

## Development and Application of Cell-penetrating Peptides

Hwajung Yi\*

*Division of Influenza Virus, Center for Infectious Diseases, Korea National Institute of Health, Korea Centers for Disease Control and Prevention, Chungcheongbuk-do, Korea*

Intracellular transduction of hydrophilic macromolecules has been problematic owing to the biochemical restriction imposed by lipid bilayer of the cytoplasmic membrane. Several technologies have been developed to improve the intracellular delivery of the large molecules for therapeutic purpose, including cell penetrating peptide. Cell penetrating peptides or cell permeable peptides (CPPs) were initially discovered based on the potency of certain full-length proteins or proteins to translocate across the plasma membrane. Currently, CPPs are broadly applied for intracellular delivery of biologically functional molecules *in vivo* and *in vitro*, varying from small molecules, peptides, proteins, liposomes and nucleic acids. With introducing the history and characteristics of CPPs, this review will focus on the intracellular transduction mechanism and application of CPPs.

**Key Words:** Cell-penetrating peptides, Protein transduction domain, Peptides, Endocytosis

### 1. 서론

진핵세포의 세포막(plasma membrane)은 단백질 혹은 당단백질이 삽입되어 있는 이중지질막(lipid bilayer)이다. 친소수성(hydrophobic)인 세포막의 특성으로 친수성(hydrophilic) 물질은 특별한 기전에 의해서만 세포 내로 이동이 가능하다. 작은 이온(small ion)의 경우 세포막의 채널(channel)의 개폐 조절에 의해 세포 내 유출입이 이루어지며, 일부 친수성 물질들은 세포막의 셔틀 단백질(transmembrane shuttle protein)에 의해 세포 내로 이송된다. 크기가 큰 단백질은 엔도사이토시스(endocytosis)에 의해 세포 내로 이동되며 (1), 이렇게 이동된 단백질의 대부분은 세포 내 엔도솜(endosome)에 갇혀 라이소솜(lysosome)과 융합에 의해 분해되는 것으로 알려져 있다. 이러한 세포막의 특성과 세포 내 물질전달 기전으로 인해 친수성

잔기를 갖고 크기가 큰 펩타이드나 단백질은 대부분 세포막을 투과하여 세포질에 전달될 수 없다는 것이 정설로 알려져 왔다 (2).

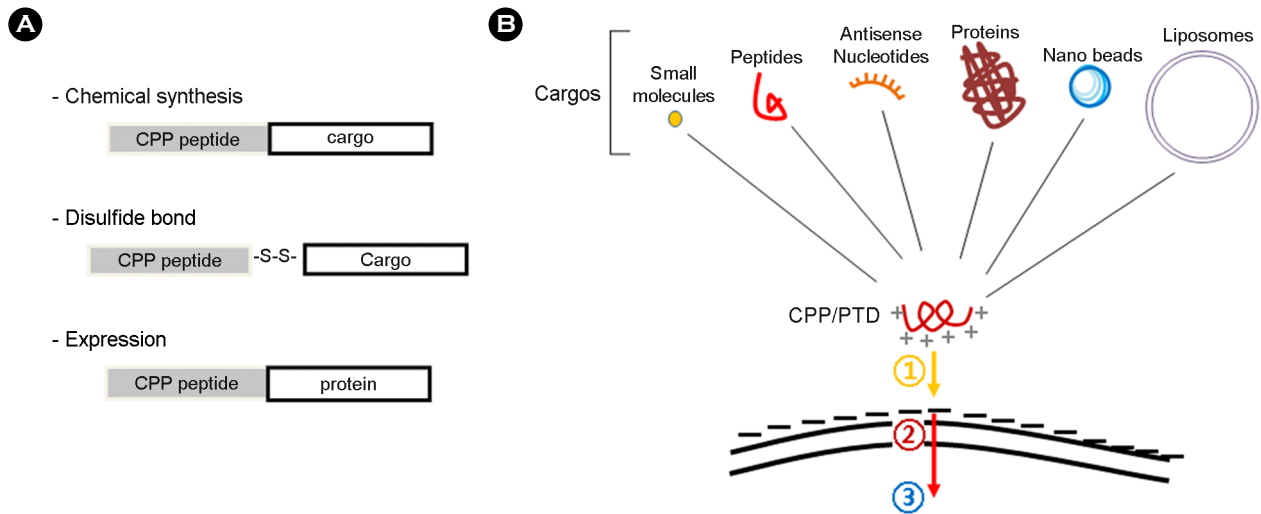
질환의 타겟(target)이 세포 내부에 있는 경우에 약물의 세포 내 전달은 질병 치료, 예방, 진단 등을 위해 반드시 선결되어야 하는 문제이다. 효과적인 세포 내 약물 전달을 위해 리포솜 등과 같은 약물 전달체에 의한 연구가 시도되어 왔지만, 생체의 면역계에 의한 빠른 소실이나, 세포와의 상호작용으로 인한 장애 등의 극복해야 할 문제점이 남아있다. 이러한 상황에서 세포막을 파괴하지 않으며, 세포독성을 나타내지 않고 세포의 생체막과 핵막을 통과해 친수성 거대 분자를 세포질 및 핵질로 전달이 가능한 기술들이 몇몇 단백질에서 세포막을 통과할 수 있는 protein transduction domain (PTDs)의 발견에 의해 연구 개발되고 있다 (3). 이러한 PTD는 PTD 자체뿐 아니라 PTD에 연결된 Cargo를 세포 내로 운할 수 있어 질병

Received: August 19, 2013/ Revised: August 26, 2013/ Accepted: August 30, 2013

\*Corresponding author: Hwajung Yi. Division of Influenza Virus, Center for Infectious Diseases, Korea National Institute of Health, Korea Centers for Disease Control and Prevention, 187, Osongsaengmyeong2-ro, Gangoe-myeon, Cheongwon-gun, Chungcheongbuk-do, 363-951, Korea.

