



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0117965
(43) 공개일자 2020년10월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) G01N 21/29 (2006.01)
G01N 21/31 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6896 (2013.01)
G01N 21/29 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0128807(분할)
(22) 출원일자 2020년10월06일
심사청구일자 2020년10월06일
(62) 원출원 특허 10-2019-0017328
원출원일자 2019년02월14일
심사청구일자 2019년02월14일

(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
특허법인 다해

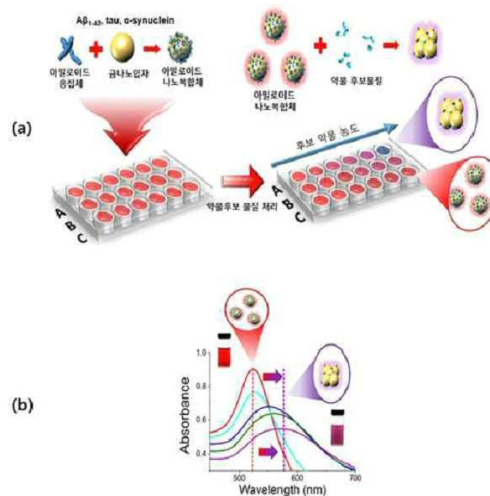
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝용 아밀로이드 베타 올리고머-금 나노입자 복합체 제조방법

(57) 요약

본 발명은 약물에 의한 아밀로이드 분해 효능을 용이하게 검지할 수 있는 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝용 비색 센서 키트 및 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 21/314 (2013.01)

G01N 2333/4709 (2013.01)

G01N 2500/20 (2013.01)

(72) 발명자

김인수

서울특별시 성북구 인촌로24가길 4-11, B03호

이규도

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

정효기

서울특별시 동대문구 안암로18가길 20, B동 403호
(제기동)

김용환

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

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711084485
과제번호	R1611814
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(이공)중견연구자지원사업
연구과제명	그래핀 센서 소자 기반 퇴행성 뇌질환 관련 약물 스크리닝 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2016.06.01 ~ 2019.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝용 아밀로이드 베타 올리고머-금 나노입자 복합체 (Amyloid beta oligomer-shelled gold nanoparticle: ASGN) 제조방법:

(가) 하기 단계를 포함하는 금 나노입자 제조 단계;

(ㄱ) 염화 금산(HAuCl_4) 전구체와 시트르산 나트륨을 반응시켜 시트르산으로 안정화된 금 나노입자 제조 단계; 및

(ㄴ) 상기 금 나노입자를 원심분리 및 세척하여 금 나노입자를 획득하는 단계.

(나) 하기 단계를 포함하는 아밀로이드 베타(AB) 정제 단계;

(1) 동결 건조된 AB 펩티드를 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol: HFIP)에 용해하는 단계; 및

(2) 상기 (1) 단계의 용액에서 수분과 HFIP를 증발시키는 단계.

(다) 상기 (가) 단계에서 제조된 금 나노입자와 상기 (나) 단계에서 정제한 AB를 1:1200~1600 몰비율로 혼합하여 교반하는 단계;

(라) 상기 (다) 단계의 혼합물을 35~39 °C에서 20~28시간 동안 인큐베이션하여 ASGN를 제조하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (ㄱ) 단계는 HAuCl_4 2.55 ml을 증류수 10ml에 녹인 염화 금산 용액과 증류수에 시트르산 나트륨 108.8 mg을 녹인 용액 10ml를 혼합하고 교반하며 가열하고, 용액이 끓기 시작하면 시트르산 나트륨 용액 0.9ml를 첨가하고 15분 동안 가열하여 시트르산으로 안정화된 금 나노입자는 제조하는 것인, 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 (ㄴ) 단계는 시트르산으로 안정화된 금 나노입자를 8,000~12,000 rpm에서 3~6분 동안 세척하여 18~22 nm 직경의 금 나노입자를 획득하는 것인, 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 (1) 단계는 동결 건조된 AB 펩티드 1 mg을 2300 μl HFIP에 용해한 후 상온에서 40~80 분 동안 유지하는 것인, 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (2) 단계는 상기 (1) 단계의 용액을 튜브에 분주하고 2시간 동안 진공 동결건조하고 영하의 온도 조건 및 진공 조건에서 1300~1700 rpm으로 40~80 분 동안 원심분리하여 수분과 HFIP를 증발시키는 것인, 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 (다) 단계는 금 나노입자와 Aβ를 1:1400 몰비율로 혼합하여 교반하는 것인, 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 (라) 단계는 (다) 단계의 혼합물을 37 °C에서 24시간 동안 인큐베이션하여 ASGN을 제조하는 것인, 제조방법.

청구항 8

제1항 내지 7항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝용 아밀로이드 베타 올리고머-금 나노입자 복합체(Amyloid beta oligomer-shelled gold nanoparticle: ASGN)로서,

상기 복합체는 금 나노입자 표면에 아밀로이드 베타 올리고머가 hard corona 패턴으로 코팅된 것을 특징으로 하며,

상기 ASGN의 직경은 25~32 nm인 것을 특징으로 하는, 아밀로이드 베타 올리고머-금 나노입자 복합체.

청구항 9

제8항의 아밀로이드 베타 올리고머-금 나노입자 복합체를 포함하는 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝용 비색 센서.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체를 포함하는 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝용 비색 센서 키트 및 이를 이용한 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 퇴행성 뇌질환(degenerative brain disease)은 나이가 들어감에 따라 뇌에서 발생하는 질환을 뜻한다. 현재까지 잘 알려지지 않은 원인으로 뇌에서 특정 뇌세포군이 서서히 그 기능을 잃고 뇌신경계의 정보전달에 가장 중요한 뇌신경세포의 사멸, 뇌신경세포와 뇌신경세포 사이의 정보를 전달하는 시냅스의 형상이나 기능상의 문제 또는 뇌신경의 전기적 활동성의 이상적 증가나 감소로 인하여 야기되는 것으로 알려져 있다.

[0004] 현재까지 알려진 알츠하이머병의 가장 대표적인 증상 또는 예후는 베타아밀로이드(Aβ)의 집적에 의한 응집이 있다. 이러한 증상으로 인해 환자의 뇌에서는 베타아밀로이드 플라그(plaques)가 나타난다.

[0005] 이때, 베타아밀로이드 중에서도 베타아밀로이드 42(Aβ₄₂)는 병독성이 매우 크고, 다량으로 생성될 경우 피브릴(fibril)을 형성하게 되고, 피브릴이 모여 플라크를 형성하게 되는 것으로, 아밀로이드 침전을 유발하기 때문에 알츠하이머병의 주요 원인이 된다.

[0006] 이러한 알츠하이머 주요 원인 물질 중에 하나로 밝혀진 베타아밀로이드 42를 타겟으로 하는 치료제 개발이 활

발하게 진행되고 있다. 예를 들면, 베타아밀로이드 피브릴, 베타아밀로이드 플라크로 합성을 진행하고, 상기 합성된 물질에 타겟 약물을 첨가하여 원자빔현미경이나 투과전자현미경 등을 이용하여 약물의 분해효과를 확인하거나 형광물질을 넣어서 $A\beta_{42}$ 의 분해효과를 관찰하는 방식이 있었다.

[0007] 그러나, 상기 $A\beta_{42}$ 는 매우 고가이고, 약물 개발에 필요한 베타아밀로이드 피브릴, 베타아밀로이드 플라크를 합성하는데 오랜 시간이 걸리는 문제가 있었다.

