

# 펩토이드 라이브러리와 그 응용

## Peptoid Library and Its Application

임현석 | Hyun-Suk Lim

Department of Chemistry, Pohang University of Science and Technology  
77 Cheongam-Ro, Nam-Gu, Pohang, Gyeongbuk 790-784, Korea  
E-mail: hslim@postech.ac.kr

### 1. 서론

펩토이드(peptoids)는 *N*-alkylated glycine의 올리고머 형태를 갖는 펩타이드 유사체(peptidomimetics)이다(그림 1a).<sup>1</sup> 펩토이드에서는 치환기(R)가 아민에 붙어 있으므로 카이랄 중심(chiral center)과 아마이드 수소(amide hydrogen)가 없는 형태를 갖는다. 이러한 펩토이드는 펩타이드와는 달리 비자연성(unnatural)이기 때문에 단백질 분해 효소에 의해 쉽게 분해되지 않으므로 생체 내 안정성이 매우 뛰어나다. 또한 아마이드 수소 대신 알킬기가 치환되어 있으므로 펩타이드에 비해 상대적으로 소수성을 갖게 되며, 세포 투과성이 훨씬 좋은 것으로 알려져 있다.<sup>2,3</sup> 따라서 펩토이드는 펩타이드의 단점을 극복할 수 있는 우수한 펩타이드-유사체로서의 가능성을 가지고 있다.<sup>4</sup> 또한 펩토이드는 펩타이드와 마찬가지로 고체상 합성법을 통해 간단히 합성할 수 있고, 거대한 라이브러리의 구축이 가능하다.<sup>5,6</sup> 본 글에서는 펩토이드 라이브러리 합성과 고효율 스크리닝 및 그 응용에 대해 소개하고자 한다.

### 2. 본론

#### 2.1 펩토이드 라이브러리의 합성

펩토이드는 펩타이드와 마찬가지로 고체상(solid-phase) 합성법을 이용하여 손쉽게 합성이 가능하다.<sup>6</sup> 그림 1b에 나타낸 바와 같이 아민기를 갖는 폴리머 비드(polymer beads)를 출발 물질로 하여 브로모아세틸화(bromoacetylation) 반응 및 아민 치환 반응의 두 단계의 반응을 통해 간단히 펩토이드 잔기를 도입할 수 있다. 이와 같은 과정을 반복함으로써 펩토이드 올리고머를 효율적으로 합성할 수 있다. 또한 여러 가지 다른 일차 아민(primary amines)을 사용함으로써 다양한 구조의 펩토이드 합성이 가능하다. 특히, 수백 개 이상의 구조적으로 다양한 치환기를 갖는 일차 아민들을 시약으로 쉽게 구매할 수 있으며, 이러한 아민들을 building block으로 사용하면 펩토이드 라이브러리(combinatorial library)의 합성이 가능하다(그림 1c). 펩토이드 라이브러리 합성은 잘 알려진 split-and-pool 방법을 이용하며,<sup>7</sup> 구체적인 과정은 다음과 같다. 먼저, 그림 2에서 보는 바와 같이 수만-수백만 개의 폴리머 비드에 브로모아세틸화를 한 후 여러 개의 다른 반응 용기에 같은 양으로 나눈다(split 과정). 각 반응 용기에 있는 비드들을 다른 일차 아민과 반응을 시킨 후, 모든 비드를 한 개의 반응 용기에 넣고 잘 섞어 줌으로써 randomization을 시킨다(pool 또는 mix 과정). 모든 비드에 대해서 브로모아세틸화 반

Author



임현석

1991 한양대학교 화학과 (학사)  
1993 한양대학교 화학과 (석사)  
1993-2005 중외제약 책임연구원  
2004 포항공과대학교 (박사)  
2005-2008 UT-Southwestern Medical Center (미국), 박사후연구원  
2008-2012 Indiana University School of Medicine (미국), 조교수  
2012-현재 포항공과대학교 화학과 부교수



