



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0025077
(43) 공개일자 2020년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) C07K 1/113 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/4711 (2013.01)
C07K 1/1136 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0101894
(22) 출원일자 2018년08월29일
심사청구일자 2020년01월20일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
윤대성
서울특별시 강남구 광평로10길 6, 101동 201호(일원동, 한솔마을아파트)
이규도
경기도 남양주시 별내5로5번길 49, 302호(별내동, 은원빌딩)
(74) 대리인
특허법인 다해

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 마이크로파 조사를 이용한 체외 아밀로이드 응집체 합성방법

(57) 요약

본 발명은 체외 환경에서 소량의 단백질 단량체 용액에 마이크로파를 조사하여, 단시간 내에 아밀로이드 응집체를 합성하는 기술에 관한 것이다. 본 발명은 아밀로이드 원료에 마이크로파를 조사하여 베타(β) 병풍구조를 형성하는 단계를 포함하는 마이크로파 조사를 이용한 체외 아밀로이드 응집체 합성방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이원석

인천광역시 계양구 효서로 10, 101동 1002호(효성동, 삼성홈타운아파트)

최예성

경기도 의정부시 오목로 73 (민락동 한라비발디아파트) 108동 1603호

이상원

서울특별시 서초구 효령로29길 42, 1동 301호 (방배동, 베토벤하이츠)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A2B4010269

부처명 한국연구재단

연구관리전문기관 고려대학교 산학협력단

연구사업명 중견연구자지원사업

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

기 여 율 1/3

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018M3C1B7020722

부처명 한국연구재단

연구관리전문기관 고려대학교 산학협력단

연구사업명 자연모사혁신기술개발사업

연구과제명 고효율성 저농도 시간차 다중약물 전달 시스템 개발

기 여 율 1/3

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2018.04.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10079316

부처명 한국산업기술평가관리원

연구관리전문기관 고려대학교 산학협력단

연구사업명 소재부품기술개발사업(투자자연계형기술개발사업)

연구과제명 고민감도 핸디 타입형 비침습 피부암 진단용 모듈 개발

기 여 율 1/3

주관기관 주식회사 로켓

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

아밀로이드 원료에 마이크로파를 조사하여 베타(β) 병풍구조를 형성하는 단계를 포함하는 마이크로파 조사를 이용한 체외 아밀로이드 응집체 합성방법

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 마이크로파는 300MHz~300GHz의 주파수를 가지며, 500~1500W의 출력으로 1~30초간 1~50회 조사되는 것을 특징으로 하는 체외 아밀로이드 응집체 합성방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 아밀로이드 원료는 베타-락토글로불린 이며, 0.1~10wt%의 농도를 가지는 것을 특징으로 하는 체외 아밀로이드 응집체 합성방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 아밀로이드 원료는 응집 저해제로서 L-아스코브르산 또는 응집 촉진제로서 금속 나노물질을 포함하는 것을 특징으로 하는 체외 아밀로이드 응집체 합성방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 금속 나노물질은 금, 은, 구리, 주석, 철 또는 ITO를 포함하며, 나노입자, 금속으로 코팅된 나노입자, 나노와이어 또는 금속으로 코팅된 나노와이어의 형상을 가지는 것을 특징으로 하는 체외 아밀로이드 응집체 합성방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 마이크로파 조사를 이용한 체외 아밀로이드 응집체 합성방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 체외 환경에서 소량의 단백질 단량체 용액에 마이크로파를 조사하여, 단시간 내에 아밀로이드 응집체를 합성하는 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 체내에 존재하는 다양한 단백질 중 일부는 잘못 접힘 현상에 의하여 베타 병풍구조를 가질 수 있다. 이러한 베타 병풍구조를 갖는 단백질들이 뭉치게 되면 섬유 모양 응집체를 형성하게 되며 이러한 응집체를 아밀로이드 응집체라고 한다.