[0008] 따라서, 알츠하이머병은 아직까지 치료제가 발견되지 않은 만큼 진행속도를 늦추는 요법이 유일하기 때문에, 알츠하이머와 같은 퇴행성 신경질환을 치료할 수 있는 기술 등이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) KR 10-1082484

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 전술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 약물에 의한 아밀로이드 분해 효능을 용이하게 검지할 수 있는 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝용 비색 센서 키트 및 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝 방법에 이용되는 아밀로이드 베타 올리고머-금 나노입자 복합체(ASGN) 제조방법과 상기 방법으로 제조된 ASGN을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 실시예에서,
- [0013] 금 나노입자 표면에 아밀로이드 단백질 올리고머가 코팅되어 아밀로이드 단백질 응집체가 형성된 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체를 포함하는, 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝용 비색 센서 키트를 제공한다.
- [0014] 상기 키트에 포함되는 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체는 하기 단계를 포함하는 방법으로 제조된다:
- [0015] (가) 하기 단계를 포함하는 금 나노입자 제조 단계;
- [0016] (ㄱ) 염화 금산($HAuCl_4$) 전구체와 시트르산 나트륨을 반응시켜 시트르산으로 안정화된 금 나노입자 제조 단계; 및
- [0017] (ㄴ) 상기 금 나노입자를 원심분리 및 세척하여 금 나노입자를 획득하는 단계.
- [0018] (나) 하기 단계를 포함하는 아밀로이드 베타(AB) 정제 단계;
- [0019] (1) 동결 건조된 AB 펩티드를 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol: HFIP)에 용해하는 단계; 및
- [0020] (2) 상기 (1) 단계의 용액에서 수분과 HFIP를 증발시키는 단계.
- [0021] (다) 상기 (가) 단계에서 제조된 금 나노입자와 상기 (나) 단계에서 정제한 AB 를 1:1200~1600 몰비율로 혼합하여 교반하는 단계;
- [0022] (라) 상기 (다) 단계의 혼합물을 35~39 °C에서 20~28시간 동안 인큐베이션하여 ASGN를 제조하는 단계.
- [0023] 본 발명의 일 구현예로서, (ㄱ) 단계는 $HAuCl_4$ 2.55 ml을 증류수 10ml에 녹인 염화 금산 용액과 증류수에 시트르산 나트륨 108.8 mg을 녹인 용액 10ml를 혼합하고 교반하며 가열하고, 용액이 끓기 시작하면 시트르산 나트륨 용액 0.9ml를 첨가하고 15분 동안 가열하여 시트르산으로 안정화된 금 나노입자는 제조하는 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 (ㄴ) 단계는 시트르산으로 안정화된 금 나노입자를 8,000~12,000 rpm에서 3~6

본 동안 세척하여 18~22 nm 직경의 금 나노입자를 획득하는 것일 수 있다.

- [0025] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (1) 단계는 동결 건조된 AB 펩티드 1 mg을 2300 μ l HFIP에 용해한 후 상온에서 40~80 분 동안 유지하는 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (2) 단계는 상기 (1) 단계의 용액을 튜브에 분주하고 2시간 동안 진공 동결건조하고 영하의 온도 조건 및 진공 조건에서 1300~1700 rpm으로 40~80 분 동안 원심분리하여 수분과 HFIP를 증발시키는 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (다) 단계는 금 나노입자와 AB를 1:1400 몰비율로 혼합하여 교반하는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (라) 단계는 (다) 단계의 혼합물을 37 °C에서 24시간 동안 인큐베이션하여 ASGN을 제조하는 것일 수 있다.
- [0029] 상기 방법으로 제조되는 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체는 금 나노입자 표면에 아밀로이드 베타 올리고머가 hard corona 패턴으로 코팅되어 있으며, 그 직경은 25~32 nm이다.
- [0030] 종래의 아밀로이드-금 나노입자 복합체는 아밀로이드의 monomer 또는 fibril 혼합 형태가 금 나노입자 표면에 부착된 형태이지만, 본 발명의 방법으로 제조된 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체는 금 나노입자 표면에 부착된 아밀로이드의 95% 이상이 올리고머 형태이다.
- [0031] 또한, 본 발명은 다른 하나의 실시예에서,
- [0032] i) 금 나노입자 표면에 아밀로이드 단백질 올리고머가 코팅되어 아밀로이드 단백질 응집체가 형성된 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체를 준비하는 단계;
- [0033] ii) 상기 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체에 퇴행성 신경질환 치료제 후보 약물을 처리하는 단계; 및
- [0034] iii) 상기 후보 약물을 처리한 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체와 처리하지 않은 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체의 색 변화를 비교하는 단계;
- [0035] 를 포함하는 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0037] 본 발명에 따른 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝용 비색 센서 키트 및 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝 방법은 아밀로이드 단백질 응집체가 형성된 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체를 이용하여 용이하게 퇴행성 신경질환 치료제를 용이하게 스크리닝할 수 있다.
- [0038] 특히, 상기 복합체에 아밀로이드 단백질을 타겟하는 후보 약물군을 처리하여, 상기 후보 약물을 처리한 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체와 처리하지 않은 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체의 색 변화를 비교함으로써 고속 약물 스크리닝이 가능하고, 이에 따라 새로운 후보 약물을 선정하는데 드는 시간 및 비용을 절감할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 본 발명의 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝용 비색 센서 키트에 따른 약물 스크리닝 기술의 동작원리를 나타낸 도면이다((a) 후보 약물 처리 과정, (b) 약물 반응여부에 따른 용액의 색변화).
- 도 2(a)는 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체의 촉매 특성을 이용한 상기 복합체(ASGN)의 합성 방법을 나타내는 도면이며, 도 2(b)는 ASGN의 합성 과정에서 촬영한 HRTEM 이미지이고((1) 금 나노입자, (2, 3) ASGN의 합성 중간 과정, (4) ASGN), 도 2(c)는 금 나노입자들의 HRTEM 이미지이며, 도 2(d)는 ASGN들의 HRTEM 이미지이다. 아울러, 도 2(e)는 ASGN를 이용한 안티-AB 약물 스크리닝 과정을 나타내는 개략도이다.
- 도 3(a)는 서로 다른 3개의 항체(6E10, A11 및 OC)를 갖는 그래핀 기반 센서의 기능화 및 그래핀 기반 센서를 이용한 AB의 특성 분석의 개략도이며, 도 3(b)는 비교예 및 실시예의 처리에 따라 항체 고정화된 그래핀 센서의 상태적 저항 변화를 나타내는 그래프이고, 도 3(c)는 비교예의 금 나노입자와 실시예의 아밀로이드 단백질-

금 나노입자 복합체의 직경을 나타내는 그래프이고, 도 3(d) 는 비교예의 금 나노입자와 실시예의 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체의 XPS 조사 스펙트럼을 나타내는 그래프이며, 도 3(e) 는 동결-해동 전/후 과정의 금 나노입자 및 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체의 용액 이미지와 동결-해동 전/후 과정의 금 나노입자 및 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체의 직경을 나타내는 그래프이다(FT: 동결-해동 과정; $P * < 0.0001$ N.S. 중요하지 않음; N.A. 사용할 수 없음).