어린 펩토이드는 재합성하고, HPLC 정제를 하여 순수한 상태로 얻는다. 이후 이들 펩토이드가 실제 표적 단백질에 결합하는지 다양한 생화학적 어세이(assay) 방법을 통해 검증한다. 예를 들면 fluorescence polarization assays, isothermal calorimeter (ITC), surface plasmon resonance(SPR), 또는 NMR 방법 등을 이용할 수 있다. 이후 추가적인 실험을 통해 표적 단백질의 리간드로서의 기능이 있는지를 확인하게 된다. 앞서 언급한대로 펩토이드 라이브러리는 대부분 표적 단백질과 직접 인큐베이션을 통해 단백질 리간드를 발굴하였다. 최근 UT- Southwestern Medical School의 연구 그룹에서는 펩토이드 라이브러리를 특정 단백질을 표면에 발현시킨 세포와 인큐베이션 하는 방법인 세포-기반 스크리닝을 개발한 바 있다. 이 방법을 이용하면 분리 및 정제가 힘든 막단백질을 표적으로 하는 펩토이드 리간드를 손쉽게 발굴할 수 있다.<sup>9</sup>

비드상 스크리닝 방법 외에 마이크로어레이(microarray)를 이용하여 펩토이드 라이브러리 스크리닝이 가능하다(그림 4). 그림 4a에 나타낸 바와 같이 OBOC 펩토이드 라이브러리를 합성한 후, 각각의 비드를 96-well plate의 각 well에 넣고 cleavage solution(일반적으로 trifluoroacetic acid와 같은 강산)을 넣어서 펩토이드를 비드로부터 분리시킨다. 남은 cleavage solution을 evaporation으로 제거한 후, DMSO 등의 용매를 넣어 stock solution을 만든다. 이렇게 만들어진 펩토이드를 포함하는 stock solution은 마이크로어레이(microarray)를 이용하여 유리기판에 프린팅을 함으로써 마이크로어레이 칩을 제작할 수 있다. 비드상 스크리닝에서와 마찬가지로 마이크로어레이 칩 상에 제조된 펩토이드 라

이브러리는 형광표지된 단백질과 인큐베이션을 하는 방식으로 스크리닝을 할 수 있다. 칩을 충분히 씻어 준 후에 형광스캐너를 이용하여 가장 강한 형광을 보이는 spot을 찾을 수 있다. 이 spot에 해당하는 펩토이드의 구조는 MS/MS방법을 통해 확인할 수 있다. 마이크로어레이 칩을 이용하면 형광스캐너를 통해 스크리닝을 함으로써 형광의 세기를 정량화할 수 있기 때문에 매우 편리하게 단백질 리간드를 찾을 수 있다. 한가지 단점은 마이크로어레이로 사용하는 유리기판에는 약 10,000개 정도의 spot만을 프린팅할 수 밖에 없기 때문에 비드상 스크리닝에 비해 상대적으로 적은 수의 펩토이드 라이브러리 스크리닝만이 가능하다는 것이다. 최근 미국 Scripps의 Thomas Kodadek 그룹은 이러한 펩토이드 라이브러리 기반의 마이크로어레이를 알츠하이머병, 암과 같은 질병의 진단용 칩으로의 응용이 가능함을 보였다.<sup>10,11</sup>

이러한 결합력-기반의 비드상 스크리닝 방법은 여러 가지 중요한 장점을 가지고 있다. 우선 비드상 스크리닝법은 기존의 전통적인 화합물 스크리닝 방법에 비해 매우 경제적이다. 단백질 리간드를 발굴하기 위해서 일반적으로 multi-well plate에서 행해지므로 단백질 등 시료가 매우 많이 필요하며, 무엇보다도 스크리닝에 사용되는 라이브러리 화합물 모두 일정 순도 이상으로 정제된 상태여야 한다. 이와 같은 많은 라이브러리 화합물들을 구매 또는 개별 합성 하는 것은 엄청난 비용이 필요하다. 또한 이들 수많은 화합물들을 multi-well plate의 각 well에 일정 농도로 넣어 주기 위해서는 값 비싼 자동화 장비 등이 요구된다. 이에 반해 비드상 스크리닝에서는 한 개의 시험관에 모든 라이브러리 화합물을 넣고 표적 단백질과 인큐베이션을 하는 간단한 스크리닝을 함으로

