10% 소태아혈청(FBS; Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany)과 1% 항생제(10,000U/mL 페니실린 G, 10,000  $\mu$ g/mL 스트렙토마이신 및 25  $\mu$ g/mL 암포테리신 B; Hyclone, Logan, UT, USA)가 보충된, 돌베코(Dulbecco)의 Modified Eagle Medium/F-12 Nutrient Mixture Ham(DMEM/F-12; WelGENE) 1:1 혼합물에서 배양하였다. 상기 항생제는 0.2  $\mu$ m 필터를 통과시켜 사용 전에 멸균하여 사용하였으며, 상기 세포는 5% CO<sub>2</sub>를 포함하는 가습 하에, 37° C의 조건으로 배양하였다.

## [0117] 실험예 4: 아밀로이드 베타 섬유화 실험

[0118] 자연형 아밀로이드 베타와 이의 단백질 변이체의 섬유화 속도를 확인하기 위하여, ThT 형광 실험을 수행하였다.

[0119] 구체적으로, 각 시료는 10 마이크로 몰농도로, 5 마이크로 몰농도의 ThT와 함께 20 밀리 몰농도 트리스(히드록시메틸)아미노메테인-염화수소 용액 (pH 7.4)에서 37° C 온도 조건으로 섬유화를 진행하였다.

[0120] 구체적으로, Corning 96-well black polystyrene microplate (Corning 3603, Corning, New York, NY, USA)에 시료를 넣고, 상단을 밀봉 (EASY seal sealing film, Greiner-Bio-One)하였다. 이후 형광 세기를 Synergy H1 microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA)로 측정하였다. 이 때, 여기 파장(excitation)과 방출 파장(emission)은 각각 446 nm, 482 nm이다.

## [0122] 실험예 5: 투과전자현미경(TEM)을 이용한 섬유의 형태학적 분석

[0123] 아밀로이드 베타 단백질의 섬유 형성을 시각적으로 확인하기 위하여, 우라닐 아세테이트를 이용한 음각 염색을 수행하였다.

[0124] 구체적으로, 0.5% w/v 농도의 우라닐 아세테이트 스톡 용액을 HPLC 등급 물에서 제조하고 0.22  $\mu$ m 일회용 주사

기 필터로 여과하였다. Aβ 펩티드의 총 농도는 10 μM로 이를 24시간 동안 인큐베이션한 후, 400-mesh formvar/carbon Cu(II) 그리드(Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA)로 옮겼다. 인큐베이션된 피브릴 샘플(5 μL)을 20℃에서 3분 동안 Cu(II) 그리드에 스왑팅하고 제거하였다. 0.5% w/v 우라닐 아세테이트 용액을 사용하여 샘플을 제거한 직후 그리드를 2회 세척하고, 각 샘플을 5 μL 우라닐 아세테이트 용액으로 1분 간 염색하였다. 이후, 염색 용액을 제거 후, 상기 샘플을 20℃에서 4시간 동안 건조시켰다.

[0125] 아밀로이드 베타 단백질의 섬유 길이를 측정하기 위하여, Able Image Analyzer v3.6을 통해 사진을 분석하였으며, 여기에서 섬유 길이는 확인 가능한 섬유의 끝에서부터 반대쪽 끝까지의 거리를 측정하여 정의하였다.

[0126] TEM 사진은 JEM-F200 (TFEG) (JEOL Ltd, Japan) field-emission transmission electron microscope (National Center for Inter-University Research Facilities (NCIRF), Seoul National University, Seoul, Republic of Korea)로 확인하였다.

## [0128] 실험예 6: 세포 생존율 실험

[0129] 세포 생존율은 MTT 어세이로 평가하였다.

[0130] 구체적으로, 15,000개의 세포를 96-웰 플레이트의 각 웰에 키우고 24시간 동안 배양하였다. SH-SY-5Y 세포에 아밀로이드 베타 단백질과 이의 섬유를 처리한 뒤 2일간 배양하였다. 이후, MTT 용액을 배지에 첨가한 뒤, 3시간 동안 37℃에서 배양하여 MTT-formazan 생성물을 형성하게 하였다. 생성물의 양은 540nm 파장에서의 흡광 정도로 정량하였다.

[0131] 각 시험은 3개의 시료로 한 번에 시행하였으며, 전체 실험은 재현성 확보를 위해 3회 반복하였다.