도 4(a)는 Aβ 모노머 농도에 따른 실시예의 ASGN 용액의 상대적 흡광도 이동(A_{609}/A_{525}) 및 각 농도에 해당되는 ASGN 용액의 사진을 나타내는 도면이며, 도 4(b) 는 완충 용액에 따른 비교예의 금 나노입자 용액의 A_{609}/A_{525} 의 이동을 나타내는 그래프이고, 도 4(c) 는 버퍼 용액의 종류에 따른 실시예의 ASGN 용액의 A_{609}/A_{525} 의 이동을 나타내는 그래프이며, 도 4(d) 는 protease XIV 용액에서 시간에 따른 실시예의 ASGN 용액의 상대적 흡광도 이동(A_{609}/A_{525})을 나타내는 그래프이다.

도 5는 실시예의 ASGN 을 이용한 Aβ 분해 효소의 동력학적 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 6은 Aβ 분해 에이전트(Aβ degrading agent, EPPS)의 동력학적 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 7(a)-(e)는 알츠하이머 치료에 도움을 주는 물질인 Curcumin, Glutathione, Rutin hydrate, Eptifibatide acetate, Tramiprosate 의 약물 효능을 검출한 결과를 나타내는 그래프이며, 도 7(f) 는 도 7(a)-(e)에서의 결과를 dose-dependent curve로 나타낸 그래프고, 도 7(g),(h) 는 상기 약물들의 평가지표를 Efficacy/potency (M^{-1})로 나타낸 표와 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다.
- [0042] 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.
- [0043] 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.
- [0044] 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.
- [0046] 본 발명은 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체를 포함하는 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝용 비색 센서 키트 및 이를 이용한 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0047] 본 발명에서, “아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체”는 금 나노입자의 표면에 아밀로이드 단백질 올리고머가 코팅되어 있는 입자를 나노입자를 의미하며, 보다 상세하게는 금 나노입자 표면에 아밀로이드 단백질 올리고머가 코팅되어, 아밀로이드 단백질 응집체가 형성되어 있는 복합체를 의미할 수 있다.
- [0048] 본원발명에서 사용되는 용어 중 '아밀로이드 단백질', '아밀로이드성 단백질'은 아밀로이드를 형성할 수 있는 단백질 혹은 그 절편을 지칭한다. '아밀로이드 침착물', '아밀로이드 응집체', '아밀로이드 원섬유' 등의 용어는 단백질의 비정상 접힘 현상에 의해 2차 혹은 3차 구조가 랜덤코일이나 알파-나선 구조에서 베타-시트로 변화되어 질환 유발의 원인이 되는 단백질 침착물을 의미하며, '아밀로이드 단백질 단량체'는 구조 변화가 일어나기 이전의 단백질을 뜻한다.
- [0049] 상기 아밀로이드 단백질 올리고머는 금 나노입자 표면에 코팅되어 있어, 용액 내에서 금 나노입자가 서로 응집되지 않도록 입체 안정화(steric stabilization) 역할을 할 수 있다. 특히, 상기 복합체에 아밀로이드 단백질을 타겟하는 후보 약물군을 처리하였을 때, 상기 후보 약물이 아밀로이드 단백질의 응집체를 분해하는 효과가

있다면, 아밀로이드 단백질 응집체의 분해 효과에 따라 금 나노입자의 표면이 들어나게 되고, 이에 따라 금 나노입자들의 응집이 일어나게 된다. 상기 금 나노입자들의 응집 현상은 광학적 특성에 변화가 일어나게 되어 후보 약물을 처리하지 않은 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체 대비 상기 복합체의 색 변화가 일어나게 된다. 예컨대, 상기 복합체의 색 변화는 금 나노입자가 뭉침에 따라 색이 변화는 현상으로 localized surface plasmon resonance(LSPR) 현상에 의해서 일어날 수 있다.

- [0050] 본 발명에서, 나노입자는 LSPR 현상을 보이는 나노물질의 경우 모두 사용 가능하나, 금 나노입자가 바람직하며, 이는 금 나노입자(gold nanoparticle) 또는 금나노막대(gold nanorod) 등이 있다
- [0051] 본 발명에서, 상기 나노입자는 일 예로써, 금 나노입자를 실시예에서 예시하고 있으나, 이것 이외에도, 유기 나노입자, 무기, 금속 나노입자 등의 비유기 나노입자 또한 모두 적용이 가능할 것이다.
- [0052] 이러한 색 변화를 감지함으로써, 본 발명은 아밀로이드 단백질 응집체의 분해 효능을 검지할 수 있고, 이에 따라 고속 약물 스크리닝 등을 수행할 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝용 비색 센서 키트를 이용하여, 후보 약물 처리전/후의 복합체의 색 변화를 감지함으로써, 고속 약물 스크리닝을 수행할 수 있다.
- [0053] 한편, 상술한 색 변화는 육안, 분광계 또는 색도계(비색계) 등을 이용하여 측정할 수 있으며, 색 변화를 측정할 수 있는 도구라면 어떠한 도구를 사용하여도 무관하다.
- [0054] 나아가, 후보 약물은 퇴행성 신경질환 치료제 후보 약물을 의미하며, 특정 양태로서, 아밀로이드 단백질 응집 분해요소이다. 구체적으로, 알츠하이머 치료를 위한 아밀로이드 타겟 약제는 아밀로이드 생성 억제제, 응집 저해제 및 응집 분해제 등으로 이루어져 있으며, 본 발명은 이러한 다양한 군중에 아밀로이드 응집을 분해할 수 있는 약물 및 효소를 스크리닝할 수 있다.
- [0055] 본 발명에서, "퇴행성 신경질환" 이라 함은, 노화와 깊은 관련을 가지면서, 정상적인 노화의 과정과는 달리 급속하게 신경계의 일부 또는 뇌 전체에 비정상적인 신경세포의 죽음이 일어나 뇌와 척수의 기능이 상실되어 인지 능력, 보행-운동 능력 등이 감소하는 질환을 의미한다. 보다 구체적으로, 상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 루게릭병(Lou Gehrig disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 다발성 경화증(Multiple sclerosis), 뇌졸중(stroke), 또는 치매(dementia)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 예를 들면, 본 발명에서의 퇴행성 신경질환은 알츠하이머병을 의미할 수 있다.
- [0056] 아울러, "아밀로이드 단백질(amyloid proteins)"은 베타 평판 구조의 형태로 서로 엉켜 응집되는 단백질들을 의미하는데, 아밀로이드 단백질의 베타 평판 응집 현상은 다수의 질병과 관련될 수 있다.
- [0057] 보다 상세하게, 아밀로이드 단백질은 알츠하이머병의 베타-아밀로이드와 타우 단백질, 파킨슨병의 알파-시뉴클레인, 헌팅턴병의 헌팅틴, 프리온 관련 질환의 프리온, 제2당뇨병의 아밀린, 전신 아밀로이드증의 면역 글로불린, 혈청 아밀로이드 A 및 트랜스티레틴으로 구성된 군에서 선택되는 아밀로이드 침착 형성이 가능한 단백질 또는 그 절편을 의미할 수 있다. 예를 들면, 아밀로이드 단백질은 알츠하이머병의 베타-아밀로이드를 의미할 수 있으며, 이하에서는 베타-아밀로이드 42, Aβ₄₂, 또는 Aβ와 혼용될 수 있다.
- [0059] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0060] 본 발명은 하나의 실시예에서,
- [0061] 금 나노입자 표면에 아밀로이드 단백질 올리고머가 코팅되어 아밀로이드 단백질 응집체가 형성된 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체를 포함하는, 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝용 비색 센서 키트를 제공한다.
- [0062] 특히, 상기 키트는, 상기 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체의 아밀로이드가 약물에 의해 분해되면서 나타나는 색 변화를 측정하는 도구를 더 포함할 수 있으며, 상기 색 변화를 측정하는 도구는 분광계 또는 색도계(비색계)일 수 있으며, 색 변화를 측정할 수 있는 도구라면 어떠한 도구라도 무관하다. 특정 양태로서, 상기 색 변화는 육안으로도 측정이 가능하다.
- [0063] 예컨대, 후보 약물을 처리한 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체와 처리하지 않은 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체의 색 변화를 비교할 수 있다. 보다 구체적으로, 후보 약물을 처리하지 않은 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체의 색상은 붉은색이고, 상기 후보 약물을 처리하여 아밀로이드 단백질 응집체가 분해되어 붉

은색이 푸른색일 수 있으며, 이러한 경우, 후보 약물을 퇴행성 신경질환 치료제로 스크리닝할 수 있다.