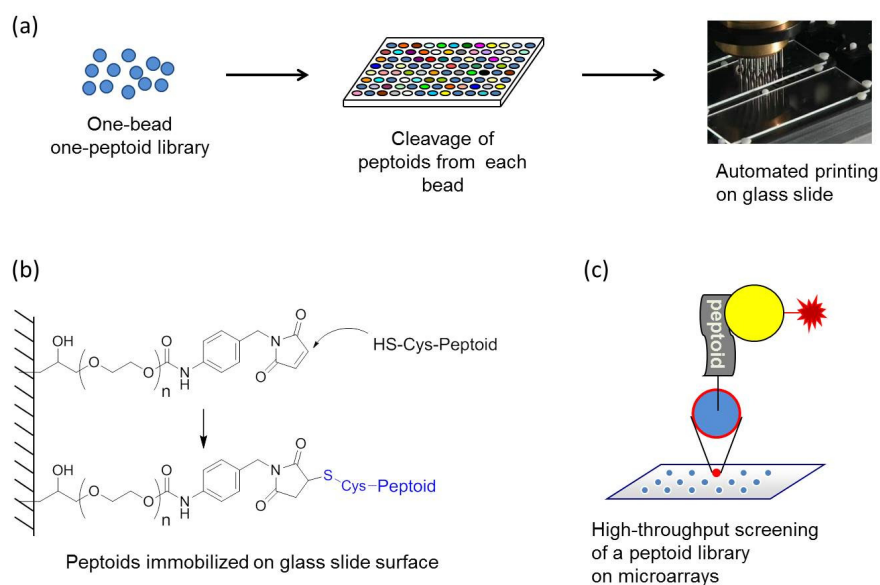


그림 4. (a) One-bead one-compound combinatorial library로부터 마이크로어레이의 제조, (b) 각 펩토이드를 유리기판에 immobilization할 때의 화학반응, (c) 마이크로어레이 칩 상의 펩토이드 라이브러리를 이용한 고속 검색법의 모식도.

써 매우 적은 양의 단백질만이 필요하며, 별다른 고가 장비가 요구되지 않는다. 수만 ~ 수백만 개의 화합물을 갖는 거대한 라이브러리의 스크리닝이 1-2주 내에 가능하다. 또한, 결합력-기반의 비드상 스크리닝은 표적 단백질에 대한 3차원 구조 정보를 필요로 하지 않는다는 장점이 있다. 많은 단백질들이 상호작용하는 단백질 또는 리간드와 결합을 하면서 단백질 표면의 구조가 변경되어 새로운 pocket을 만드는 경우가 있다. 이러한 pocket은 약물 디자인의 표적이 될 수 있다. 하지만, 단백질이 다른 단백질 등과 결합하는 과정에서 다이내믹한 구조변화에 의해 생기는 pocket은 단백질 혼자 있을 때는 관찰되지 않기 때문에 설명 표적 단백질의 X-선 결정구조가 밝혀져 있더라도 그러한 pocket을 예측하는 것은 어렵다.<sup>12</sup> 결합력-기반의 스크리닝에서는 다양한 구조를 갖는 수많은 펩토이드로부터 대상 단백질에 직접 결합하는 물질을 찾는 unbiased approach이므로 이러한 예측이 힘든 pocket에 직접 결합하는 리간드를 찾는데 매우 적합한 방법이 될 수 있다.

### 2.3 고리형 펩토이드 라이브러리

펩토이드 라이브러리는 단백질 리간드를 발굴하기 위한 아주 유용한 화합물 소스라고 할 수 있지만, 한 가지 단점이 있다. 앞서 언급한 바와 같이 펩토이드 구조에는 카이랄 중심과 아마이드 수소가 없다. 따라서 일반적인 펩토이드는 기본적으로 상당히 flexible한 구조를 갖는다. 이러한 펩토이드는 단백질에 결합 전후의 엔트로피 차이가 상대적으로 크기 때문에 큰 entropy penalty를 갖는다. 따라서 일반적으로 펩토