Phone: +82-43-719-8196, Fax: +82-43-719-8219, e-mail: pobee@nih.go.kr

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).



**Figure 1. Utility of cell permeable peptide (CPP) in transduction of various cargos into the cell.** In order to utilize the CPP in intracellular transduction of various cargo molecules, (A) CPP can be covalently linked to cargos by chemical synthesis. The disulfide bonds are also used for linkage between CPP and cargos. Especially, cargos of proteins are to be expressed with CPP as recombinant proteins. (B) A wide variety of cargo has been conjugated with arginine-dependent CPPs bearing lots of positive charges. Despite the mechanism of transduction across the cellular membrane is not clearly elucidated, the initial step (1) of intracellular transduction by CPP appears to involve charge-to-charge interaction between the basic amino-acids of CPP and acidic motifs on the cell membrane. The next step (2) remains to be studied, even though there have been several hypotheses with experimental evidences for explaining how the CPPs can be internalized into cell (refer to Fig. 2). Once inside the cell (3), numerous complex events and activities can be performed on the CPP and cargo such as target binding, separation of cargo from PTD, protein refolding, post-translational modification, macromolecular assembly, nuclear import/export and so on. (B) of this figure was modified from figure 1 of the reference (2).

의 치료를 위한 약물의 전달 뿐 아니라 다양한 물질의 세포 내 전달을 요하는 다양한 분야에 응용이 가능하며 (Fig. 1), 현재 10~30여 개의 펩타이드의 세포투과성의 cell penetrating peptide (CPP)로써 다양한 CPP가 발견 및 개발되어 연구에 활용되고 있다. 이에 본 총설에서는 생물학적 의학적 활용가치가 높은 CPP에 대한 연구동향 및 활용 사례에 대한 내용을 소개하고자 한다.

## 2. CPP의 발견과 종류

CPP는 살아있는 세포의 세포막을 통과하여 세포질이나 핵에 도달할 수 있는 능력을 갖는 물질이다. 이러한 CPP는 단백질이나 단백질의 일부 도메인이 세포막을 통과하는 것이 관찰됨으로써 발견되었는데, human immunodeficiency virus (HIV)의 Tat transactivator나 *Drosophila melanogaster*의 transcription factor인 Antennapedia (Antp)가 처음 발견되었고 이후 non-natural 펩타이드에서도 이러한 현상이 관찰되었다(Table 1) (4).

CPP는 보통 10~30개의 짧은 아미노산으로 구성되어

있으며, 아미노산의 분포와 종류는 각각의 CPP에 따라 다양하나 대부분의 CPP가 염기성의 아미노산(basic amino acids, lysine and arginine)을 많이 포함하고 있으며 (5), 일부는 양쪽성 알파사슬 구조(amphipathic alpha-helical structure)를 나타낸다 (6~8). HIV 유래의 Tat, 초파리의 Antp의 호메오도메인(homeodomain) 유래의 CPP(각각 Tat, Penetratin)가 인위적으로 디자인한 CPP인 Pep-1과 함께 가장 연구가 많이 되어 있으며 이러한 CPP의 특성은 세포막의 투과가 용이하지 않은 다양한 물질(단백질, DNA, RNA, peptide)을 세포 내로 전달하여 질환의 치료 및 분자생물학 연구에 이용하는 것을 가능하게 한다 (9).

Tat는 86개의 아미노산으로 이루어진 후천성 면역 결핍증후군을 발생시키는 HIV-1의 전사인자로 감염된 세포에서 HIV-1의 전사 및 복제를 유도하고 휴지기에 있는 바이러스를 재활성화 시키는 단백질이다. 이들 아미노산 중 RKKKRRQRRR (Tat transactivator의 49-57 amino acids)이 CPP의 역할을 하는 최소 부위로 알려져 있다 (10). Tat의 아미노산을 치환시키거나 결실시키는 실험을 통해 arginine이나 lysine이 Tat가 CPP로써 세포 내로 투과하는

**Table 1.** The representative cell-penetrating peptides (CPPs).

Name	Amino acids sequences of CPPs	Origin of CPPs
Tat	GRKKRRQRRRPPQ	Tat protein of HIV-1 virus
Antennapedia (Penetratin)	RQIKIWFQNRRMKWKK	Homeoproteins
Transportan	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL	Chimeric peptide of neuropeptide Galanin and mastoparan
VP22	DAATATRGRSAASRPTEPRAPARSASRRPRPVE	Taguement protein in HSV-1 virus envelope
Hph-1	YARVRRRGPRR	Transcription factor Hph-1 protein
R11 (R9)	RRRRRRRRRRR (RRRRRRRRRR)	Artificial peptide
Signal sequence based peptide	AAVALLPAVLLALLAP	Signal peptide of kFGF (Kaposi Fibroblast Growth Factor)
Amphipathic peptide	KLALKLALKALKAAALKLA	Artificial peptide

효율을 결정하는 중요한 역할을 하는 것이 밝혀졌다. 또한 다중의 Tat를 사용하면 리포솜과 같은 보다 큰 물질을 세포 내로 운반할 수 있다 (11).

