(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0153147
(43) 공개일자 2023년11월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01) *C12Q 1/37* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/70 (2022.05)
C12Q 1/37 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0053001
(22) 출원일자 2022년04월28일
심사청구일자 2022년04월28일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
고려대학교 세종산학협력단
세종특별자치시 조치원읍 세종로 2511 (고려대학교세종캠퍼스내)
(72) 발명자
윤대성
서울특별시 강남구 광평로10길 6(일원동, 한솔마을아파트) 101-201
정효기
서울특별시 동대문구 안암로18가길 20 (제기동) B동 403호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

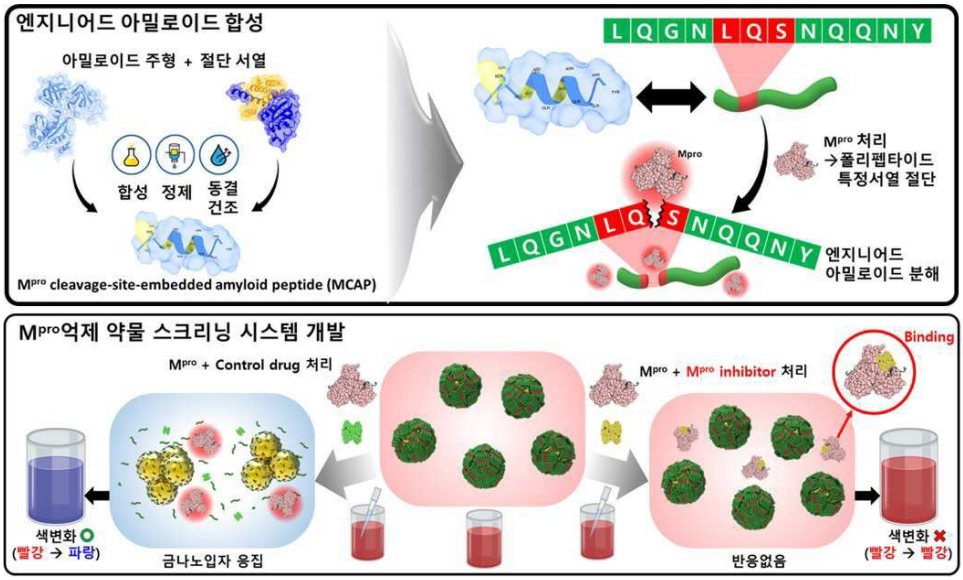
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **다중 변이 코로나바이러스 치료용 약물 스크리닝 방법**

(57) 요 약

본 발명은 다중 변이 코로나바이러스 치료용 약물 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명은 낮은 농도의 M^{pro}를 이용하여 단시간에 코로나바이러스 치료제를 스크리닝할 수 있는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 33/68 (2013.01)
C12Q 2521/537 (2013.01)
G01N 2333/165 (2013.01)
G01N 2500/02 (2013.01)

(72) 발명자
이동택
서울특별시 성북구 종암로 23길 35 래미안세레니티 204동 603호
박동성
서울특별시 강남구 논현로26길 24 - 5 (도곡동 좋은집) 301호
장재원
서울특별시 성북구 고려대로 28-7 ((안암동2가)) 202호
김용환
서울특별시 송파구 성내천로 103 (오금동 송파두산위브) 102동 2005호
방준호
서울시 성북구 고려대로 47 SM빌딩 201호
이규도
세종특별자치시 조치원읍 섭골길 59(e-편한세상 세종) 102-704
정다연
세종특별자치시 조치원읍 문화6길 10 햇살하우스 401호
김현지
서울특별시 성북구 고려대로 47 (안암동2가) SM 빌딩 202호
김재홍
서울특별시 강남구 학동로21길 23 ((논현동, 비쥬힐)) 201호
서영준
경기도 의정부시 평화로 150, 203동 102호
김연호
경기도 안성시 대덕면 서동대로 4725 (롯데캐슬 센트럴시티) 105동 1102호
홍지혜
서울특별시 동작구 상도로54길 52 (상도동) sw드림빌 404호
이상원
서울특별시 강남구 삼성로 11, 디에이치아너힐즈 323동 105호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711158812
과제번호	2018M3C1B7020722
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	STEAM연구(R&D)
연구과제명	고효율성 저농도 시간차 다중약물 전달 시스템 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 서열을 포함하는 엔지니어드 아밀로이드 펩타이드를 제조하는 단계 (a);

염화금산($HAuCl_4$)과 시트르산 나트륨을 혼합하여 금나노입자를 제조하는 단계 (b); 및

상기 단계 (a)의 아밀로이드 펩타이드와 상기 단계 (b)의 금나노입자를 혼합하여 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체를 제조하는 단계 (c);를 포함하는 코로나바이러스 치료제 스크리닝용 조성물의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단계 (a)의 엔지니어드 아밀로이드 펩타이드는 β-sheet인 것인, 코로나바이러스 치료제 스크리닝용 조성물의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단계 (b)는, 염화금산과 초순수를 혼합하여 가열한 뒤, 시트르산 나트륨을 첨가하여 가열하는 것인, 코로나바이러스 치료제 스크리닝용 조성물의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 단계 (c)의 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체는,

금나노입자와 엔지니어드 아밀로이드 펩타이드를 부피비 1 : 0.5~10으로 혼합하여 제조된 것인, 코로나바이러스 치료제 스크리닝용 조성물의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 단계 (c)의 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체는 붉은색인, 코로나바이러스 치료제 스크리닝용 조성물의 제조방법.

청구항 6

제1항의 제조방법에 의해 제조된 코로나바이러스 치료제 스크리닝용 조성물.

청구항 7

제6항의 조성물에 코로나바이러스 치료제 후보 약물을 처리하는 단계;를 포함하는 코로나바이러스 치료제 스크

리닝 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

후보 약물 처리 후 푸른색으로 색이 변하는 경우 상기 후보 약물을 코로나바이러스 치료제로 선정하는 단계;를 더욱 포함하는 것인, 코로나바이러스 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 다중 변이 코로나바이러스 치료용 약물 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 COVID-19 펜데믹 극복을 위해 백신과 치료제 관련 연구가 다수 수행되고 있으나, SARS-CoV-2의 스파이크 단백질(spiked protein)은 변이가 계속되고 있다. 특히 백신 접종 후 항체량이 감소한다는 연구 보고에 따라 백신 효과에 대한 의문이 제기되고 있으며, 치료제에 대한 임상시험은 꾸준히 증가하고 있어, COVID-19 치료제 개발에 대한 연구 개발이 절실히 필요한 실정이다.