- [0065] 도 1은 본 발명의 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝용 비색 센서 키트에 따른 약물 스크리닝 기술의 동작원리를 나타낸 도면이다((a) 후보 약물 처리 과정, (b) 약물 반응여부에 따른 용액의 색변화). 도 1을 참조하여, 본 발명의 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝용 비색 센서 키트의 동작원리를 상세히 설명하고자 한다.
- [0066] 아밀로이드 단백질은 금 나노입자 표면을 덮고 있어, 상기 복합체가 입체적 안정성을 얻게되고, 이에 따라 상기 복합체는 용액 (PBS buffer, Tris buffer)에서 용이하게 분산될 수 있다. 특히, 아밀로이드 단백질을 분해하는 효소나 약물이 작용하게 되면, 상기 금 나노입자 표면을 덮고 있는 아밀로이드 단백질은 시간이 지남에 따라 분해되고, 상기 금 나노 입자 표면에서 분리된다. 이와 같이, 아밀로이드 단백질이 분리된 금 나노입자는 높은 염 농도에서 서로 응집되고, 이에 따라 용액 내에서 색 변화가 일어나게 된다.
- [0067] 이와는 대조적으로, 아밀로이드 단백질에 비 효과적인 약물은 용액 내에서 아밀로이드 단백질이 분해되지 않아 상기 금 나노입자가 서로 응집되지 않으며, 이에 따라 용액의 색 변화가 일어나지 않는다.
- [0068] 예를 들어, 상기 후보 약물을 처리하여 아밀로이드 단백질 응집체가 분해되어 용액의 색이 붉은색에서 푸른색으로 변하는 경우, 상기 후보 약물을 퇴행성 신경질환 치료제로 스크리닝할 수 있다. 상기 색 변화는 육안, 분광계 또는 색도계(비색계)를 이용하여 측정할 수 있다.
- [0070] 상기 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체는 상술한 바와 같이, 금 나노입자 표면에 아밀로이드 단백질 올리고머가 코팅되어, 상기 금 나노입자 표면에 아밀로이드 단백질 응집체가 형성되어 있는 복합체를 의미할 수 있다. 즉, 금 나노입자가 복합체의 코어(core)를 이루고, 상기 아밀로이드 단백질은 코어 금속 표면의 셸(shell)을 이루게 된다.
- [0071] 특히, 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체는 골드입자 표면의 음전하와 아밀로이드 단백질 N말단의 양전하의 쿨롱 힘의 작용으로 인해 금나노입자 표면에 아밀로이드 단백질이 코팅이 가능하고, 추가적인 베타 병풍 구조가 아밀로이드끼리 형성된다. 상기의 이유로 아밀로이드-금 나노입자 복합체는 특정한 리간드(ligand) 없이도 복합체를 이룰 수 있다.
- [0072] 예를 들면, 양전하성 금 나노입자는 양전하성 물질로 캡핑된 것일 수 있으며, 음전하성 금 나노입자는 음전하성 물질로 캡핑된 것일 수 있다. 반드시 이로 제한된 것은 아니나, 상기 음전하성 물질은 시트르산(citrate) 일 수 있다.
- [0073] 상기 아밀로이드 단백질 올리고머는 금 나노입자 표면에 코팅되어 있어, 용액 내에서 금 나노입자가 서로 응집되지 않도록 입체 안정화(steric stabilization) 역할을 할 수 있다. 특히, 상기 복합체에 아밀로이드 단백질을 타겟하는 후보 약물군을 처리하였을 때, 상기 후보 약물이 아밀로이드 단백질의 응집체를 분해하는 효과가 있다면, 아밀로이드 단백질 응집체의 분해 효과에 따라 금 나노입자의 표면이 들어나게 되고, 이에 따라 금 나노입자들의 응집이 일어나게 된다. 나아가, 상기 금 나노입자들의 응집 현상은 광학적 특성에 변화가 일어나게 되어 후보 약물을 처리하지 않은 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체 대비 상기 복합체의 색 변화가 일어나게 된다.
- [0074] 이러한 색 변화를 감지함으로써, 본 발명은 아밀로이드 단백질 응집체의 분해 효능을 검지할 수 있고, 이에 따라 고속 약물 스크리닝 등을 수행할 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝용 비색 센서 키트를 이용하여, 후보 약물 처리전/후의 복합체의 색 변화를 감지함으로써, 고속 약물 스크리닝을 수행할 수 있다.
- [0075] 여기서, 아밀로이드 단백질(amyloid proteins)은 베타 평판 구조의 형태로 서로 엉켜 응집되는 단백질들을 의미하는데, 아밀로이드 단백질의 베타 평판 응집 현상은 다수의 질병과 관련될 수 있다.
- [0077] *61보다 상세하게, 아밀로이드 단백질은 알츠하이머병의 베타-아밀로이드와 타우 단백질, 파킨슨병의 알파-시뉴클레인, 헌팅턴병의 헌팅틴, 프리온 관련 질환의 프리온, 제2당뇨병의 아밀린, 전신 아밀로이드증의 면역 글로불린, 혈청 아밀로이드 A 및 트랜스티레틴으로 구성된 군에서 선택되는 아밀로이드 침착 형성이 가능한 단백질 또는 그 절편을 의미할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서 아밀로이드 단백질은 알츠하이머병의 베타-아밀로이

드를 의미할 수 있다.

