



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년02월01일

(11) 등록번호 10-2631987

(24) 등록일자 2024년01월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**G01N 33/68** (2006.01) **G01N 33/53** (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
**G01N 33/6896** (2013.01)  
**G01N 33/5304** (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-0133625
- (22) 출원일자 2023년10월06일  
 심사청구일자 2023년10월06일
- (30) 우선권주장  
 1020220129004 2022년10월07일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌  
 KR10201110109128 A  
 (뒷면에 계속)

- (73) 특허권자  
 아밀로이드솔루션 주식회사  
 경기도 성남시 분당구 판교로255번길 58, 601호(삼평동)  
 연세대학교 산학협력단  
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자  
 김영수  
 인천광역시 연수구 컨벤시아대로130번길 100, 1803동 503호  
 조일환  
 충청남도 천안시 서북구 광장로 231, 104동 302호  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
 특허법인더웨이브

전체 청구항 수 : 총 24 항

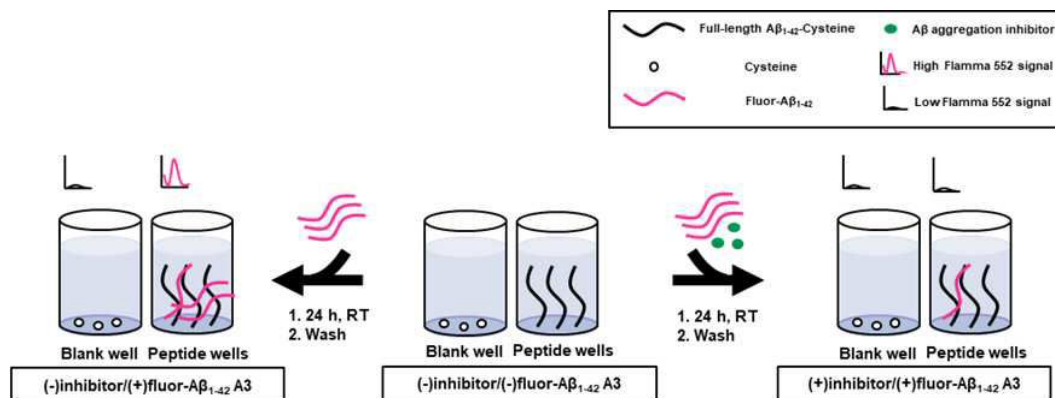
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 아밀로이드 단백질 응집 억제 또는 용해 후보물질 스크리닝 방법

## (57) 요약

아밀로이드 단백질 간 결합을 방해하거나 조절하는 약물 검색 및 약물의 표적 도메인을 검색하는 방법에 관한 것으로, 일 양상에 따른 아밀로이드 단백질 응집 억제 또는 용해 후보물질 스크리닝 방법에 의하면 기존의 알려진 아밀로이드 단백질 응집 저해제 또는 용해제 간의 효능을 비교할 수 있을뿐 아니라, 아밀로이드 단백질 응집 저해제 또는 용해제의 타겟 도메인들을 분석하고, 더 나아가 기전 규명까지 밝힐 수 있기 때문에 아밀로이드 단백질, 특히 A $\beta$ 의 단백질 서열에 특이적으로 응집을 풀어주는 저해제 또는 용해제 개발에 유용할 수 있다.

대표도 - 도9



- |  |   |
|--|---|
| <p>(52) CPC특허분류<br/> <i>G01N 2333/4709</i> (2013.01)<br/> <i>G01N 2500/00</i> (2013.01)</p> <p>(72) 발명자<br/> <b>김혜주</b><br/>         경기도 화성시 동탄문화센터로 39, 315동 1202호<br/> <b>김혜연</b><br/>         인천광역시 연수구 컨벤시아대로130번길 100, 180<br/>         3동 503호</p> | <p>(56) 선행기술조사문헌<br/>         KR1020040070221 A<br/>         KR1020070051342 A<br/>         US20070135334 A1<br/>         US20080268549 A1<br/>         NOVO, M. et al., Scientific Report, 2018, Vol. 8, pp 1-8.<br/>         ZHANG, S. et al., Biochemistry, 2021, Vol. 60, pp 1191-1200.</p> |
|--|---|

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345315659
과제번호	2018R1A6A1A03023718
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초연구기반기축사업
연구과제명	난치성 질환 치료를 위한 트랜스포톤 제어 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.10.06

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- (1) 제1 아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트를 제공하는 단계;
- (2-1) 단백질 응집 억제제 후보물질과 지표물질이 결합된 제2 아밀로이드 단백질을 상기 플레이트에 접촉시키는 단계; 또는
- (2-2) 지표물질이 결합된 제2 아밀로이드 단백질을 상기 플레이트에 접촉시킨 후 단백질 응집 용해제 후보물질을 처리하는 단계; 및,
- (3-1) 상기 (2-1) 단계에서 제1 아밀로이드 단백질과 제2 아밀로이드의 응집물을 측정하여 무처리 대조군 대비 변화시킨 응집 억제제 후보물질을 선별하는 단계; 또는
- (3-2) 상기 (2-2) 단계에서 제1 아밀로이드 단백질과 제2 아밀로이드의 응집물을 측정하여 무처리 대조군 대비 변화시킨 응집 용해제 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 단백질 응집 억제제 또는 응집 용해제를 스크리닝하는 방법.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 (2-1) 또는 (2-2) 단계는 제1 및 제2 아밀로이드 단백질의 응집을 유도하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 아밀로이드 단백질은 아밀로이드 베타, 타우 단백질, 또는 알파-시누클레인( $\alpha$ -cynuclein)인 것인 방법.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 제1 및 제2 아밀로이드 단백질은 자가조립(self-assembly)하는 것인 방법.

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 제1 또는 제2 아밀로이드 단백질은 전장 단백질 (full-length protein) 또는 단백질 단편인 것인 방법.

#### 청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 단백질 단편은 아밀로이드 단백질 내의 연속되는 6 내지 15mer인 것인 방법.

#### 청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 제1 아밀로이드 단백질은 시스테인을 통해 플레이트에 부착되는 것인 방법.

#### 청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 제1 아밀로이드 단백질은 단량체 형태를 유지하도록 플레이트에 부착되는 것인 방법.

#### 청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 지표물질은 형광물질인 것인 방법.

#### 청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 응집 억제제 후보물질은 제2 아밀로이드 단백질과 동시에 또는 순차적으로 처리되는 것인 방법.

#### 청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 응집 용해제 후보물질은 제1 아밀로이드 단백질과 제2 아밀로이드 단백질이 응집된 후 처리되는 것인 방법.

#### 청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 (1)의 제1 아밀로이드 단백질은 0.1  $\mu$ M 내지 10  $\mu$ M 범위 내의 농도 또는 20시간 내지 26시간 범위 내의 시간으로 플레이트에 처리되는 것인 방법.

#### 청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 (1)의 제1 아밀로이드 단백질은 25℃ 내지 35℃ 범위 내의 온도 또는 pH 5 내지 pH 8 범위 내 pH 조건으로 플레이트에 처리되는 것인 방법.

#### 청구항 14

청구항 1에 있어서, 상기 (2-1) 또는 (2-2)의 제2 아밀로이드 단백질은 5  $\mu$ M 내지 15  $\mu$ M 범위 내의 농도, 28℃ 내지 38℃ 범위 내의 온도 또는 pH 5 내지 pH 8 범위 내 pH 조건으로 제1 아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트에 접촉시키는 것인 방법.

#### 청구항 15

청구항 1에 있어서, 상기 응집 억제제 또는 응집 용해제는 아밀로이드 베타, 타우 단백질, 또는 알파-시누클레인의 응집을 억제 또는 용해하는 것인 방법.

#### 청구항 16

청구항 1에 있어서, 상기 응집 억제제 또는 응집 용해제는 퇴행성 뇌질환 치료제인 것인 방법.

#### 청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 전임상 알츠하이머병(preclinical alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 경도인지장애(mild cognitive impairment), 대뇌 아밀로이드 백관병증, 다운증후군, 아밀로이드성 뇌졸중(stroke), 전신성 아밀로이드증, 더취(Dutch)형 아밀로이드증, 니만-픽병(Niemann-Pick disease), 노인성 치매, 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 척수소뇌성 운동실조증(spino cerebellar atrophy), 뚜렛 증후군(Tourette's syndrome), 프리드리히 보행실조(Friedrich's ataxia), 마차도-조셉병(Machado-Joseph's disease), 루이 소체 치매(Lewy body dementia), 근육긴장이상(dystonia), 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy) 및 전두측두엽 치매(frontotemporal dementia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 방법.

#### 청구항 18

제1 아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트; 및

지표물질이 결합된 제2 아밀로이드 단백질을 포함하고,

상기 제1 및 제2 아밀로이드 단백질은 자가조립되는 것인, 단백질 응집 억제제 또는 응집 용해제를 스크리닝 하기 위한 키트.

#### 청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 제1 아밀로이드 단백질은 전장 단백질 또는 단백질 단편인 것인 키트.

#### 청구항 20

(1) 복수 개의 제1 아밀로이드 단백질 단편이 부착된 플레이트를 제공하는 단계;

(2-1) 단백질 응집 억제제 후보물질과 지표물질이 결합된 제2 아밀로이드 단백질을 상기 플레이트에 접촉시키는

단계; 또는

(2-2) 지표물질이 결합된 제2 아밀로이드 단백질을 상기 플레이트에 접촉시킨 후 단백질 응집 용해제 후보물질을 처리하는 단계;

(3-1) 상기 (2-1) 단계에서 제1 아밀로이드 단백질과 제2 아밀로이드의 응집물을 측정하는 단계; 또는

(3-2) 상기 (2-2) 단계에서 제1 아밀로이드 단백질과 제2 아밀로이드의 응집물을 측정하는 단계를 포함하는 아밀로이드 단백질 응집 억제제 후보물질 또는 응집의 용해제 후보물질이 작용하는 부위를 스크리닝하는 방법.

#### 청구항 21

청구항 20에 있어서, 상기 (2-1) 또는 (2-2) 단계는 제1 및 제2 아밀로이드 단백질의 응집을 유도하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 22

청구항 20에 있어서, 상기 아밀로이드 단백질은 아밀로이드 베타, 타우 단백질, 또는 알파-시누클레인인 것인 방법.

#### 청구항 23

청구항 20에 있어서, 상기 단백질 단편은 아밀로이드 단백질 내의 연속되는 6 내지 15mer이고, 상기 복수개의 단백질 단편은 연속되는 2개 이상의 중첩되는 아미노산 잔기를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 24

청구항 23에 있어서, 응집 저해 또는 응집 용해 정도가 높게 측정되는 단백질 단편을 후보물질의 작용부위로 판정하는 단계를 더 포함하는 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 아밀로이드 단백질의 응집 억제제(inhibitor) 또는 용해제(disaggregator)를 스크리닝하는 방법, 키트 및 아밀로이드 단백질 응집 억제제 또는 용해제의 응집 억제 또는 용해 작용 부위를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 아밀로이드증(amyloidosis)은 아밀로이드(amyloid)로 불리는 비정상적인 단백질이 조직에 축적되어 나타나는 질환이다. 아밀로이드는 7-13 nm의 직경 및 베타 시트( $\beta$ -sheet) 구조를 가지고 현미경 하에서 보면 섬유성 형태로 나타나는 단백질 덩어리로, Thioflavin T(ThioT) 및 콩고 레드(congo red)에 의해 염색되는 특징을 가지고 있다. 아밀로이드는 정상적인 체내에서 발견되지 않으며, 현재까지 36가지 단백질이 이를 형성할 수 있음이 보고되어 있다(Picken, Acta Haematol.(2020), 143:322-334). 대표적인 아밀로이드증에는 알츠하이머 병(Alzheimer's disease), 파킨슨 병(Parkinson's disease), 헌팅턴 병(Huntington disease) 및 프라이온 병(prion disease)등의 신경질환이 포함되며, 그 외에도 원인 단백질과 영향받은 장기에 따라 다양한 양상을 가지는 다수의 아밀로이드증이 존재한다.

[0003] 이러한 아밀로이드증 중 하나인, 알츠하이머병의 중요한 병리적 특징은 노인성 플라크(senile plaque)라고 불리는 펩티드 응집체의 형성이며, 이는 시냅스 기능장애 및 신경세포의 사멸을 유발한다. 이러한 노인성 플라크의 성분 중 하나는 40-42 아미노산 길이의 아밀로이드-베타(amyloid-beta)이다. 아밀로이드-베타 단량체는 올리고머, 원섬유(protofibril) 및 베타-시트가 풍부한 섬유로 자가조립(self-assemble)되기 쉽고, 신경 독성의 발병과 관련이 있다.

[0004] 아밀로이드-베타 플라크와 신경 독성 사이의 상관관계에 대해서는 아직 명확히 밝혀진 바가 없지만, 아밀로이드-베타의 중간 올리고머 또는 응집체로의 자가 조립은 알츠하이머병과 같은 뇌신경 질환의 발병과 관련된 것으로 여겨지고 있다.

[0005] 그러나 현재까지 개발된 아밀로이드성 질병 치료제의 대다수는 환자에게 면역 반응을 일으키는 A $\beta$  단편(fragment) 또는 A $\beta$  내의 특정 에피토프(epitope)에 대한 항체를 사용하거나 케미컬 의약품을 적용하는 방식을 채용하고 있다. 케미컬 의약품의 경우에는 현재까지 아밀로이드성 질병에 대한 근본적인 치료제는 부재한 상태이다.

[0006] 따라서, 본 발명자들은 아밀로이드 단백질, 특히 아밀로이드 베타 플라크 생성을 억제하는 퇴행성 뇌질환 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하기 위해 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 일 양상은 아밀로이드 단백질의 응집을 억제, 저해 또는 용해하는 물질을 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 다른 양상은 아밀로이드 단백질의 응집을 억제, 저해 또는 용해하는 물질을 스크리닝하는 키트를 제공하는 것이다.

[0009] 또 다른 양상은 아밀로이드 단백질의 응집을 억제, 저해 또는 용해하는 물질의 응집 억제 또는 용해 작용 부위를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 아밀로이드 단백질의 응집 억제제 또는 응집 용해제를 스크리닝하는 방법, 예를 들어 퇴행성 뇌질환을 갖고 있거나 또는 퇴행성 뇌질환이 발생할 위험이 있는 대상체에서 퇴행성 뇌질환을 치료하거나 예방하기 위해 아밀로이드 단백질 응집 억제제 또는 용해제 후보 물질을 스크리닝하는 방법 및 키트를 제공한다.