Antp는 초파리의 배아 발생 시 형태 형성에 관여하는 전사인자로 알려진 호메오단백질(homeoprotein)로, 초파리 이외의 다른 종에서도 호메오단백질이 존재하며 여러 종간에 호메오단백질 내의 호메오도메인에 60개의 유사하거나 동일한 아미노산 서열을 지닌 helix-turn-helix 구조를 가지고 있다. 이러한 구조가 Antp에서 유래한 펩타이드의 세포투과성에 중요한 역할을 할 것으로 생각되며 (6), 호메오도메인의 세 번째 helix에 위치한 RQIKIWFQNRRMKWKK는 초파리와 사람에서 동일한 아미노산 서열을 가지며 세포투과성에 핵심적인 역할을 하는 것으로 밝혀졌다 (12). 또한 호메오도메인은 DNA와 결합할 수 있는 구조를 지니고 있어, 현재 Antp 유래 CPP는 penetratin이란 이름으로 상용화되어 분자생물학 연구에 사용되는 유전자 DNA(주로 plasmid DNA)를 진핵세포에 도입하는 트랜스펙션 시약으로 판매되고 있다 (13).

바이러스나 초파리 유래 단백질에서 유도된 CPP의 경우, 치료제 등으로 개발되어 인체에 적용할 때 CPP에 대한 면역반응을 유도할 가능성이 있고, 이렇게 유도된 면역반응은 같은 CPP를 반복적으로 투여할 때 그 효능이 반감 혹은 소실될 수 있다. 이러한 가능성을 배제하기 위해 인체의 단백질체에서 CPP를 찾아내고, 이를 이용하려는 연구가 많이 진행되고 있다. 실제로 인간이 가지고 있는

몇몇 단백질에서 CPP 기능을 하는 아미노산 서열이 밝혀졌는데, 이들 중 하나가 세포 내 산소의 농도를 인식하여 관련 유전자의 발현을 조절하는 전사인자인 HIF-1 단백질의 발현 후 수식(modification)을 담당하는 Hph-1 또한 CPP로써 기능을 하는 것으로 알려져 있다 (14). 또한 인체 단백질인 Hox-A5의 호메오도메인은 초파리 호메오단백질 Antp와 91%의 유사성을 지니며 특히 RQIKIWFQNRRMKWKK 부위는 세포투과성을 지니는 것으로 초파리의 호메오단백질에서 발견된 것과 서열이 동일하며, 이 부분은 Hox-A5 뿐만 아니라 Hox-A4, Hox-B5, Hox-B7, Hox-D3, GAX, MOX-2와 같은 사람의 다른 호메오단백질에서 발견되는 것으로 보아 호메오단백질에서 기능적으로도 중요한 역할을 할 것으로 생각된다 (15).

기존에 밝혀진 CPP의 아미노산 서열을 기반으로 하여 보다 효과적으로 세포막을 통과할 수 있는 새로운 PTD를 만들려는 시도가 있다. 대부분의 경우, 염기성 아미노산인 lysine이나 arginine과 같은 양 전하를 띄는 서열을 첨가하여 만들어졌다. 그 예로는 R9 (RRRRRRRRRR)이나 R11 (RRRRRRRRRRR)와 같은 경우 arginine만으로 이루어져 CPP로의 역할을 하는 것이 밝혀졌으며, 가장 잘 알려진 인공 합성 CPP로 transportan이 있다. Transportan은 galanin 수용체 리간드인 galanin 뉴로펩타이드의 12개 아미노산 서열과, G-protein을 활성화시키며 세포독성이 있는 mastoparan 펩타이드의 14개 아미노산 서열이 연결된 카이메라 펩타이드이다. 실험 결과 transportan에서 AGYLLGKINLKALAALAKKIL 부위가 세포투과성에 필

요한 부분임이 밝혀졌다. Mastoparan은 세포막에 구멍을 내는 기능을 하는 것으로 알려져 있다. Mastoparan과 galanin을 서로 결합한 transportan은 세포막에 구멍을 내는 능력뿐만 아니라 수용체와 결합하는 능력을 모두 가짐으로써 세포막을 투과하는 성질을 갖는 것이라 생각되고 있다 (11).

