

진핵생물 개시인자 유래 펩타이드의 세포 성장 억제 효능

Effect of cell growth inhibition by eukaryotic initiation factor 2 derived peptides

유한진^a, 임광석^{b*}

HanJin Yu^a, Kwang Suk Lim^{b*}

^a HaulBio, 22, Geodudanji 1-gil, Dongnae-myeon, Chuncheon-si, Gangwon-do, 24398, Republic of Korea

^b Department of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chuncheon, 24341, Republic of Korea

Received 28 August 2020; Revised 7 October 2020; Accepted 7 October 2020

Abstract

In the process of protein transcription and translation, various protein complexes bind to DNA, and all processes are precisely controlled. Among the proteins constituting this complex, a peptide derived from eukaryotic initiation factor (eIF) 2 was synthesized. In addition, in order to increase the efficiency of transduction of this peptide into cells, peptides with polyarginine, one of the protein transduction domains (PTD), were synthesized. Cell growth inhibition was confirmed in HER2 positive breast cancer (SK-Br-3) and HER2 negative breast cancer (MDA-MB-231), and cardiomyocytes (H9c2). The peptide with polyarginine had high transduction efficiency in all cells, and had excellent cancer cell growth inhibitory effects. The peptide used in this study might be useful peptide therapeutics for the treatment of cancer through future research.

Keywords: Peptide therapeutics, Protein transduction domain, Intracellular uptake, Eukaryotic initiation factor

1. 서론

최근 바이오의약품은 유전공학 기술 발전에 따라 전 세계 치료제 시장의 주요 의약품으로 자리 잡고 있다. 바이오의약품은 생물체에 서 유래된 것을 원료 또는 재료로 하여 제조한 의약품으로 생물학적 제제, 유전자재조합의약품, 세포배양의약품, 세포치료제 및 유전자 치료제 등이 있다^{1, 2}. 이들 중 유전자 재조합 의약품 인 단백질 및 항체 치료제가 세계 시장에서 주요 10대 의약품 중 7품목을 차지하고 있다³. 이와 함께 세포 치료제 시장은 줄기세포와 면역세포를 중심으로 조직재생 및 암치료제 분야로 확대되고 있다. 면역 반응 및 생체 기전을 기반으로 하는 이 의약품들은 고령화에 따른 만성 질환 및 면역 질환의 증가로 더욱 활발하게 연구 개발이 진행 중이다⁴.

바이오의약품들 중 하나인 펩타이드 치료제는 약 40여개이하의 아미노산으로 이루어진 물질로 주로 화학적인 합성을 통해서 생산되는 의약품이다⁵. 화학적으로 합성하여 제작하기 때문에 합성에 시간이 많이 소요되었으나, Bruce Merrifield에 의해 고안된 고상합성 방식과 HPLC에 의한 순수정제법 개발 등으로 합성기술이 급속도로 향상되었다^{6, 7}. 하지만 펩타이드는 생체 이용률이 낮은 치명적인 단점으로 여러 제약회사들이 최종 임상 단계에서 개발을 포기했다. 그럼에도 많은 바이오텍 회사들을 중심으로 새로운 펩타이드의 발견과 약물전달 기술 등을 통해 생체 이용률을 높여 펩타이드 치료제에 대한 기대가 높아지고 있다.

펩타이드는 호르몬, 신경전달물질 같은 생리활성 펩타이드인 신약, 항체 특이성 항체를 생산하는 면역유도 물질 및 생분해

* Corresponding author. Tel.: +82-33-250-6279

fax: +82-33-250-5546

E-mail address: kslim@kangwon.ac.kr (Kwang Suk Lim).

성 고분자 형태의 약물전달체로 응용이 가능하다^{8, 9}. 특히 단백질의 2, 3차 구조를 모방하여 제작한 펩타이드는 단백질과 단백질 사이의 결합을 억제 또는 항상 시킴으로써 세포의 활성을 조절 할 수 있다. 이는 표적 물질 이외의 다른 물질에 대한 결합성이 낮은 표적 특이성이 우수하기 때문이며 생체 조직내에 축적되는 양이 적고 독성에 대한 부작용이 낮다고 알려져 있다.