[0011] 일 양상은 (1) 제1 아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트를 제공하는 단계;

[0012] (2-1) 단백질 응집 억제제 후보물질과 지표물질이 결합된 제2 아밀로이드 단백질을 상기 플레이트에 접촉시키는 단계; 또는 (2-2) 지표물질이 결합된 제2 아밀로이드 단백질을 상기 플레이트에 접촉시킨 후 단백질 응집 용해제 후보물질을 처리하는 단계; 및, (3-1) 상기 (2-1) 단계에서 제1 아밀로이드 단백질과 제2 아밀로이드의 응집물을 측정하여 무처리 대조군 대비 변화시킨 응집 억제제 후보물질을 선별하는 단계; 또는 (3-2) 상기 (2-2) 단계에서 제1 아밀로이드 단백질과 제2 아밀로이드의 응집물을 측정하여 무처리 대조군 대비 변화시킨 응집 용해제 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 단백질 응집 억제제 또는 응집 용해제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0013] 일 구체예에 있어서, 상기 (2-1) 또는 (2-2) 단계는 제1 및 제2 아밀로이드 단백질의 응집을 유도하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0014] 일 구체예에 있어서, 상기 단백질 응집 억제제 또는 응집 용해제를 스크리닝하는 방법은 상기 아밀로이드 단백질의 응집물을 변화시킨 물질 또는 무처리 대조군에 비해 아밀로이드 단백질의 응집물을 변화시킨 후보 물질을 아밀로이드 단백질 응집 억제제 또는 응집 용해제로서 선별하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0015] 본 명세서에서 “아밀로이드 단백질”은 베타 평판 구조의 형태로 서로 엉켜 응집되는 단백질로, 아밀로이드 침착 형성이 가능한 단백질 또는 그 절편을 의미한다. 본 발명에서 아밀로이드 단백질은 아밀로이드 단백질 응집체를 구성하는 개별 단백질을 의미할 수 있다.

[0016] 일 구체예에 있어서, 상기 아밀로이드 단백질은 아밀로이드 베타, 타우 단백질, 알파-시누클레인, 프리온, 아밀로이드성 단백질, 아밀로이드 트랜스티레틴, 루이소체, 폴리글루타민, 토신 A 및 AIMP2 단백질일 수 있다.

[0017] 본 명세서에서 용어 “아밀로이드 베타(amyloid beta)”는 36 내지 43개 아미노산을 포함하는 펩타이드 분자로서, 아밀로이드 플라크의 주된 성분으로, 알츠하이머병의 발병에 관여하는 것으로 알려져 있다. 상기 아밀로이드 베타 펩타이드 분자는 응집하여 신경세포 독성 올리고머를 형성하여, 퇴행성 뇌질환을 유발한다. 상기 아밀로이드 베�타 펩타이드 분자는 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein (APP); UniProtKB P05067)을 베타 세크레타제(beta secretase)와 감마 세크레타제(gamma secretase)로 절단하여 얻어지는 것일 수 있다.

[0018] 일 구체예에 있어서, 상기 아밀로이드 단백질은 자가조립(self-assembly)하는 것일 수 있다.

- [0020] 본 명세서에서 용어 “아밀로이드 단백질 응집체”는 질환 상태와 연관되어 있는 아밀로이드 단백질 응집체 (aggregate)를 지칭한다. 이러한 질환 상태에는 세포의 사멸, 또는 2개 이상 세포들간 뉴런 신호전달의 부분적 이거나 완전한 상실이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 아밀로이드 단백질 응집체는 세포의 내부, 또는 세포의 외부에 위치할 수 있다. 구체적으로, 아밀로이드 단백질 응집체는 신경독성을 유발할 수 있고, 후술하는 퇴행성 뇌질환의 원인이 될 수 있다.
- [0021] 일 구체예에 있어서, 상기 아밀로이드 단백질 응집체는 아밀로이드 단백질의 중합체, 피브릴 전구체, 피브릴 (fibril), 플라크(plaque), 동중 단백질과 결합된 단백질 단량체 및 중합체를 포함할 수 있다. 상기 피브릴은 아밀로이드 단백질의 올리고머(oligomer)를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 자가조립 단백질은 수용성 아밀로이드 베타 응집체 및/또는 불수용성 아밀로이드 베타 응집체, 아밀로이드 베타 올리고머, 아밀로이드 베타 프로토피브릴(protofibril), 아밀로이드 베타 피브릴(fibril), 및 아밀로이드 베타 플라크(plaque)일 수 있다.
- [0023] 일 구체예에 있어서, 상기 제1 또는 제2 아밀로이드 단백질은 전장 단백질 (full-length protein) 및/또는 단백질 단편(fragment)인 것일 수 있다.
- [0024] 일 구체예에 있어서, 상기 전장 단백질은 아밀로이드 베타<sub>1-36</sub>, 아밀로이드 베타<sub>1-38</sub>, 아밀로이드 베타<sub>1-40</sub>, 또는 아밀로이드 베타<sub>1-42</sub> 펩타이드인 것일 수 있다.
- [0025] 본 명세서에서 용어 “단백질 단편(fragment)”는 단백질의 절단형을 의미한다. 구체적으로, 상기 단백질 단편은 상기 전장 단백질의 절단된 일부분을 의미한다.
- [0026] 일 구체예에 있어서, 상기 단백질 단편은 아밀로이드 단백질 내의 연속되는 단백질일 수 있다. 구체적으로, 아밀로이드 단백질 내의 연속되는 6 내지 15mer인 것일 수 있다.
- [0027] 일 구체예에 있어서, 상기 단백질 단편은 6 내지 15mer인 것일 수 있다.
- [0028] 일 구체예에 있어서, 상기 단백질 단편은 6 내지 14mer인 것일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 단백질 단편은 6 내지 13mer인 것일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 단백질 단편은 6 내지 12mer인 것일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 단백질 단편은 6 내지 11mer인 것일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 단백질 단편은 6 내지 10mer인 것일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 단백질 단편은 6 내지 9mer인 것일 수 있다.
- [0029] 일 구체예에 있어서, 상기 단백질 단편은 아밀로이드 베타 6mer(이하, 아밀로이드 베타 육량체라고도 함.)인 것일 수 있다.
- [0030] 상기 단백질 단편은 DAEFRH일 수 있다. 상기 단백질 단편은 AEFRHD일 수 있다. 상기 단백질 단편은 EFRHDS일 수 있다. 상기 단백질 단편은 FRHDSG일 수 있다. 상기 단백질 단편은 RHDSGY일 수 있다. 상기 단백질 단편은 HDSEY일 수 있다. 상기 단백질 단편은 DSGYEV일 수 있다. 상기 단백질 단편은 SGYEVH일 수 있다. 상기 단백질 단편은 GYEVHH일 수 있다. 상기 단백질 단편은 YEVHHQ일 수 있다. 상기 단백질 단편은 EVHHQK일 수 있다. 상기 단백질 단편은 VHHQKL일 수 있다. 상기 단백질 단편은 HHQKLV일 수 있다. 상기 단백질 단편은 HQKLVF일 수 있다. 상기 단백질 단편은 QKLVFF일 수 있다. 상기 단백질 단편은 KLVFFA일 수 있다. 상기 단백질 단편은 LVFFAE일 수 있다. 상기 단백질 단편은 VFFAED일 수 있다. 상기 단백질 단편은 FFAEDV일 수 있다. 상기 단백질 단편은 FAEDVG일 수 있다. 상기 단백질 단편은 AEDVGS일 수 있다. 상기 단백질 단편은 EDVGSN일 수 있다. 상기 단백질 단편은 DVGSNK일 수 있다. 상기 단백질 단편은 DVGSNG일 수 있다. 상기 단백질 단편은 VGSNGA일 수 있다. 상기 단백질 단편은 GSNGAI일 수 있다. 상기 단백질 단편은 SNGAII일 수 있다. 상기 단백질 단편은 NGAIIG일 수 있다. 상기 단백질 단편은 GAIIGL일 수 있다. 상기 단백질 단편은 AIIGLM일 수 있다. 상기 단백질 단편은 IIGLMV일 수 있다. 상기 단백질 단편은 IGLMVG일 수 있다. 상기 단백질 단편은 GLMVGK일 수 있다. 상기 단백질 단편은 LMVGKV일 수 있다. 상기 단백질 단편은 MVGKVV일 수 있다. 상기 단백질 단편은 VGVVVI일 수 있다. 상기 단백질 단편은 GGVVIA일 수 있다.
- [0032] 일 구체예에 있어서, 상기 제1 아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트를 제공하는 단계에 있어서, 제1 아밀로이드 단백질은 C말단에 결합된 시스테인으로 플레이트에 부착되는 것일 수 있다. 구체적으로, 전장 단백질 아밀로이드 베타<sub>1-42</sub> 또는 아밀로이드 베타 육량체는 C말단에 결합된 시스테인을 통해 플레이트에 부착되는 것일 수 있다.
- [0033] 일 구체예에 있어서, 상기 시스테인은 대칭 무수화물 활성화(systemic anhydride activation)을 통해 제1 아밀로이드 단백질의 C-말단에 결합된 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 아밀로이드 단백질의 C- 또는 N-말



단에 시스테인의 결합은 통상의 당업자에게 자명한 방법으로 수행될 수 있다.

- [0034] 일 구체예에 있어서, 상기 아밀로이드 단백질 C-말단에 시스테인이 결합된 펩타이드는 고체상 펩타이드 합성 방법을 통해 합성되는 것일 수 있다. 구체적으로, 마이크로파를 이용한 9-플루오렌닐메틸옥시카르보닐 고체상 펩타이드 합성에 의한 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 일 구체예에 있어서, C-말단에 시스테인 결합된 전장 아밀로이드 베타<sub>1-42</sub> 또는 아밀로이드 베타 육량체는 대칭 무수화물 활성화(systemic anhydride activation)을 통해 C-말단에 시스테인(cysteine)을 결합시킨 후, 마이크로파를 이용한 9-플루오렌닐메틸옥시카르보닐 고체상 펩타이드 합성으로 제조될 수 있다.
- [0036] 일 구체예에 있어서, 상기 C-말단에 시스테인 결합된 전장 아밀로이드 베타<sub>1-42</sub> 또는 아밀로이드 베타 육량체는 C-말단에 시스테인이 플레이트의 작용기와 반응하여 부착될 수 있고, 구체적으로 말레이미드(maleimide) 및 이의 유도체, 아지리딘 및 이의 유도체, 아크릴로일 및 이의 유도체, 또는 아릴할라이드 및 이의 유도체와 반응하여 부착될 수 있다.
- [0037] 일 구체예에 있어서, 상기 제1 아밀로이드 단백질은 단량체 형태로 플레이트에 부착되고, 제2 아밀로이드 단백질과 접촉하여 응집체를 이루기 전에 단량체 형태를 유지하도록 플레이트에 부착된 것일 수 있다.
- [0038] 일 구체예에 있어서, 상기 방법은 (1) C말단에 결합된 시스테인을 통해 전장 아밀로이드 베타<sub>1-42</sub> 또는 아밀로이드 베타 육량체가 부착된 플레이트를 제공하는 단계; (2-1) 상기 플레이트에 단백질 응집 억제제 후보물질과 지표물질이 결합된 전장 아밀로이드 베타<sub>1-42</sub>를 접촉시키는 단계, 또는 (2-2) 지표물질이 결합된 전장 아밀로이드 베타<sub>1-42</sub>를 접촉시킨 후, 단백질 응집 용해제 후보물질을 처리하는 단계; 및, (3-1) 무처리 대조군 대비 아밀로이드 베타 간의 응집을 억제하는 응집 억제제 후보물질을 선별하는 단계; 또는 무처리 대조군 대비 응집된 아밀로이드 베타 간의 응집을 용해시키는 응집 용해제 후보물질을 선별 단계를 포함하는 단백질 응집 억제제 또는 응집 용해제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0039] 상기 방법은 아밀로이드 베타 간의 응집률을 측정하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0040] 일 구체예에 있어서, 상기 제2 아밀로이드 단백질을 접촉시키는 단계는 제1 아밀로이드 단백질과 응집을 유도하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0042] 일 구체예에 있어서, 상기 제2 아밀로이드 단백질은 지표물질과 결합된 것일 수 있다.
- [0043] 상기 지표물질은 제1 아밀로이드 단백질에 제2 아밀로이드 단백질간 결합정도를 측정하기 위한 것; 및 응집 억제제, 응집 용해제, 응집 억제제 후보물질 또는 응집 용해제 후보물질에 의해 제1 아밀로이드 단백질 및 제2 아밀로이드 단백질의 응집 억제능 또는 응집 용해능, 구체적으로 응집 저해정도 또는 응집 용해 정도를 측정하기 위한 것일 수 있다.
- [0044] 일 구체예에 있어서, 상기 지표물질은 형광물질 또는 형광 단백질 단편인 것일 수 있다.
- [0045] 일 구체예에 있어서, 상기 형광물질은 로다민, 쿠마린, 에보블루(EvoBlue), 옥사진, 카보피로닌, 나프탈렌, 비페닐, 안트라센, 페난트렌, 피렌 또는 카바졸을 기본 골격으로 갖는 형광염료 또는 상기 형광염료의 유도체일 수 있다.
- [0046] 구체적으로, 상기 형광물질은 플루오레세인(Fluorescein), CR110:카복시로다민 110:로다민 그린(상표명), TAMRA:카복시테트라메틸로다민: TMR, 카복시로다민 6G : CR6G, BODIPY FL(상표명) : 4,4-디플루오로-5,7-디메틸-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-프로피온산, BODIPY 493/503(상표명) : 4,4-디플루오로-1,3,5,7-테트라메틸-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-8-프로피온산, BODIPY R6G(상표명) : 4,4-디플루오로-5-(4-페닐-1,3-부타디에닐)-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-프로피온산, BODIPY 558/568(상표명) : 4,4-디플루오로-5-(2-티에닐)-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-프로피온산, BODIPY 564/570(상표명) : 4,4-디플루오로-5-스티릴-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-프로피온산, BODIPY 576/589(상표명) : 4,4-디플루오로-5-(2-피롤릴)-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-프로피온산, BODIPY 581/591(상표명) : 4,4-디플루오로-5-(4-페닐-1,3-부타디에닐)-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-프로피온산, EvoBlue10(상표명), EvoBlue30(상표명), MR121, ATTO 655(상표명), ATTO 680(상표명), ATTO 700(상표명), ATTO MB2(상표명), Alexa Fluor 350(상표명), Alexa Fluor405(상표명), Alexa Fluor 430(상표명), Alexa Fluor 488(상표명), Alexa Fluor 532(상표명), Alexa Fluor546(상표명), Alexa Fluor 555(상표명), Alexa Fluor 568(상표명), Alexa Fluor 594(상표명), Alexa



Fluor633(상표명), Alexa Fluor 680(상표명), Alexa Fluor 700(상표명), Alexa Fluor 750(상표명), Alexa Fluor790(상표명), Flamma 496(상표명), Flamma 507(상표명), Flamma 530(상표명), Flamma 552(상표명), Flamma560(상표명), Flamma 575(상표명), Flamma 581(상표명), Flamma 648(상표명), Flamma 675(상표명), Flamma749(상표명), Flamma 774(상표명), Flamma 775(상표명), Rhodamine Red-X(상표명), Texas Red-X(상표명), 5(6)-TAMRA-X(상표명), 5TAMRA(상표명), Indocyanine green (ICG) 및 2-((E)-2-((E)-2-(4-(2-carboxyethyl)phenoxy)-3-((E)-2-(3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(3-(tri-methyl ammonio)-propyl)indolin-2-ylidene)ethylidene)cyclohex-1-enyl)vinyl)-3,3-dimethyl-1-(3-(trimethyl ammonio)-propyl)-3H-indolium-5-sulfonate disodium bromide (ZW800-1)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0047] 일 구체예에 있어서, 상기 형광 단백질 단편은 venus, Cerulean, Citrine, mKate가 있으며 서로 다른 색깔을 띄는 형광 단백질들이거나, 또는 그 일부인 것일 수 있다.