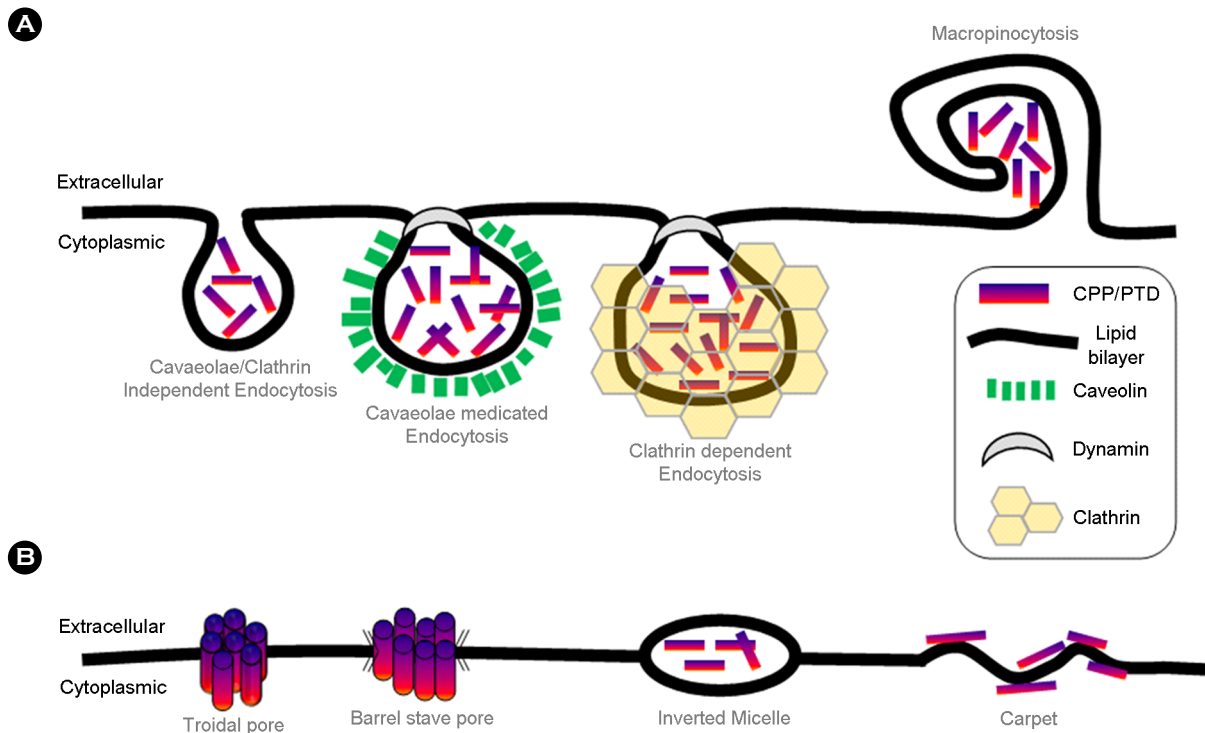
### 3. CPP의 세포투과 기전

분자량이 약 200 dalton 이상이며 친수성의 물질은 세포 내로 자유롭게 이동하지 못한다. 이러한 고분자 혹은 친수성 물질이 세포 외부에서 세포 내부로 이동하는 경우는 세포 자체의 엔도사이토시스에 의해 능동적으로 운반되는 것으로 알려져 있다. CPP의 경우 친수성과 소수성의 다양한 잔기를 갖는 10~30개의 아미노산으로 이루어진 분자량이 1,000~3,000 dalton의 물질로 엔도사이토시스에 의해 세포 내로 수송되는 것으로 추정되어 이를 규명하기 위한 연구가 수행되었다. 초기 실험에서는 CPP를 세포의 엔도사이토시스가 저해되는 낮은 온도, 혹은 엔도사이토시스 저해제를 처리한 세포를 이용한 실험에서도 CPP가 세포 내로 투과되어 존재함을 확인하였다. 따라서 초기 연구에서는 CPP의 세포 내 투과성이 엔도사이토시스와는 무관하게 일어나는 것으로 생각했다 (2, 9, 11).

D-enantiomer(거울상 이성질체)를 사용하거나 역순의 아미노산 서열을 갖는 CPP를 사용하여 실험한 결과 L-enantiomer와 바른 순서를 갖는 CPP와 비교하여 세포 내 투과성을 측정한 결과 큰 차이를 나타내지 않은 것으로 보아 특정한 세포막의 수용체가 CPP의 세포 내 유입에 관여하지 않는 것으로 생각된다 (5, 16, 17). 이후 일부 CPP를 사용한 몇몇 연구에서 수용체와 에너지 비의존적으로 일어나는 것으로 생각되는 CPP 펩타이드의 세포 내 투과성이, 형광이나 방사선으로 표지된 CPP를 세포에 처리하고, 이러한 세포 내에 형광이나 방사선의 잔류 양을 측정하여 CPP의 세포 내 투과 정도를 측정하는 실험에서 세포를 고정(cell fixation)하는 과정에서 발생하는 실험적 오류일 수 있는 것이 확인되었다. 형광이나 방사선이 표지된 CPP 펩타이드가 세포 내에 투과되지 않고 세포막에 결합한 상태로 고정되어 이후 실험과정에서 모두 제거되지 않아 CPP가 세포 내에 투과되어 있는 것으로 오판하는 결과를 초래할 수 있는 것으로 확인되었다 (1, 3, 9, 11,

17). 이외에도 CPP의 세포투과 기전에 대한 다양한 가설이 존재하며, CPP의 종류에 따른 아미노산 서열의 구성과 세포에 처리한 농도에 따라 그 세포투과 기전이 다를 것으로 생각되고 있다 (1, 11).