펩타이드는 우수한 효능에도 불구하고 생체내 안정성이 낮은 문제점으로 치료제로 사용이 되지 못하고 있다. 펩타이드의 효능을 높여주기 위해 Polyethylene glycol (PEG), 나노입자 및 하이드로젤 등 다양한 약물전달 시스템이 응용되고 있다^{10, 11}. Protein transduction domain(PTD)는 Cell penetrating peptide(CPP)로도 잘 알려져 있는 단백질 도메인으로 양이온성 성질을 갖고 있다. 이에 음극성인 세포막에 잘 결합할 수 있게 되고 엔도사이토시스 기전에 의해 세포내로 빠르게 도입된다. 이러한 특성 때문에 PTD는 펩타이드 전달 효율을 높이기 위해 적용됨은 물론 나노입자, 단백질 및 화학 의약품 등의 세포 도입 효율을 향상시키기 위한 약물전달 시스템으로 사용되고 있다^{12, 13}. 많이 사용되는 PTD에는 인체면역결핍바이러스 (Human immunodeficiency virus, HIV)에서 유래한 Tat(YGRKKRRQRRR) 및 아르기닌 집합체인 폴리 아르기닌 (Poly arginine)이 대표적이며 이외에도 많은 PTD가 보고되고 있다¹⁴⁻¹⁶. Tat 및 폴리 아르기닌을 보면 구성 아미노산이 양극성 아미노산임을 알 수 있으며 다른 PTD들도 대부분 아르기닌(R), 라이신(K) 및 히스티딘(H)로 구성된다. 또한 폴리아르기닌은 보통 3개 이상일 때 세포내 도입이 향상되며 11개를 넘어서면 세포 독성이 높아지는 특성을 보인다¹⁷.

본 연구에서는 유전자 발현을 조절하는 많은 단백질 중에서 eukaryotic initiation factor(eIF) 2 단백질을 구성하는 subunit 중 eIF2 알파 단백질에서 유래한 펩타이드를 합성하였고 세포 내 도입을 높이기 위해 PTD를 추가로 도입했다. 이를 심근 세포 및 암세포에 처리하고 세포 내 도입 효율 및 세포의 성장에 미치는 영향에 대해 평가하였다.

2. 결과 및 고찰

2.1 펩타이드 합성

세포는 성장 및 생리활성 유지를 위해서 핵 안의 DNA로부터 많은 단백질을 생산하게 된다. 이 단백질들을 생산하기 위해 다양한 단백질들이 DNA에 결합하고 정확한 조절 기전에 의해서 진행된다. DNA에서 mRNA를 생산하고 다시 tRNA에 의해 아미노산이 합성되는 central dogma 과정을 거치는데 이때 작용하는 단백질 중

eukaryotic initiation factor(eIF) 2 는 전사과정의 개시에 필요하며 알파, 베타 및 감마 서브 유닛으로 구성되어 있다. 여기서 eukaryotic initiation factor 2(eIF2)를 구성하는 subunit 중 알파 단백질로부터 peptide 서열을 구성하였다. 펩타이드는 10개의 아미노산(TP)로 구성되어 있으며 세포 내 도입을 향상 시키기 위해 PTD 중 하나인 6개의 아르기닌(6R)을 도입한 20개의 아미노산(TPR)로 구성되어 있다.

Table 1 Synthesis of peptide

Abbreviation	Peptide sequence
TP	RLGRGGFGVV
TPR	RLGRGGFGVVGGSRRRRRR

2.2 세포 내 도입 효율

펩타이드가 세포의 성장을 억제하기 위해서는 세포 내로 빠르게 도입이 되어야 한다. 특히 펩타이드는 혈장 내 안정성이 낮기 때문에 이의 효능을 유지하기 위해서는 표적 세포에 도입이 빠르게 되어야 한다. FITC가 결합 된 펩타이드의 세포 내 도입을 보면 TPR 처리군은 H9c2 심근 세포에서 4시간 동안 배양했을 때 65.25%의 세포 내 도입을 보여주었으며 TP처리군은 4시간 동안 배양 후에도 12.83%로 매우 낮은 도입율을 보여주었다. 유방암 세포인 SK-Br-3 와 MDA-MB-231에서는 1시간 동안 배양했을 때부터 80% 이상의 세포 내 도입을 나타내었으며, MDA-MB-231 세포에서는 다른 세포주와 비교하여 가장 높은 세포 내 도입 효율을 나타내었다. 또한 H9c2세포와 동일하게 TP 처리군은 4시간 동안 배양을 하여도 도입율이 낮음을 보여주었다. 데이터에는 나타나지 않지만 24시간 동안 배양을 했을 때는 모든 세포 주에서 10% 이하의 세포 내 도입이 관찰되었는데 이는 펩타이드의 안정성에 의한 것으로 보인다. 세포 내에 도입된 펩타이드가 분해 되면서 FITC 역시 세포 내에 안정적으로 유지되지 않기 때문에 FACS 분석에서 검출이 되지 않은 것으로 사료 된다.