[0049] 본 명세서에서 용어 “아밀로이드 단백질 응집 억제제”는 아밀로이드 단백질의 집적을 억제하는 것을 의미하고, “아밀로이드 단백질 응집 용해제”는 이미 형성된 아밀로이드 단백질의 응집을 분해하는 물질을 의미할 수 있다. 상기 응집 억제제 또는 응집 용해제는 아밀로이드 단백질의 자가조립(self-assembly)을 억제하거나 이미 형성된 자가조립 단백질의 응집을 분해하는 물질을 의미할 수 있다. 구체적으로, 수용성 단백질 응집체 및/또는 불수용성 단백질 응집체의 집적을 억제(inhibit aggregation)하거나 용해(disaggregate)하는 물질을 의미할 수 있다.

[0050] 일 구체예에 있어서, 상기 응집 억제제 또는 응집 용해제는 아밀로이드 베타, 타우 단백질, 또는 알파-시누클레인( $\alpha$ -cynuclein)의 응집을 억제 또는 용해하는 것일 수 있다.

[0051] 일 구체예에 있어서, 상기 응집 억제제는 아밀로이드의 섬유화(amyloid fibrillation) 및 아밀로이드 섬유 응집을 억제하는 것이며, 응집 용해제는 응집된 응집체를 분해(dissociation)의 의미를 포함한다. 구체적으로, 수용성 아밀로이드 베타 응집체 및/또는 불수용성 아밀로이드 베타 응집체, 아밀로이드 베타 올리고머, 아밀로이드 베타 프로토프ibril(protofibril), 아밀로이드 베타 fibril(fibril), 및 아밀로이드 베타 플라크(plaque) 등을 용해하거나 집적을 억제하는 물질이다.

[0052] 일 구체예에 있어서, 상기 아밀로이드 단백질 응집 억제제 또는 응집 용해제는 퇴행성 뇌질환 치료제일 수 있다.

[0053] 일 구체예에 있어서, 상기 응집 억제제 또는 응집 억제제 후보물질은 제2 아밀로이드 단백질과 동시에 또는 순차적으로 처리되는 것일 수 있다.

[0054] 일 구체예에 있어서, 상기 응집 억제제는 제2 아밀로이드 단백질과 동시에 처리되는 것일 수 있다. 구체적으로, 아밀로이드 베타 응집 저해제 커큐민(curcumin) 또는 실로-이노시톨(scyllo-inositol)은 fluor- $A\beta_{1-42}$ 과 동시에 처리되는 것일 수 있다.

[0055] 일 구체예에서, 상기 응집 용해제 또는 응집 용해제 후보물질은 제1 아밀로이드 단백질 및 제2 아밀로이드 단백질을 응집시킨 후, 처리되는 것일 수 있다.

[0056] 구체적으로, 아밀로이드 베타 응집 용해제는 네크로스타틴-1(necrostatin-1) 및 수니티닙(sunitinib)은 fluor- $A\beta_{1-42}$ 과 순차적으로, 예를 들어 24시간 후에 처리되는 것일 수 있다.

[0057] 상기 단백질 응집 억제제 또는 응집 용해제는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료에 사용되어 (1)아밀로이드 베타의 축적, (2) 뇌세포의 노화, (3) 시냅스의 손실, (4)말초 면역 세포 축적과 같은 퇴행성 뇌질환, 구체적으로 알츠하이머 병의 병리적 증상을 완화시키는 것일 수 있다.

[0058] 본 명세서에서 용어 "퇴행성 뇌질환"은 뇌의 퇴행성 변화와 관련된 모든 질환, 특히, 뇌 및/또는 뇌신경세포에서의 아밀로이드-베타의 응집 등의 요인에 의하여 유발될 수 있는 모든 질환 (뇌질환)을 포괄적으로 기재하기 위하여 사용된다. 일 구체예에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 전임상 알츠하이머병(preclinical alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 경도인지장애(mild cognitive impairment), 대뇌 아밀로이드 맥관병증, 다운증후군, 아밀로이드성 뇌졸중(stroke), 전신성 아밀로이드증, 더취(Dutch)형 아밀로이드증, 니만-픽병(Niemann-Pick disease), 노인성 치매, 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 척수소뇌성 운동실조증(spino cerebellar atrophy), 뚜렛 증후군(Tourette's syndrome), 프리드리히 보행실조(Friedrich's ataxia), 마차도-조셉병(Machado-Joseph's disease), 루이 소체 치매(Lewy body dementia), 근육긴장이상(dystonia), 진행성 핵상 마

비(progressive supranuclear palsy) 및 전두측두엽 치매(frontotemporal dementia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다. 바람직하게, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병일 수 있다.

- [0059] 본 명세서에서 용어 "알츠하이머병"이란 노인성 치매와 호환적으로 사용되고, 노인성 플라크, 신경염증 엉킴(tangles), 및 진행성 신경 손실로 특징되는 특정 퇴행성 뇌질환과 관련된 정신적인 퇴화를 수반하는 질병을 의미할 수 있다.
- [0060] 본 명세서에서 용어 "파킨슨병"이란 종종 운동 기능 및 언어능력을 손상시키는 중추 신경계의 만성 및 진행성 퇴행성 질환을 의미할 수 있다.
- [0061] 본 명세서에서 용어 "헌팅턴병"이란 헌팅턴 단백질을 암호화하는 유전자 내 3 염기 반복 팽창에 의해 야기되어, 무도증, 정신이상, 치매 등이 수반되는 신경퇴행성 질환을 의미할 수 있다.
- [0062] 본 명세서에서 용어 "루게릭병"이란 운동신경세포만 선택적으로 사멸되는 질환으로 대뇌 피질의 상위운동신경세포와 뇌간 및 척수의 하위운동신경세포 모두가 점차적으로 파괴되는 질환을 의미할 수 있다.
- [0063] 본 명세서에서 용어 "픽병(pick's disease)"는 뇌의 신경세포의 진행성 파괴를 나타내는 질환을 의미할 수 있다.
- [0064] 본 발명의 용어 "타우병증"이란 타우 단백질(세포 내 마이크로튜불-관련 단백질과 밀접하게 관련된 패밀리)이 뇌조직에 비정상적으로 축적됨에 의하여 뇌신경이 손상되는 신경퇴행성 질환을 의미할 수 있다.
- [0066] 일 구체예에 있어서, 상기 방법은 C말단에 결합된 시스템인으로 제1 아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트를 제공하는 단계;
- [0067] (2-1) 상기 플레이트에 단백질 응집 억제제 후보물질과 지표물질이 결합된 제2 아밀로이드 단백질을 접촉시키는 단계, 또는 (2-2) 지표물질이 결합된 제2 아밀로이드 단백질을 접촉시킨 후, 단백질 응집 용해제 후보물질을 처리하는 단계; 및, (3-1) 무처리 대조군 대비 제1 아밀로이드 단백질과 제2 아밀로이드 단백질 간의 응집을 억제하는 응집 억제제 후보물질을 선별하는 단계; 또는 무처리 대조군 대비 제1 아밀로이드 단백질과 제2 아밀로이드 단백질 간의 응집을 용해시키는 응집 용해제 후보물질을 선별 단계를 포함하는 단백질 응집 억제제 또는 응집 용해제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0068] 상기 방법은 제1 아밀로이드 단백질과 제2 아밀로이드 단백질 간의 응집률을 측정하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0070] 일 구체예에 있어서, 상기 제2 아밀로이드 단백질을 접촉시키는 단계는 제1 아밀로이드 단백질과 응집을 유도하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0071] 구체적으로, 전장 단백질 아밀로이드 베타<sub>1-42</sub> 또는 단백질 단편 아밀로이드 베타 육량체는 C말단에 결합된 시스템인으로 플레이트에 부착되는 것일 수 있다.
- [0072] 상기 제1 아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트를 제공하는 단계에 있어서, 플레이트에 처리되는 제1아밀로이드 단백질의 농도는 0.00001  $\mu\text{M}$  내지 50  $\mu\text{M}$ 일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 제1아밀로이드 단백질의 농도는 0.01  $\mu\text{M}$  내지 20  $\mu\text{M}$ 일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 제1아밀로이드 단백질의 농도는 0.1  $\mu\text{M}$  내지 15  $\mu\text{M}$ 일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 제1아밀로이드 단백질의 농도는 0.1  $\mu\text{M}$  내지 10  $\mu\text{M}$ 일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 제1 아밀로이드 단백질의 농도는 0.5  $\mu\text{M}$  내지 5  $\mu\text{M}$ 일 수 있다. 구체적으로, 상기 제1아밀로이드 단백질의 농도는 1  $\mu\text{M}$  일 수 있다. 상기 플레이트에 처리되는 제1아밀로이드 단백질의 농도가 0.1  $\mu\text{M}$ 이하의 경우에는 플레이트에 고정되는 제1아밀로이드 단백질의 고정 효과가 낮아 본 발명의 스크리닝 방법으로 사용하기가 어렵고, 플레이트에 처리되는 제1아밀로이드 단백질의 농도가 10  $\mu\text{M}$ 초과의 경우에는 플레이트에 고정되는 제1아밀로이드 단백질의 고정 효과가 포화(saturation)되고, 비특이적 결합 등 고정되지 않고 플레이트에 존재하는 제1아밀로이드 단백질의 농도가 높아져 응집을 측정에 오류를 발생시킬 수 있는 바, 본 발명의 제1아밀로이드 단백질의 농도는 0.1  $\mu\text{M}$  내지 10  $\mu\text{M}$ , 바람직하게는 0.5  $\mu\text{M}$  내지 5  $\mu\text{M}$ 이어야 한다.
- [0073] 일 구체예에 있어서, 상기 제1 아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트를 제공하는 단계에 있어서, 상기 제1아밀로이드 단백질은 플레이트에 처리하고 20℃ 내지 40℃에서 인큐베이션하여 플레이트에 부착된 것일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 아밀로이드 단백질은 25 내지 35℃에서 인큐베이션하여 플레이트에 부착된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 아밀로이드 단백질은 28 내지 32℃에서 인큐베이션하여 플레이트에 부착된 것일 수 있다. 상기 제1 아밀로이드 단백질을 25℃ 미만 또는 35℃초과에서 인큐베이션하여 부착시킬 경우, 플레이트에 부착 효율이 현저히 낮아 응집 억제제 또는 응집 용해제 스크리닝 방법에 적용할 수 없는 바, 제1 아밀로이드 단

백질은 플레이트에 처리하고 25℃ 내지 35℃, 바람직하게는 28 내지 32℃에서 인큐베이션하여 플레이트에 부착되어야 한다.

[0074] 일 구체예에 있어서, 상기 제1 아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트를 제공하는 단계에 있어서, 상기 제1아밀로이드 단백질은 플레이트에 처리하고 12내지 36시간동안 인큐베이션하여 플레이트에 부착되는 것일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 아밀로이드 단백질은 20 내지 26시간 동안 인큐베이션하여 플레이트에 부착되는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 제1아밀로이드 단백질은 23 내지 25시간 동안 인큐베이션하여 플레이트에 부착되는 것일 수 있다. 상기 아밀로이드 단백질을 20시간 미만으로 인큐베이션할 경우, 플레이트에 고정되는 제1아밀로이드 단백질의 고정 효과가 낮아 본 발명의 스크리닝 방법으로 사용하기가 어렵고, 26시간 이상으로 인큐베이션할 경우 고정 효과가 포화되므로, 실험의 신속성 및 사업성(경제성) 측면에서 상기 제1아밀로이드 단백질은 20 내지 26시간, 바람직하게 23 내지 25시간 동안 인큐베이션하여 플레이트에 부착되어야 한다.

[0075] 일 구체예에 있어서, 상기 제1 아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트를 제공하는 단계에 있어서, 상기 제1아밀로이드 단백질은 pH 4 내지 9에서 플레이트에 부착된 것일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 제1아밀로이드 단백질은 pH 5 내지 8에서 플레이트에 부착된 것일 수 있다. 구체적으로 제1아밀로이드 단백질은 pH 6.5 내지 7.2에서 플레이트에 부착된 것일 수 있다. 상기 제1 아밀로이드 단백질을 pH 5미만, pH 8 초과에서 플레이트에 부착할 경우, 제1아밀로이드 단백질의 고정 효과가 낮아 본 발명의 스크리닝 방법으로 사용시 스크리닝 효율이 떨어지므로, 제1아밀로이드 단백질은 pH 5 내지 pH 8, 바람직하게는 pH 6.5 내지 7.2에서 플레이트에 부착되어야 한다.

[0076] 일 구체예에 있어서, 상기 제2아밀로이드 단백질을 제1 아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트에 접촉시키는 단계에 있어서, 상기 제2아밀로이드 단백질은 제1 아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트에 1μM 내지 15μM 범위 내의 농도로 처리될 수 있다. 일 구체예에 있어서, 5μM 내지 15μM 범위 내의 농도로 처리될 수 있다. 구체적으로, 8μM 내지 12μM 범위 내의 농도로 처리될 수 있다. 상기 제2아밀로이드 단백질을 5μM 미만으로 처리할 경우, 제1 및 제2아밀로이드 단백질간 응집율이 낮아 본 발명의 스크리닝 방법으로 사용하기가 어렵고, 상기 제2아밀로이드 단백질을 15μM 초과하여 처리할 경우 비특이적 결합 등 제1아밀로이드 단백질과 응집되지 않고 플레이트에 존재하는 제2아밀로이드 단백질의 농도가 높아져 응집을 측정에 오류를 발생시킬 수 있는 바, 제2아밀로이드 단백질은 제1 아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트에 5μM 내지 15μM, 바람직하게는 8μM 내지 12μM로 처리되어야 한다.