- [0079] 본 발명에서 "나노"란 이 기술분야의 통상의 기술자들이 이해하는 정도의 크기 범위를 포함한다. 구체적으로 상기 크기 범위는 0.1 내지 1000 nm의 크기일 수 있으며, 더 구체적으로는 10 내지 1000 nm, 더욱 바람직하게는 10 내지 500 nm, 더 더욱 바람직하게는 10 내지 250 nm 일 수 있다.
- [0080] 아울러, 상기 금 나노입자는 평균 직경 10 내지 50 nm 이다. 특정 양태로서, 상기 금 나노입자의 평균 직경이 10 nm 미만인 경우, 금 나노입자의 곡률이 커 아밀로이드 단백질이 붙지 못하는 문제가 발생할 수 있으며, 상기 금 나노입자의 평균 직경이 50 nm 를 초과하게 되면, 금 나노입자 자체의 국소 표면공명 현상(Localized surface plasmon resonance)이 현저하게 줄어드는 문제가 발생한다. 따라서, 상기 금 나노입자는 평균 직경 10 내지 50 nm 인 것이 바람직하다.
- [0081] 나아가, 금 나노입자의 셸을 이루는 아밀로이드 단백질 올리고머의 평균두께는 1 내지 3 nm 이다. 특정 양태로서, 상기 아밀로이드 단백질 올리고머의 평균두께가 1 nm 미만인 경우, 단백질은 올리고머가 아니라 모노머라 판단될 수 있으며, 상기 아밀로이드 단백질 올리고머의 평균두께가 3 nm 를 초과하게 되면, 아밀로이드 섬유로 판단될 수 있다. 따라서, 상기 금 나노입자의 셸을 이루는 아밀로이드 단백질 올리고머의 평균두께는 1 내지 3 nm 일 수 있으며, 바람직하게는 2 내지 3 nm 일 수 있다.
- [0082] 예컨대, 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체의 평균 직경은 15 내지 50 nm 일 수 있다.
- [0084] 상기 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체는, 상기 아밀로이드 단백질 및 상기 금 나노입자의 비율을 100 ~ 2250 : 1 로 혼합하여 얻어진 것을 특징으로 한다. 한편, 아밀로이드 단백질이 금 나노입자 대비 1400를 초과하는 경우, 올리고머 형태를 벗어나 피브릴 형태로 변화하며, 아밀로이드 단백질이 금 나노입자의 부피비 대비 1400 미만인 경우, 충분하게 금 나노입자를 감쌀 수 없어, 상기 범위가 바람직하며, 예를 들면, 베타-아밀로이드와 금 나노입자의 1400 : 1 비율이 아밀로이드 두께가 2~3 nm인 최적의 농도비이다.
- [0086] 또한, 본 발명은 다른 하나의 실시예에서,
- [0087] i) 금 나노입자 표면에 아밀로이드 단백질 올리고머가 코팅되어 아밀로이드 단백질 응집체가 형성된 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체를 준비하는 단계;
- [0088] ii) 상기 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체에 퇴행성 신경질환 치료제 후보 약물을 처리하는 단계: 및
- [0089] iii) 상기 후보 약물을 처리한 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체와 처리하지 않은 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체의 색 변화를 비교하는 단계;
- [0090] 를 포함하는 퇴행성 신경질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0091] 여기서, 아밀로이드 단백질은 상술한 바와 같이, 알츠하이머병의 베타-아밀로이드와 타우 단백질, 파킨슨병의 알파-시뉴클레인, 헌팅턴병의 헌팅틴, 프리온 관련 질환의 프리온, 제2당뇨병의 아밀린, 전신 아밀로이드증의 면역 글로불린, 혈청 아밀로이드 A 및 트랜스티레틴으로 구성된 군에서 선택되는 아밀로이드 침착 형성이 가능한 단백질 또는 그 절편을 의미할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서 아밀로이드 단백질은 알츠하이머병의 베타-아밀로이드를 의미할 수 있다.
- [0092] 특히, 상기 색 변화는 육안, 분광계 또는 색도계(비색계)로 측정할 수 있다.
- [0093] 나아가, iii) 단계 이후에, iv) 상기 후보 약물을 처리하지 않은 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체의 색깔은 붉은색이고, 상기 후보 약물을 처리하여 아밀로이드 단백질 응집체가 분해되어 붉은색이 푸른색으로 변하는 경우, 상기 후보 약물을 퇴행성 신경질환 치료제로 스크리닝하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0094] 보다 구체적으로, 상기 붉은색을 나타내는 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체의 최대 흡광도는 525 nm 이고, 상기 후보 약물을 처리하여 아밀로이드 단백질 응집체가 분해되어 붉은색이 푸른색으로 변하는 경우 최대 흡광도가 609 nm일 수 있다.
- [0095] 본 발명은 상기 방식을 통하여, 상기 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체에 후보 약물 물질을 포함시킨 색변

화를 통해 퇴행성 신경질환용 치료제를 스크리닝 한다. 상기 키트에서 후보 약물 물질을 포함시키지 않은 것을 대조군으로 두고 후보 약물 물질을 포함한 것을 실험군으로 한 다음, 특정 시간 동안 상기 복합체의 색변화를 측정하여 대조군과 실험군을 비교한다.

[0096] 상기 후보 약물을 처리하여 아밀로이드 단백질 응집체가 분해되어 붉은색이 푸른색으로 변하는 경우, 후보 약물 물질이 퇴행성 신경 질환의 치료제로서 활용될 수 있는 가능성을 확인할 수 있다.

[0098] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 보다 상세히 설명한다.

[0099] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0101] <제조예>

[0102] 금 나노입자의 합성

[0103] 금 나노입자의 합성을 위하여 금 나노입자는 염화 금산(HAuCl₄) 전구체로, 시트르산 나트륨(sodium citrate)을 표면 안정제로 사용하여 열을 가하면서 환원시켜 합성하는 '수열합성방법'으로 제조하였다. 나노입자의 크기는 표면안정제의 양을 통해 조절하였다.

[0104] 구체적으로, HAuCl₄ 2.55 ml를 증류수 47.5 ml에 녹인 저장용액과 시트르산 나트륨 108.8 mg 을 증류수 10 ml 을 제조한 후, HAuCl₄ 용액에 넣고 끓을 때까지 교반하면서 가열하였고, 용액이 끓기 시작하면 시트르산 나트륨 용액 0.9 ml 을 첨가하였다. 이 용액을 15분 동안 끓여서 보관하였다.

[0105] 그리고, 시트르산으로 안정화된 금 나노입자를 10,000 rpm에서 5 분 동안 세척하여 직경이 약 20 nm 인 금 나노입자를 합성하였다.

[0107] β 아밀로이드(AB 정제)

[0108] 동결 건조된 1 mg의 AB 펩티드를 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol(HFIP)) 230 μ l 에 용해한 후 상온에서 1시간 동안 유지하였다. 그리고, 상기 용액(AB 용액)을 micro-centrifuge tube에 적정량 분주를 해주고, 이를 2시간 동안 진공을 유지하며 동결 건조시키는 SpeedVac에서 증발시킨 후, 추가 실험을 위해 튜브를 -20 °C에서 보관하였다.

[0109] 이후 진공 농축기(SpeedVac)로 옮긴 뒤 -20 °C 및 진공상태에서 1500rpm으로 1시간동안 원심분리를 해서 남은 HFIP와 수분을 제거합니다. 이렇게 정제된 물질은 사용하기 전 저장용액(stock solution)으로 -20° C에 보관하였다.

[0111] <실시예>

[0112] 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체의 제조

[0113] 제조예에서 합성된 금 나노입자 표면에 정제된 AB 를 코팅하여 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체를 제조하였다.

[0114] 구체적으로, 제조예에서 합성된 금 나노입자를 포함하는 용액을 10,000 rpm, 30분 동안 원심분리를 하였고, 상층액을 제거하여, 0.07 μ l 가 되게 만들어 주었다. 그리고, 정제된 AB 가 10 μ M 이 되도록 DW를 적절한 비율로 희석시킨 후 3시간 동안 37 °C에서 인큐베이션 시켰다.

[0115] 그 후, 상기 희석시킨 AB 와 금 나노입자 용액 160 μ l: 70 μ l 비율로 혼합하여 교반하였다. 그리고, 상기 AB 와 금 나노입자를 포함하는 용액(이하, AB 금 나노입자 용액)을 120 rpm 으로 회전하는 thermomixer 에 37 °C로 24시간동안 인큐베이션하여, AB 금 나노입자 복합체를 제조하였다. 그리고, 만들어진 용액이 총 1ml 가 되도록 DW 를 넣어주었다.