PTD의 양이온성 특성에 의한 세포내 도입 향상 덕분에 6개의 아르기닌이 도입된 TPR이 TP군과 비교하여 모든 세포에서 빠른 시간에 많이 세포내로 도입됨을 알 수 있다. 이와 함께 펩타이드 보호를 위한 약물 전달 시스템으로 Polyethylene glycol (PEG) 같은 고분자의 도입하면 PTD와 함께 펩타이드의 효능 향상을 기대할 수 있다. 또한 펩타이드는 치료제 및 단백질 도입이외에도 표적 전달 시스템으로 응용이 가능하다. 이를 적용하면 심근 표적 및 암세포 표적 전달 시스템을 만들 수 있으며 다양한 약물이 효과적인 전달이 가능할 것으로 본다.

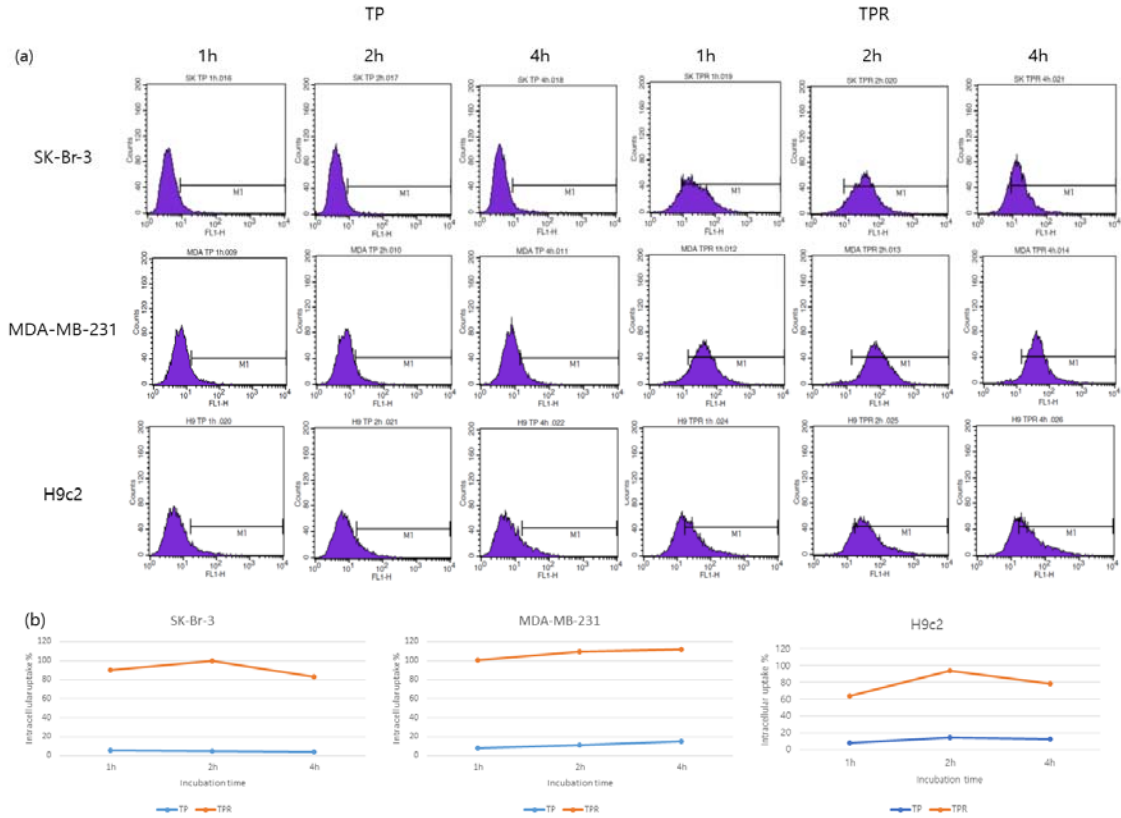


Fig. 1 Intracellular uptake of peptide in SK-BR-3, MDA-MB-231 and H9c2 cells.