[0003] COVID-19 치료를 위한 약물은 크게 3가지 메커니즘이 존재하는데, 첫째로 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질을 타겟으로 하는 약물이다. 이러한 약물은 스파이크 단백질과 결합하여, 바이러스가 숙주세포 표면의 ACE-2 수용체와 결합하는 것을 방지함에 따라 바이러스의 숙주세포로의 유입을 차단한다. 그러나 스파이크 단백질의 잦은 변이에 의해 중화항체의 효능이 감소한다는 한계점이 존재한다. 특히, 감염력이 강한 델타변이의 경우 스파이크 단백질 내부에 16개의 돌연변이를 보유하며, 오미크론 변이는 32개의 돌연변이를 보유하고 있어, 중화항체의 작용이 더욱 어려운 실정이다.

[0004] 두 번째는, 바이러스 RNA를 타겟으로 하는 약물이다. 이들은 SARS-CoV-2 RNA 복제 과정에 간섭하여 치명적인 RNA 돌연변이를 유발함에 따라 바이러스의 복제를 억제한다. 렘데시비르(remdesivir)와 몰누피라버(Molnupiravir)가 대표적이나, 렘데시비르는 약물의 효능에 대한 논란과 더불어, 간과 신장의 기능을 저하한다는 부작용이 보고되고 있으며, 몰누피라버는 포유동물의 RNA에서도 돌연변이를 일으켜 유전체 손상으로 인한 기형아나 선천적 유전병을 일으킬 수 있다는 치명적인 부작용이 보고되었다.

[0005] 세 번째는, SARS-CoV-2 유래 단백질 분해효소를 타겟으로 하는 약물이다. SARS-CoV-2 주요 단백질 분해효소(main protease)인 M^{pro}의 활성을 억제하여 바이러스의 증식을 억제하는 방법으로, 구체적으로는 세포 내부로 들어온 바이러스의 pp1a/ab 단백질을 절단함으로써 복제를 개시하는 바이러스 유래 단백질 분해효소이다. 한편, M^{pro}에 의한 바이러스 복제 기작은 다양한 종류의 코로나바이러스(SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-HKU1 등)들이 그 메커니즘을 공유하고 있다. 2003년에 유행한 SARS-CoV-1의 M^{pro} 활성 부위 서열과 2021년 SARS-CoV-2의 M^{pro} 활성 부위 서열을 비교했을 때 변이가 관찰되지 않았으며, 이에 따라 M^{pro} 활성 부위를 타겟으로 하는 약물은 인체에 대한 부작용 우려가 낮고, 향후 발생할 수 있는 코로나바이러스 치료제로도 사용 가능성이 매우 높을 것으로 예상된다.

[0006] 이에, 본 발명은 코로나바이러스의 M^{pro}의 활성을 억제하는 M^{pro} 억제제를 스크리닝하는 방법을 제공하고 한다. 특히, 기존의 M^{pro} 억제제 스크리닝 방법은 M^{pro}의 높은 단가에도 불구하고 고농도의 M^{pro}를 이용하였을 뿐만 아니라 두 가지 이상의 형광물질이 필요하며, 스크리닝에 필요한 시간이 수 일 소요되었던 한계를 극복하여, 낮은 농도의 M^{pro}를 이용하여 단시간에 코로나바이러스 치료제를 스크리닝할 수 있는 방법을 개발하여 제공한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) KR 10-2022-0002156 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 코로나바이러스의 변이에도 변하지 않는 M^{pro} 활성 부위를 타겟으로 하는 약물 스크리닝 방법을 제공하고자 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 코로나바이러스 치료제 스크리닝용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 서열을 포함하는 엔지니어드 아밀로이드 펩타이드를 제조하는 단계 (a); 염화금산($HAuCl_4$)과 시트르산 나트륨을 혼합하여 금나노입자를 제조하는 단계 (b); 및 상기 단계 (a)의 엔지니어드 아밀로이드 펩타이드와 상기 단계 (b)의 금나노입자를 혼합하여 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체를 제조하는 단계 (c);를 포함하는 코로나바이러스 치료제 스크리닝용 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0011] 본 발명에 있어서, 상기 단계 (a)의 엔지니어드 아밀로이드 펩타이드는 β-sheet인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0012] 본 발명에 있어서, 상기 단계 (b)는, 염화금산과 초순수를 혼합하여 가열한 뒤, 시트르산 나트륨을 첨가하여 가열하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명에 있어서, 상기 단계 (c)의 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체는, 금나노입자와 엔지니어드 아밀로이드 펩타이드를 부피비 1 : 0.5~10으로 혼합하여 제조된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 본 발명에 있어서, 상기 단계 (c)의 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체는 붉은색인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 코로나바이러스 치료제 스크리닝용 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 조성물에 코로나바이러스 치료제 후보 약물을 처리하는 단계;를 포함하는 코로나바이러스 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 스크리닝 방법은, 후보 약물 처리 후 푸른색으로 색이 변하는 경우 상기 후보 약물을 코로나바이러스 치료제로 선정하는 단계;를 더욱 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0018] 본 발명은 낮은 농도의 M^{pro}를 이용하여 단시간에 코로나바이러스 치료제를 스크리닝할 수 있는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 발명의 아밀로이드 펩타이드 합성 원리와 스크리닝 원리를 간략하게 도시한 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 피브릴화 아밀로이드 펩타이드를 AFM(atomic force microscopy) 및 TEM(transmission electron microscope)으로 관찰한 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 피브릴화 아밀로이드 펩타이드의 β-sheet 구조를 확인한 도이다. 도 3A는 DLS(dynamic light scattering) 분석 결과, 도 3B는 CD(Circular dichroism) 분석 결과, 도 3C는 Thioflavin T 형광 분석 결과, 도 3D는 FT-IR 분석 결과이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)의 구조적 안정성을 분석한 도이다. 도 4A는 아밀로이드 펩타이드 용액의 혼합 양에 따른 흡광도 피크를 나타낸 도이다. 도 4B는 50 μL 아밀로이드 펩타이드 용액으로 제조한 나노복합체의 UV-vis 스펙트럼 분석 결과이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)의 동결-해동 성능을 분석

한 도이다. 도 5A는 동결 전, 도 5B는 동결 및 해동 후의 UV-vis 스펙트럼 분석 결과이다. 도 5C 및 도 5D는 각각 동결 및 해동 후의 금나노입자(bare AuNP)와 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)의 색변화를 관찰한 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 금나노입자(bare AuNP)와 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)의 물리·화학적 특성을 분석한 도이다. 도 6A는 유체역학적 직경을 측정한 결과이고, 도 6B는 제타 전위(zeta potential)를 분석한 결과이고, 도 6C는 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)의 금나노입자 표면에 아밀로이드 펩타이드가 코팅되어 있음을 X선 광전자 분광법으로 확인한 결과이고, 도 6D는 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)의 TEM 이미지를 나타낸 도이다.

도 7A는 본 발명의 일 실시예에 있어서, M^{pro} 농도별 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)의 UV-vis 스펙트럼을 분석한 도이고, 도 7B는 M^{pro} 농도별 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)의 응집 정도를 확인한 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 기존에 알려진 M^{pro} 억제제를 스크리닝하여 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)의 UV-vis 스펙트럼을 분석한 도이다.