- [0003] 아밀로이드 응집체는 체내에 신경 세포에 쌓여 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 등과 같은 퇴행성 신경질환을 야기하는 것으로 알려져 있다.
- [0004] 의료과학 분야에서 이러한 아밀로이드 응집체의 형성 기작, 물리·화학적 특성, 퇴행성 신경질환 발병과의 연관성 등을 밝히기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있지만 이러한 연구가 진행되기 위해선 우선적으로 아밀로이드 응집체가 필요하다.
- [0005] 복잡한 체내 환경에 의한 영향을 통제하기 어렵기 때문에 체내 환경에서 만들어진 아밀로이드 응집체는 일반적인 아밀로이드 응집체에 대한 연구를 수행하기에 부적합하다. 따라서 아밀로이드 응집체를 체외 환경에서 합성하는 기술을 필요로 한다.
- [0006] 기존의 아밀로이드 응집체 체외 합성 방법은 대부분 단백질 단량체 용액을 열충탕 방식을 이용하여 합성하고 있다. 하지만 이와 같은 방식으로 응집체를 형성하기 위해서는 대량의 단백질 단량체 용액을 필요로 할 뿐만 아니라, 고온에서 오랜 시간 동안 증탕해야 한다.
- [0007] 따라서 기존의 방식으로 아밀로이드 응집체를 합성하게 되면 단량체 용액의 증발로 인하여 농도를 통제하기 어렵고, 합성에 걸리는 시간이 길어 시간적인 문제도 발생한다. 또한, 대량의 단백질 단량체가 필요함에 따라 연구 재료비 부분에서 경제적 부담이 발생하게 된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) (0001) 대한민국 등록특허공보 제10-0351642호
(특허문헌 0002) (0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2012-0079163호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 체외 환경에서 아밀로이드 응집체를 합성하는 기존의 방법의 문제점을 해결하고자 한다.
- [0010] 또한 소량의 단백질 단량체 용액을 이용하여 단시간에 아밀로이드 응집체를 합성하기 위하여 마이크로파를 이용하여, 마이크로파를 조사하기 위해서 실험실에서 사용되고 있는 전자레인지에 이용하여 제조비용을 절감할 수 있도록 하고자 한다.
- [0011] 또한 기존의 합성 방법과 달리, 소량의 용액으로 단시간에 아밀로이드 응집체를 형성하는 합성 방법을 제공하고 자 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 전술한 문제를 해결하기 위해, 본 발명은 아밀로이드 원료에 마이크로파를 조사하여 베타(β) 병풍구조를 형성하는 단계를 포함하는 마이크로파 조사를 이용한 체외 아밀로이드 응집체 합성방법을 제공한다.
- [0013] 상기 마이크로파는 300MHz~300GHz의 주파수를 가지며, 500~1500W의 출력으로 1~30초간 1~50회 조사될 수 있다.
- [0014] 상기 아밀로이드 원료는 베타-락토글로불린 이며, 0.1~10wt%의 농도를 가질 수 있다.
- [0015] 상기 아밀로이드 원료는 응집 저해제로서 L-아스코브르산 또는 응집 촉진제로서 금속 나노물질을 포함할 수 있다.
- [0016] 상기 금속 나노물질은 금, 은, 구리, 주석, 철 또는 ITO를 포함하며, 나노입자, 금속으로 코팅된 나노입자, 나노와이어 또는 금속으로 코팅된 나노와이어의 형상을 가질 수 있다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명에 따른 마이크로파를 이용한 아밀로이드 응집체 합성 기술은 소량의 단백질 단량체 용액으로도 응집체의 합성이 가능하다.