[0077] 일 구체예에 있어서, 상기 제2아밀로이드 단백질을 제1아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트에 접촉시키는 단계에 있어서, 상기 제2아밀로이드 단백질은 제1 아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트에 처리하고 20℃ 내지 40℃에서 인큐베이션하여 제1 아밀로이드 단백질과 응집시킬 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 아밀로이드 단백질은 28 내지 38℃에서 인큐베이션하여 제1 아밀로이드 단백질과 응집시킬 수 있다. 구체적으로, 상기 아밀로이드 단백질은 30 내지 36℃에서 인큐베이션하여 제1 아밀로이드 단백질과 응집시킬 수 있다. 상기 제1 아밀로이드 단백질을 28℃ 미만 또는 38℃초과에서 인큐베이션하여 제1 아밀로이드 단백질과 응집시킬 경우, 제1 아밀로이드 단백질과 응집 효율이 현저히 낮아 응집 억제제 또는 응집 용해제 스크리닝 방법에 적용할 수 없는 바, 제2아밀로이드 단백질은 제1 아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트에 처리하고 28 내지 38℃, 바람직하게는 30 내지 36℃에서 인큐베이션하여 제1 아밀로이드 단백질과 응집시켜야 한다.

[0078] 일 구체예에 있어서, 상기 제2아밀로이드 단백질을 제1아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트에 접촉시키는 단계에 있어서, 상기 제2아밀로이드 단백질은 pH 4 내지 9에서 제1 아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트에 접촉시킬 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 제2아밀로이드 단백질은 pH 5 내지 8에서 제1 아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트에 접촉시킬 수 있다. 구체적으로, 상기 제2아밀로이드 단백질은 pH 7 내지 8에서 제1 아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트에 접촉시킬 수 있다. 상기 제2 아밀로이드 단백질을 pH 5미만, pH 8 초과에서 제1 아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트에 접촉시킬 경우, 제1아밀로이드 단백질과 응집 효과가 낮아 본 발명의 스크리닝 방법으로 사용하기가 어려운 바, 제2아밀로이드 단백질은 pH 5 내지 pH 8, 바람직하게는 pH 7 내지 pH 8에서 제1 아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트에 접촉시켜야 한다.

[0080] 다른 양상은 제1 아밀로이드 단백질이 부착된 플레이트; 및 지표물질이 결합된 제2 아밀로이드 단백질을 포함하는 단백질 응집 억제제 또는 응집 용해제를 스크리닝 하기 위한 키트를 제공한다.

[0081] 일 구체예에 있어서, 상기 제1 및 제2 아밀로이드 단백질은 전장 단백질(full-length protein)또는 단백질 단편인 것일 수 있다.

- [0082] 일 구체예에 있어서, 상기 제1 및 제2 아밀로이드 단백질은 자가조립되는 것일 수 있다.
- [0083] 상기 “자가조립 단백질”, “단백질 단편” “응집 억제제” 및 “응집 용해제”는 상기한 바와 같다.
- [0084] 일 구체예에 있어서, 상기 응집 억제제는 제2 아밀로이드 단백질과 동시에 또는 순차적으로 처리되는 것일 수 있다.
- [0085] 일 구체예에 있어서, 상기 응집 용해제는 제1 아밀로이드 단백질 및 제2 아밀로이드 단백질을 응집시킨 후, 처리되는 것일 수 있다.
- [0087] 본 발명은 아밀로이드 단백질 및 이의 단편을 이용하여, 아밀로이드 단백질 응집 억제제 또는 응집 용해제의 작용부위를 검색하는 방법, 예를 들어 퇴행성 뇌질환을 갖고 있거나 또는 퇴행성 뇌질환이 발생할 위험이 있는 대 상체에서 퇴행성 뇌질환을 치료하거나 예방하기 위해 아밀로이드 단백질 응집 억제제 또는 응집 용해제의 작용 부위(구체적으로, 작용 도메인)를 검색하는 방법을 제공한다.
- [0088] 다른 양상은 (1) 복수 개의 제1 아밀로이드 단백질 단편이 부착된 플레이트를 제공하는 단계; (2-1) 단백질 응 집 억제제 후보물질과 지표물질이 결합된 제2 아밀로이드 단백질을 상기 플레이트에 접촉시키는 단계; 또는 (2- 2) 지표물질이 결합된 제2 아밀로이드 단백질을 상기 플레이트에 접촉시킨 후 단백질 응집 용해제 후보물질을 처리하는 단계; (3-1) 상기 (2-1) 단계에서 제1 아밀로이드 단백질과 제2 아밀로이드의 응집물을 측정하는 단계; 또는 (3-2) 상기 (2-2) 단계에서 제1 아밀로이드 단백질과 제2 아밀로이드의 응집물을 측정하는 단계를 포함하는 아밀로이드 단백질 응집 억제제 후보물질 또는 응집의 용해제 후보물질이 작용하는 부위를 스크리닝하 는 방법을 제공한다.
- [0089] 상기 제1 아밀로이드 단편 및 제2 아밀로이드 단백질간 응집 저해 또는 용해 정도를 제1 아밀로이드 단백질 단 편별로 정렬하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0090] 일 구체예에 있어서, 상기 (2-1) 또는 (2-2) 단계는 제1 및 제2 아밀로이드 단백질의 응집을 유도하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0091] 일 구체예에 있어서, 상기 아밀로이드 단백질은 아밀로이드 베타, 타우 단백질, 또는 알파-시누클레인인 것일 수 있다.
- [0092] 일 구체예에 있어서, 상기 단백질 단편은 아밀로이드 단백질 내의 연속되는 6내지 15mer이고, 상기 복수 개의 단백질 단편은 연속되는 2개 이상의 중첩되는 아미노산 잔기를 포함하는 것일 수 있다. 응집물을 측정하는 단계 는 지표물질의 세기를 분석하여 단백질 단편별로 비교하여 분석한 것일 수 있다.
- [0093] 일 구체예에 있어서, 상기 방법은 응집 저해 또는 응집 용해 정도가 높게 측정되는 단백질 단편을 후보물질의 작용부위로 판정하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 응집 저해 또는 응집 용해 정도가 높게 측 정되는 하나의 단백질 단편을 작용부위로 판정하거나 또는 응집 저해 또는 응집 용해 정도가 높게 측정되는 복 수 개의 단백질 단편의 서로 중첩되는 아미노산 잔기를 작용부위로 판정하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 단백질 단편을 작용부위로 판정하는 단계는 실시예에 나타난 방법을 통해 단백질 단편별로 응 집 저해율(%) 또는 응집 용해율(%)을 비교해보았을 때, 상위 값을 나타내는 단백질 단편을 선택하는 단계를 포 함하는 것일 수 있다.
- [0094] 일 구체예에 있어서, 상기 작용부위는 아밀로이드 단백질 내 2개 이상 존재하는 것일 수 있다.
- [0095] 상기 “자가조립 단백질”, “단백질 단편” “응집 억제제” 및 “응집 용해제”는 상기한 바와 같다.
- [0096] 일 구체예에 있어서, 상기 아밀로이드 단백질은 아밀로이드 베타, 타우 단백질, 또는 알파-시누클레인( $\alpha$ -cynuclein)인 것일 수 있다.
- [0097] 일 구체예에 있어서, 상기 단백질 단편은 6 내지 15mer인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 단백질 단편은 6mer 인 것일 수 있다.
- [0098] 일 구체예에 있어서, 상기 응집 억제제 또는 응집 억제제 후보물질은 제2 아밀로이드 단백질과 동시에 또는 순 차적으로 처리되는 것일 수 있다.
- [0099] 일 구체예에 있어서, 상기 응집 용해제 또는 응집 용해제 후보물질은 제1 아밀로이드 단백질 및 제2 아밀로이드 단백질을 응집시킨 후, 처리되는 것일 수 있다.



[0100] 일 구체예에 있어서, 상기 아밀로이드 단백질 응집 억제제 후보물질 또는 응집의 용해제 후보물질이 작용하는 부위를 스크리닝하는 방법은 A $\beta$  응집 저해제 또는 용해제의 타겟 사이트(target site)를 예측하고 분석하는데 사용되는 분자 도킹 시뮬레이션(molecular docking simulation) 연구 결과들을 검증에 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 합리적 디자인(rational design) 방법을 활용하여 A $\beta$ 의 서열에 특이적으로 응집을 억제하거나 풀어주는 응집 억제제 또는 용해제 개발에 사용될 수 있다.

### 발명의 효과

[0101] 일 양상에 따른 아밀로이드 단백질 응집 억제 또는 용해 후보물질 스크리닝 방법에 의하면 기존의 알려진 아밀로이드 단백질 응집 저해제 또는 용해제 간의 효능을 비교할 수 있을뿐 아니라, 아밀로이드 단백질 응집 저해제 또는 용해제의 타겟 도메인들을 분석하고, 더 나아가 기전 규명까지 밝힐 수 있어 아밀로이드 단백질, 특히 A $\beta$ 의 특정 단백질 서열의 응집을 풀어주는 저해제 또는 용해제 개발에 유용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0102] 도 1은 C-말단에 시스테인이 부착된 아밀로이드 베타 및 아밀로이드 베타 단편의 제조방법을 설명하기 위한 모식도이다.

도 2는 C-말단에 시스테인이 부착된 아밀로이드 육량체(hexamer) 단편의 종류를 나타내기 위한 모식도이다.

도 3은 아밀로이드 베타<sub>1-6</sub> 내지 아밀로이드 베타<sub>10-15</sub>의 육량체 단편을 역상-HPLC로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 아밀로이드 베타<sub>11-16</sub> 내지 아밀로이드 베타<sub>20-25</sub>의 육량체 단편을 역상-HPLC로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 아밀로이드 베타<sub>21-26</sub> 내지 아밀로이드 베타<sub>30-35</sub>의 육량체 단편을 역상-HPLC로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 아밀로이드 베타<sub>31-36</sub> 내지 아밀로이드 베타<sub>37-42</sub>의 육량체 단편 및 아밀로이드 베타<sub>1-42</sub>를 역상-HPLC로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 A $\beta$  및 MAP의 최적의 조건(펩타이드 농도, 고정시간, 온도, pH 및 형광 표지의 농도)을 확인한 그래프이다.

도 8은 A $\beta$  및 MAP 펩타이드의 구조적, 형태적, 응집적 변화를 확인한 결과이다.

도 9은 아밀로이드 베타 응집 저해제(inhibitor)로 후보 물질의 스크리닝 방법을 나타낸 모식도이다.

도 10는 아밀로이드 베타 응집 용해제(dissociator)로 후보 물질의 스크리닝 방법을 나타낸 모식도이다.

도 11은 A $\beta$ 를 이용하여 아밀로이드 베타 응집 저해제(Curcumin 및 Scyllol-inositol)의 응집 저해효과를 확인한 그래프이다.

도 12는 A $\beta$ 를 이용하여 아밀로이드 베타 응집 용해제(Necrostatin-1 및 Sunitinib)의 응집 용해효과를 확인한 그래프이다.

도 13는 아밀로이드 베타 응집 저해제(inhibitor)로 후보 물질의 스크리닝 방법을 나타낸 모식도이다.

도 14은 아밀로이드 베타 응집 용해제(dissociator)로 후보 물질의 스크리닝 방법을 나타낸 모식도이다.

도 15은 MAP을 이용하여 아밀로이드 베타 응집 저해제(Curcumin)의 응집 용해 작용 부위를 확인한 그래프이다.

도 16은 MAP을 이용하여 아밀로이드 베타 응집 저해제(Scyllol-inositol)의 응집 저해 작용 부위를 확인한 그래프이다.

도 17는 MAP을 이용하여 아밀로이드 베타 응집 용해제(Necrostatin-1)의 응집 용해 작용 부위를 확인한 그래프이다.

도 18은 MAP을 이용하여 아밀로이드 베타 응집 용해제(Sunitinib)의 응집 저해 작용 부위를 확인한 그래프이다.

도 19는 A3 제조방법을 나타낸 모식도이다.

도 20은 MAP 제조방법을 나타낸 모식도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0103] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다. 실시예들은 다양한 변환을 가할 수 있는 바, 실시예들은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 다양한 형태로 구현될 수 있다.

#### [0105] 실시예 1. A3 및 MAP 제작

##### [0106] 1.1. C-말단 시스테인이 결합된 아밀로이드 베타 합성

[0107] A3(A $\beta$  aggregation assay) 및 MAP(mapping amyloid plate) 제작을 위해서 37개의 C-말단 시스테인이 부착된 A $\beta_{1-42}$  욕량체 단편과 C-말단 시스테인이 부착된 전장 A $\beta_{1-42}$ 를 마이크로파를 이용한 9-플루오렌닐메틸옥시카르보닐 고체상 펩타이드 합성 방법을 통해 합성하였고, 이를 도 2에 나타내었다.

[0108] 구체적으로, C-말단의 첫번째 시스테인은 대칭 무수화물 활성화(symmetric anhydride activation) 방법으로 붙였다. 2.2 mmol의 Fmoc-Cys(trt)-OH, 1.0 mmol의 DIC, 그리고 51 mg의 DMAP을 2 mL의 DMF/DCM (1:1, v/v) 용액에 녹인 뒤 DMF에 부풀어있는 0.25 mmol의 Wang resin LS과 함께 1.5 시간 동안 반응시켰다. 남은 단백질 서열들은 자동화 펩타이드 합성기(automated peptide synthesizer)를 이용하여 순차적으로 커플링 하였다. 합성이 끝난 뒤 절단 카테일(92.5:2.5:2.5:2.5 TFA/deionized water/TIS/DODT, v/v/v/v)을 넣고 4 시간 동안 반응시켰다. TFA는 회전증발농축기를 사용하여 증발시킨 후 냉각시킨 무수 에테르를 넣고 15 분 동안 원심 분리시켜 정제되지 않은 형태의 펩타이드를 만들었고, 이는 도 1에 나타내었다.

[0109] 37개의 C-말단 시스테인이 부착된 A $\beta_{1-42}$  욕량체 단편을 역상-고성능 액체 크로마토그래피(reversed-HPLC) 방법을 통해 정제하고 분석하였고, 이를 도 3 내지 도 6에 나타내었다.

[0110] 도 1은 C-말단에 시스테인이 부착된 아밀로이드 베타 및 아밀로이드 베타 단편의 제조방법을 설명하기 위한 모식도이다.

[0111] 도 2는 C-말단에 시스테인이 부착된 아밀로이드 욕량체(hexamer) 단편의 종류를 나타내기 위한 모식도이다.