도 9A는 본 발명의 일 실시예에 있어서, M^{pro} 처리에 따른 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)의 반응을 TEM으로 관찰한 이미지를 나타낸 도이다. 도 9B는 leupeptin 처리에 따른 반응 결과를, 도 9C는 lopinavir 처리에 따른 반응 결과를, 도 9D는 hesperetin 처리에 따른 반응 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 엔지니어드 아밀로이드 펩타이드(MCAP)와 아밀로이드 서열을 포함하지 않는 엔지니어드 펩타이드인 MCRP의 차이를 나타낸 도이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 엔지니어드 아밀로이드 펩타이드(MCAP)와 MCRP의 ThT 신호를 분석한 도이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 있어서, M^{pro} 억제제 처리에 따른 효소 활성도를 분석한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 M^{pro} 절단 서열(L-Q-S)을 포함하는 아밀로이드 펩타이드가 금나노입자에 코팅된 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)에 관한 것으로, 코로나바이러스(Coronavirus) 유래 단백질 분해 효소인 M^{pro}를 억제하는 M^{pro} 억제제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. M^{pro}(main protease)는 코로나바이러스(Coronavirus) 유래 단백질 분해 효소이며, 본 발명은 바이러스 유래 단백질 분해효소를 억제함에 따라 바이러스의 증식을 억제할 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 코로나바이러스는, 코로나바이러스 과에 속하는 바이러스들을 말한다. 코로나바이러스는 바이러스의 특성과 숙주에 따라 호흡기 또는 소화기 감염병을 유발하는 것으로 알려져 있다.

[0021] 본 발명의 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체에 M^{pro} 및 특정 약물을 처리할 경우, 특정 약물에 M^{pro} 억제효과가 포함되었다면 용액의 색 변화가 관찰되지 않으며, 특정 약물에 M^{pro} 억제효과가 포함되지 않았다면 용액의 색 변화가 관찰된다. 상기 용액은 금나노입자의 응집 등 구조적 안정성 붕괴에 따라 색 변화가 발생하는데, M^{pro}에 의해 M^{pro} 절단 서열(L-Q-S)이 절단되어 아밀로이드 펩타이드가 분해되고, 금나노입자의 응집이 유도되어 용액의 색 변화가 발생한다. 반면 M^{pro} 억제제에 의해 활성이 감소한 M^{pro}는 아밀로이드 펩타이드를 분해하지 못하며, 금나노입자의 응집을 유도하지 못해 용액의 색 변화가 관찰되지 않는다(도 1 참조).

[0022] 한편, M^{pro}에 의한 바이러스 복제 기작은 다양한 종류의 코로나바이러스(SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-HKU1 등)들이 그 메커니즘을 공유하고 있다. 2003년에 유행한 SARS-CoV-1의 M^{pro} 활성 부위 서열과 2021년 SARS-CoV-2의 M^{pro} 활성 부위 서열을 비교했을 때 변이가 관찰되지 않았으며, 이에 따라 M^{pro} 활성 부위를 타겟으로 하는 약물은 인체에 대한 부작용 우려가 낮고, 향후 발생할 수 있는 코로나바이러스 치료제로도 사용 가능성이 매우 높을 것으로 예상된다.

[0024] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0026] **<준비예 1>**

[0027] 동결건조된 SARS-CoV-2의 주요 프로테아제(main protease, M^{pro})는 Biosynth Carbosynth(UK)에서 구입하였다. 엡셀렌(ebselen), 헤스페레틴(hesperetin), 류펩틴(leupeptin), 로피나비르(lopinavir), 헤스페리딘(hesperidin), 염화금산삼수화물(chloroauric acid trihydrate($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$)) 및 시트르산삼나트륨(trisodium citrate)은 Sigma-Aldrich(USA)에서 구입하였다. 증류수(distilled water, DW) 및 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)는 Gibco(USA)에서 구입하였다.

[0029] **<실시예 1> 아밀로이드 펩타이드의 제조**

[0030] SARS-CoV-2의 주요 프로테아제(main protease, M^{pro})는 L-Q-S, L-Q-A, L-Q-G 서열을 절단한다. 본 실험에서는 프리온 단백질 유래 아밀로이드 서열(G-N-N-Q-Q-N-Y)과 M^{pro} 절단 서열(L-Q-S)을 융합하여 Solid Phase Peptide Synthesis 방법을 이용하여 C-terminal부터 엔지니어드 아밀로이드 펩타이드(M^{pro} cleavage site embedded amyloid peptide, MCAP, L-Q-G-N-L-Q-S-N-Q-Q-N-Y, Peptron, Korea)를 사용하였다(도 1).

표 1

[0031]

서열번호 1	GNNQQNY
서열번호 2	LQS

[0033] **<실시예 2> 엔지니어드 아밀로이드 펩타이드(MCAP)의 피브릴(fibril)화**

[0034] **2-1. MCAP의 피브릴화**

[0035] 프리온 단백질 유래 아밀로이드 서열(G-N-N-Q-Q-N-Y)과 M^{pro} 절단 서열(L-Q-S)을 포함하는 엔지니어드 아밀로이드 펩타이드(MCAP)를 증류수에 용해하여 1 mg/mL의 MCAP 용액을 제조하였다. 50 μL의 MCAP 용액과 pH 2의 증류수 150 μL를 혼합하여 37℃의 shaking incubator(Eppendorf, Germany)에서 1,000 rpm으로 5일간 충분히 반응시켜 피브릴화 하였다. 피브릴화 아밀로이드 펩타이드를 하기와 같이 확인하였다.

[0037] **2-2. AFM(atomic force microscopy) 및 TEM(transmission electron microscope)분석**

[0038] 실리콘 웨이퍼를 piranha 용액(H_2SO_4:H_2O_2=1:1)으로 세척하였다. 50 μL의 피브릴화 아밀로이드 펩타이드 용액을 실온에서 20분간 실리콘 웨이퍼에 증착시키고, 증류수로 세척한 뒤, fume hood에서 12시간 건조시켰다.

[0039] AFM 분석은 반경이 10 nm 미만인 실리콘 팁(NCHR, Park Systems, South Korea)을 사용하여 NX10(Park systems, South Korea)으로 측정하였다. AFM 측정은 0.4 Hz의 스캔 속도와 5 μm × 5 μm의 이미지 크기에서 NCM모드로 수행하였다. 이미지 평탄화(image flattening) 및 토폴로지 분석(topological analysis)은 Smart Scan(Park systems, South Korea) 소프트웨어로 수행하였다. AFM 분석을 통해 얻은 이미지를 Easyworm 소프트웨어를 사용하여 피브릴화 아밀로이드 펩타이드의 지속 길이(persistence length)를 측정한 결과, 229.95 ± 94.22 nm임을 확인하였다(도 2A).