- [0018] 또한, 기존 연구 결과에 따르면 최소 5시간이 필요한 이전의 합성 기술보다 현저히 짧은 시간 (7분) 내에 아밀로이드 응집체를 형성할 수 있다.
- [0019] 체외에서 아밀로이드 응집체를 합성하고 그 응집체들의 특성을 평가하는 연구영역에서 적은 양의 단량체 용액으로 단시간에 응집체를 합성할 수 있어, 그 시간과 비용을 절감하는 효과를 볼 수 있다.
- [0020] 또한, 아밀로이드 응집체의 형성을 증폭시키는 것으로 알려진 금속 나노물질(즉, 은나노와이어와 은나노입자)과 응집체 형성을 억제하는 것으로 알려진 L-아스코르브산의 효과를 확인할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 의한 원자힘현미경 사진으로, 마이크로파를 농도별 베타-락토글로불린 단량체 용액((A) 1wt%, (B) 0.5wt%, (C) 0.1wt%)에 조사하여 아밀로이드 응집체를 형성한 후, 원자힘현미경을 이용하여 확인한 응집체의 모습을 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 의한 타이오플라빈-T 분석 결과로, 마이크로파를 농도별 베타-락토글로불린 단량체 용액에 조사하여 아밀로이드 응집체를 형성한 후 확인한 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 의한 전자레인지에 의하여 마이크로파 조사를 통해 응집체의 형성을 억제 (L-아스코르브산) 또는 촉진시키는 물질 (은나노입자, 은나노와이어)을 각각 단량체에 처리하여 실험하는 방식에 대한 모식도이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 의한 다양한 농도의 ((A) 0mM, (B) 3mM, (C) 30mM, (D) 300mM) L-아스코르브산의 농도를 아밀로이드 응집체에 처리한 후, 응집체 형성의 억제 효과를 확인한 원자힘현미경 이미지이며, (E) 4가지 조건의 L-아스코르브산 농도를 아밀로이드 응집체에 처리 후, 베타병풍구조를 확인하기 위하여 분석한 타이오플라빈-T 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 의한 금속 나노물질인 은나노입자와 은나노와이어의 베타-락토글로불린 응집체 형성 촉진 결과로 (A) 두 가지 종류의 금속 나노물질이 타이오플라빈-T의 형광량에 주는 영향과 (B) 그에 따른 타이오플라빈-T 분석 결과를 각각 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하에서는 본 발명의 바람직한 실시예를 상세하게 설명한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐리게 할 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략하기로 한다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한, 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있음을 의미한다.
- [0023] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예를 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0024] 발명에서 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. 본 발명에서, 포함하다 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, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0025] 본 발명은 아밀로이드 원료에 마이크로파를 조사하여 베타(β) 병풍구조를 형성하는 단계를 포함하는 마이크로파 조사를 이용한 체외 아밀로이드 응집체 합성방법에 관한 것이다.
- [0026] 상기 마이크로파는 300MHz~300GHz의 주파수를 가지며, 500~1500W의 출력으로 1~30초간 1~50회 조사될 수 있다. 상기 주파수 또는 출력 미만이거나 1초미만으로 조사하는 경우 병풍구조를 생성하기 어려우며, 상기 주파수 또는 출력을 초과하거나 30초 초과 또는 50회 초과하여 조사하는 경우 생성된 아밀로이드 구조가 마이크로파에 의하여 변성되거나 붕괴될 수 있다.
- [0027] 상기 아밀로이드 원료는 베타-락토글로불린 이며, 0.1~10wt%의 농도를 가질 수 있다. 0.1wt%미만의 농도를 가지는 경우 병풍구조를 형성하기 어려우며, 10wt%를 초과하는 경우 응집체의 크기가 커져서 침전이 일어날 수

있다.