2.3 세포 성장 억제 효율 평가

세포 내로 도입된 펩타이드는 표적 단백질에 결합하여 전사 개시 단백질 복합체의 형성을 방해 함으로써 단백질 등의 생산을 억제하게 된다. 전사 개시 억제에 의해 단백질 생산이 저해 되면 세포의 분열 및 성장이 억제되고 나아가 사멸에 이르게 된다. HER2 양성 유방암인 SK-BR-3세포와 HER2 음성 유방암 세포인 MDA-MB-231에서 펩타이드의 처리후 세포 사멸을 평가했다. SK-BR-3에서 TPR 처리군은 약 40%의 세포 사멸 효과를 보여주었으나 TP 처리군에서는 control과 비교하여 큰 차이를 나타내지 않았다. MDA-MB-231에서 TPR 처리군은 약 40%의 세포 사멸 효과를 보였으며, TP 처리군에서는 농도에 따라 다르긴 했으나 20% 내외의 효과를 보여주었다. SK-BR-3에서는 TP와 TPR이 큰 차이를 보였으나 MDA-MB-231에서는 큰 차이가 없었던 이유는 in vitro 실험 상에서 MDA-MB-231의 세포 성장이 빠르기 때문에 세포 분열시 자연스럽게 세포 내로 유입되는 펩타이드에 의한 효과로 예상된다.

이는 일반세포와 비교해보면 쉽게 알 수 있는데 H9c2 심근세포에 TP와 TPR을 처리하여 세포의 생존율을 평가해보았다. TP는 모든 농도 처리군에서 약 20% 내외의 사멸 효과를 보였으며 2ug/ml의

고농도 처리군만 20% 이상의 세포 사멸 효과를 보였다. 반면에 TPR은 TP와 같은 농도에서 비슷하거나 조금 더 높은 세포 사멸 효과를 보였으며, 2ug/ml의 처리군에서 약 30%의 세포 사멸 효과를 보여주었다. 일반 세포는 암세포와 비교하여 세포의 성장 및 분열이 느리기 때문에 세포 내 대사도 느리게 일어나게 된다. 이에 PTD가 없는 TP는 세포 내 도입 효율이 떨어져 세포의 성장을 억제하지 못했고 TPR은 세포내 도입이 빠르기 때문에 상대적으로 높은 세포 사멸을 보였다. 하지만 심근세포에서 TPR은 암세포군과 비교하여 세포의 사멸 유도가 상대적으로 낮음을 알 수 있다. 이는 화학 항암제에서 부작용이 발생하는 것과 같은 이유라고 볼 수 있는데 화학 항암제 역시 암세포의 빠른 성장과 대사 기전을 표적으로 하여 약효가 나타나기 때문이다. 따라서 본 연구에서는 폴리 아르기닌을 통해 선별 펩타이드의 효능을 입증했으나 추후 효과적인 암세포 사멸과 부작용을 낮추기 위해서는 암세포 표적 펩타이드를 도입하여 표적 전달을 통해 암세포만 사멸하는 것에 대해 연구가 수행되어야 한다. 이와 함께 최적의 펩타이드 서열을 더 조사하여 도입한다면 효과적인 항암 효과를 기대할 수 있을 것이다.