[0040] TEM 분석은 0.25 mg/mL의 MCAP 용액을 37℃에서 1,000 rpm으로 96시간 반응시킨뒤 12,000 rpm에서 1시간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 수행하였다. 도 2B는 TEM 분석 이미지이다. 도 2B의 좌측 이미지를 통해 MCAP의 피브릴화가 진행된 것을 확인하였으며, 우측 이미지에 이를 확대한 형상을 나타내었다.

[0042] **<실시예 3> 피브릴화 아밀로이드 펩타이드의 β-sheet 구조 확인**

[0043] **3-1. DLS(dynamic light scattering) 분석**

[0044] 0.25 mg/mL의 MCAP 용액을 37℃에서 1,000 rpm으로 3일간 반응시키면서 DLS(dynamic light scattering)를 이용하여 유체역학적 직경(hydrodynamic diameter)을 측정하였다. 반응시킨 MCAP 용액 1 mL를 일회용 큐벳 (10 mm light path, standard type, Kartell, Italy)에 넣어 Zetasizer Nano S90 (Malvern Panalytical, United Kingdom)으로 1 cycle당 10번씩 4 cycle, 총 40회 측정하였다. 도 3A에서 보듯이, 반응 시간에 따라 단량체 형태의 MCAP로부터 피브릴화가 진행되며, 직경과 표준편차가 증가(1h : 0.20 ± 0.073 μm, 12h : 0.30 ± 0.03 μm, 24h : 0.98 ± 0.13 μm, 36h : 3.40 ± 1.37 μm, 48h : 3.62 ± 2.02 μm)하는 것으로 나타났다.

[0046] **3-2. CD(Circular dichroism) 분석**

[0047] CD는 물질의 2차 구조를 확인할 수 있으며, 랜덤 코일(random coil) 형태는 210 nm ≥ wavelength에서 y축 값이 음의 값을 보인다. 0.25 mg/mL의 MCAP 용액을 37℃에서 1,000 rpm으로 각각 12, 24, 36, 48, 60, 96h 반응시킨 후, 석영 유리 큐벳(1 mm path length, 10 mm inside wide, Aireka Cells, USA)에 주입 후 측정하였다. 스펙트럼의 검출 범위가 190~300 nm이고, 스캐닝 속도가 10 nm/min인 J-815 (Jasco, Japan)으로 원형 이색성 스펙트럼(Circular dichroism spectra)을 측정하였다. 스펙트럼은 8 nm 분해능을 가지며, CDTool 소프트웨어로 처리되었다. 도 3B에서 보듯이, 피브릴화 아밀로이드 펩타이드는 210~240 nm의 wavelength에서 음의 값을, 210 nm ≥ wavelength에서는 양의 값을 보이는 피크를 확인하였다. 즉, 반응 시간에 따라 β-sheet 구조에 의한 신호가 증가하였으며, MCAP는 점차 β-sheet 구조로 피브릴화 되는 것을 의미한다.

[0049] **3-3. Thioflavin T 형광 분석**

[0050] ThT(Thioflavin T)는 β-sheet 구조를 탐지하는 형광물질이다. 0.25 mg/mL의 MCAP 용액을 20 μM의 ThT 용액과 pH 2 용액 상에서 37℃, 1,000 rpm으로 3일간 반응시키며 ThT 형광신호를 측정하였다. ThT 형광신호는 30분 간격으로 99 시간 동안 측정하였다. 실험 결과를 도 3C에 나타내었다. 반응 시간에 따라 ThT 형광 신호 값이 증가하였으며, 이는 β-sheet 형태의 피브릴화 아밀로이드 펩타이드가 형성되는 것을 의미한다.

[0052] **3-4. FT-IR(Fourier transform infrared) 분석**

[0053] FT-IR는 β-sheet 구조를 측정할 경우 1,620/cm 부근에서 피크가 확인된다. 48시간 반응시킨 피브릴화 아밀로이드 펩타이드 용액을 12,000 rpm에서 1시간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 이를 실리콘 웨이퍼에 증착시킨 뒤, fume hood에서 12시간 건조시켰다. FT-IR 스펙트럼은 Cary 630 FTIR Spectrometer(scanning range 1,600~1,700/cm, Agilent Technologies, USA)로 측정하였다. 스펙트럼은 4 nm의 분해능을 가지며, Agilent MicroLab 소프트웨어로 처리하였다. 도 3D에서 보듯이, 1,620/cm 부근에서 피크가 측정되어 피브릴화 아밀로이드 펩타이드가 β-sheet의 구조임을 확인하였다.

[0055] **<실시예 4> 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)의 합성**

[0056] **4-1. 금나노입자(AuNP)의 제조**

[0057] Citrate reduction을 사용하여 금나노입자를 합성하였다. 2.5 mL의 38.8 mM 염화금산($HAuCl_4$) 용액과 45 mL Millipore water를 둥근 비커에서 혼합하고, 1,200 rpm으로 교반하면서 가열하였다. 혼합물을 끓인 후, 80 mM 시트르산 나트륨(sodium citrate) 용액 1 mL를 첨가하고 1,200 rpm으로 교반하면서 1시간 가열하여 시트르산으로 안정화된 금나노입자를 제조하였다. 금나노입자는 20 nm 크기로 제조되었다. 최종 금나노입자 용액을 실온으

로 냉각하고 4℃에서 보관하였다.

[0059] **4-2. 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)의 최적화**

[0060] 증류수와 PBS를 10:1 부피비로 혼합한 혼합물을 MCAP에 첨가하여 0.1 mg/mL의 MCAP 용액을 제조하였다. 20 nm 금나노입자 용액을 13,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 40 μL 금나노입자 용액을 상기 실시예 2의 (0.09 mg/mL) 25, 50, 100, 200, 300 및 400 μL와 각각 혼합하여 37℃, 1,000 rpm으로 반응하여 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체를 합성하였다. 1×PBS 600 μL를 첨가하여 salt resistance test를 24시간 수행하고, UV-vis 스펙트럼을 측정하였다. UV-vis 스펙트럼은 분광광도계(scan range 400~800 nm, scan rate 600 nm/min, Perkin Elmer, USA)로 측정하였다. 분산된 상태의 20 nm 이하 금나노입자의 UV-vis 스펙트럼은 525 nm(A_{525}) 부근에서 피크가 검출되었다. 피브릴화 아밀로이드 펩타이드가 금나노입자 표면을 잘 코팅하지 못한 경우, PBS에 의해 금나노입자가 응집되어 용액의 색 변화를 일으키고, 피크가 650 nm(A_{650}) 근처로 이동한다. 따라서, 금나노입자의 응집 정도는 상대 흡광도(A_{650}/A_{525})로 정량화할 수 있다.

[0061] 도 4A에서 보듯이, 25~100 μL MCAP 용액을 이용한 경우 피크가 525 nm(A_{525}) 부근에서 관찰되어 가장 안정한 구조로 확인되었다.