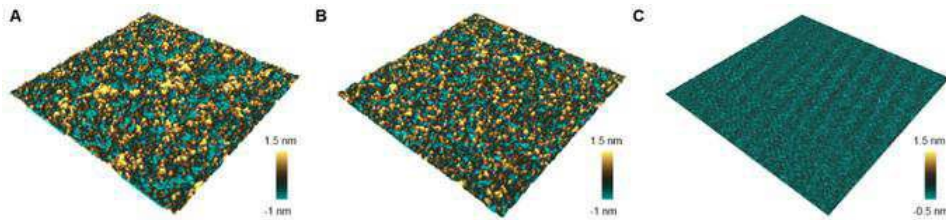
- [0028] 상기 아밀로이드 원료는 응집 저해제로서 L-아스코브르산 또는 응집 촉진제로서 금속 나노물질을 포함할 수 있다.
- [0029] 상기 금속 나노물질은 금, 은, 구리, 주석, 철 또는 ITO를 포함하며, 나노입자, 금속으로 코팅된 나노입자, 나노와이어 또는 금속으로 코팅된 나노와이어의 형상을 가질 수 있다.
- [0030] 이하 본 발명을 상세한 실험방법을 통하여 자세히 설명한다.
- [0031] 본 발명에서 아밀로이드 응집체를 형성하기 위하여 베타-락토글로불린의 단량체를 사용할 수 있다.
- [0032] 96웰 플레이트에 베타-락토글로불린 단량체 용액을 농도별로 (1 wt%, 0.5 wt%, 0.1 wt%) 200 μ l씩 넣고 시중에 판매되는 전자레인지(1100W)를 이용하여 마이크로파를 조사하였다.
- [0033] 본 발명에 있어서 마이크로파는 주파수 300MHz에서 300GHz사이의 전자기파의 한 영역을 의미한다. 이러한 마이크로파를 이용하여 유전체 물질 내의 극성 분자를 회전시켜 가열하는 방식을 유전가열이라 한다. 유전가열 방식을 이용하면 표면을 과열하지 않고 내부를 균일하게 단시간에 가열할 수 있다.
- [0034] 따라서 아밀로이드 원료 용액에 마이크로파를 조사하면 극성 분자인 물 분자를 회전시켜, 단백질 구조에서 비틀림 진동을 일으킴으로써 단백질의 변성과 재접힘이 일어나 단백질 구조의 변형을 가져올 수 있다.
- [0035] 상기 마이크로파는 10초 동안 조사하였고, 10초 간격으로 20번 조사하였다.
- [0036] 상기 마이크로파 조사로 형성된 아밀로이드 응집체의 형태를 확인하기 위하여 원자힘현미경을 사용하였다.
- [0037] 원자힘현미경을 통해 아밀로이드 응집체가 울리고며 형태로 형성되었음을 확인하였다. 단, 단량체 용액의 농도가 일정 수준 이하 (0.1 wt%) 일 때는 응집체가 형성되지 않는 것을 확인 할 수 있었다(도 1).
- [0038] 마이크로파 조사로 인한 아밀로이드 응집체 형성의 양적 분석을 위하여 타이오플라빈-T 용액을 사용하였다. 타이오플라빈-T는 단백질의 베타병풍구조에 침투하여 형광을 발하는 물질로, 형광량을 통해 아밀로이드 응집체의 양적 변화를 비교하기 위하여 학계에서 널리 사용되고 있는 물질이다.
- [0039] 아밀로이드 원료 용액의 농도가 커질수록 타이오플라빈-T의 형광량 또한 증가했으며, 원자힘현미경 분석과 마찬가지로 일정 수준 이하의 농도에서는 응집체가 형성되지 않음을 확인할 수 있었다(도 2).]
- [0040] 본 발명의 응용 가능성을 확인하기 위해 아밀로이드 응집체 형성을 억제하는 것으로 알려져있는 L-아스코브르산과 응집체 형성을 촉진하는 것으로 알려진 금속 나노물질(은나노입자, 은나노와이어)을 이용한 실험을 실시하였다(도 3).
- [0041] 위의 아밀로이드 응집체를 형성하는 실험 조건과 동일하게 실시하였다. 96웰 플레이트에 베타-락토글로불린 단량체 용액 100 μ l와 효과를 확인하고자 하는 물질(L-아스코브르산)의 용액 100 μ l를 넣어 실험을 실시하였다. 마찬가지로 전자레인지로 마이크로파를 10초 동안 조사하였으며 10초 간격으로 20번 조사하였다(도 3).
- [0042] L-아스코브르산의 아밀로이드 응집체 형성 억제 효과 또한 원자힘현미경과 타이오플라빈-T 분석을 통해 확인하였다. L-아스코브르산 농도는 0mM, 3mM, 30mM, 300mM이 사용되었다.
- [0043] L-아스코브르산의 농도가 높을수록, 원자힘현미경 분석에서는 아밀로이드 응집체가 형성되지 않았으며 타이오플라빈-T 분석에서는 형광량이 줄어들었음을 확인하였다(도 4).
- [0044] 금속 나노물질인 은나노입자와 은나노와이어를 이용하여 아밀로이드 응집체의 형성이 촉진되는 것을 확인하는 실험을 실시하였다.
- [0045] 위의 아밀로이드 응집체를 형성하는 실험 조건과 동일하게 실시하였다. 96웰 플레이트에 베타-락토글로불린 단량체 용액 100 μ l와 효과를 확인하고자 하는 물질(은 나노입자 또는 은 나노와이어)의 용액 100 μ l를 넣어 실험을 실시하였다. 마찬가지로 전자레인지로 마이크로파를 10초 동안 조사하였으며 10초 간격으로 20번 조사하였다(도 3).
- [0046] 단백질 단량체가 없을 때 금속 나노물질이 타이오플라빈-T의 형광량에 주는 영향은 없었으며, 마이크로파 조사 후 은나노입자와 은나노와이어를 포함한 베타-락토글로불린 단량체 용액에서 아밀로이드 응집체 형성이 촉진되는 것을 확인할 수 있었다(도 5).