이드 라이브러리 스크리닝을 통해 얻어진 hit 화합물은 표적 단백질에 대한 결합력이 그다지 높지 않다. 이러한 단점을 극복하기 위해 여러 가지 구조적 견고함을 갖는 펩토이드의 개발이 활발히 진행되고 있다. 대표적인 방법은 선형 펩토이드의 고리화 반응을 통해 고리형 펩토이드를 만드는 방법이다. 최근 본 연구그룹을 포함한 몇몇 연구그룹에서 고리형 고리형 펩토이드(cyclic peptoids) 또는 이중고리형 펩토이드(bicyclic peptoids)를 개발한 바 있다(그림 5a).<sup>13-17</sup> 고리형/이중고리형 펩토이드는 일반적인 선형 펩토이드에 비해 훨씬 높은 구조적 견고함을 가지게 되며, pre-organized 구조를 갖게 되어 표적 단백질에 훨씬 더 강하게 결합할 것으로 기대된다. 다만 한 가지 기술적인 문제는 고리형 펩토이드를 이용하여 라이브러리를 구축하고 스크리닝을 할 때 구조 분석이 어렵다는 점이다. 앞서 언급한 바와 같이 선형 펩토이드는 Edman sequencing 또는 MS/MS를 통해 간단히 구조 분석이 가능하다. 하지만 고리형 구조의 펩토이드가 되면, Edman reaction이 시작되는 N-terminal의 아민기가 없어져서 Edman sequencing이 불가능하다. 또한 고리형 펩토이드는 MS/MS에서 매우 복잡한 fragmentation 형태를 보인다. 본 연구 그룹에서는 고리형 펩토이드에 site-specific cleavage라는 전략을 통해 이러한 문제를 효율적으로 해결하였다.<sup>13</sup> 즉, 고리형 펩토이드를 합성할 때 thioaryl 그룹을 넣어 주고, 나중에 oxidative ring opening 반응을 통해 고리형 펩토이드를 다시 선형으로 전환시켜줄 수 있다. 상기에서 설명한 바와 같이 선형 펩토이드는 MS/MS 분석으로 구조 확인이 가능하

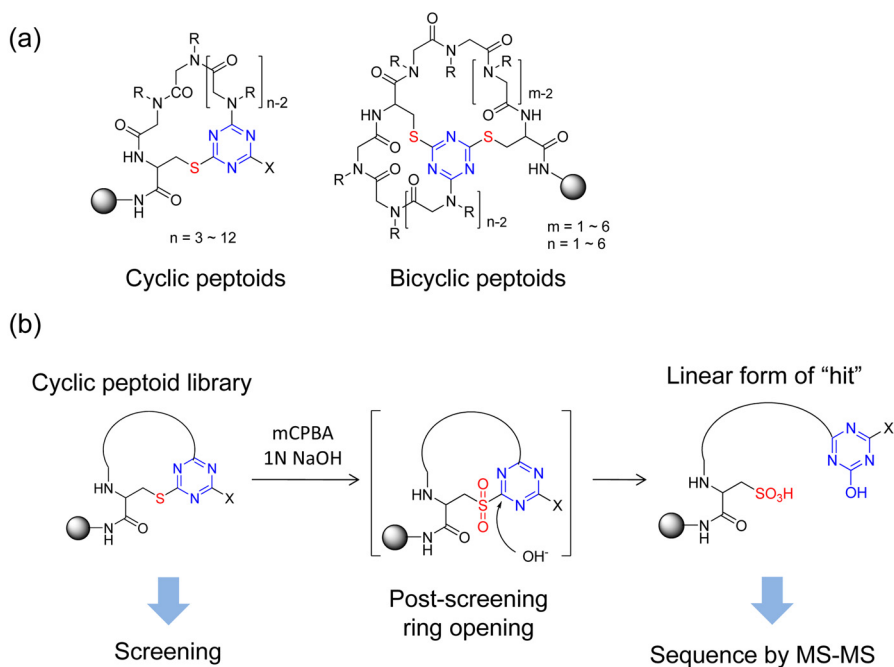


그림 5. (a) 고리형 펩토이드와 이중고리형 펩토이드, (b) 고리형 펩토이드의 선형화를 통한 구조 분석.