[0062] 한편, 50 μL MCAP 용액으로 제조한 나노복합체의 구조적 안정성을 추가로 확인하기 위해, 나노복합체에 증류수를 추가하여 총 부피를 0.8 mL로 제조하고, 시간에 따른 UV-vis 스펙트럼을 측정한 결과, 도 4B에서 보듯이, 24시간 구조적 안정성이 유지되는 것을 확인하였다.

[0064] **<실시예 5> 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)의 특성 분석**

[0065] **5-1. 동결-해동 성능(freeze-thaw performance) 분석**

[0066] 본 실험에서는 상기 실시예 4에서 제조한 금나노입자용액(bare AuNP)과 50 μL MCAP 용액으로 제조한 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)의 동결-해동 성능(freeze-thaw performance)을 분석하였다.

[0067] 각각 1 mL의 bare AuNP와 MCAP-AuNP를 -80℃에서 2시간 동결시킨 후, 실온에서 2시간 해동하였다. 동결 및 해동 전후의 유체역학적 직경(hydrodynamic diameter)을 Zetasizer로 측정하였다. 또한 동결 및 해동 전후의 각 용액의 UV-vis 스펙트럼을 측정하였다. 도 5에 실험 결과를 나타내었다.

[0068] 도 5A는 동결 전, 도 5B는 동결 및 해동 후의 UV-vis 스펙트럼 측정 결과를 나타낸 도이다. 동결 전후 피크 변화와 도 5C에서 보듯이, 동결 및 해동 후의 경우 금나노입자의 응집이 일어나 색 변화가 관찰된 반면, 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)는 동결 전후 피크가 일정하며, 도 5D에서 보듯이, 동결 및 해동 후에도 색 변화가 관찰되지 않아 구조적 안정성이 매우 우수한 것으로 확인되었다.

[0070] **5-2. 물리·화학적 특성 분석**

[0071] 본 실험에서는 상기 실시예 4에서 제조한 금나노입자용액(bare AuNP)과 50 μL MCAP 용액으로 제조한 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)의 물리·화학적 특성을 분석하였다.

[0072] 상기 실시예 3과 같이, DLS(dynamic light scattering)를 이용하여 bare AuNP와 MCAP-AuNP의 유체역학적 직경(hydrodynamic diameter)을 측정한 결과를 도 6A에 나타내었다. Bare AuNP가 19.01 ± 0.53 nm, MCAP-AuNP가 21.96 ± 0.67 nm였으며, 엔지니어드 아밀로이드 펩타이드에 의해 코팅된 MCAP-AuNP가 코팅 전 금나노입자에 비해 약 3 nm 두꺼워지는 점을 확인하였다.

[0073] 도 6B에 MCAP-AuNP의 zeta potential 값을 나타내었다. 0.4 mg/mL의 MCAP-AuNP 용액을 Zetasizer Cuvette에 넣고 각 지점별 accumlation time을 15회 지정하여 측정하였다. 그 결과, MCAP-AuNP의 zeta potential은 -19 ± 3.1 mV로, MCAP-AuNP의 구조적 안정성이 우수한 것으로 확인되었다.

[0074] X선 광전자 분광법(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)을 이용하여 금(Au) 원소와 질소(N) 원소의 피크를 확인하였다. MCAP-AuNP 용액을 6,720×g로 20분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 각 용액(< 40 μL)의 펠릿(pellet)을 실리콘 웨이퍼에 증착시키고, fume hood에서 24시간 건조하였다. K-alpha instrument(Thermo VG,

UK)를 이용하여 XPS를 측정하였다. 이 장비는 4.8 × 10^{-9} mb에서 단색 X선 소스(Al Kα line: 1486.6 eV)를 제어할 수 있다. 0.1 eV 스텝 사이즈의 40 eV 패스에너지를 이용하여 0~800 eV 범위를 스캔하였다. 도 6C에서 보듯이, 단백질에 의해 질소(N) 1s 피크가 측정되었으며, 이로부터 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)의 금나노입자 표면에는 MCAP 용액, 즉 아밀로이드 펩타이드가 코팅되어 있음을 확인할 수 있었다.

[0075] Filter paper를 적당한 크기로 잘라 petri dish 바닥에 깔고 그 위에 TEM grid를 올렸다. MCAP-AuNP 용액을 TEM grid 위에 떨어뜨린 후 petri dish에서 건조 시킨 후 TEM 이미지를 촬영하였다. 도 6D는 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)의 TEM 이미지 결과이다. 이러한 결과 역시 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)의 금나노입자 표면에 엔지니어드 아밀로이드 펩타이드가 코팅되어 있음을 나타낸다.

[0077] **<실시예 6> M^{pro}의 농도별 운동 분석(kinetic analysis)**

[0078] M^{pro}를 농도별(0.925~18.5 nM)로 PBS에 20분간 용해하여 각 부피를 0.8 mL로 제조하였다. 상기 실시예 4에서 제조한 금나노입자용액(bare AuNP)과 50 μL 아밀로이드 펩타이드 용액으로 제조한 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)에 농도별 M^{pro} 용액을 혼합하여 총 부피가 총 부피가 1 mL가 되도록 하였다. MCAP-AuNP 및 M^{pro} 혼합물을 37℃에서 1시간 반응시킨 후, UV-vis 스펙트럼을 분광광도계로 측정하였다.

[0079] 도 7A에서 보듯이, M^{pro} 농도가 증가할수록 UV 피크가 오른쪽으로 이동하였다. M^{pro} 농도에 따른 금나노입자의 응집 정도를 정량화(A_{650}/A_{525})한 S자형 용량-반응 곡선을 도 7B에 도시하였다(EC_{50} : 1.96 nM). 이에 따라, 본 발명의 M^{pro} 억제제 스크리닝 기술은 기존 기술(~수 μM) 대비 1,000배 이하의 M^{pro} (~수 nM)를 사용하여 M^{pro} 억제제를 스크리닝할 수 있음을 확인하였다.

[0081] **<실시예 7> M^{pro} 억제제 스크리닝**

[0082] PBS(1.5% DSMO)에 다양한 농도로 용해된 M^{pro} 억제제(ebselen, hesperidin, hesperetin, lopinavir, leupeptin)에 50 ng의 M^{pro}를 첨가(1.4 nM)하여 용액의 총 부피를 800 μL로 제조하였다. 혼합물을 실온에서 20분간 반응시킨 후 200 μm 크기의 PVDF syringe filter(Biopil, China)에 여과하여 미반응 물질을 제거하였다. 600 μL의 최종 용액을 200 μL 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP) 용액에 첨가하고 37℃에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 UV-vis 스펙트럼을 분광광도계로 측정하였다. 입자의 응집 정도는 상대 흡광도(A_{650}/A_{525})로 분석하였다.

[0083] 도 8에서 보듯이, 각 약물의 IC_{50} 값은 ebselen 0.39 μM, hesperetin 43.14 μM, leupeptin 28.57 μM, lopinavir 10.7 μM, hesperidin 369.4 μM로 확인되었다.