## [0133] 실시예

### [0134] 실시예 1: 아밀로이드 베타 (1-42)의 구조 및 동역학적 특성을 기반으로 섬유 형성 반응을 억제할 수 있는 점 돌연변이체 선정

[0135] 아밀로이드 베타 (1-42)의 섬유 형성 단계에서는 아밀로이드 베타 (1-42) 사슬 사이의 소수성 상호작용이 중요한 역할을 하므로, 효율적인 섬유 형성의 억제를 위해 일차적으로는 소수성 상호작용이 주요하게 발생하는 영역을 찾았다.

[0136] 그러기 위하여, 자연형 아밀로이드 베타 (1-42) 섬유 구조의 특성을 반영하여 계산한 결과, 각 아미노산의 용해도 점수를 먼저 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 특별히 용해도 점수가 낮은, 즉, 용해도 점수가 -1 미만인 2 영역으로 류신 17 내지 페닐알라닌 19 영역과 아이소류신 32 내지 알라닌 42 영역을 확인할 수 있었다 (도 1).

[0137] 섬유 형성에 중요한 또 다른 과정은 초기 상호작용 과정이다. 이에, 다음 단계로 분자 동역학 전산 모사법을 이용하여 충분히 긴 시간 동안 계산하여 평형 상태에 도달한 두 아밀로이드 베타 (1-42) 사슬이 상호 작용하는 경향을 확인하였다.

[0138] 그 결과, 도 1에서 확인할 수 있는 것과 같이, 사슬 내부 및 사슬 간 접촉 확률 지도를 통해 이전 아미노산의 용해도 점수를 기반으로 확인한 2개의 영역이 다른 영역과 비교하여 더 높은 확률로 서로 접촉하는 것을 확인할 수 있었다 (도 1). 이렇게, 상기 1차 및 2차의 두 전산 모사법이 서로 상관관계를 보이며 같은 결과를 도출하는 것은, 소수성 상호작용이 아밀로이드 섬유 형성 초기 단계에서 비중 있는 역할을 하기 때문인 것으로 판단된다.

[0140] 이 후, 상기의 전산 모사법을 통해 확인한 2개의 영역에서 4 개의 소수성 아미노산인 페닐알라닌 19, 아이소류신 32, 류신 34 및 알라닌 42를 점 돌연변이의 대상으로 선택하였다. 또한, 상기 선택된 4 개의 아미노산을 각각 극성이며 전하를 띄지 않는 4 종류의 아미노산인 아스파라긴, 글루타민, 세린 및/또는 트레오닌으로 모두 치환하여 4개의 단백질 변이체 용해도 점수를 계산하였다. 그 결과, 역시 도 1에서 확인할 수 있듯이, 4 개의 아미노산 중 아스파라긴으로 치환하였을 때, 가장 용해도 점수가 많이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 다른 아미노산으로 치환하였을 때에도 용해도 점수가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 효율적인 섬유 형성의 방해를 위해서는 최소 2개 이상의 아미노산이 치환된 단백질 변이체가 필요하다는 것을 알 수 있었다 (도 1).