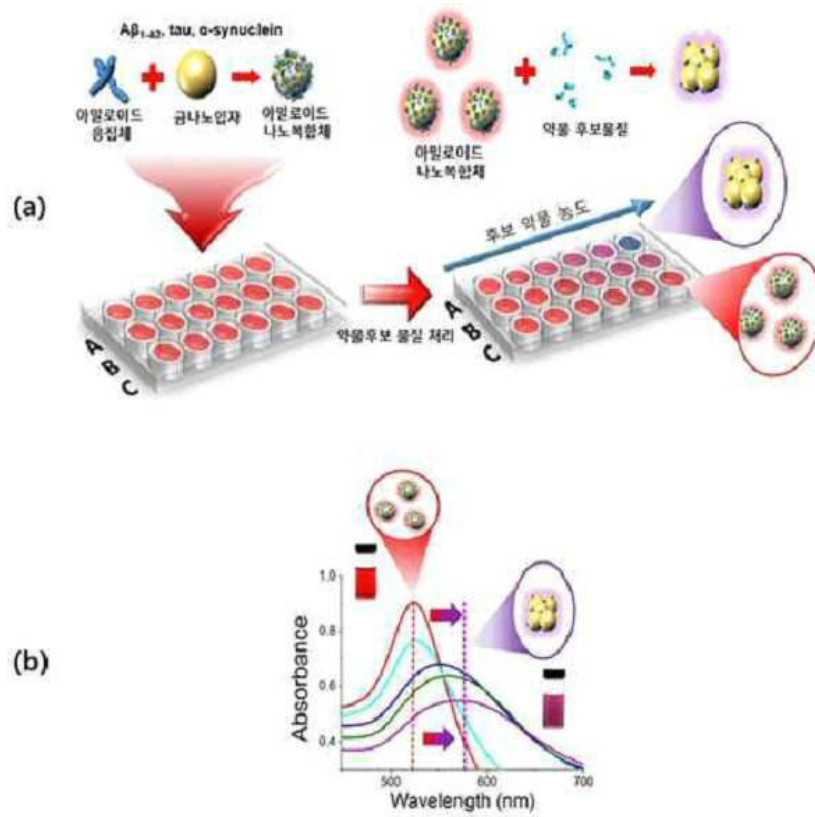
- [0117] 그리고, 도 2와 같이 아밀로이드-금 나노입자 복합체(A β gold nanoparticles, ASGN)를 합성하였다.
- [0118] 도 2(a) 는 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체의 촉매 특성을 이용한 상기 복합체(ASGN)의 합성 방법을 나타내는 도면이며, 도 2(b)는 ASGN 의 합성 과정에서 촬영한 HRTEM 이미지이고((1) 금 나노입자, (2, 3) ASGN 의 합성 중간 과정, (4) ASGN), 도 2(c) 는 금 나노입자들의 HRTEM 이미지이며, 도 2(d) 는 ASGN 들의 HRTEM 이미지이다. 아울러, 도 2(e)는 ASGN 를 이용한 안티-AB 약물 스크리닝 과정을 나타내는 개략도이다.
- [0119] 도 2를 참조하면, 금 나노입자 표면에 AB 모노머가 붙고, 그 위에서 올리고머가 일어나게 되며, 최종적으로 아밀로이드-금 나노입자 복합체가 형성된다. 이렇게 형성되는 과정과 결과물은 도 2(b)-(d) 에서 확인할 수 있다. 특히, 이렇게 합성된 아밀로이드-금 나노입자 복합체는 도 2e와 같이 표면의 아밀로이드가 분해됨에 따라서 용액의 색이 변하는 약물스크리닝 매커니즘을 구현할 수 있다.
- [0121] <비교예>
- [0122] 금 나노입자 표면에 아밀로이드 단백질을 코팅한 것을 제외하곤, 실시예 1과 동일한 방법으로 금 나노입자를 준비하였다.
- [0124] <실험예>
- [0125] 실험예 1. 아밀로이드 금-나노입자 복합체의 특성 확인
- [0126] 실시예에서 제조한 아밀로이드-금 나노입자 복합체 표면의 아밀로이드 성분을 확인하기 위하여 서로 다른 항체를 갖는 그래핀 센서를 제조하고, 상기 복합체의 반응성을 확인하였다. 그리고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0127] 도 3(a) 는 서로 다른 3개의 항체(6E10, A11 및 OC)를 갖는 그래핀 기반 센서의 기능화 및 그래핀 기반 센서를 이용한 AB 의 특성 분석의 개략도이며, 도 3(b) 는 비교예 및 실시예의 처리에 따라 항체 고정화된 그래핀 센서의 상태적 저항 변화를 나타내는 그래프이고, 도 3(c) 는 비교예의 금 나노입자와 실시예의 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체의 직경을 나타내는 그래프이고, 도 3(d) 는 비교예의 금 나노입자와 실시예의 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체의 XPS 조사 스펙트럼을 나타내는 그래프이며, 도 3(e) 는 동결-해동 전/후 과정의 금 나노입자 및 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체의 용액 이미지와 동결-해동 전/후 과정의 금 나노입자 및 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체의 직경을 나타내는 그래프이다(FT: 동결-해동 과정; P * <0.0001 N.S. 중요하지 않음; N.A. 사용할 수 없음).
- [0128] 보다 구체적으로, 도 3(a)와 같이 서로 다른 3개의 항체를 붙인 그래핀 센서를 제작하고, 아밀로이드 나노 입자와의 반응성을 확인하였다. 그 결과, 도 3(b)와 같이 6E10 (모든 아밀로이드와 결합)과 A11 (올리고머에 결합)에 반응함을 확인할 수 있으며 OC(아밀로이드 피브릴과 결합)의 경우 반응하지 않음을 알 수 있다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, 금-아밀로이드 표면에 붙은 단백질은 올리고머임을 확인할 수 있다.
- [0129] 아울러, 동적광산란을 통해서 확인한 결과 금 나노입자의 hydrodynamic diameter가 아밀로이드로 감싸짐에 따라 22.45에서 29.03으로 증가함을 확인할 수 있으며, 이는 아밀로이드의 두께가 약 3 nm임을 나타낸다(도 3(c) 참조). XPS와 freeze-thaw process를 통해서 아밀로이드 단백질 코팅을 확인하였다(도 3(d), (e)).
- [0131] 실험예 2. 아밀로이드 금-나노입자 복합체의 안정성 테스트
- [0132] PBS buffer 상에서 실시예에서 제조한 아밀로이드 단백질-금 나노입자 복합체의 안정성 테스트를 실시하였다. 그리고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0133] 도 4(a)는 A β 모노머 농도에 따른 실시예의 ASGN 용액의 상대적 흡광도 이동(A_{609}/A_{525}) 및 각 농도에 해당되는 ASGN 용액의 사진을 나타내는 도면이며, 도 4(b) 는 완충 용액에 따른 비교예의 금 나노입자 용액의 A_{609}/A_{525} 의 이동을 나타내는 그래프이고, 도 4(c) 는 버퍼 용액의 종류에 따른 실시예의 ASGN 용액의 A_{609}/A_{525} 의 이동을 나타내는 그래프이며, 도 4(d) 는 protease XIV 용액에서 시간에 따른 실시예의 ASGN 용액의 상대적 흡광도 이동

(A_{609}/A_{525})을 나타내는 그래프이다. 이는 3분마다 기록하였다.