[0084] M^{pro} 억제제의 작용을 검증하기 위해, PBS(10% DSMO)에 다양한 농도로 용해된 M^{pro} 억제제(leupeptin, lopinavir, hesperetin)에 12 μg의 M^{pro}를 첨가(1.4 nM)하여 용액의 총 부피를 500 μL로 제조하였다. 혼합물을 실온에서 20분간 반응시킨 후 200 μm 크기의 PVDF syringe filter(Biopil, China)에 여과하여 미반응 물질을 제거하였다. 이후, 1.88, 3.7, 5.66, 7.55, 9.43, 11.32 μM의 MCAP 용액에 70 μL의 혼합물을 첨가하여 최종 부피를 220 μL로 제조하였다. microplate reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP) 용액의 농도에 따른 M^{pro} 억제제에 의한 상대 흡광도(A_{650}/A_{525})를 분석하였다. 도 12와 같이 억제제 처리에 따른 효소 활성도는 Michaelis-Menten 방정식을 이용하여 분석하였다.

[0085] 도 9에 M^{pro} 처리에 따른 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)의 반응을 TEM으로 관찰한 이미지를 나타내었다. 도 9A는 M^{pro}와 반응시킨 엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)이고, 도 9B에 leupeptin 처리에 따른 반응 결과를, 도 9C에 lopinavir 처리에 따른 반응 결과를, 도 9D에 hesperetin처리에 따른 반응 결과를 TEM으로 관찰한 이미지를 나타내었다. 도 9에서 보듯이, 상기 M^{pro} 억제제 처리에 따라 M^{pro}의 활성이 억제되어,

엔지니어드 아밀로이드 나노복합체(MCAP-AuNP)에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

[0087] **<실시예 8> M^{pro}에 의한 절단되는 서열에 따른 엔지니어드 아밀로이드 펩타이드의 특성 확인**

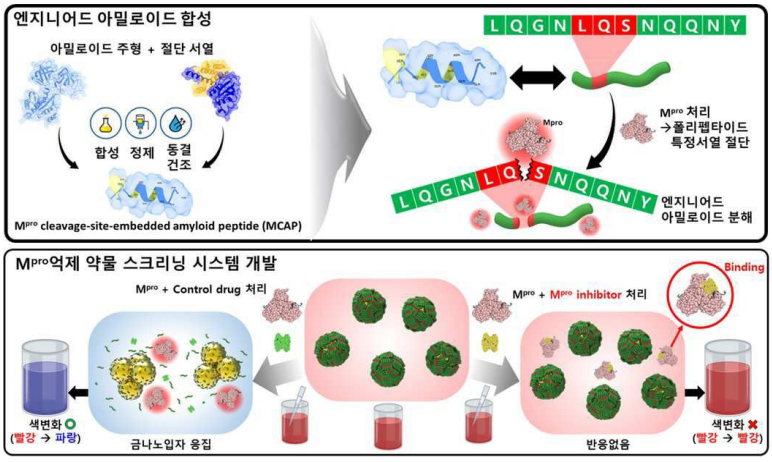
[0088] 본 실험에서는 M^{pro}에 의해 절단되는 서열인 L-Q-S, L-Q-A, L-Q-G를 연결하여 L-Q-S-L-Q-A-L-Q-G-L-Q-S-S 서열을 가진 펩타이드(M^{pro} cleavage-site-embedded repeated peptide, MCRP)를 제조하였다. 도 10A 및 도 10B에 본 발명의 엔지니어드 아밀로이드 펩타이드(M^{pro} cleavage site embedded amyloid peptide, MCAP, L-Q-G-N-L-Q-S-N-Q-Q-N-Y)와의 차이를 나타내었다.

[0089] 상기 실시예 4와 동일하게, 50 μL MCRP 용액과 40 μL 금나노입자 용액을 혼합하여 나노복합체를 제조하고, 1×PBS 600 μL를 첨가하여 salt resistance test를 24시간 수행하여 UV-vis 스펙트럼을 측정한 결과를 도 10C에 나타내었다. 실험 결과, 본 발명의 MCAP에 비해 나노복합체의 구조적 안정성이 불안정한 것을 확인하였으며, 특히 MCRP가 금나노입자의 표면을 코팅하지 못하여 금나노입자가 응집됨에 따라 흡광도가 오른쪽으로 이동한 것을 확인하였다. 즉, MCRP는 β-sheet의 아밀로이드 성질이 없어, 금나노입자 표면을 코팅하지 못하였다.

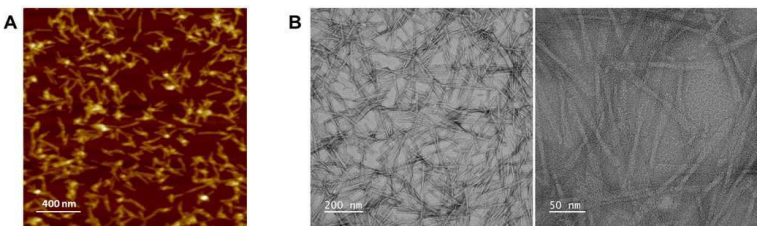
[0090] 또한, 상기 실시예 3과 같이 ThT 분석을 수행한 결과, 도 11에서 보듯이, 본 발명의 MCAP에 비해 ThT 신호가 확인되지 않았으며, 이는 β-sheet의 피브릴화 아밀로이드 펩타이드를 형성하지 못하기 때문으로 확인되었다.