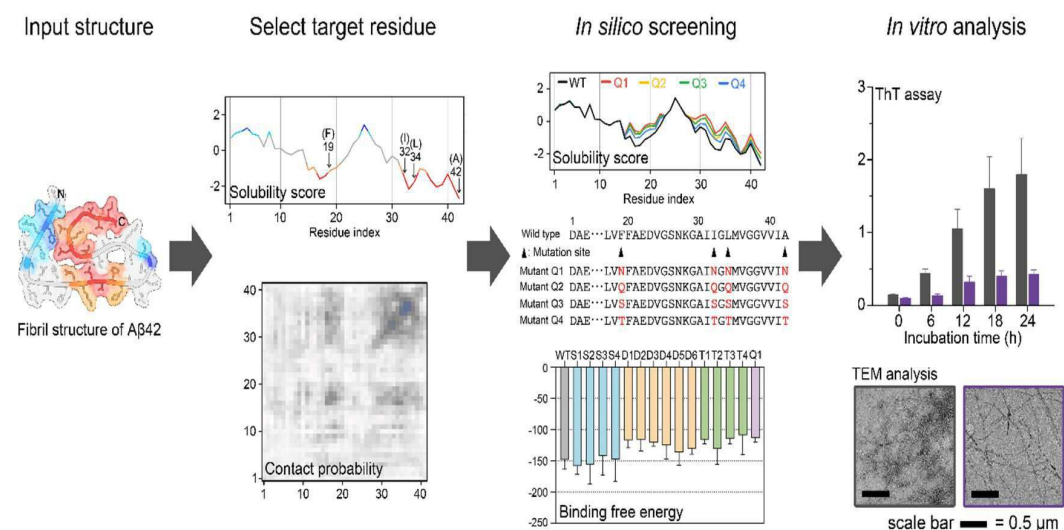
- [0142] **실시예 2: 아밀로이드 베타 (1-42)의 섬유화 반응 시 자연형(야생형)과 본 발명의 단백질 변이체 각각의 아밀로이드 섬유 형태와 길이 변화 확인**
- [0143] 자연형(야생형) 아밀로이드 베타 (1-42)와 본 발명에서 제조된 단백질 변이체 각각에 대하여 10 마이크로 몰농도를 37 °C에서 1 일간 가하여 섬유화 반응을 수행하였다. 이 후, 섬유 형성이 완료된 용액을 폼바가 증착된 구리격자판에 옮긴 뒤, 우라닐 아세테이트를 이용한 음성 염색법을 수행하였다(도 2d).
- [0144] 그 결과, 상기의 실험 조건에서 분당 205 번의 회전을 시험관에 가했을 때, 자연형 아밀로이드 베타 섬유의 평균 길이는 334.5 나노미터 (nm)이고 표준편차는 218.2 nm로 측정되었다 (도 2e).
- [0145] 다음으로, 상기 실시예 1에서와 같이, 동일한 실험 조건에서 전산 모사법을 통해 선정한 4 개의 소수성 아미노산을 아스파라긴으로 치환한 단백질 변이체 섬유의 평균 길이는 766.0 nm이고, 표준편차는 551.1 nm로 자연형 대비 대폭 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (도 2e).
- [0146] 흥미롭게도, 3 개의 소수성 아미노산을 아스파라긴으로 치환한 단백질 변이체 섬유의 평균 길이는 일부 증가하였지만, 그 중 페닐알라닌 19, 류신 34, 및 알라닌 42를 치환한 단백질 변이체와 아이소류신 32, 류신 34, 및 알라닌 42를 치환한 단백질 변이체의 경우에는, 오히려 섬유의 평균 길이가 각각 254.4 nm, 199.3 nm로 자연형 아밀로이드 베타 섬유의 평균 길이보다 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0147] 특히, 섬유의 평균 길이가 증가한 2 종의 단백질 변이체가 공통으로 포함하는 페닐알라닌 19와 아이소류신 32만 아스파라긴으로 치환한 단백질 변이체 역시, 평균 섬유 길이 819.4 nm로 조작된 섬유 형성 속도 특성이 유지되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0148] 또한, 형성된 섬유의 평균 길이가 길어지고, 섬유 구조에 결합하는 티오플라빈 T를 활용하여 섬유 형성 속도를 형광 세기를 통해 확인해 본 결과, 전산 모사법을 이용해 고안된 돌연변이체는 속도론적으로 아밀로이드 베타 단백질의 섬유 형성 과정을 저해할 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다 (도 2의 a 내지 c).