세포 외부의 물질이 세포 내부로 수송되는 기전은 직접투과와 엔도사이토시스로 나뉘며(Fig. 2), 이전의 직접 세포투과 기전에 대한 연구는 항생 펩타이드에서 많은 연구가 되어 왔다. 항생 펩타이드는 미생물의 세포막에 대한 특이적인 작용을 통해 항생 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 항생 펩타이드의 세포막에 대한 작용 및 투과 기전은 직접투과 기전으로 크게 'barrel-stave', 'carpet', 'toroidal-pore'의 세 가지 모델로 구분될 수 있다. 'Barrel-stave' 모델은 세포막에 붙은 helix 구조를 갖는 다수의 펩타이드가 축적이 되고 세포막으로 함입되어 펩타이드의 소수성 부분이 세포막의 지질과 결합하여 펩타이드가 세포막을 관통하는 구멍을 형성하게 된다. 이러한 세포막의 구멍을 통해 세포 외부의 물질이 세포 내로의 전달이 가능하게 된다. 'Carpet' 모델은 펩타이드의 양 전하를 갖는 부분이 세포막의 음이온성 인지질의 머리 부분에 결합하여 세포막 표면을 카펫처럼 덮는다. 이 경우, 세포막의 국소 지역에 펩타이드의 농도가 높아지면 펩타이드는 detergent의 역할을 하여 세포막에 마이셀(micelle)을 형성하게 하여 세포 이중막 구조를 파괴하여 펩타이드가 세포 내로 침투하게 된다. 'Toroidal-pore' 모델은 helix 구조를 갖는 펩타이드가 세포막으로 침투하여 세포막 지질층이 왜곡되도록 하여 세포막에 구멍이 형성되는 것으로 물리적으로 세포막의 기능이 상실되어 펩타이드 및 세포 외부의 물질이 세포 내로 투과하는 모델이다(Fig. 2). 이러한 펩타이드에 의한 세포 외부의 물질의 세포 내 전달 기전은 펩타이드가 양쪽성 helix 구조를 갖는 경우에 설명이 용이하며 일부 CPP의 경우 이러한 양쪽성 helix 구조를 갖는 경우가 있어 이러한 방식으로 CPP의 세포 내 수송 기전의 일부를 설명할 수 있으리라 생각된다. 그러나, 'barrel-stave', 'carpet', 'toroidal-pore' 세 가지 모델에 의해 세포 외부의 물질이 세포 내부로 유입이 될 경우 세포막을 불안정하게 만들며, 세포막에 손상을 주어 세포독성을 나타내는 경우가 많다. 대부분의 CPP의 경우 다양한 크기의 전달물질과 결합하여 세포 내부로 투과 혹은 이동시 독성을 나타내지 않는다. 이러한 사실로 보아 위의 모델에서 단지 CPP의 세포 내 수송되는 기전의 일부만을 설명하는 것으로 생각되고 있다 (9).



**Figure 2. Intracellular transduction mechanisms of cell permeable peptides.** Intracellular transduction of CPPs has been explained with a variety of mechanisms. These mechanisms include (A) energy-dependent pathways, based on vesicle forming, known as endocytosis, and (B) direct translocation, which is engaged with the formation of hydrophilic pores or local destabilization of the cytoplasmic membrane. This figure was modified from figure 1 of the reference (9).

한편 CPP의 세포 내 수송이 엔도사이토시스 작용과 연관이 있음이 밝혀졌다. 엔도사이토시스는 크게 파고사이토시스(phagocytosis)와 피노사이토시스(pinocytosis)로 구분되며, 파고사이토시스는 주로 매크로파지(macrophage)와 같은 특정한 세포에서 일어나며, 피노사이토시스(pinocytosis)는 대부분의 세포에서 일어나며 매크로피노사이토시스(macropinocytosis), clathrin 매개 엔도사이토시스, caveolae 매개 엔도사이토시스가 이에 속한다(Fig. 2). CPP의 세포 내 투과 기전이 엔도사이토시스에 의한 것인지 확인하기 위해, CPP 그 자체 혹은 운반물질이 연결되어 있는 CPP를 세포에 처리 시, 특정 엔도사이토시스 경로에 해당하는 특이적 저해제를 사용하거나, 엔도사이토시스 경로에 해당하는 특정 단백질의 dominant-negative 단백질을 과발현 하거나, 세포를 저온처리(energy depletion condition)하거나 하는 방식 등으로 실험한 결과, 가장 대표적인 CPP의 하나인 Tat에 GST 혹은 GFP가 연결된 물질의 경우 주로 caveolae 매개 엔도사이토시스에 의해 세포 내로 들어가는 것으로 밝혀졌으며, Tat 자체나 Tat-HA2

의 경우 매크로피노사이토시스에 의해 세포 내로 수송되는 것으로 드러났다 (1, 9, 18). 한편, 다른 연구에서는 모든 세포의 엔도사이토시스 경로를 배제하고자, 유전공학 기법으로 clathrin과 caveolae 매개 엔도사이토시스가 결여 되도록 제작된 세포에 저온(energy depletion)에서 arginine-rich의 다양한 CPP를 사용하여 실험한 결과, Tat의 경우 세포 내로 이동하는 것이 관찰되는 것으로 보아 Tat의 세포 내 이동은 전적으로 엔도사이토시스만 의존하지 않는다는 결론을 내리기도 했다. 이러한 결과들은 CPP의 세포 내 수송이 알려진 엔도사이토시스 뿐만 아니라 밝혀지지 않은 다른 세포 내 수송 경로를 통해 세포 내로 수송될 가능성이 있으며, CPP의 세포투과 기전은 CPP의 구성 아미노산 종류와 생화학적인 구조에도 영향을 받는 것으로 생각될 수 있다 (9, 11).