도면

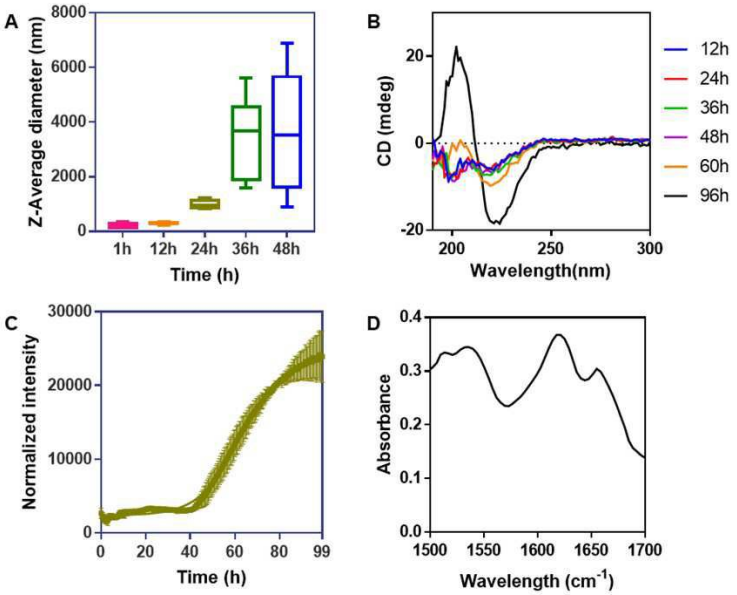
도면1



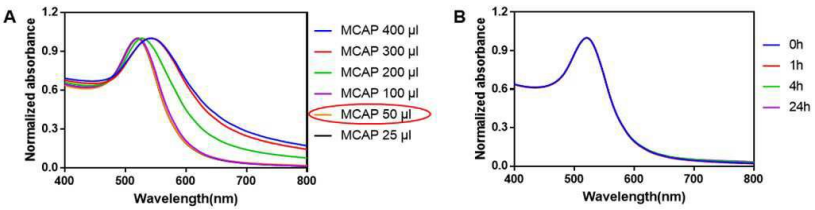
도면2



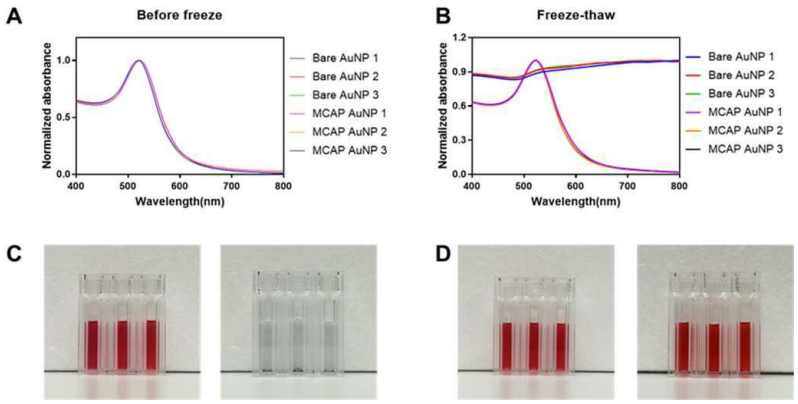
도면3


A
Z-Average diameter (nm)
8000
6000
4000
2000
0
1h
12h
24h
36h
48h
Time (h)
B
CD (mdeg)
20
0
-20
200
250
300
Wavelength(nm)
12h
24h
36h
48h
60h
96h
C
Normalized intensity
30000
20000
10000
0
0
20
40
60
80
99
Time (h)
D
Absorbance
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
1500
1550
1600
1650
1700
Wavelength (cm-1)

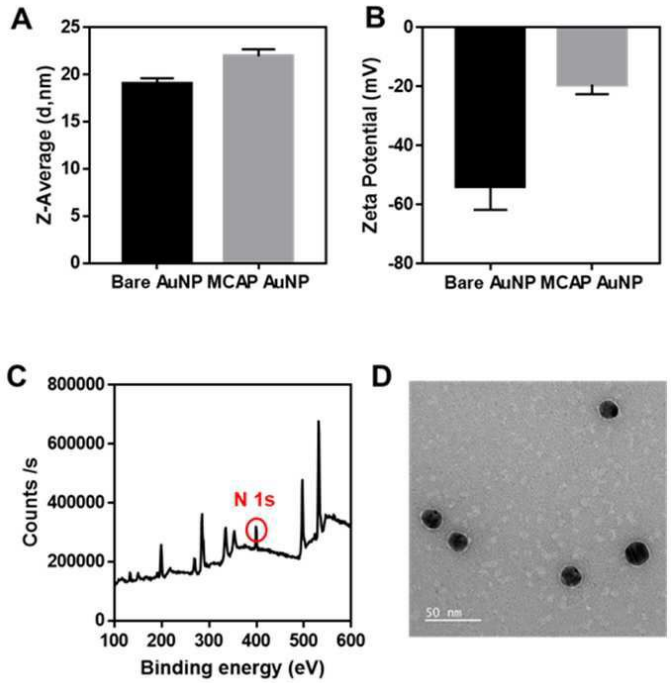
도면4


A
Normalized absorbance
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
400
500
600
700
800
Wavelength(nm)
MCAP 400 µl
MCAP 300 µl
MCAP 200 µl
MCAP 100 µl
MCAP 50 µl
MCAP 25 µl
B
Normalized absorbance
Wavelength(nm)
0h
1h
4h
24h

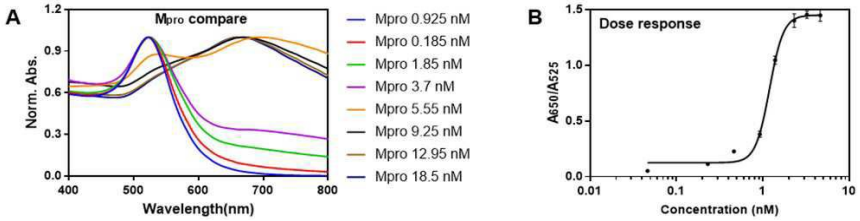
도면5


A
Before freeze
Normalized absorbance
1.0
0.5
0.0
400
500
600
700
800
Wavelength(nm)
Bare AuNP 1
Bare AuNP 2
Bare AuNP 3
MCAP AuNP 1
MCAP AuNP 2
MCAP AuNP 3
B
Freeze-thaw
Normalized absorbance
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
Wavelength(nm)
Bare AuNP 1
Bare AuNP 2
Bare AuNP 3
MCAP AuNP 1
MCAP AuNP 2
MCAP AuNP 3
C
D

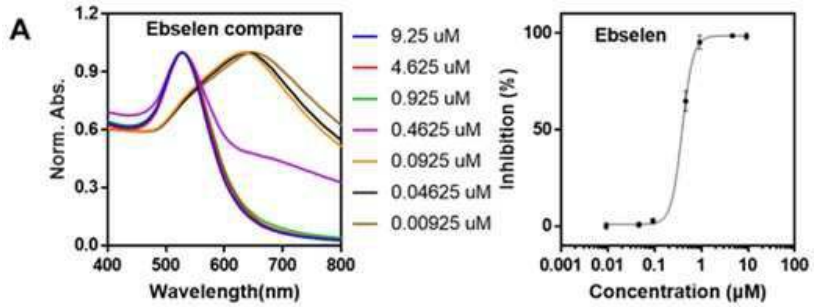
도면6


A
Z-Average (d,nm)
Bare AuNP MCAP AuNP
B
Zeta Potential (mV)
Bare AuNP MCAP AuNP
C
Counts /s
N 1s
Binding energy (eV)
D
50 nm