- [0149] 아울러, 페닐알라닌 19 및 아이소류신 32를 모두 치환하면서 동시에, 류신 34, 및 알라닌 42를 아스파라긴으로 치환한 변이체의 경우에도 세포 독성이 감소하고 섬유 형성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(도 2a 및 도 4).
- [0151] 반면, 페닐알라닌 19 및 아이소류신 32를 각각 하나만 아스파라긴으로 치환한 두 단백질 변이체의 경우에는 2개의 아미노산을 모두 치환한 경우와는 달리, 섬유 형성 속도 지연 효과가 나타나지 않아, 앞서 실시예 1에서 수행한 전산 모사법의 결론과 일치하는 아미노산 중 최소 2개 이상의 아미노산을 치환해야 효과적으로 아밀로이드 베타 단백질의 섬유 형성을 지연할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0153] **실시예 3: 아밀로이드 베타 (1-42)의 섬유화 반응 시 자연형과 섬유 형성 억제에 성공한 단백질 변이체가 혼합되어 있을 때, 단백질 변이체의 비율에 따른 섬유의 형태와 길이 및 세포 독성 변화 확인**
- [0154] 돌연변이가 섬유 형성 속도에 미치는 영향을 확인한 뒤, 본 발명의 단백질 변이체가 자연형 아밀로이드 베타 단백질과 공존할 때의 효과를 확인하였다. 돌연변이의 숫자를 최소화하기 위해 섬유 형성을 억제한 단백질 변이체 중에서 F19N/I32N, F19N/I32N/L34N, 및 F19N/I32N/A42N 세 종을 선택한 후, 혼합물의 속도론적 경향성을 24시간 동안 관측하였다.
- [0155] 그 결과, 상기 3종의 단백질 변이체 모두 자연형 아밀로이드 베타 단백질의 섬유화를 억제하였고, 억제 효과는 자연형과 단백질 변이체의 비율에 의존하는 것을 확인할 수 있었다. 구체적으로, F19N/I32N 단백질 변이체는 20%, 50%, 그리고 100%로 각각 존재할 때, ThT 형광 세기가 순수한 자연형 돌연변이를 100%로 간주했을 때 대비 67%, 52%, 및 15%까지 감소하는 것을 확인하였다.
- [0156] TEM 사진상에서도 섬유가 감소한 것을 확인할 수 있었으며, 평균적인 섬유의 길이의 경우 단백질 변이체의 비율이 20%, 50%, 및 100% 일 때, 각각 386.3nm, 495.5nm, 및 742.7nm인 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해, 자연형 아밀로이드 베타 단백질의 섬유 길이가 334.5nm였던 것과 비교하여 본 발명의 단백질 변이체에서 섬유가 길어지고, 분포 또한 짧은 섬유부터 매우 긴 섬유까지 혼재되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해, 섬유의 핵 형성이 방해받았고, 단백질 변이체가 자연형 아밀로이드 베타 단백질과 상호작용하여 섬유 핵 형성 과정을