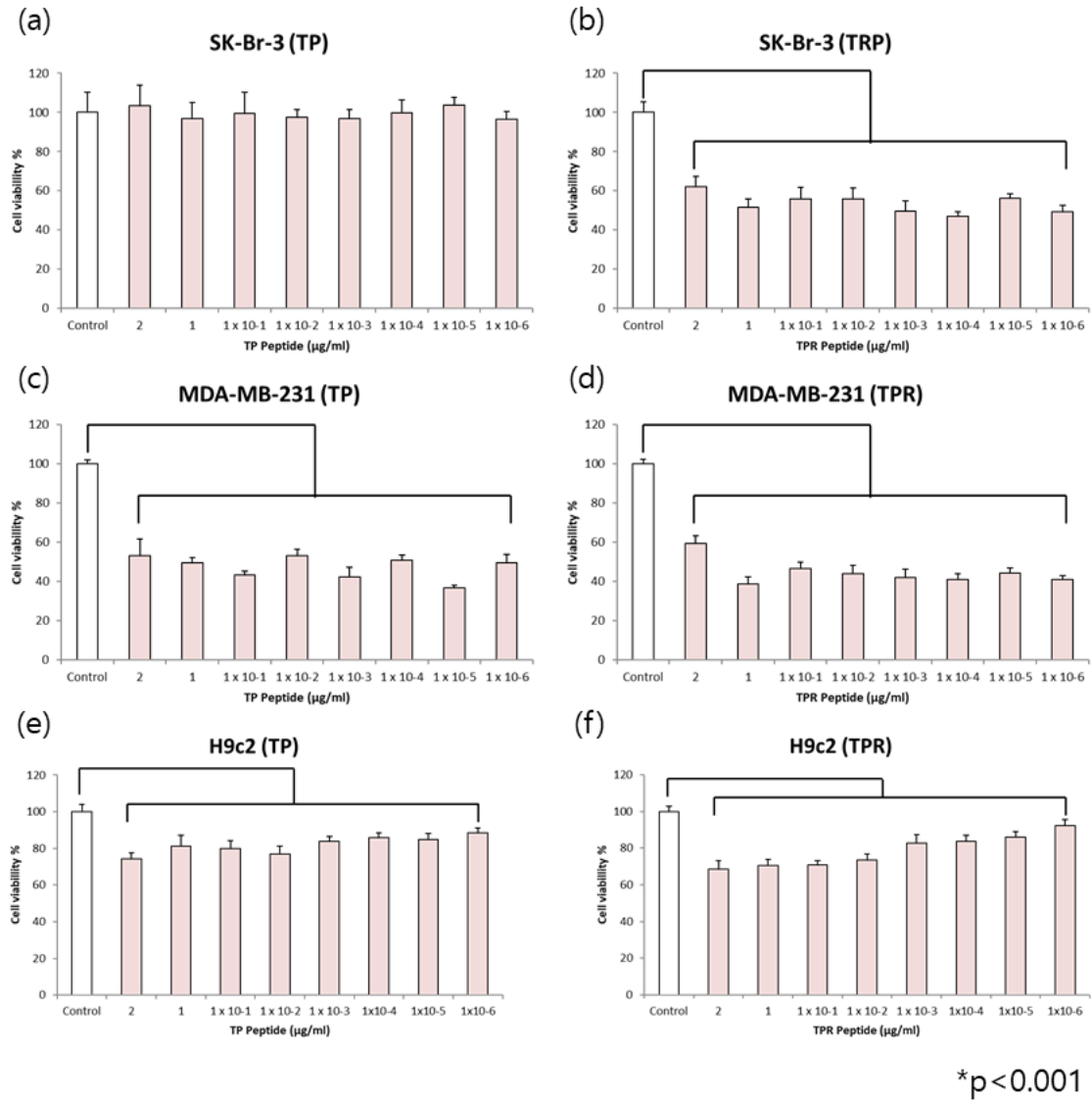


Fig. 2 Cell growth inhibitory effect of peptide in SK-Br-3, MDA-MB-231 and H9c2 cells.

3. 실험재료 및 방법

3.1 재료

실험에 사용한 펩타이드는 (주)펩트론(Daejun, Korea)에서 합성을 진행했으며 또한 Fluorescein isothiocyanate(FITC)가 펩타이드에 결합된 FITC-펩타이드도 합성하였다. H9c2 세포, SK-Br-3, MDA-MB-231 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구매하였다. 세포 배양에 사용하는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), RPMI 1640 media, Penicillin, Trypsin, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

시약은 Sigma Aldrich (MO, USA)에서 구매하였다. Flow cytometer cell sorting (FACS) tube는 Corning (NY, USA)에서 구입했다.