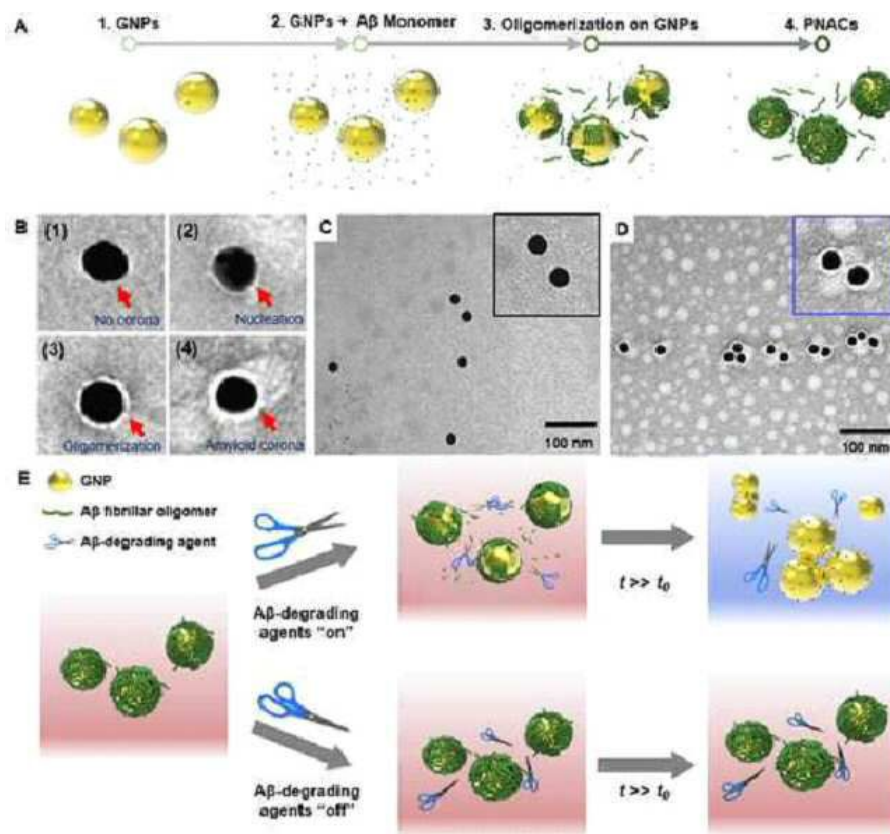
- [0134] 보다 구체적으로, 도 4는 아밀로이드 단백질과 금 나노입자의 비율을 다르게 하면서 (100 ~ 2250:1) PBS buffer 상에서 아밀로이드-금 나노입자의 안정성을 측정하였다. 상대적 흡광도 (A_{609}/A_{525})를 확인한 결과, 아밀로이드-금 나노입자의 안정성은 1400:1에서 가장 안정한 것으로 나타났다.
- [0135] 그리고, 도 4(b),(c)에서 추가적으로 안정성을 더 검증하였으며, 그리고 추가적으로 protease XIV를 양성 대조군 실험으로 아밀로이드-금 나노입자의 색변화를 UV-vis spectroscopy로 관찰 하였다, 시간이 경과할 수록 525 Absorbance는 감소하고, 609 Absorbance는 서서히 증가함을 확인할 수 있다.
- [0137] 실험예 3. 아밀로이드 금-나노입자 복합체의 반응성 확인
- [0138] 아밀로이드 금-나노입자 복합체(ASGN)의 반응성을 확인하기 위하여, 아밀로이드를 분해시키는 것으로 알려진 아밀로이드 분해 단백질(Protease XIV와 Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9))과 아밀로이드 금-나노입자의 반응성을 확인하였다. 그리고, 이에 따라 본 발명의 복합체가 약물 개발뿐만 아니라, 아밀로이드를 분해시키는 효소의 작용도 확인할 수 있었다. 그 결과는 도 5에 나타내었다.
- [0139] 도 5는 실시예의 ASGN 을 이용한 AB 분해 효소의 동력학적 분석 결과를 나타낸 도면이다.
- [0140] 도 5(a)는 활성화된 protease XIV 의 UV-vis spectrum의 변화를 나타내며, 도 5(b)는 불활성화된 protease XIV의 UV-vis spectrum의 변화를 나타낸다. 도 5(c), (d) 는 각각의 광학적 특성변화를 흡광도 비(A_{609}/A_{525})로 나타낸 그래프이며, 또한 이를 Michaelis-Menten kinetics를 통해 분석한 결과이다. 활성화된 protease XIV의 농도에 따라 상대적 흡광도가 증가함을 정량적으로 확인할 수 있었다 ($R^2 = 0.99$).
- [0141] 한편, MMP-9은 AB을 분해하지 못하나 AB를 분해할 수 있으며 (도 5(e)), 이로 인해 MMP-9은 뇌안에 있는 뉴런의 골지체와, 세포질내의 AB를 분해하여 제거하는 역할을 한다. 도 5(f),(g)를 통해 아밀로이드-금 나노입자의 아밀로이드가 각각 AB 일때와 AB 일때를 다르게 합성하여 MMP-9의 분해활성을 확인하였다. 이를 통해 MMP-9은 AB 만을 특징적으로 분해함이 확인되었으며, 도 5(j),(k)와 같이 상대적 흡광도를 통해 MMP-9의 활성을 상대적 흡광도로 검증이 가능함을 확인하였다.
- [0143] 나아가, 아밀로이드를 분해한다고 알려져 있는 EPPS 라는 약물을 통하여 본 발명으로 국소 약물의 분해효과도 검증 가능함을 확인하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0144] 도 6은 AB 분해 에이전트(AB degrading agent, EPPS)의 운동 분석 결과를 나타낸 도면이다.
- [0145] 도 6(a)와 같이 EPPS 에 의해 광학적 특성이 변화함을 확인하였으며, 도 6(b)-(d)와 같이 상대적 흡광도를 약물의 dose-, time-dependent curve 를 통해서 확인하였다.
- [0147] 실험예 4. 아밀로이드 금-나노입자 복합체를 이용한 약물 스크리닝
- [0148] 도 7(a)-(e)는 알츠하이머 치료에 도움을 주는 물질인 Curcumin, Glutathione, Rutin hydrate, Eptifibatide acetate, Tramiprosate 의 약물 효능을 검출한 결과를 나타내는 그래프이며, 도 7(f) 는 도 7(a)-(e)에서의 결과를 dose-dependent curve로 나타낸 그래프고, 도 7(g),(h) 는 상기 약물들의 평가지표를 Efficacy/potency (M-1)로 나타낸 표와 그래프이다.
- [0150] 이러한 결과를 통해서 본 발명에 따른 키트로 효소활성과 다양한 약물 스크리닝이 가능함을 확인하였다.