지연하는 것을 예측할 수 있다.

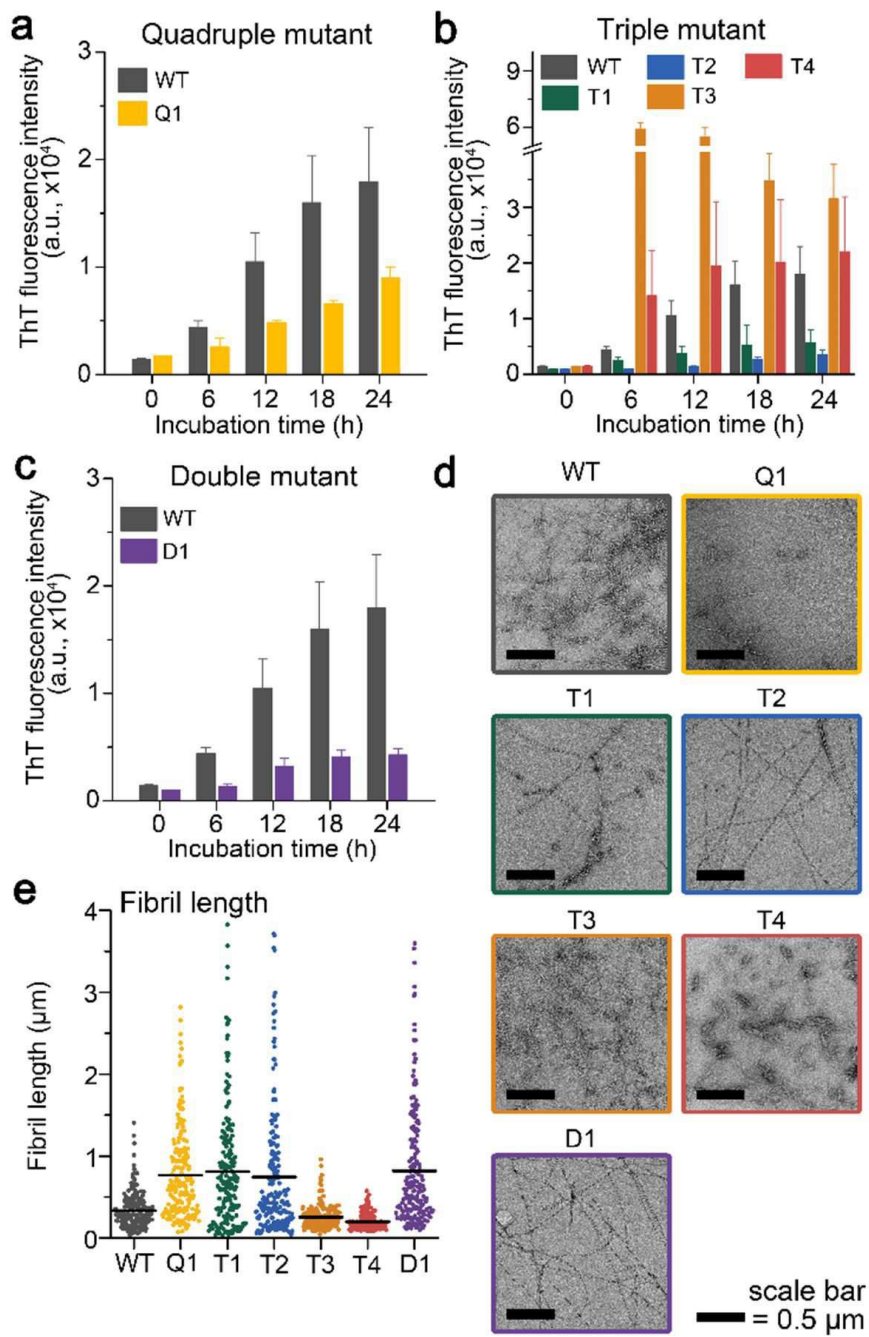
- [0158] 다음으로, 형성된 아밀로이드 섬유의 세포 독성을 비교하여 아밀로이드 베타 (1-42) 단백질이 갖는 세포 독성의 변화를 확인해 보았다. 구체적으로, 배양된 신경모세포종 15,000개에 단량체 상태의 단백질과 섬유 상태의 단백질을 각각 1 마이크로 몰농도로 가하여 2일간 배양한 후, MTT 시약을 이용해 세포 독성의 변화를 측정하였다.
- [0159] 그 결과, 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 자연형 아밀로이드 베타 (1-42)의 섬유로 처리된 세포의 생존율은 63%인 반면, 본 발명의 단백질 변이체가 20% 혼합된 경우에는 세포 생존율이 72%까지 증가하였고, 특히 단백질 변이체의 비율이 50%로 증가했을 때는 세포 생존율이 76%까지 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (도 3).
- [0160] 이는 단순히 자연형 아밀로이드 베타의 농도가 80%로 감소했을 때의 생존율보다 더 높은 수치이다. 이 결과를 통해 단순히 자연형 아밀로이드 베타 단백질의 농도가 줄어드는 효과 이상으로 단백질 변이체와 자연형 단백질의 상호작용을 통해 발생한다는 사실을 확인할 수 있었다.
- [0161] 이러한 결과는 본 발명의 단백질 변이체가 자연형 아밀로이드 베타 단백질과의 상호작용으로 신경모세포의 생존율을 증가시켜 알츠하이머와 같은 신경퇴행성 질환을 예방 및/또는 치료할 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0163] 상술한 실시예를 종합하면, 아밀로이드 섬유화를 일으키는 아밀로이드 베타 (1-42)의 구조 기반 단백질 변이체는 자연형 아밀로이드 베타의 특성인 섬유 형성 속도를 지연시키고, 아밀로이드 섬유화 과정에서 발생하는 세포 독성도 또한 감소시키는 것을 확인할 수 있다.
- [0164] 또한, 기존 아밀로이드 섬유화 억제 방법과 달리, 본 발명에 따르면 아밀로이드 섬유의 형성 속도 및 길이 조절이 항체 및 나노입자 등 외부 첨가물이 아닌 아밀로이드 베타 단백질의 점 돌연변이체를 통해 제어할 수 있음을 확인할 수 있다.
- [0166] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