3.2 펩타이드 합성

본 실험에서 사용한 펩타이드는 Eukaryotic initiation factor 2(eIF2)를 구성하는 subunit 중 알파 단백질로부터 유래한 다음의 서열을 합성하였다. Peptide 1 (TP)은 RLGRGGFGVV 서열로, Peptide 2 (TPR)는 RLGRGGFGVVGGSSRRRRRRR의 서열로 합성하였다. 각 펩타이드는 80%의 순도로 5mg를 합성하였다. 또한 FITC가 결합된 FITC-TP 및 FITC-TPR을 80%의 순도로 각 1mg를 합성하

였다.

3.3 세포 배양

H9c2 세포는 10% Fetal bovine serum albumin(FBS), 1% Penicillin를 넣은 DMEM으로 5% CO₂ 및 37°C 배양기에서 배양하였다. 또한 SK-Br-3와 MDA-MB-231 세포는 10% Fetal bovine serum albumin (FBS), 1% Penicillin를 넣은 RPMI1640 배지에서 5% CO₂ 및 37°C 배양기에서 배양하였다. 모든 세포는 세포의 confluency 80%에서 계대배양을 실시하여 배양하였다.

3.4 세포 도입 효능 평가

배양 된 H9c2, SK-Br-3 및 MDA-MB-231 세포를 Phosphate buffered saline (PBS; Welgene, KOREA)로 씻고, Trypsin을 처리하여 세포를 떼어낸 후, well당 1 x 10⁵개의 세포를 6 well plate에 분주하고 24시간 배양하였다. 대조군은 아무런 물질을 첨가하지 않은 배양액을 처리하고, 실험군은 FITC-TP와 FITC-TPR을 각각 8.33ug/ml로 처리하고 1h, 2h, 4h 동안 배양하였다. 이후 PBS로 washing하고 Trypsin을 처리하여 세포를 회수 한 후, PBS로 추가 washing을 진행하였다. 세포를 1,300rpm으로 회수하고 4% Paraform aldehyde를 첨가하여 FACS 분석 전까지 4°C냉장 보관 하였다. FACS 분석은 강원대학교 공동실험실습관의 FACS Calibur (BD, NJ, USA)를 통해 진행하였다.

3.5 세포 증식 억제 효과

배양 된 H9c2, SK-Br-3 및 MDA-MB-231 세포를 Phosphate buffered saline (PBS; Welgene, KOREA)로 씻고, Trypsin을 처리하여 세포를 떼어낸 후, well 당 1 x 10³개의 세포를 96 well plate에 분주하고 24시간 배양하였다. 대조군은 아무런 물질을 첨가하지 않은 배양액을 처리하고, 실험군은 TP와 TPR을 2ug/ml, 1ug/ml로 처리하고 이후 1ug/ml부터 1/10씩 연속 희석하여 처리하였으며 4일간 배양하였다. 세포 증식 억제는 MTT assay를 통해 분석하였다. MTT 시약을 각 well에 5mg/ml의 농도로 처리하고 4시간 동안 배양하였다. 4시간 후에 처리한 MTT 시약을 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO, Biosesang, Sungnam-si, KOREA)를 100ul 씩 각 well에 처리하고 30분 동안 상온에서 formazan을 녹였다. 이후 microplate reader(Thermofisher, MA, USA)를 사용하여 590nm의 파장으로 흡광도를 측정하였고, 결과는 대조군을 100%로 하고 실험군은 대조군과 비교하여 비율로 표기하였다.

3.6 통계 처리

모든 자료의 값은 ± 표준 편차로 표시하였으며 (n = 3), 통계 분석은 Student's *t*-test로 진행하였다. 통계적 분석의 각 유의성은 (p<0.05, 0.001)로 나타내었다.

4. 결론

단백질 전사 과정에서 다양한 단백질 복합체가 DNA에 결합하게 되고 모든 과정이 조절되게 된다. 이 복합체를 구성하는 단백질 중 eukaryotic initiation factor(eIF) 2에서 유래한 펩타이드(TP)와 이의 세포내 도입 효율을 높인 폴리 아르기닌이 도입된 펩타이드(TPR)를 합성하였다. HER2 양성 유방암 (SK-Br-3)와 HER2 음성 유방암 (MDA-MB-231)에서 세포 성장 억제를 확인하였고, 심근 세포 (H9c2)에서의 세포 성장 억제를 비교하였다. TPR이 TP와 비교하여 세포 내 도입 효율이 모든 세포에서 높았으며, 세포 성장 억제 효과도 우수하였다. 정상 세포에서의 성장 억제 부작용을 낮추고 암세포에서 성장 억제 효과를 높이기 위해 암세포 표적 펩타이드 도입을 한다면 항암 펩타이드 치료제의 하나로 개발 될 수 있을 것이다.