[0112] 도 3 내지 도 6은 아밀로이드 베타 욕량체 단편을 역상-HPLC로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

##### [0114] 1.2. A3의 제작

[0115] A3를 제작하기 위해, 말레이미드가 부착된 플레이트에 200  $\mu$ L의 세척 완충액(0.1 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.2)를 넣고 세척을 진행하였다. 전장 A $\beta_{1-42}$ -Cys 용액을 결합 완충액(0.1 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.15 M NaCl, 10 mM EDTA)에 혼합(50  $\mu$ g/mL, 5% DMSO)하였다. 100  $\mu$ L의 펩타이드 수용액(10  $\mu$ M)을 각 웰(peptide well)들에 넣고 24°C에서 24 시간동안 인큐베이션하였다. 200  $\mu$ L의 세척 완충액을 넣고 세척을 진행하였다. 시스테인 용액을 결합 완충액과 혼합(10  $\mu$ g/mL)하였다. 200  $\mu$ L의 상기 결합 완충액과 혼합된 시스테인 용액(10  $\mu$ g/mL)을 각 웰(blank well)넣고 24°C에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 200  $\mu$ L의 세척 완충액을 넣고 세척을 진행하였고, 이를 도 19에 나타내었다.

[0116] 도 19는 A3 제조방법을 나타낸 모식도이다.

##### [0118] 1.3. MAP의 제작

[0119] MAP을 제작하기 위해, 말레이미드가 부착된 플레이트에 200  $\mu$ L의 세척 완충액(0.1 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.2)을 넣고 세척을 진행하였다. 상기 1.1에서 제조한 37개의 각각의 A $\beta_{1-42}$  단편-Cys 용액을 결합 완충액(0.1 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.15 M NaCl, 10 mM EDTA)에 혼합(50  $\mu$ g/mL, 5% DMSO)하였고, 전장 A $\beta_{1-42}$ -Cys 용액과 결합 완충액을 혼합(50  $\mu$ g/mL, 5% DMSO)하였다. 100  $\mu$ L의 펩타이드 수용액(10  $\mu$ M)을 각 웰(peptide well)들에 넣고 24°C에서 24 시간동안 인큐베이션하였다. 200  $\mu$ L의 세척 완충액을 넣고 세척을 진행하였다. 시스테인 용액을 결합 완충액과 혼합(10  $\mu$ g/mL)하였다. 200  $\mu$ L의 상기 결합 완충액과 혼합된 시스테인 용액(10  $\mu$ g/mL)을 각 웰(blank well)넣고 24°C에서 1 시간동안 인큐베이션하였다. 200  $\mu$ L의 세척 완충액을 넣고 세척을

진행하였고 이를 도 20에 나타내었다..

[0120] 도 20은 MAP 제조방법을 나타낸 모식도이다.

[0122] 실험예 1. A3/MAP plate의 최적화 조건

[0123] 1.1. 응집 억제제 또는 응집 용해제 스크리닝을 위한 최적 조건 확립

[0124] A3/MAP의 제작 및 활용의 최적화 조건을 찾기 위하여 펩타이드 고정 농도, 펩타이드 고정 시간, 펩타이드 고정 온도, 펩타이드 고정 pH, 및 fluor-A $\beta_{1-42}$ 의 pH, 및 온도 실험을 진행하였다.

[0125] 모든 실험에는 A $\beta_{1-42}$  펩타이드를 감지하는 anti-A $\beta$  monoclonal 6E10 항체를 이용하여 플레이트에 있는 A $\beta_{1-42}$  펩타이드의 양을 간접적으로 비교, 분석하였다. 구체적으로, 실시예 1의 정제된 펩타이드를 플레이트에 고정시키기 위한 최적의 펩타이드 농도를 위해 8가지 농도 조건(0, 0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu$ M)에서 실험을 진행하였고, 정제된 펩타이드를 플레이트에 고정시키기 위한 최적의 시간을 위해 10가지 시간 조건(0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 h)에서 진행하였으며, 정제된 펩타이드를 플레이트에 고정시키기 위한 최적의 온도를 위해 6가지 온도 조건(0, 4, 24, 34, 54, 74 $^{\circ}$ C)에서 실험을 진행하였고, 정제된 펩타이드를 플레이트에 고정시키기 위한 최적의 온도를 위해 7가지 pH 조건(1.2, 3.2, 5.2, 7.2, 9.2, 11.2, 13.2)에서 실험을 진행하였다. 또한, A3/MAP 플레이트에 형광 물질이 결합된 A $\beta_{1-42}$ (fluor-A $\beta_{1-42}$ ) 펩타이드를 처리하여 A $\beta$  응집을 일으키므로, 플레이트의 웰에서 A $\beta$  응집이 생성되는 최적의 조건을 찾기 위해, 3가지의 fluor-A $\beta_{1-42}$  농도 조건(0.1, 1, 10  $\mu$ M)에서 실험을 진행하였고, fluor-A $\beta_{1-42}$  펩타이드를 10  $\mu$ M의 농도로 24시간 동안 7가지 pH조건(1.2, 3.2, 5.2, 7.2, 9.2, 11.2, 13.2)에서 실험을 진행하였으며, 플레이트의 웰에서 A $\beta$  응집이 생성되는 최적의 조건을 찾기 위해 fluor-A $\beta_{1-42}$  펩타이드를 10  $\mu$ M의 농도로 24시간 동안 6가지 온도 조건(0, 4, 24, 34, 54, 74 $^{\circ}$ C)에서 실험을 진행하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0126] 도7은 A3 및 MAP의 최적의 조건(펩타이드 농도, 고정시간, 온도, pH 및 형광 표지의 농도)을 확인한 그래프이다.

[0127] 도 7에 나타낸 바와 같이, 정제된 펩타이드를 플레이트에 고정하기 위한 펩타이드 농도 조건과 관련하여, A $\beta$  펩타이드가 농도 의존적으로 플레이트에 결합되는 것을 확인하였다. 하지만 농도가 1 $\mu$ M 이상에서 더 이상 농도 의존적으로 증가하지 않는 것을 관찰하였다. 이를 통해 정제된 펩타이드를 플레이트에 고정시키기 위해서는 1 $\mu$ M 농도의 정제된 펩타이드가 최적 농도인 점을 확인하였다(도 7A). 정제된 펩타이드를 플레이트에 고정하기 위한 펩타이드 시간 조건과 관련하여, 각 펩타이드는 1 $\mu$ M 농도에서, 6E10 항체를 통해 23-36시간동안 모든 A $\beta$  펩타이드를 효과적으로 플레이트에 고정됨을 확인하였다. 다만, 25시간 인큐베이션에서 더 이상 추가로 A $\beta$  펩타이드가 고정되지 않는 것을 확인하였다(도 7B). 정제된 펩타이드를 플레이트에 고정하기 위한 펩타이드 온도 조건과 관련하여, 각 펩타이드는 1 $\mu$ M 농도로 플레이트에 처리하고, 6E10 항체로 확인한 결과, 온도가 35 $^{\circ}$ C보다 높아지면 펩타이드가 플레이트에 고정되는 효율이 현저이 낮아지는 것을 확인하였다. 이를 통해, 고정 온도가 28-32 $^{\circ}$ C범위에서 가장 효과적인 것을 확인하였다(도 7C). 정제된 펩타이드를 플레이트에 고정하기 위한 펩타이드 pH 조건과 관련하여, 각 펩타이드는 1 $\mu$ M 농도로 플레이트에 처리하고 6E10 항체로 확인한 결과, 중성의 pH 범위에서 펩타이드가 플레이트에 효과적으로 부착되었고, 특히, pH 6.5-7.2일 때, 펩타이드가 플레이트에 가장 효과적으로 붙는 것을 확인하였다(도 7D).

[0128] 플레이트에서 고정된 A $\beta_{1-42}$ 와 fluor-A $\beta_{1-42}$  간의 응집이 생성되는 최적의 조건 관련하여, fluor-A $\beta_{1-42}$ 의 농도 조건과 관련하여, Blank well과 형광의 세기를 비교했을 때 0.1과 1 $\mu$ M의 농도에서는 고정된 A $\beta_{1-42}$ 와 fluor-A $\beta_{1-42}$  간의 응집이 잘 형성되지 않았지만, 10  $\mu$ M 농도에서는 유의적으로 응집이 되며 형광세기가 검출되는 것을 확인하였다(도 7G). 또한, fluor-A $\beta_{1-42}$ 을 10  $\mu$ M 농도로 24시간 동안 다양한 pH 및 다양한 온도 조건에서 고정된 A $\beta_{1-42}$ 와 응집을 유도한 결과, pH가 중성의 범위 특히, pH 7-8일 때, 가장 효과적으로 고정된 A $\beta_{1-42}$ 와 fluor-A $\beta_{1-42}$  간의 응집을 확인하였다(도 7E). 또한, 플레이트에서 고정된 A $\beta_{1-42}$ 와 fluor-A $\beta_{1-42}$  간의 응집이 생성되는 최적의 조건 관련하여, 온도가 28-38 $^{\circ}$ C, 특히 30-36 $^{\circ}$ C에서 가장 효과적으로 고정된 A $\beta_{1-42}$ 와 fluor-A $\beta_{1-42}$  간의 응집을 확인하였다.

[0129] 이상의 결과를 통해, 정제된 펩타이드를 플레이트에 고정시키기 위한 최적한 조건은 0.5 내지 5 $\mu$ M 농도의 펩타이드를 23-25시간동안 28-32 $^{\circ}$ C, pH 6.5-7.2에서 고정시킨 후, 응집을 유도하는 형광표지 펩타이드도 8 내지 12 $\mu$



M, pH 7-8, 및 30-36°C 온도 조건에서 정제된 펩타이드와 가장 효과적으로 응집 유도할 수 있음을 확인하였다.

## [0131] 1.2. 펩타이드의 구조적/형태적/응집적 변화

[0132] 항-A $\beta$  단일 클론 6E10 항체와 항-oligomer 다클론 A11 항체들을 이용하여 플레이트에 고정된 전장 A $\beta_{1-42}$ 들이 안정한 단량체 상태를 유지하는지를 확인하였다. 6E10 항체를 통해 전장 A $\beta_{1-42}$  펩타이드들이 동일한 양으로 안정하게 플레이트에 고정되는지 확인하였고, A11 항체는 웰 안에서 전장 A $\beta_{1-42}$  펩타이드들의 부착과정 동안 응집되는지 확인하는데 사용되었다. 비교 분석을 하기 위해 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로파놀(HFIP) 또는 로릴 황산 나트륨(SDS)를 2 시간 동안 처리해서 단량체화시킨 대조군들을 사용하였다.

[0133] 또한, 항-A $\beta_{18-23}$  단일클론 4G8 항체와 항-A $\beta_{4-10}$  다클론 6E10 항체들을 이용하여 플레이트에 고정된 A $\beta_{1-42}$  단편들 또는 전장 A $\beta_{1-42}$  펩타이드들이 부착과정동안 구조적/형태적 형질을 유지하는지 확인하였다. 4G8의 에피토프는 A $\beta_{1-42}$ 의 A $\beta_{18-23}$  서열이며 6E10의 에피토프는 A $\beta_{1-42}$ 의 A $\beta_{4-10}$  서열로 알려져 있다. 따라서 이 항체들을 이용해 부착된 A $\beta_{1-42}$  단편들 또는 전장 A $\beta_{1-42}$ 를 타겟하는지 확인하였다.

[0134] 추가적으로 10  $\mu$ M 전장 A $\beta_{1-42}$  펩타이드를 처리하여 부착된 전장 A $\beta_{1-42}$ 들이 고유의 응집 기전을 유지하는지 확인하였다. 티오플라빈-T(ThT) 형광 물질은 A $\beta_{1-42}$  응집체의  $\beta$  시트의 층 간에 삽입되면 형광의 세기가 증가하고 적색-편향되는데, 이러한 ThT의 특성을 이용하여 부착된 전장 A $\beta_{1-42}$  펩타이드와 추가적으로 넣어준 10  $\mu$ M 전장 A $\beta_{1-42}$  펩타이드가 서로 응집하는지를 확인하였다.

[0135] 도 8은 A3 및 MAP 펩타이드의 구조적, 형태적, 응집적 변화를 확인한 결과이다.

[0136] 도 8에 나타난 바와 같이, 6E10 항체 및 A11 항체를 이용하였을 때 플레이트 안에 응집된 전장 A $\beta_{1-42}$  펩타이드들을 발견하지 못하였고, 이는 대조군 그룹들과 비교하였을 때도 차이가 없는 것을 확인하였다. 4G8 항체가 전장 A $\beta_{1-42}$  그리고 A $\beta_{18-23}$ 를 타겟하는 것을 확인하였다. 6E10 항체 역시도 전장 A $\beta_{1-42}$ , A $\beta_{4-9}$ , 그리고 A $\beta_{5-10}$  펩타이드들을 타겟하는 것을 확인하였다. ThT 형광 물질을 통해, 인큐베이션 시간 동안 점차적으로 응집이 관찰되었으며, 24 시간 이후부터 안정한  $\beta$  시트 형태를 갖는 아밀로이드 피브릴(fibril)의 형성을 확인하였다.

[0137] 이상의 결과를 통해, 플레이트에 부착된 모든 전장 A $\beta_{1-42}$  펩타이드들은 안정한 단량체 형태를 유지하는 것을 확인하였고, 부착과정 이후에도 단편들과 전장 A $\beta_{1-42}$  펩타이드들이 고유의 구조적/형태적 형질을 유지하는 것을 확인하였다.

## [0139] 실험예 2. 아밀로이드 베타 응집 억제제의 스크리닝

### [0140] 2.1. 아밀로이드 베타 응집 저해제(inhibitor)의 스크리닝

[0141] A3에 형광 물질인 Flamma 552와 A $\beta_{1-42}$ 를 컨주게이션한 fluor-A $\beta_{1-42}$ (10  $\mu$ M) 와 A $\beta$  응집 저해제를 넣고 24 시간 동안 상온에서 반응시켰다((+)inhibitor/(+)fluor-A $\beta_{1-42}$  A3). 비교 분석을 위해 대조군 웰에는 fluor-A $\beta_{1-42}$ 만 처리하였다((-)inhibitor/(+)fluor-A $\beta_{1-42}$  A3). 대조군과 응집 저해제를 넣은 웰들 간 Flamma 552 형광 세기를 비교하여 A $\beta$  응집 저해 물질들을 검색하였고, 이를 도 9 및 도 11에 나타내었다.

[0142] 실험 데이터를 정규화하기 위해  $Z_i = (X_i - \min(x)) / (\max(x) - \min(x)) * 100$ 의 공식을 이용하였다.

[0143]  $Z_i$ : The normalized value in the dataset

[0144]  $X_i$ : The value in the dataset, (+)inhibitor/(+)fluor-A $\beta_{1-42}$  A3

[0145]  $\min(x)$ : (-)inhibitor/(+)fluor-A $\beta_{1-42}$  A3

[0146]  $\max(x)$ : (-)inhibitor/(-)fluor-A $\beta_{1-42}$  A3

[0147] 도 9는 아밀로이드 베타 응집 저해제(inhibitor)로 후보 물질의 스크리닝 방법을 나타낸 모식도이다.

