

# 펩타이드를 결합한 나노입자의 표적 특이성

이계한\*, 정우원\*, 문현정\*\*, 박경순\*\*

## Target specificity of nanoparticles conjugated with peptides

Kyehan Rhee\*, Woo Won Jeong\*, Hyun Jeong Moon\*\*, Kyung Soon Park\*\*

### 1. 서 론

최근 나노입자는 다양한 질병의 진단 및 치료에 사용되기 위하여 개발되고 있다. 다양한 나노 입자의 표면 처리를 통하여 입자에 특정 세포 및 조직에 결합할 수 있는 기능을 부여할 수 있으므로, 특정 질병을 진단하거나 약물을 전달할 수 있는 진단 및 치료에 응용될 수 있다. 나노 입자의 특정 표적에 대한 특이성은 약물 전달 및 진단 시약의 효율을 증가시키고 부작용을 최소화 할 수 있다. 나노입자의 표적 특이성을 위하여, 표적에만 특이적으로 결합할 수 있는 항체<sup>(1)</sup> 및 펩타이드<sup>(2)</sup>를 표면에 결합하여 입자를 제조하는 연구가 진행되고 있다. 입자를 사용할 경우 많은 약물 분자나 진단 시약을 입자에 결합하여 약물 전달 및 영상 진단 효율을 증가시킬 수 있으며 입자 표면에 다양한 결합 특성을 갖는 기능부를 결합하여 입자의 표적 결합 효율을 증가할 수 있다. 또한 입자의 표면 개질을 통하여 입자의 blood half-life, 혈액에서의 제거, 생분해성 등의 약물 동력학적인 특성을 조절할 수 있다<sup>(3)</sup>.

암이나 동맥경화의 진단 및 치료를 위하여 전달 입자에 항체를 결합하는 방법이 시도되고 있으나, 가격이 비싸고 보관이 어려우며 면역원성, 세포내로의 투과에 어려움 등의 문제점이 제기된다. 펩타이드는 항체에 비해 높은 진단 효율을 갖을 수 있으며 세포 내부로의 이동이 용이하여 약물전달의 효율을 증가할 수 있다. 또한 세포 표면에 발현되는 분자를 규명하지 않더라도 phage display를 이용하여 표적특이성을 갖는 펩타이드를 선별할 수 있는 장점이 있다.

본 연구에서는 염증성 질환에서 세포의 부착 및 이동에 관여하는 cytokine인 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )에 의해 활성화된 혈관내피세포를 표적하는

펩타이드를 나노입자에 결합하여, 나노입자의 활성화된 혈관내피세포의 표적 특이성을 연구하고자 한다. 이를 위하여  $\alpha_v\beta_3$  인테그린에 특이적으로 결합하는 RGD(Arg-Gly-Asp) 펩타이드를 Qdot에 결합한 나노입자와 phage display를 이용하여 선별한 AP1 펩타이드를 hydrophobically modified glycol chitosan (HGC) 전달체에 결합한 나노입자를 제조하였다.

### 2. 본 론

#### 2.1 세포배양 및 활성화

인간 태줄 정맥 내피 세포(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)는 Cambrex Bio Science, Inc.(Walkersville, MD, USA)에서 구입하고 회사에서 제공하는 배지(EMB-2)와 편람에 따라 배양하였다. 계대배양은 4세대 이상을 넘지 않도록 하였다. 실험을 위하여  $1 \times 10^5$ 개의 세포를 젤리틴이 코팅된 60mm 접시에 분주하여 단일막이 형성되도록 배양하였다. 준비된 HUVEC에 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )를 25 ng/ml의 농도로 4시간 동안 처리하여 혈관내피세포를 활성화시켰다.

#### 2.2 입자 제조

##### 2.2.1 cRGD-Qdot

Qdot 705에 mPEG-NH<sub>2</sub> (MW 750)을 결합하여 혈액 적합성이 향상된 Qdot 입자를 제조하였다. 제조된 입자에 cRGD를 결합하여 입자를 제조하였고(QPR) 대조군으로 cRGD가 결합되지 않은 입자도 제조하였다(QP).