#### 4. 세포투과성 펩타이드의 활용

질환에 있어 유용한 단백질을 치료목적으로 사용하는

**Table 2.** Therapeutic cases in animal models of diseases by utilizing cell-penetrating peptides (CPPs).

CPPs for vector	Cargo molecules delivered by CPPs	Disease models	Therapeutic effects
R11 (RRRRRRRRRRR)	VIVIT (immunosuppressant peptide)	Islet allogeneic transplantation in mouse	Mice survival by inhibiting immunorejection (allogeneic immune response) responses
MTM (AANLLPNLLAAP)	SOCS3 (immunosuppressant protein)	Sepsis in mice	Increasing mice survival rate by immune suppression
Hph-1 (YARVPPPGPRR)	Cytoplasmic domain of CTLA-4 (immunosuppressant protein)	Allergy model in mice	Alleviating allergic responses by immune suppression

것은 대단히 매력적인 일이다. 그러나 질병의 치료를 위해 단백질과 같은 큰 크기의 물질은 그 구조 및 성질을 유지하면서 세포 내로 도입하는 것은 하나의 과제로 여겨져 왔다. 이러한 단백질을 세포 내로 전달하기 위해 lipid 혹은 polymer 기반의 운반체(liposome, microparticle, nanoparticle)를 사용하였으나, 단백질의 전달 효율이 매우 낮은 경우가 대부분이었다. 이에 CPP를 이용 다양한 종류의 기능성 단백질( $\beta$ -galactosidase, eGFP, Bcl-xL, human catalase, human glutamate dehydrogenase, Cu, Zn-superoxide dismutase, NF- $\kappa$ B inhibitor srIkB $\alpha$ , HSP70)과 접합하여 세포에 적용하여 성공적으로 타겟 단백질을 다양한 세포 내로 전달한 연구 결과들이 있다. 이러한 결과들은 CPP가 종양이나, 면역질환, 대사질환 등에 단백질 기반 치료 기법이 적용되어 치료 단백질을 세포 내로 도입하는데 활용될 수 있는 강력한 수단임을 보여준다(Table 2) (13, 14, 19, 20).

안티센스 올리고뉴클레오타이드를 이용한 기술은 세포 내의 특정 유전자를 표적으로 하여 질환의 치료에 적용할 수 있는 기술이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 특정 유전자가 특이적으로 작용 가능한 이유는 유전자가 갖는 염기서열 특이성에 기인하며, 세포 내로 유입된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 상보적인 염기서열을 갖는 특정한 유전자의 mRNA에 결합하게 되고 RNA와 DNA가 상보적으로 결합된 것을 인식하여 분해하는 효소인 RNaseH에 의해 mRNA가 제거되어 유전자의 발현이 저해된다 (21~23). 이러한 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 세포 내에 도입 시 특정한 유전자만을 타겟하여 제어할 수 있으며 생체에서 면역반응을 유발하지 않는 장점이 있으나, DNA의 특성상 세포 내에 도달하기 전에 생체에 다량으로 존재하는 DNase에 의해 분해가 될 수 있으며, 생체 내에서 구조적으로 불안정한 요소가 있다. 또

한 안티센스 뉴클레오타이드가 타겟하는 조직과 세포 내로 운반할 수 있는 기술이 선행되지 않는다면 실제 질병에 적용하여 사용하기 어려운 단점이 있다. 이러한 점을 극복하기 위하여 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 생화학적으로 변형하여 생체 내에서의 구조적 안정성을 극대화하기 위한 locked nucleic acids (LNA), Peptide Nucleic Acids (PNA), phosphorodiamidate morpholino oligomer (PMO), hexitol nucleic acids (HNA) 등이 개발되었다. 또한, 세포 내로 올리고뉴클레오타이드 혹은 이의 유도체(LNA, PNA, PMO, HNA)의 세포 내로 전달하는 문제를 해결하기 위하여 몇몇 연구에서 CPP에 PNA나 PMO를 결합하여 세포 내 유전자의 발현을 조절하고자 하는 시도가 있었다. CPP (penetratin)에 PNA를 접합하여 human Bowes 세포에서 galanin 수용체의 mRNA의 발현을 억제한 연구가 있었다. Ampipathic CPP인 (MAP)에 nociceptin/orphanin FQ receptor mRNA에 상보적인 PNA를 연결하여 CHO 세포와 신생 랫드의 cardiomyocyte에 처리하여 타겟 수용체와 관련된 생체반응을 조절한 결과가 있다 (24~26).