[0148] 도 11은 A3를 이용하여 아밀로이드 베타 응집 저해제(Curcumin 및 Scyllolol-inositol)의 응집 저해효과를 확인한 그래프이다.

- [0149] 도 11에 나타난 바와 같이, A3를 이용한 A $\beta$  응집 저해제 검색법을 통하여 응집 저해제들을 검색하였다. Curcumin은 49.0%, scyllo-inositol은 24.7% 정도로 A $\beta$  응집을 저해하는 것을 확인하였다.
- [0151] **2.2. 아밀로이드 베타 응집 용해제(dissociator)의 스크리닝**
- [0152] A3에 fluor-A $\beta_{1-42}$ (10  $\mu$ M)를 넣고 6 시간 동안 37℃에서 플레이트 안에서 응집시켰다((-)dissociator/(+)fluor-A $\beta_{1-42}$  A3). 그 후 A $\beta$  응집 용해제를 넣고 상온에서 24 시간 동안 처리하였다((+)dissociator/(+)fluor-A $\beta_{1-42}$  A3). 6 시간 동안 응집시킨 후의 Flamma 552 형광 세기와 응집 용해제를 처리한 후의 Flamma 552의 형광 세기가 감소되는 정도를 비교하여 응집을 용해시키는 물질들을 검색하였고, 이를 도 10 및 도 12에 나타내었다.
- [0153] 데이터를 정규화하기 위해  $Z_i = (X_i - \min(x)) / (\max(x) - \min(x)) * 100$ 의 공식을 이용하였다.
- [0154]  $Z_i$ : The normalized value in the dataset
- [0155]  $X_i$ : The value in the dataset, (+)dissociator/(+)fluor-A $\beta_{1-42}$  A3
- [0156]  $\min(x)$ : (-)dissociator/(+)fluor-A $\beta_{1-42}$  A3
- [0157]  $\max(x)$ : (-)dissociator/(-)fluor-A $\beta_{1-42}$  A3
- [0159] 도 10는 아밀로이드 베타 응집 용해제(dissociator)로 후보 물질의 스크리닝 방법을 나타낸 모식도이다.
- [0160] 도 12는 A3를 이용하여 아밀로이드 베타 응집 용해제(Necrostatin-1 및 Sunitinib)의 응집 용해효과를 확인한 그래프이다.
- [0161] 도 12에 나타난 바와 같이, A3를 이용한 A $\beta$  응집 용해제 검색법을 통하여 응집 용해제들을 검색하였다. Necrostatin-1은 42.5%, sunitinib은 65.2% 정도로 A $\beta$  응집을 용해하는 것을 확인하였다.
- [0162] 이상의 결과를 통해, A3 및 MAP은 A $\beta$  응집 저해제 또는 용해 후보 물질들을 효과적으로 스크리닝할 수 있는 플랫폼을 제공할 수 있음을 확인하였다.
- [0164] **실험예 3. 아밀로이드 베타 응집 억제제의 활성 부위 매핑**
- [0165] **3.1. 아밀로이드 베타 응집 저해제(inhibitor)의 활성 부위 매핑**
- [0166] MAP 플레이트에 형광 물질인 Flamma 552와 A $\beta_{1-42}$ 를 컨주게이션한 fluor-A $\beta_{1-42}$ (10  $\mu$ M)와 A $\beta$  응집 저해제를 넣고 24 시간 동안 상온에서 반응시켰다 ((+)inhibitor/(+)fluor-A $\beta_{1-42}$  MAP). 비교 분석을 위해 대조군 웰에는 fluor-A $\beta_{1-42}$ 만 처리하였다((-)inhibitor/(+)fluor-A $\beta_{1-42}$  MAP). 대조군과 응집 저해제를 넣은 웰들 간 Flamma 552 형광 세기를 비교하여 A $\beta$  응집 저해 물질이 어떤 단편들의 응집을 저해시키는지 확인함으로써 물질의 작용 부위를 규명하였고, 이를 도 13에 나타내었다.
- [0167] 실험 데이터를 정규화하기 위해 실험예 2.1과 동일한 방법인  $Z_i = (X_i - \min(x)) / (\max(x) - \min(x)) * 100$ 의 공식을 이용하였다. 또한 응집 저해 정도를 단편별로 분석한 뒤 서로 겹치는 서열이 있는 단편들을 반영한 평균 값을 구하였다. 또한, 그 중 가장 높은 값을 기준으로 정규화하여 응집 저해제가 A $\beta$ 의 어느 특정한 서열을 타겟하는지 확인할 수 있는 color-coded heatmap(초록색으로 갈수록 강하게 A $\beta$  응집 저해)을 제작했다고, 이를 도 15 및 도 16에 나타내었다.
- [0168] 도 15는 MAP을 이용하여 아밀로이드 베타 응집 저해제(Curcumin)의 응집 용해 작용 부위를 확인한 그래프이다.
- [0169] 도 16은 MAP을 이용하여 아밀로이드 베타 응집 저해제(Scyllo-inositol)의 응집 저해 작용 부위를 확인한 그래프이다.
- [0170] 도 15에 나타난 바와 같이, MAP를 이용한 A $\beta$  응집 저해제 규명 방법을 통하여 curcumin이 HQKLVF(A $\beta_{14-19}$ , A $\beta_{15-20}$ , A $\beta_{16-21}$ ), GAIIGLM(A $\beta_{29-34}$ , A $\beta_{30-35}$ ), 및 GGVVIA(A $\beta_{37-42}$ ) 도메인들을 특이적으로 타겟하며, 이 부위와 결합함으로써 응집을 저해하는 것을 확인하였다.
- [0171] 도 16에 나타난 바와 같이, MAP를 이용한 A $\beta$  응집 저해제 규명 방법을 통하여 scyllo-inositol이 VHHQKLVF(A $\beta_{12-17}$ , A $\beta_{13-18}$ , A $\beta_{14-19}$ , A $\beta_{15-20}$ ), VGSNKGAIIGL(A $\beta_{24-29}$ , A $\beta_{25-30}$ , A $\beta_{26-31}$ , A $\beta_{27-32}$ , A $\beta_{28-33}$ , A $\beta_{29-34}$ ), LMVGGV

(A $\beta$ <sub>34-39</sub>), 및 GGVVIA(A $\beta$ <sub>37-42</sub>) 도메인들을 특이적으로 타겟하며, 이 부위와 결합함으로써 응집을 저해하는 것을 확인하였다.

[0173] **3.2. 아밀로이드 베타 응집 용해제(dissociator)의 활성 부위 매핑**

[0174] MAP에 fluor-A $\beta$ <sub>1-42</sub>(10  $\mu$ M)를 넣고 6 시간 동안 37°C에서 플레이트 안에 응집시켰다((-)dissociator/(+)fluor-A $\beta$ <sub>1-42</sub> MAP). 그 후 A $\beta$  응집 용해제를 넣고 24 시간 동안 상온에서 처리하였다((+)dissociator/(+)fluor-A $\beta$ <sub>1-42</sub> MAP). 6 시간 동안 응집시킨 후의 Flamma 552 형광 세기와 응집 용해제를 처리 후의 Flamma 552의 형광 세기가 감소되는 정도를 비교하여, A $\beta$  응집 용해 물질이 어떤 단편들의 응집을 용해시켜주는지 확인함으로써 물질의 작용 부위를 규명하였고, 이를 도 14에 나타내었다.

[0175] 실험 데이터를 정규화하기 위해 실험에 2.2와 동일한 방법인  $Z_i = (X_i - \min(x)) / (\max(x) - \min(x)) * 100$ 의 공식을 이용하였다. 또한 응집 저해 정도를 단편별로 분석한 뒤 서로 겹치는 서열이 있는 단편들을 반영한 평균 값을 구하였다. 또한, 그 중 가장 높은 값을 기준으로 정규화하여 응집 용해제가 A $\beta$ 의 어느 특정한 서열을 타겟하는지 확인할 수 있는 color-coded heatmap(파란색으로 갈수록 강하게 A $\beta$  응집 용해)을 제작했고, 이를 도 17 및 도 18에 나타내었다.

[0176] 도 17은 MAP을 이용하여 아밀로이드 베타 응집 용해제(Necrostatin-1)의 응집 용해 작용 부위를 확인한 그래프이다.

[0177] 도 18은 MAP을 이용하여 아밀로이드 베타 응집 용해제(Sunitinib)의 응집 저해 작용 부위를 확인한 그래프이다.

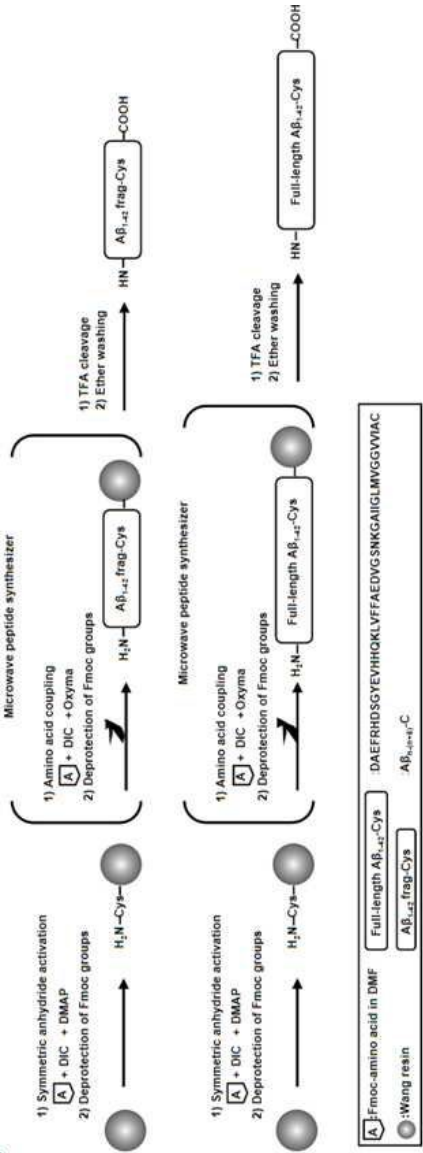
[0178] 도 17에 나타낸 바와 같이, MAP를 이용한 A $\beta$  응집 용해제 규명 방법을 통하여 necrostatin-1이 HHQKLVEF(A $\beta$ <sub>13-18</sub>, A $\beta$ <sub>14-19</sub>, A $\beta$ <sub>15-20</sub>)과 GLMGGVVIA(A $\beta$ <sub>33-38</sub>, A $\beta$ <sub>34-39</sub>, A $\beta$ <sub>35-40</sub>, A $\beta$ <sub>36-41</sub>, A $\beta$ <sub>37-42</sub>) 도메인들을 특이적으로 타겟하며 응집 용해를 일으킨다는 것을 확인할 수 있다. 전장 A $\beta$ <sub>1-42</sub>와 비교할 때 A $\beta$ <sub>36-41</sub> 부위를 특이적으로 풀어준다는 것을 확인하였다.

[0179] 도 18에 나타낸 바와 같이, MAP를 이용한 A $\beta$  응집 저해제 규명 방법을 통하여 sunitinib이 AIIGLM(A $\beta$ <sub>30-35</sub>), 및 LMVGGVVIA(A $\beta$ <sub>34-39</sub>, A $\beta$ <sub>35-40</sub>, A $\beta$ <sub>36-41</sub>, A $\beta$ <sub>37-42</sub>) 도메인들을 특이적으로 타겟하며 응집 저해를 일으킨다는 것을 확인하였다.

[0180] 이상의 결과를 통해, MAP는 A $\beta$  응집 저해제 또는 용해제의 타겟 도메인들을 분석하고, A $\beta$ 의 특정 단백질 서열의 응집을 풀어주는 저해제 또는 용해제 개발에 유용할 수 있다.