후 기

이 논문은 2017년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초 연구사업임. (No. 2017R1C1B5074521) 또한 2018년도 강원대학교 대학회계 학술연구조성비로 연구하였음.

References

- [1] Elgundi Z, Reslan M, Cruz E., Sifnoitis V., Kayser V., 2017, The state-of-play and future of antibody therapeutics, Advanced drug delivery review, 122 2-19.
- [2] Lu R.M., Hwang Y.C., Liu I.J., Lee C.C., Tsai H.Z., Li H.J., Wu H.C., 2020, Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases, Journal of biomedical science, 27 1.
- [3] Urquhart L., 2018, Market watch: Top drugs and companies by sales in 2017, Nature review drug discovery, 17 232.
- [4] Weiner G.J., 2015, Building better monoclonal antibody-based therapeutics, Nature review cancer, 15 361-370.
- [5] Drucker D.J., 2020, Advances in oral peptide therapeutics, Nature review drug discovery, 19 277-289.
- [6] Biostem, 2016, Introduction of peptide therapeutics, <http://www.biostem.kr>.

- [7] Yu B., Hwang D., Jeon H., Kim H., Lee Y., Keum H., Kim J., Lee D.Y., Kim Y., Chung J., Jon S., 2019, A hybrid platform based on a bispecific peptide-antibody complex for targeted cancer therapy, *Angewandte chemie International edition*, 58 2005-2010.
- [8] Fosgerau K., Hoffmann T., 2015, Peptide therapeutics: current status and future directions, *Drug discovery today*, 20 122-128.
- [9] Picha K., Huang C., Bugelski P., O'Neil K., 2014, Engineering peptide therapeutics using MIMETIBODY technology, *Methods of molecular biology*, 1088 125-145.
- [10] Boopathy A.V., Davis M.E., 2014, Self-assembling peptide-based delivery of therapeutics for myocardial infarction, *Methods of molecular biology*, 1141 159-164.
- [11] Vadevo S.M.P., Gurung S., Khan F., Haque M.E., Gunassekaran G.R., Chi L., Permpoon U., Lee B., 2019, Peptide-based targeted therapeutics and apoptosis imaging probes for cancer therapy, *Archives of pharmacal research*, 42 150-158.
- [12] Gait M.J., Arzumanov A.A., McClorey G., Godfrey C., Betts C., Hammond S., Wood M.J.A., 2019, Cell-Penetrating Peptide Conjugates of Steric Blocking Oligonucleotides as Therapeutics for Neuromuscular Diseases from a Historical Perspective to Current Prospects of Treatment, *Nucleic acid therapeutics*, 29 1-12.
- [13] Saarbach J., Sabale P.M., Winssinger N., 2019, Peptide nucleic acid (PNA) and its applications in chemical biology, diagnostics, and therapeutics, *Current opinion in chemical biology*, 52 112-124.
- [14] Won Y.W., Lim K.S., Kim Y.H., 2011, Intracellular organelle-targeted non-viral gene delivery systems, *Journal of controlled release*, 152 99-109.
- [15] Kim H.Y., Kim S., Youn H., Chung J.K., Shin D.H., Lee K., 2011, The cell penetrating ability of the proapoptotic peptide, KLAKLAKKLAKLAK fused to the N-terminal protein transduction domain of translationally controlled tumor protein, MIIYRDLISH, *Biomaterials*, 32 5262-5268.
- [16] Backlund, C. M., Parhamifar, L., Minter, L., Tew, G. N., Andresen, T. L., 2019, Protein Transduction Domain Mimics Facilitate Rapid Antigen Delivery into Monocytes, *Molecular pharmaceutics*, 16 2462-2469.
- [17] Park T.G., Jeong J.H., Kim S.W., 2006, Current status of polymeric gene delivery systems, *Advanced drug delivery review*, 58 467-486.