\* 명지대학교 기계공학부

\*\* KIST, 의학연구센터

## 2.2.2 AP1- HGC

파지 라이브리리를 동맥경화 프라크와 37°C에 1 시간 반응시켜 결합한 파지를 회수하는 탐색 과정을 총 3회 반복하여 동맥경화 플라크에 강한 특이성을 가진 파지를 발굴하였다. 파지에 유전자 재조합으로 삽입된 DNA 염기서열을 판독하고, 아미노산서열을 분석한 다음, 표적 펩타이드(API)를 합성하였다. HGC는 5  $\beta$ -cholic acid를 glycol chitosan에 공유 결합시켜 제작하였다<sup>(4)</sup>. HGC는 SMCC [N- succinimidyl - 4 - (maleimidomethyl) cyclo-hexanecarboxylate]와 반응시킨 후, cyanine 5.5를 결합하였다 (MCC-HGC-Cy5.5). 이 입자에 AP-1 peptide를 결합하여 AP1-HGC 나노입자를 제조하였다.

## 2.3 나노입자의 혈관내피세포의 결합 특성

### 2.3.1 항체의 라벨링

활성화된 내피세포에서 발현되는 adhesion molecule을 확인하기 위하여 ICAM, VCAM, E-selectin 항체 (Chemicon Inc. U.S.A.)에 cyanine 5.5를 결합하였다. 활성화된 HUVEC을 고정된 후 DAPI로 염색하였다. PBS로 세척 후 mAb-Cy5.5 (2.5  $\mu$ g/mL)를 샘플에 넣어주고 배양 후 세척하였다. 샘플을 고정 후 형광현미경 (AxiosCam Carl Zeiss, U.S.A.)로 관찰하였다. ICAM, VCAM, E-selectin 모두 활성화된 HUVEC에서는 관찰되었으나, 활성화되지 않은 대조군에서는 나타나지 않았다.

### 2.3.2 cRGD-Qdot

형광 현미경 관찰을 통하여 활성화된 HUVEC에  $\alpha_v\beta_3$  인테그린이 발현됨을 확인하였다. HUVEC 샘플에 cRGD가 붙은 Qdot (QPR)과 cRGD를 결합하지 않은 Qdot (QP)을 주입 후 입자의 세포 부착특성을 형광 현미경으로 관찰하였다. QPR은 세포에 부착하여, 세포 내부로 들어간 것이 관찰되었으나 QP는 세포에 붙지 않았다. QPR은 활성화된 HUVEC에 더 많이 부착되었다.

### 2.3.3 AP1- HGC

HUVEC 샘플에 AP1- HGC를 주입하고 (100  $\mu$ g/ml), 1시간 후 입자의 세포 부착 특성을 형광 현미

경으로 관찰하였다. AP1-HGC는 활성화된 HUVEC에서 우수한 부착 특성을 나타냈다.

## 3. 결론

펩타이드를 결합한 나노입자의 표적특이성을 연구하기 위하여 HUVEC을 cytokine TNF- $\alpha$ 를 이용하여 활성화 하였다. HUVEC의 in vitro 활성화를 확인하기 위하여 HUVEC에서 ICAM-1, VCAM, E-selectin 등의 adhesion molecules 및 인테그린의 발현을 항체를 이용하여 확인하였다. 동맥경화 프라크에 부착하는 펩타이드 API를 HGC에 결합하여 동맥경화 표적 나노입자를 제조하였다. AP1-HGC는 활성화 되지 않은 HUVEC에 비해 활성화된 혈관내피세포에 더 많이 부착되었다. Qdot에 cRGD를 결합하여  $\alpha_v\beta_3$  인테그린을 표적하는 나노입자를 제조하였다. RGD가 결합한 Qdot는 활성화된 HUVEC에서 우수한 부착특성을 나타냈다. 따라서 특정 질병이나 분자를 표적할 수 있는 펩타이드를 결합한 나노입자는 분자영상 및 약물전달용으로 사용이 가능하리라 예상된다.

## 후 기

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구사업 (R01-2006-000-10269-0)의 지원에 의해 수행되었음

## 참고 문헌

- (1) Kang HW, et al, 2002, "Magnetic resonance imaging of inducible E-selectin expression in human endothelial cell culture", *Bioconjug. Chem.*, 13, pp.122-127.
- (2) Kelly KA, et al, 2005, "Detection of vascular adhesion molecule-1 expression using a novel multimodal nanoparticle", *Cir Res*, 96, pp.327-336.
- (3) Weissleder R, et al., 2005, "Cell specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules", *Nature Biotech.* 23, pp. 1418-1423.
- (4) Park JH, et al, 2004, "Self-assembled nanoparticles based on glycol chitosan bearing 5 $\beta$ -cholic acid for RGD peptide delivery", *J Control. Release*, 95, pp.579-588