도면

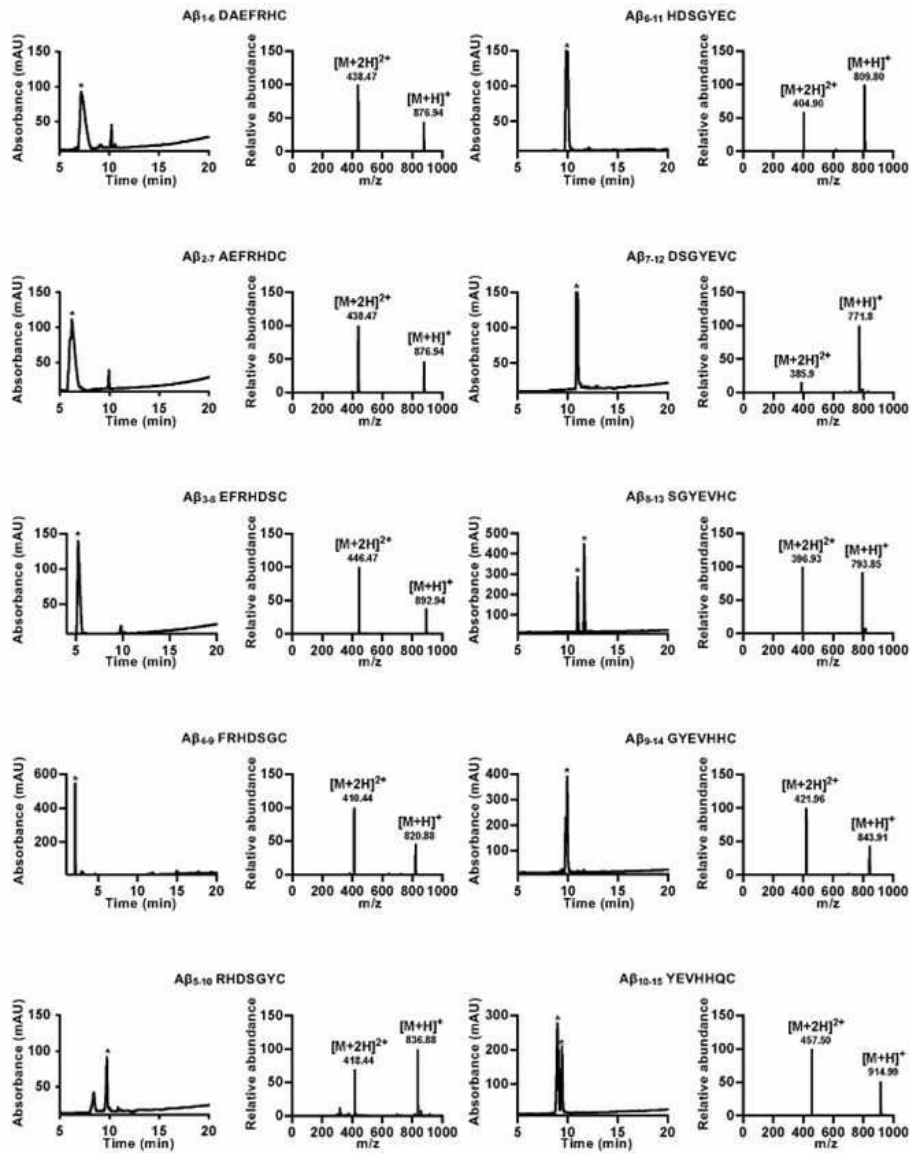
도면1



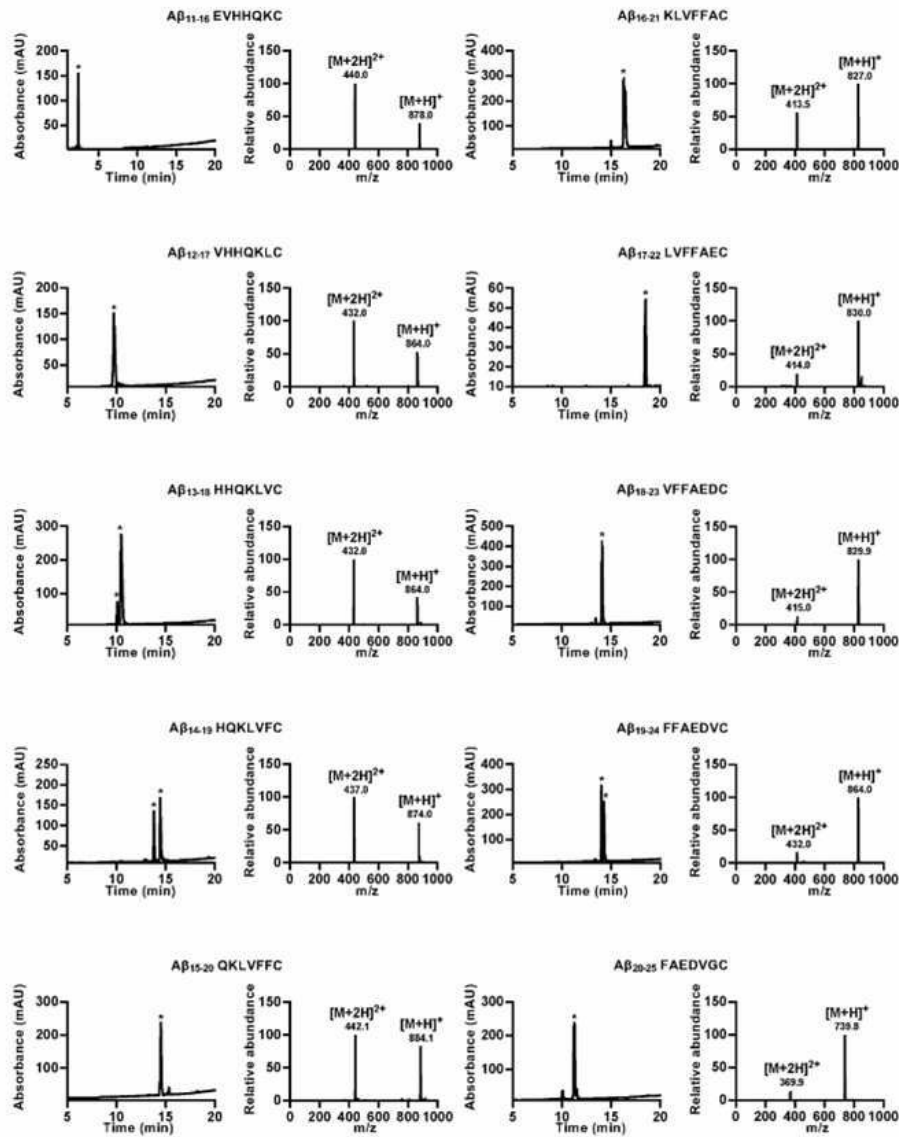
도면2



도면3

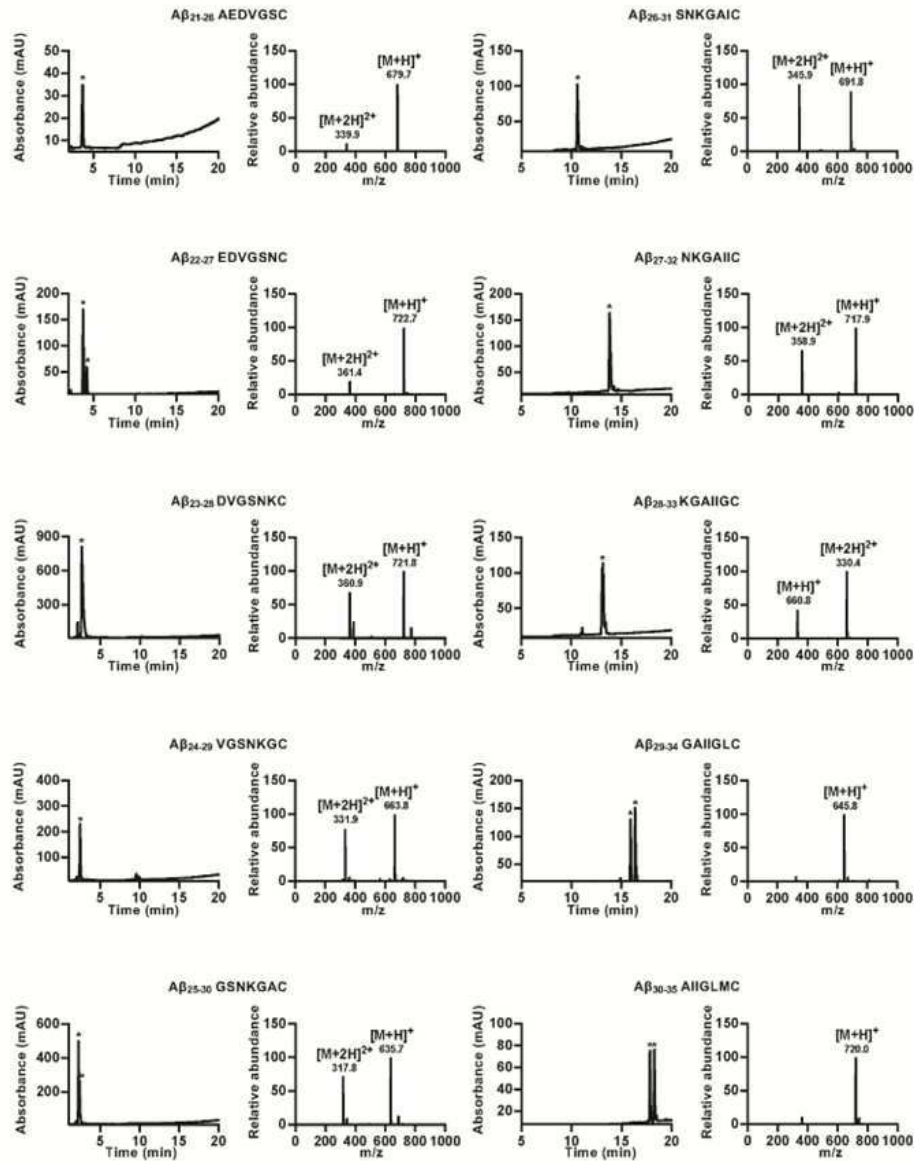


도면4

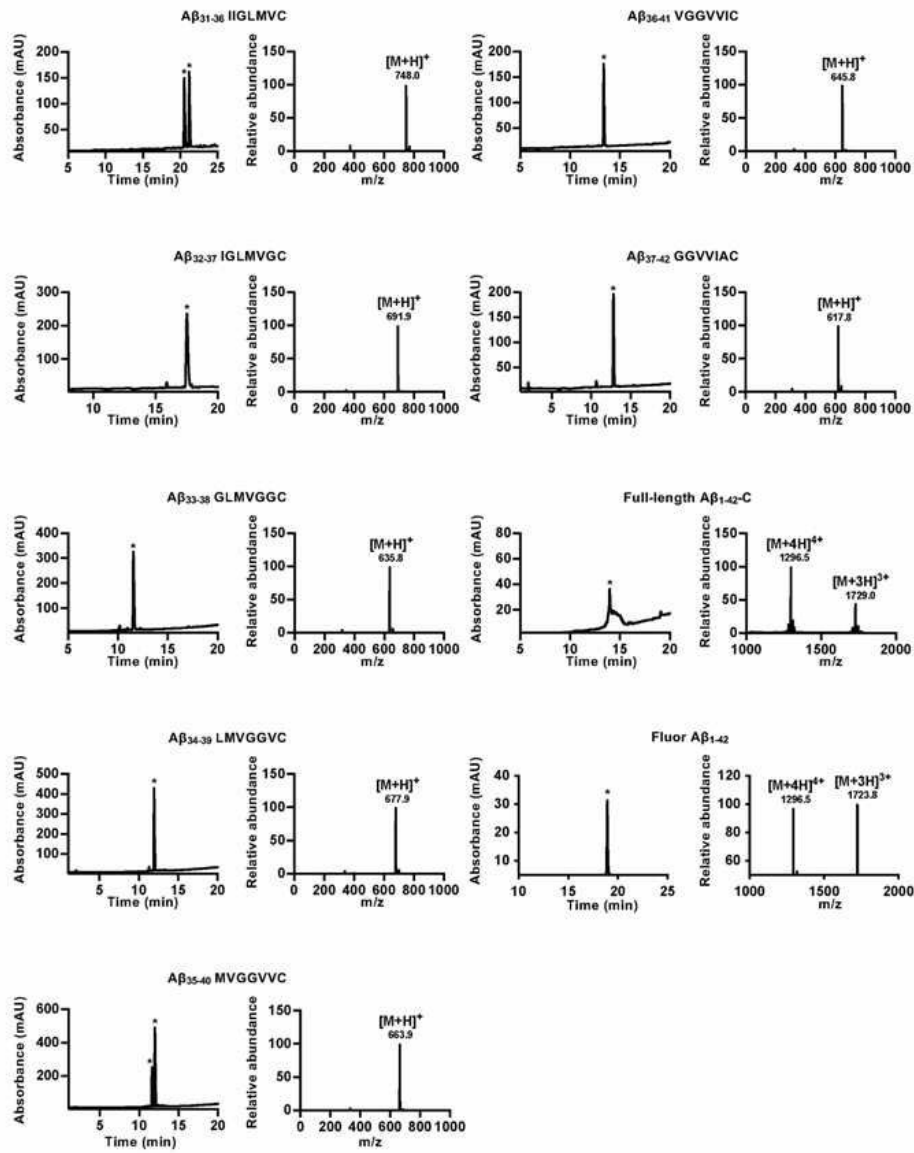




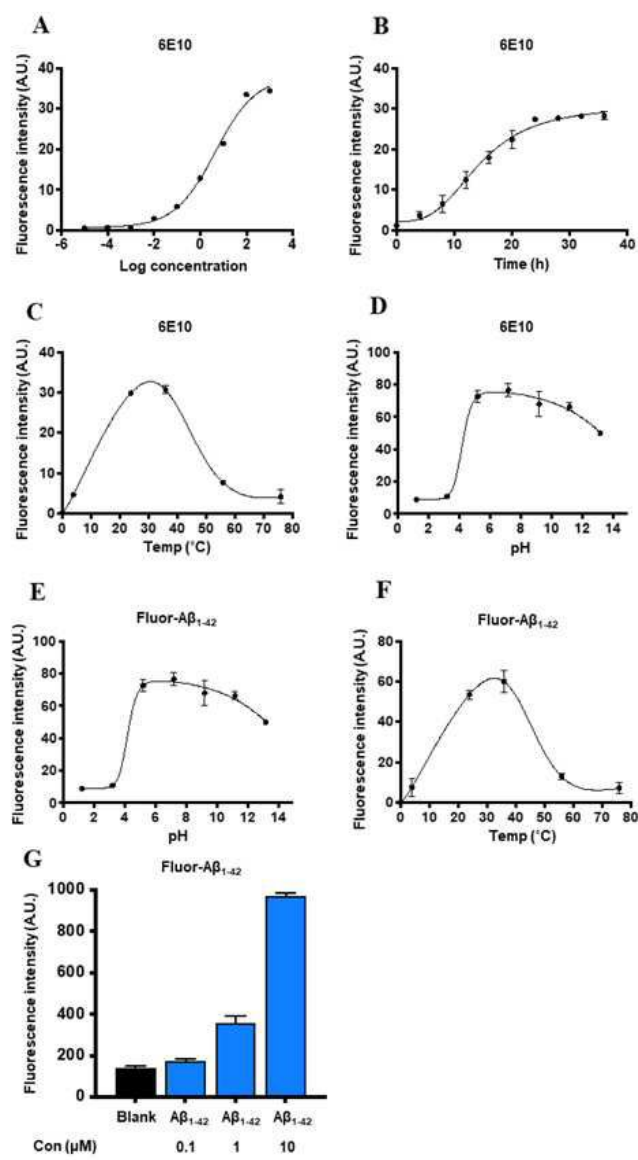
도면5



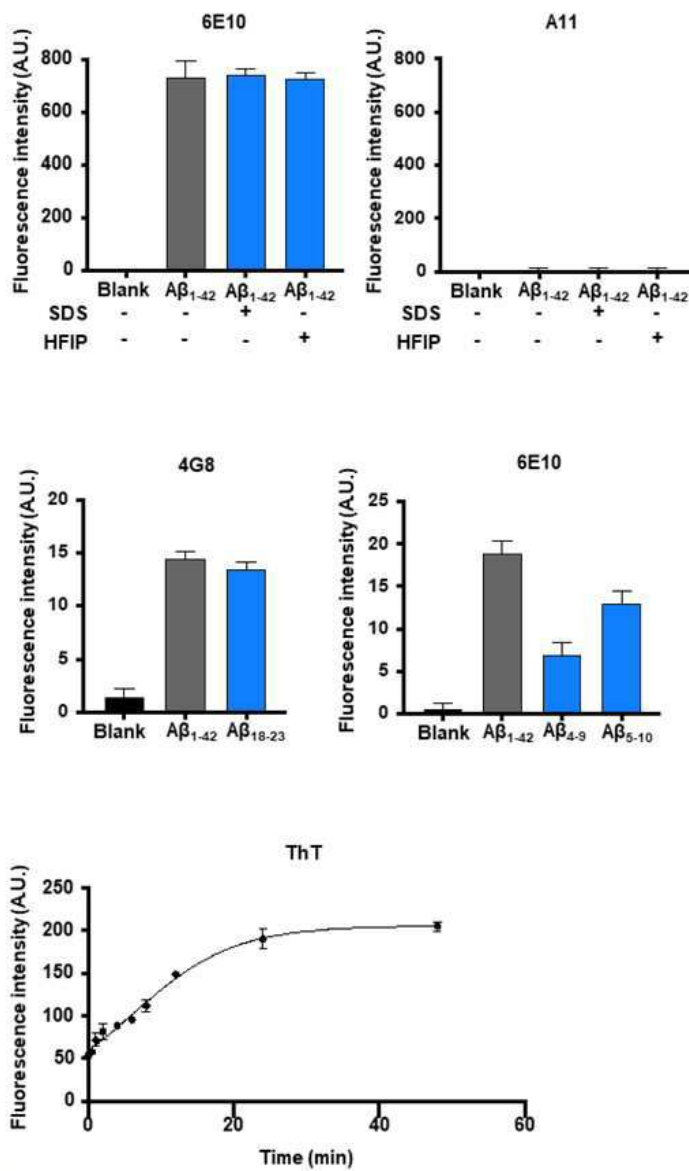
도면6



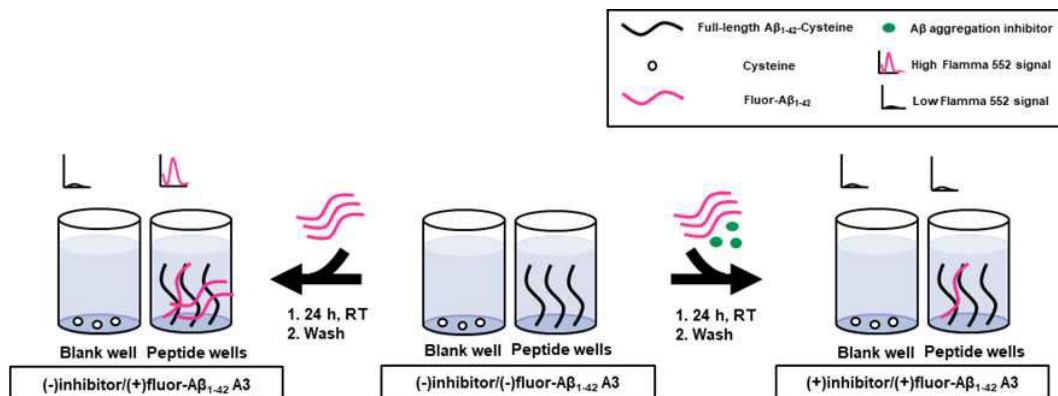
도면7



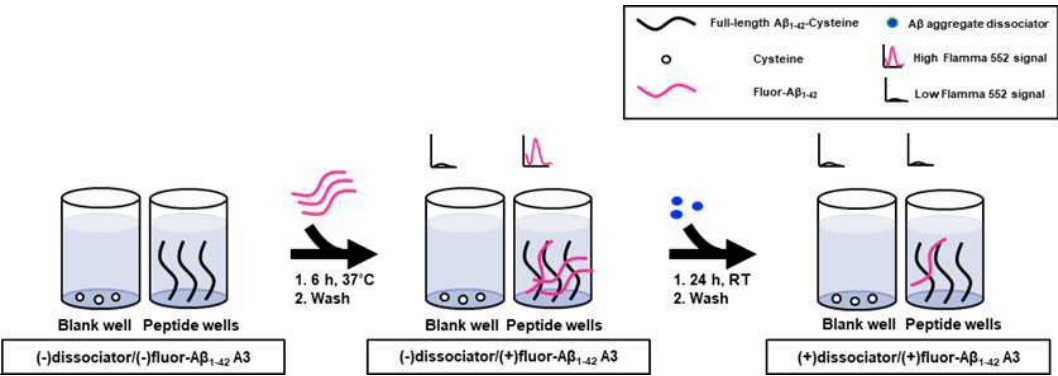
도면8



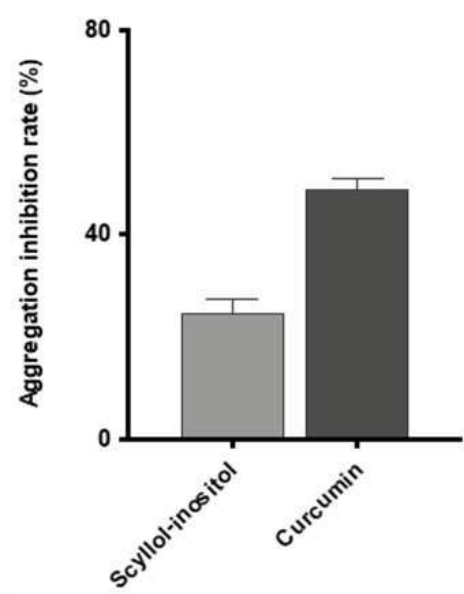