## 도면

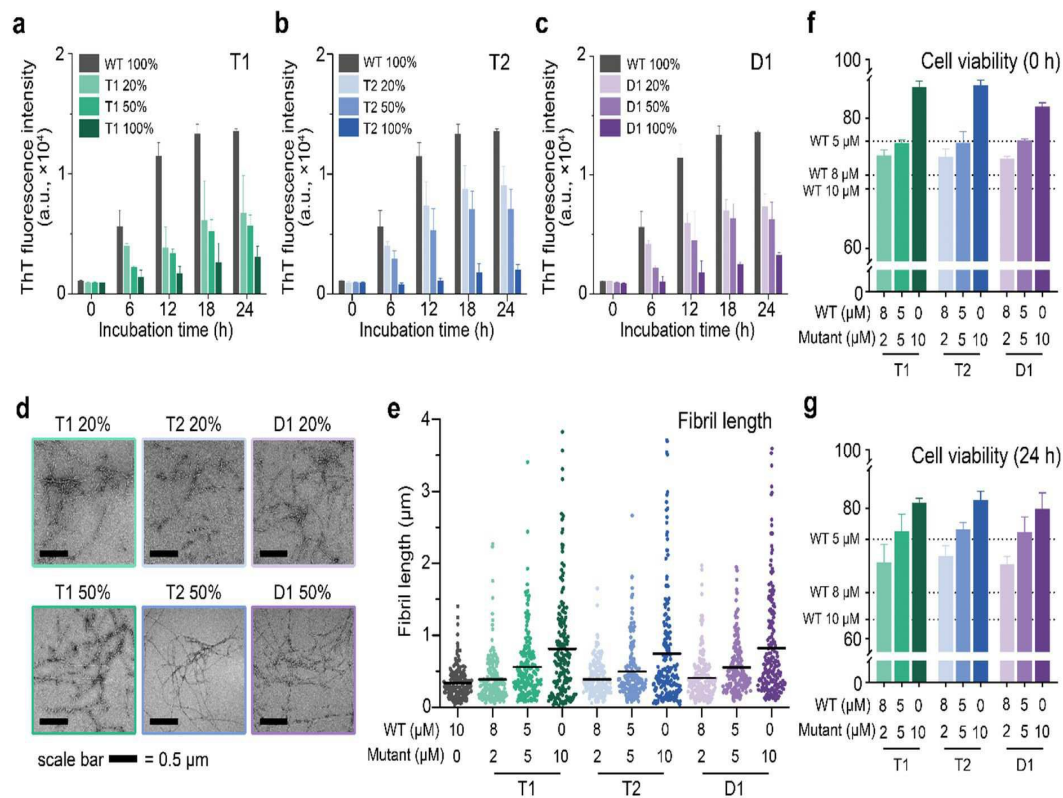
### 도면1



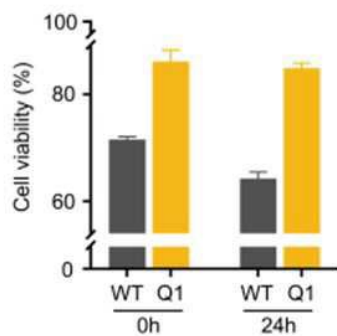
도면2



도면3



도면4



## 서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Novel protein variant and a composition for treating neurodegenerative disease using the same
- <130> JKP1703R1
- <150> KR 10-2021-0192521
- <151> 2021-12-30
- <160> 8

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amyloid beta protein

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

35 40

<210> 2

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F19N/I32N/L34N

<400> 2

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1 5 10 15

Leu Val Asn Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Asn

20 25 30

Gly Asn Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

35 40

<210> 3

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F19N/I32N/A42N

<400> 3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1 5 10 15

Leu Val Asn Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Asn

20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Asn

35 40

<210> 4

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F19N/I32N

<400> 4

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1 5 10 15

Leu Val Asn Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Asn

20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

35 40

<210> 5

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F19N/I32N/L34N/A42N

<400> 5

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1 5 10 15

Leu Val Asn Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Asn

20 25 30

Gly Asn Met Val Gly Gly Val Val Ile Asn

35 40

<210> 6

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> F19S/I32S/L34S/A42S

<400> 6

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1 5 10 15

Leu Val Ser Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ser

20 25 30

Gly Ser Met Val Gly Gly Val Val Ile Ser

35 40

<210> 7

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F19T/I32T/L34T/A42T

<400> 7

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1 5 10 15

Leu Val Thr Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Thr

20 25 30

Gly Thr Met Val Gly Gly Val Val Ile Thr

35 40

<210> 8

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F19Q/I32Q/L34Q/A42Q

<400> 8

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1 5 10 15

Leu Val Gln Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Gln

20 25 30

Gly Gln Met Val Gly Gly Val Val Ile Gln

35 40