[0047] 특히 은나노와이어를 포함한 경우보다 은나노입자를 포함한 경우에 응집체 형성이 더욱 증가하였다.

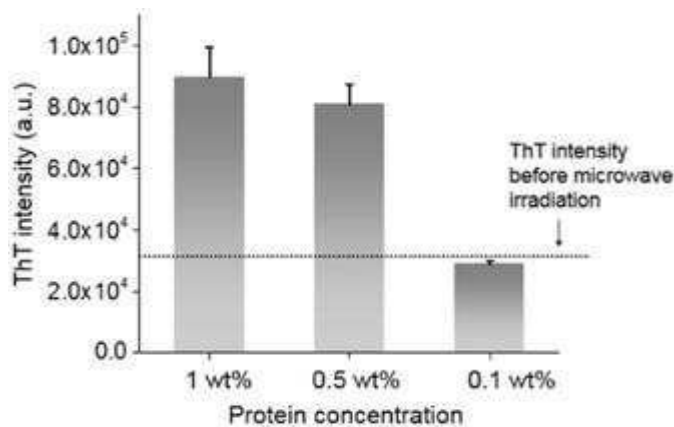
[0049] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

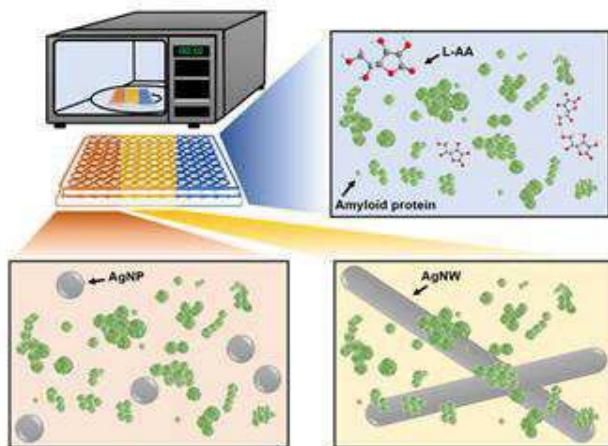
도면1



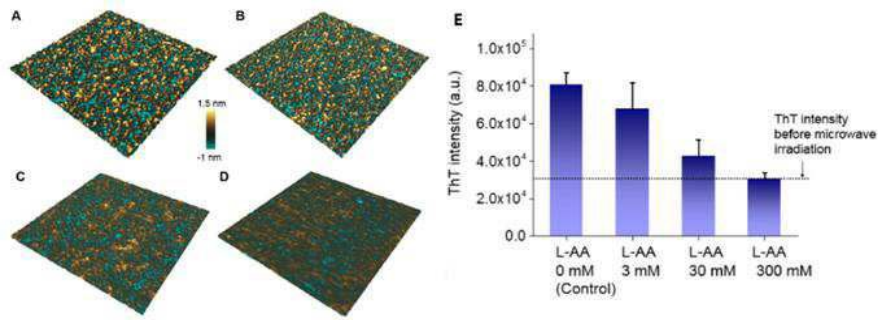
도면2



도면3



도면4



도면5