도면

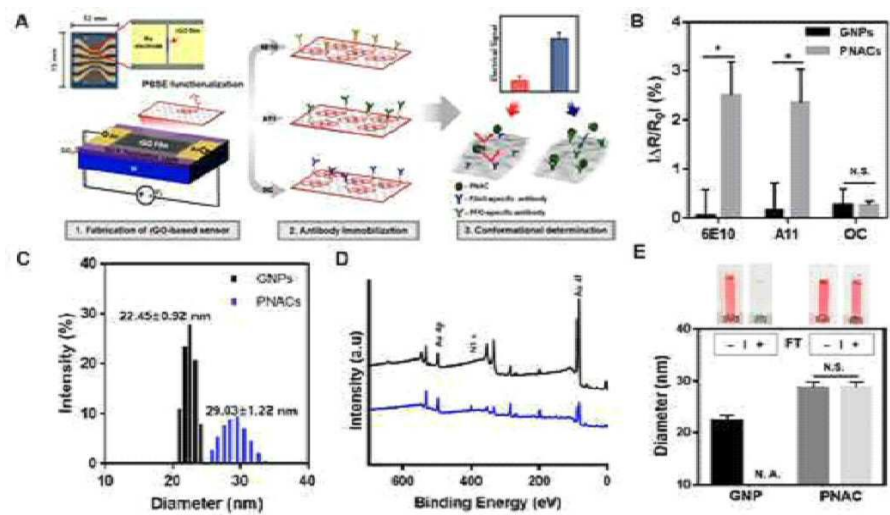
도면1



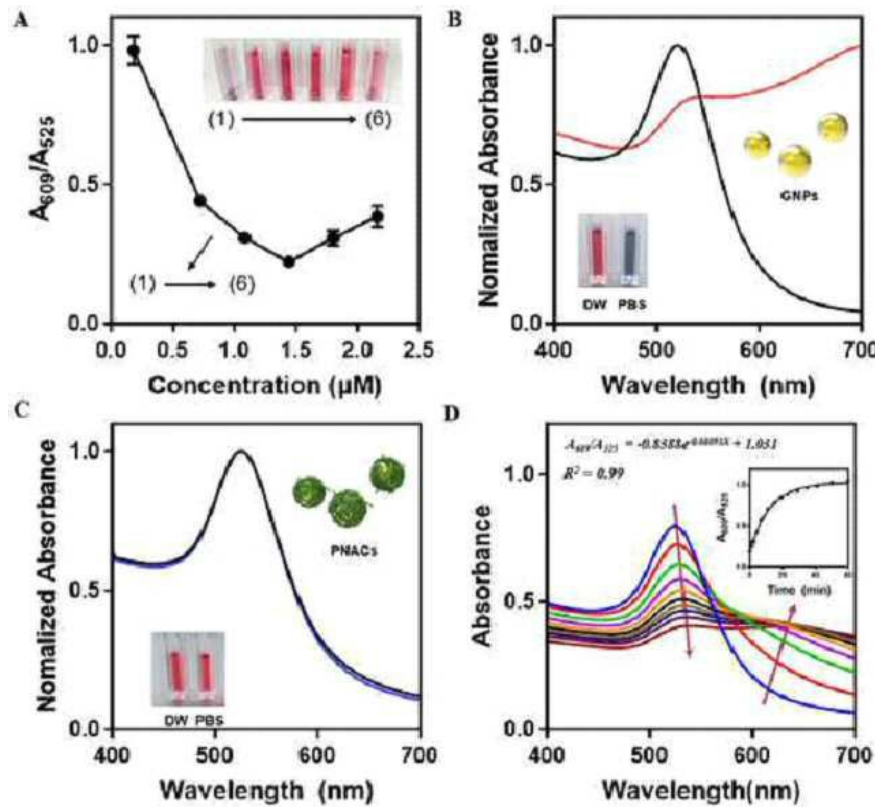
도면2



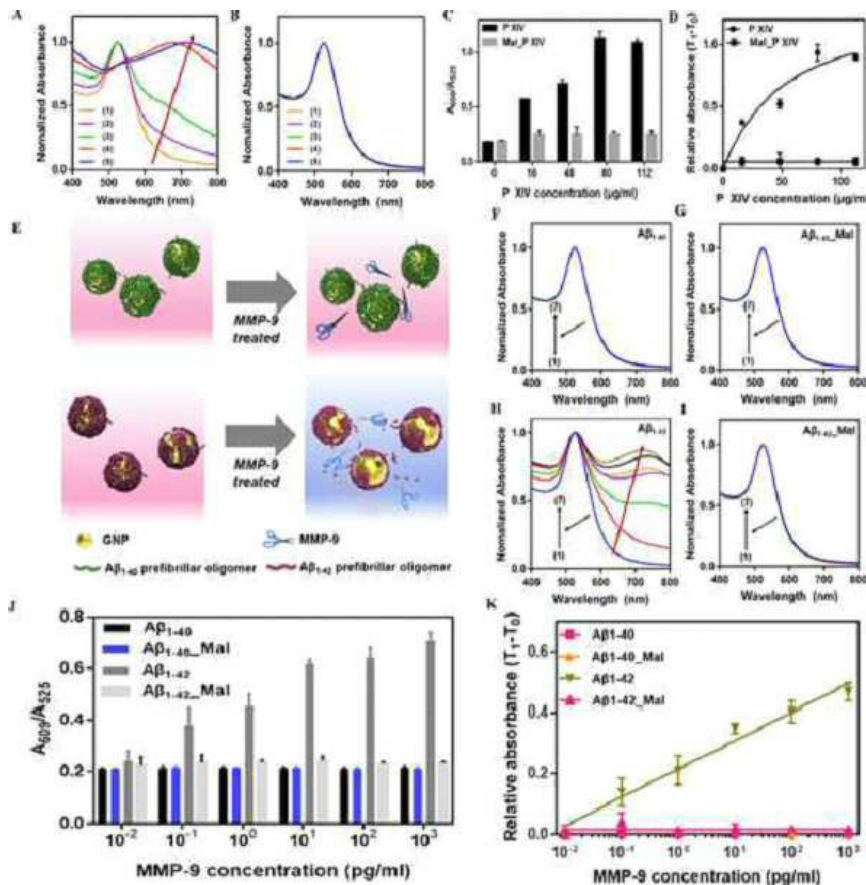
도면3



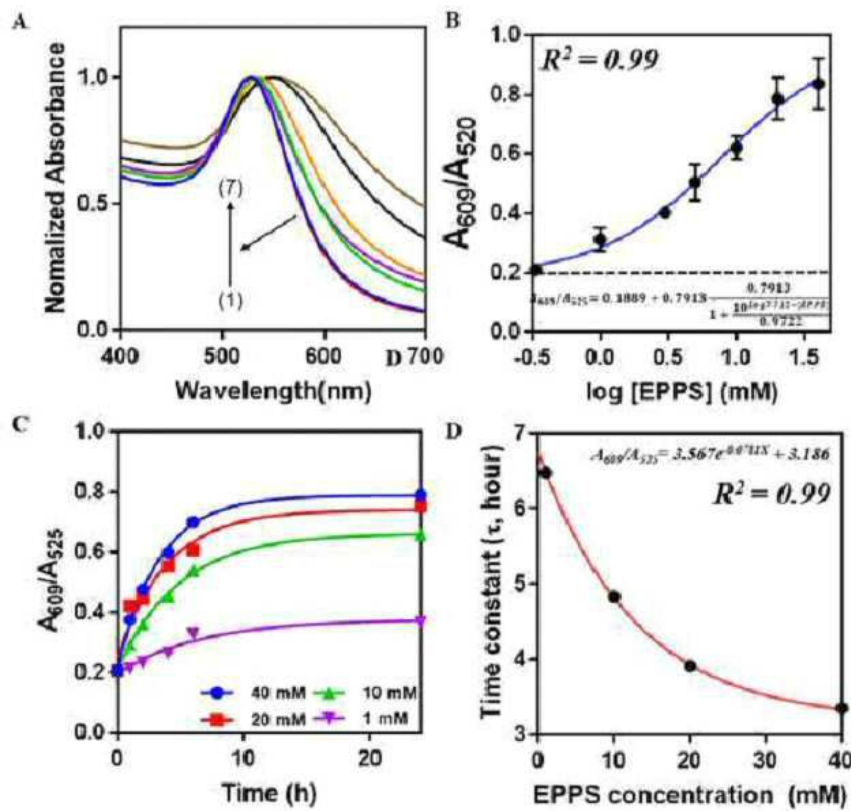
도면4



도면5



도면6



도면7