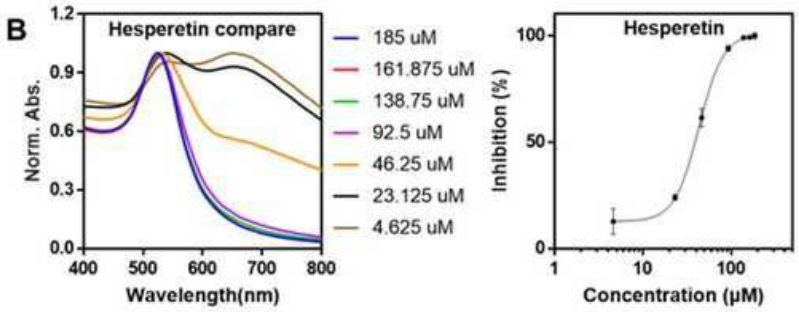
도면7


A
Mpro compare
Norm. Abs.
Wavelength(nm)
Mpro 0.925 nM
Mpro 0.185 nM
Mpro 1.85 nM
Mpro 3.7 nM
Mpro 5.55 nM
Mpro 9.25 nM
Mpro 12.95 nM
Mpro 18.5 nM
B
Dose response
A650/A525
Concentration (nM)

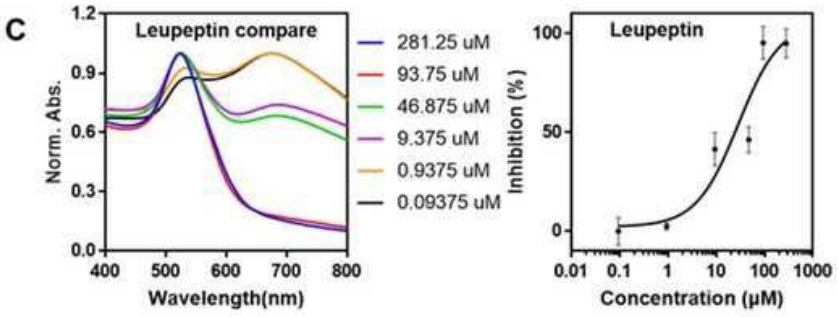
도면8a


A
Ebselen compare
Norm. Abs.
Wavelength(nm)
9.25 uM
4.625 uM
0.925 uM
0.4625 uM
0.0925 uM
0.04625 uM
0.00925 uM
Ebselen
Inhibition (%)
Concentration (μM)

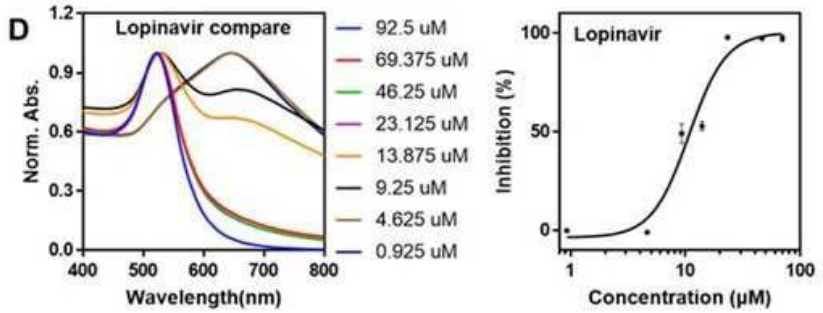
도면8b



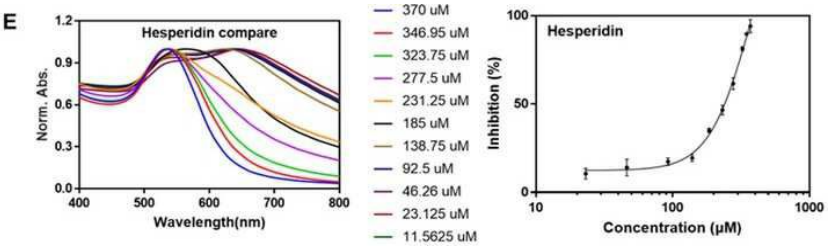
도면8c



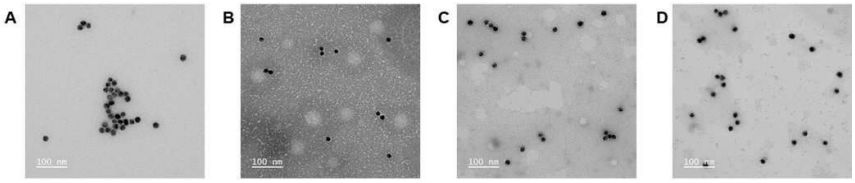
도면8d



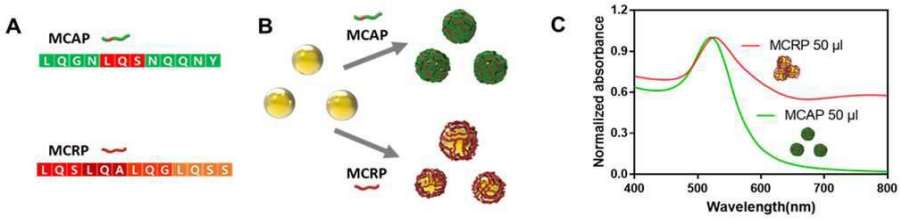
도면8e



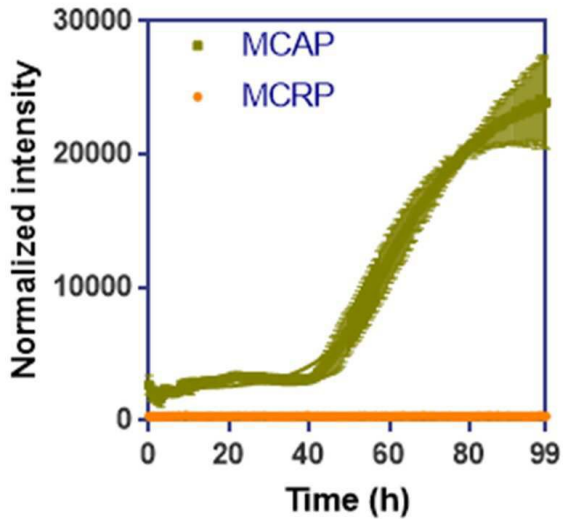
도면9



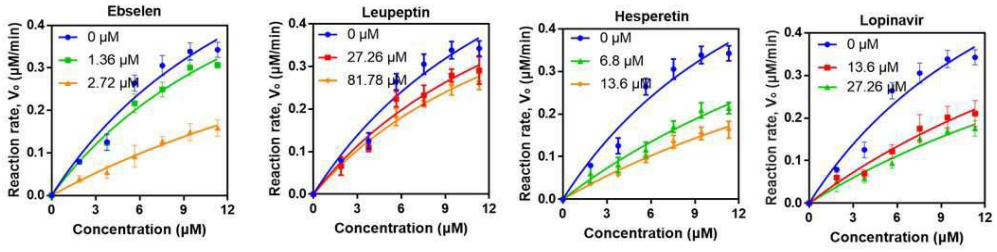
도면10



도면11



도면12



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

Korea University Research and Business Foundation, Sejong Campus

<120> Drug screening method for SARS-CoV-2 multi-variants treatment

<130> PN2202-129

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> prion

<400> 1

Gly Asn Asn Gln Gln Asn Tyr

1 5

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequences cleaved by the main proteases

<400> 2

Leu Gln Ser

1