다(그림 5b). 이러한 고리형/이중고리형 펩타이드는 기존의 펩타이드가 가지는 장점을 그대로 살리면서 구조적 견고함을 갖으므로 향후 단백질 리간드 발굴을 위해 매우 유용한 화합물 라이브러리가 될 것으로 기대된다.

### 3. 결론

펩타이드는 합성의 용이함, 우수한 세포 투과성, 생체 내 안정성 등 다양한 장점을 가진 펩타이드-유사체라고 할 수 있다. 또한 고체상 합성법과 split-and-pool 방법을 이용하면 수백만 개 이상의 거대한 펩타이드 라이브러리 구축이 가능하다. 이렇게 합성된 펩타이드 라이브러리는 비드상 스크리닝이나 마이크로어레이 스크리닝 방법을 통해 저비용으로 손쉽게 표적 단백질 리간드 발굴에 응용될 수 있다. 더욱이 최근 개발된 고리형/이중고리형 펩타이드는 견고한 구조를 가짐으로써 표적 단백질에 더욱 강하게 결합하는 리간드가 될 것으로 기대된다. 이러한 펩타이드 라이브러리와 간단한 스크리닝 방법을 이용한다면 기존의 방법으로는 발굴하기 힘든 매우 도전적인 표적 단백질(예를 들면 단백질 상호작용에 관여하는 단백질)의 리간드를 상대적으로 용이하게 찾을 수 있을 것이다. 이러한 기술은 향후 신약개발 및 화학생물학 분야에서 매우 유용할 것으로 전망된다.

### 참고문헌

1. R. J. Simon, R. S. Kania, R. N. Zuckermann, V. D. Huebner, D. A. Jewell, S. Banville, S. Ng, L. Wang, S. Rosenberg, and C. K. Marlowe *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 9367 (1992).
2. P. Yu, B. Liu, and T. A. Kodadek, *Nat. Biotechnol.*, **23**, 746 (2005).
3. Y. U. Kwon and T. Kodadek, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 1508 (2007).
4. R. N. Zuckermann and T. Kodadek, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **11**, 299 (2009).
5. H. S. Lim, C. T. Archer, and T. Kodadek, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 7750 (2007).
6. G. M. Figliozzi, R. Goldsmith, S. C. Ng, S. C. Banville, and R. N. Zuckermann, *Methods Enzymol.*, **267**, 437 (1996).
7. K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, and R. J. Knapp, *Nature*, **354**, 82 (1991).
8. J. M. Astle, L. S. Simpson, Y. Huang, M. M. Reddy, R. Wilson, S. Connell, J. Wilson, and T. Kodadek, *Chem. Biol.*, **17**, 38 (2010).
9. D. G. Udugamasooriya, S. P. Dineen, R. A. Brekken, and T. Kodadek, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 5744 (2008).
10. M. M. Reddy, R. Wilson, J. Wilson, S. Connell, A. Gocke, L. Hynan, D. German, and T. Kodadek, *Cell*, **144**, 132 (2011).
11. M. M. Reddy, T. Kodadek, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 12672 (2005).
12. M. R. Arkin, M. Randal, W. L. DeLano, J. Hyde, T. N. Luong, J. D. Oslob, D. R. Raphael, L. Taylor, J. Wang, R. S. McDowell, J. A. Wells, and A. C. Braisted, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 1603 (2003).
13. J. H. Lee, A. M. Meyer, and H. S. Lim, *Chem. Commun.*, **46**, 8615 (2010).
14. J. H. Lee, H. S. Kim, and H. S. Lim, *Org. Lett.*, **13**, 5012 (2011).
15. S. B. Shin, B. Yoo, L. J. Todaro, and K. Kirshenbaum, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 3218 (2007).
16. S. N. Khan, A. Kim, R. H. Grubbs, and Y. U. Kwon, *Org. Lett.*, **13**, 1582 (2011).
17. L. S. Simpson and T. Kodadek, *Tetrahedron Lett.*, **53**, 2341 (2012).