다양한 나노운반체(nanocarrier)를 이용한 약물의 전달은 생체 내에서의 안정성을 증가시키고, 약동성을 개선하여 그 효능을 극대화 시키고 부작용을 줄이기 위해 연구가 되고 있다. 나노운반체로써 리포솜(liposome)이나 마이셀(micelle)이 주로 사용되고 있고, 이러한 막지질 기반의 나노운반체들에 특정 세포나 분자를 표적 할 수 있는 리간드나 분자 이미징을 위한 기능성기의 수식을 통해 질병의 진단과 치료에 적용하고자 하는 시도가 행해지고 있다. CPP를 리간드로 이용해 리포솜이나 마이셀을 수식하여 리포솜이나 마이셀에 싸여져 있는 약물 혹은 나노파티클의 세포 내로의 전달을 증가하게 하는 연구 결과가 있다 (27, 28).

siRNA (small interference RNA)나 shRNA (small hairpin

RNA)를 사용한 RNA 저해(RNA interference)는 유전자의 기능을 연구하고 질병의 새로운 타겟 유전자를 발굴하는데 필수적인 방법이다 (29~31). 그러나 siRNA 역시 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 단점인 세포 내로의 수송이 어렵다는 점을 들 수 있다. 이것을 극복하기 위해 바이러스 기반 혹은 다른 전달체를 사용한 다양한 시도가 있었으나, 임상에 적용할만한 수준으로 siRNA를 세포 내로 전달하는 방법은 현재 개발되어 있지 않은 실정이다. CPP를 이용한 siRNA의 전달을 위해 CPP를 siRNA와 공유결합 혹은 비공유결합으로 연결하는 방식이 있다. Transportan, Tat, penetratin과의 공유결합에 의해 siRNA를 세포 내로 전달하여 특정한 유전자의 발현을 억제한 보고가 있다 (32~34). 위 실험에서 siRNA와 CPP를 cross-linking한 후 공유결합을 이룬 CPP-siRNA만을 정제하여 사용하지 않은 결과로 실제 공유결합으로 이루어진 CPP-siRNA가 세포 내로 들어가 작용을 한 것인지 비공유결합의 siRNA와 CPP의 복합체(complex)가 세포 내로 전달되어 작용을 하였는지 분명하지 않으며, 이후 다른 연구에서 정제된 CPP-siRNA를 사용한 결과 상당히 높은 농도로 사용할 경우에만 세포 내에서 타겟 유전자의 억제가 관찰되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 최근에서 siRNA와 CPP의 비공유 복합체를 제작하여 siRNA를 세포 내로 전달하려는 많은 연구가 이루어지고 있다. 예로, 펩타이드 OCT-4를 타겟하는 siRNA와 CPP 비공유결합 복합체를 제작하여 세포에 처리한 결과 OCT-4 뿐만 아니라 OCT-4에 의해 조절되는 유전자인 cyclin B1 역시 발현이 저해되는 것을 관찰하였다. 같은 방식으로 Polyarginine CPP에 VEGF (vascular endothelial growth factor)를 타겟으로 하는 siRNA의 비공유결합 복합체를 제작하여 이를 세포에 적용 VEGF 유전자의 발현을 억제한 사례도 있다 (35, 36). 이러한 비공유결합을 활용하여 CPP-siRNA 복합체를 제작하는 방식은 대부분 음의 전하를 띠는 siRNA와 양의 전하를 띠는 CPP 사이의 정전기적인 상호작용에 기반으로 형성된다. dsRNA 바인딩 도메인 (DRBD)을 Tat에 접합하여 이를 siRNA와 상호반응 시켜 비공유결합 복합체를 형성하게 하는 방식이 개발되어 있으며, 이러한 DRBD 방식을 활용하여 인간배아줄기세포, T세포 등에 특정 유전자의 발현을 억제한 연구 결과가 있다 (37)

## 5. 결론

다양한 연구를 통해 CPP는 다양한 크기와 구조 및 생화학적 성질을 갖는 물질을 세포 안으로 전달하게 하는 물질임이 밝혀졌다. 이러한 CPP는 약리효과를 갖고 있으나 세포 내 전달이 어려워 치료제로 개발되지 못했던 다양한 물질의 약물전달시스템으로 활용 가능할 것으로 생각된다.

실제 환자의 치료를 위한 다양한 약물, 올리고뉴클레오타이드, 유전자 치료 물질 등이 연구 개발되고 있다. 이러한 치료제 후보 물질의 생체 내에서의 전달에 있어 안전하고 재현성이 좋으며 효과적인 약물전달체계의 개발이 필수적이다. CPP가 이러한 약물 및 다양한 물질들을 세포 내로 전달하는 효율적인 전달체계로 임상에서 활용되기 위해서는 CPP에 의한 물질의 세포 내 전달 기전이 보다 분명하게 밝혀져야 하며, CPP에 의한 치료 물질의 세포 내 수송에 있어 해결되어야 할 기술적 과제는 CPP를 통해 세포 내로 유입된 약물이나 치료 물질의 많은 부분이 엔도솜에 갇혀 세포질 내로 유입되어 작용하지 못하는 점과 CPP가 세포 특이성을 갖게 하여 치료하고자 하는 특정 조직과 세포에만 약물이 전달될 수 있게 하는 기술의 개발이 필요하다. 이러한 단점을 극복할 수 있는 기술이 개발된다면 CPP를 이용한 다양한 질환의 치료에 적용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Joliot A, Prochiantz A. Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat Cell Biol* 2004;6:189-96.
- 2) Wadia JS, Dowdy SF. Protein transduction technology. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13:52-6.
- 3) Heitz F, Morris MC, Divita G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br J Pharmacol* 2009;157:195-206.
- 4) Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 1988;55:1189-93.
- 5) Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Tanaka S, Ueda K, *et al.* Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem* 2001;276:5836-40.
- 6) Berlese JP, Convert O, Derossi D, Brunissen A, Chassaing G.