도면9



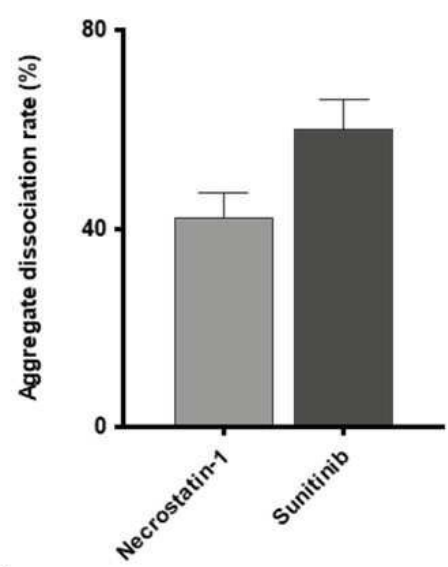
도면10



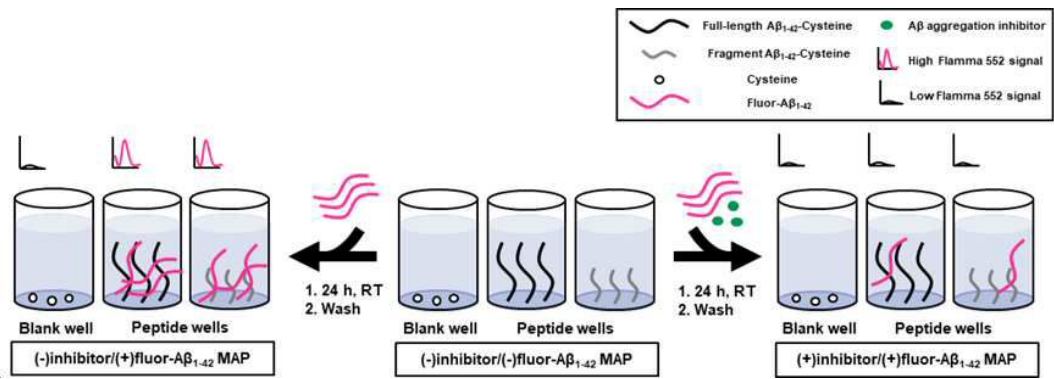
도면11



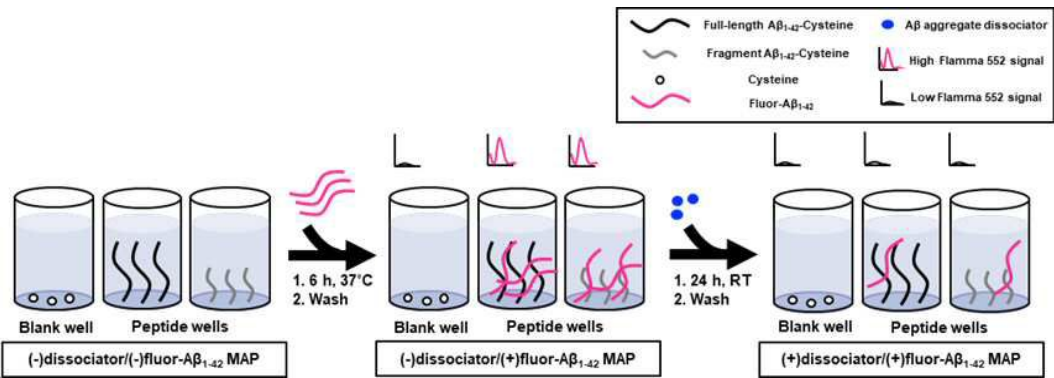
도면12



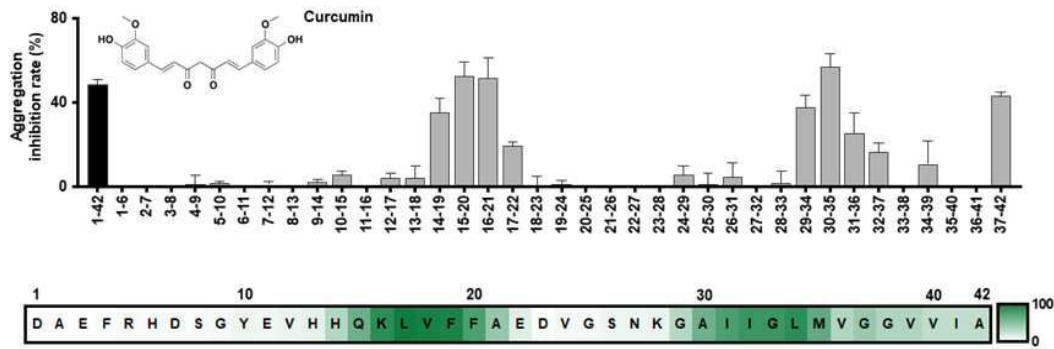
도면13



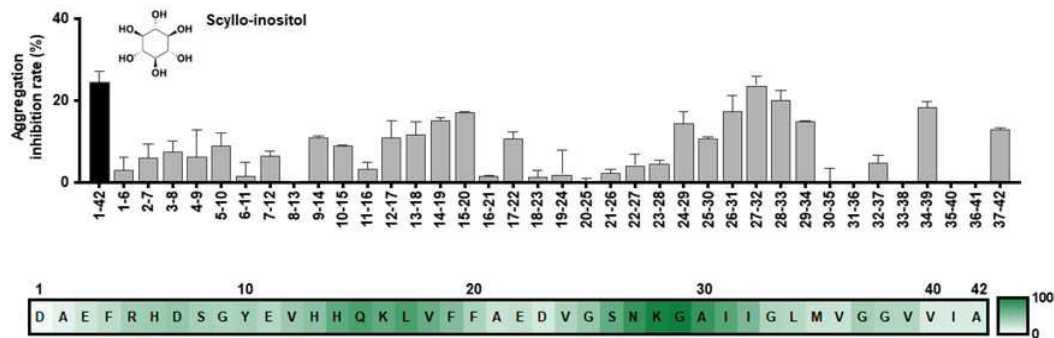
도면14



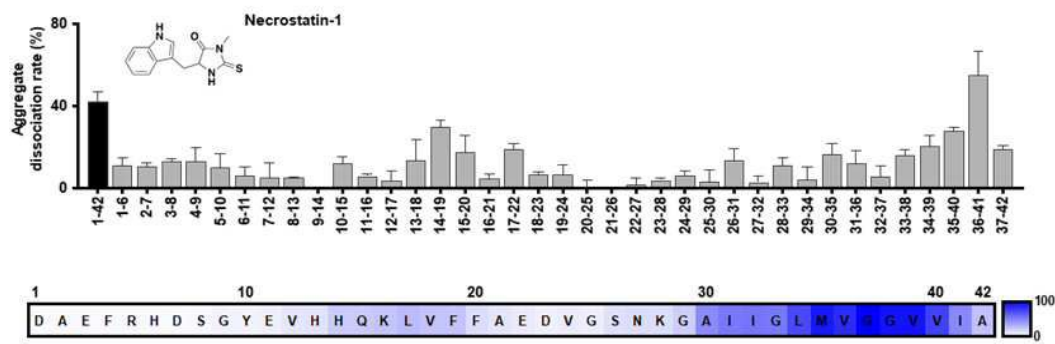
도면15



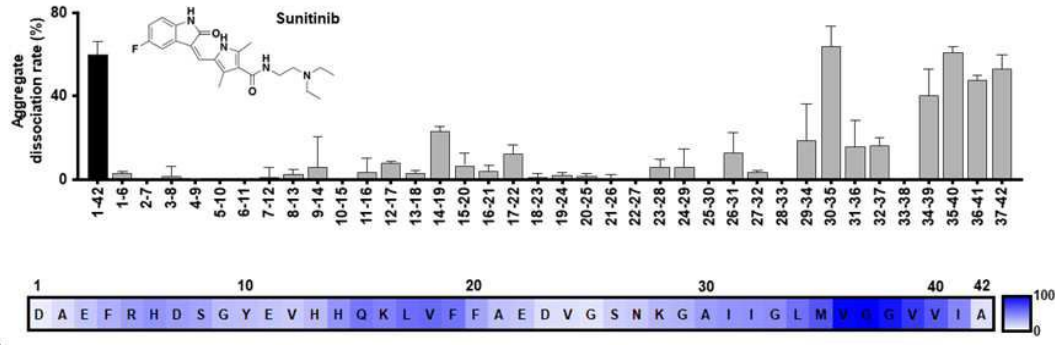
도면16



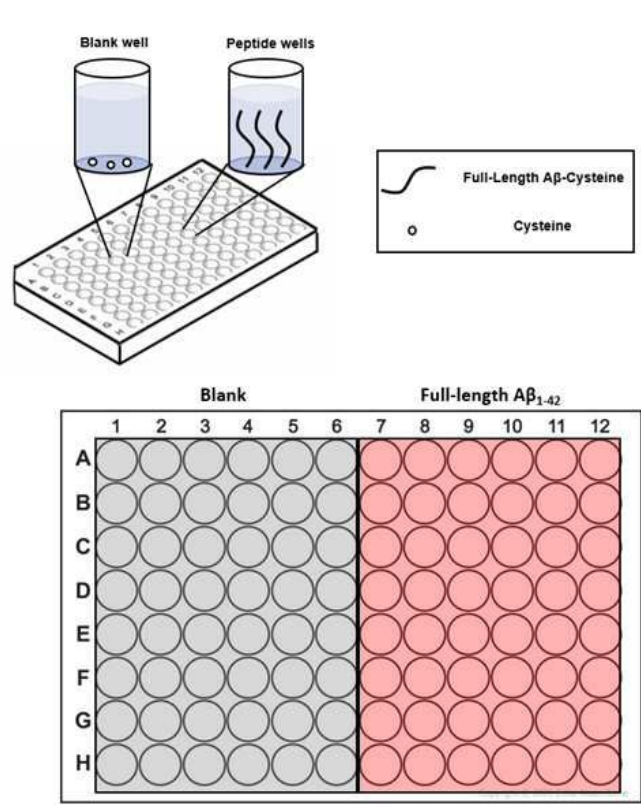
도면17



도면18



도면19





도면20