- Conformational and associative behaviors of the third helix of Antennapedia homeodomain in membrane-mimetic environments. *Eur J Biochem* 1996;242:372-86.
- 7) Drin G, Déméné H, Temsamani J, Brasseur R. Translocation of the pAntp peptide and its amphipathic analogue AP-2AL. *Biochemistry* 2001;40:1824-34.
  - 8) Scheller A, Wiesner B, Melzig M, Bienert M, Oehlke J. Evidence for an amphipathicity independent cellular uptake of amphipathic cell-penetrating peptides. *Eur J Biochem* 2000; 267:6043-50.
  - 9) Trabulo S, Cardoso AL, Mano M, de Lima MC. Cell-Penetrating Peptides-Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems. *Pharmaceuticals* 2010;3:961-93.
  - 10) Vivès E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* 1997;272:16010-7.
  - 11) Schmidt N, Mishra A, Lai GH, Wong GC. Arginine-rich cell-penetrating peptides. *FEBS Lett* 2010;584:1806-13.
  - 12) Pietersz GA, Li W, Apostolopoulos V. A 16-mer peptide (RQIKIWQNRRMKWKK) from antennapedia preferentially targets the Class I pathway. *Vaccine* 2001;19:1397-405.
  - 13) Vasconcelos L, Pärn K, Langel U. Therapeutic potential of cell-penetrating peptides. *Ther Deliv* 2013;4:573-91.
  - 14) Choi JM, Ahn MH, Chae WJ, Jung YG, Park JC, Song HM, *et al.* Intranasal delivery of the cytoplasmic domain of CTLA-4 using a novel protein transduction domain prevents allergic inflammation. *Nat Med* 2006;12:574-9.
  - 15) Gehring WJ. Homeo boxes in the study of development. *Science* 1987;236:1245-52.
  - 16) Brugidou J, Legrand C, Méry J, Rabié A. The retro-inverso form of a homeobox-derived short peptide is rapidly internalised by cultured neurons: a new basis for an efficient intracellular delivery system. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;214:685-93.
  - 17) Suzuki T, Futaki S, Niwa M, Tanaka S, Ueda K, Sugiura Y. Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. *J Biol Chem* 2002;277:2437-43.
  - 18) Futaki S. Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:547-58.
  - 19) Noguchi H, Matsushita M, Okitsu T, Moriwaki A, Tomizawa K, Kang S, *et al.* A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice. *Nat Med* 2004;10:305-9.
  - 20) Jo D, Liu D, Yao S, Collins RD, Hawiger J. Intracellular protein therapy with SOCS3 inhibits inflammation and apoptosis. *Nat Med* 2005;11:892-8.
  - 21) Järver P, Langel U. The use of cell-penetrating peptides as a tool for gene regulation. *Drug Discov Today* 2004;9:395-402.
  - 22) Laufer SD, Restle T. Peptide-mediated cellular delivery of oligonucleotide-based therapeutics *in vitro*: quantitative evaluation of overall efficacy employing easy to handle reporter systems. *Curr Pharm Des* 2008;14:3637-55.
  - 23) Gleave ME, Monia BP. Antisense therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 2005;5:468-79.
  - 24) Juliano R, Alam MR, Dixit V, Kang H. Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 2008;36:4158-71.
  - 25) Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* 2003;270:1628-44.
  - 26) Lebleu B, Moulton HM, Abes R, Ivanova GD, Abes S, Stein DA, *et al.* Cell penetrating peptide conjugates of steric block oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:517-29.
  - 27) Torchilin VP. Cell penetrating peptide-modified pharmaceutical nanocarriers for intracellular drug and gene delivery. *Biopolymers* 2008;90:604-10.
  - 28) Temsamani J, Vidal P. The use of cell-penetrating peptides for drug delivery. *Drug Discov Today* 2004;9:1012-9.
  - 29) Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002;418:244-51.
  - 30) Dorsett Y, Tuschl T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:318-29.
  - 31) de Fougères A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:443-53.
  - 32) Muratovska A, Eccles MR. Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. *FEBS Lett* 2004;558:63-8.
  - 33) Chiu YL, Ali A, Chu CY, Cao H, Rana TM. Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells. *Chem Biol* 2004;11:1165-75.
  - 34) Davidson TJ, Harel S, Arboleda VA, Prunell GF, Shelanski ML, Greene LA, *et al.* Highly efficient small interfering RNA delivery to primary mammalian neurons induces MicroRNA-like effects before mRNA degradation. *J Neurosci* 2004;24: 10040-6.



- 35) Zeineddine D, Papadimou E, Chebli K, Gineste M, Liu J, Grey C, *et al.* Oct-3/4 dose dependently regulates specification of embryonic stem cells toward a cardiac lineage and early heart development. *Dev Cell* 2006;11:535-46.
- 36) Crombez L, Morris MC, Dufort S, Aldrian-Herrada G, Nguyen Q, Mc Master G, *et al.* Targeting cyclin B1 through peptide-based delivery of siRNA prevents tumour growth. *Nucleic Acids Res* 2009;37:4559-69.
- 37) Eguchi A, Meade BR, Chang YC, Fredrickson CT, Willert K, Puri N, *et al.* Efficient siRNA delivery into primary cells by a peptide transduction domain-dsRNA binding domain fusion protein. *Nat Biotechnol* 2009;27:567-71.
-