

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2016.2.2.96>

## Comparative study of linear and cyclic forms of apoptosis-targeting peptide

Yeong Su Ha,<sup>1</sup> Nisarg Soni,<sup>1</sup> Phuong Tu Huynh,<sup>1</sup> Byung-Heon Lee,<sup>2</sup> Gwang Il An,<sup>3</sup> and Jeongsoo Yoo<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Medicine, BK21 Plus KNU Biomedical Convergence Program, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Korea;

<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Cell Biology and Cell & Matrix Research Institute, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Korea;

<sup>3</sup>Molecular Imaging Research Center, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences Seoul, Korea;

### ABSTRACT

Apoptosis, a genetically determined process of programmed cell death, is considered a vital component of various processes including normal cell turnover, animal development, and tissue homeostasis. It has a crucial role in many medical disorders and hence the development of non-invasive imaging tool is highly demanded. Recently, we have developed a peptide-based radioactive probe (ApoPep-1) for apoptosis detection. In that work the potential of probe for apoptosis detection was verified, however in vivo stability of radiolabeled peptide was not enough to monitor apoptosis for extended period. In current study, we prepared cyclic ApoPep-1 peptides to improve the stability of original linear ApoPep-1 and carried out direct comparison studies in vitro and in vivo. A targeting efficacy of newly synthesized cyclic ApoPep-1 peptide for apoptosis was confirmed in acute myocardial infarct model.

*J Radiopharm Mol Probes 2(2):96-102, 2016*

**Key Word:** ApoPep-1 peptide, Apoptosis, Cyclic peptide, Proteolytic stability, Radiopharmaceuticals

### Introduction

세포사멸 (apoptosis)은 유전자에 의해 제어되어 죽는 프로그램 세포사로 정상세포를 갱신하거나 이상이 생긴 세포를 제거하기 위해 발생된다. 세포의 핵 내에서 DNA가 절단되어 단편화되고, 그 결과 핵농축, 핵융해가 일어나 최종적으로 세포 축소, 용모의 소실 등으로 인해 세포사멸 소체로 단편화되어 주위의 대식세포에 의해 탐식된다(1). 세포사멸은 신체의 분화와 발생 과정에서 해가 되거나 불필요한 세포를 제거함으로써 세포 수를 조절하는 중요한 역할을 하며(2), 이러한 세포사멸 신호전달 기전에 문제가 발생되면 발달장애, 면역계질환, 신경퇴화, 암 등 다양한 질환을 유발할 수 있다(3). 최근에는 항암제의 주요 원리로 세포사멸을 자극하여 암세포

를 죽이는 방법을 많이 사용하고 있는데(4), 특정약물에 대한 효과가 환자에 따라 다르게 나타날 수 있으므로 암세포의 사멸정도에 따라 약물의 투여량을 조절할 수 있게 된다면 이러한 치료법은 매우 유용할 것이다. 따라서 세포사멸을 표적으로 하여 암세포에 대한 항암제의 치료 효과를 조기에 평가할 수 있는 방법은 매우 중요한 주제이다.

최근에 본 연구팀에서는 세포사멸을 표적으로 하는 선형의 ApoPep-1 펩타이드에 방사성 요오드 I-124를 표지하여 허혈, 간 독성으로 인한 세포사멸뿐만 아니라, 항암제 치료에 따른 종양세포에서의 세포사멸을 영상화함으로써 항암치료에 따른 종양의 치료효과를 모니터링 할 수 있는 가능성에 대하여 보고하였다(5). 종양의 치료는 일회성이 아니라 꾸준한 항암치료를 통해 효과를 관찰하고, 거기에 따른 항암치료

September 21, 2016 / Revised: October 17, 2016 / Accepted: October 24, 2016

**Corresponding Author :** Jeongsoo Yoo, Department of Molecular Medicine, BK21 Plus KNU Biomedical Convergence Program, Kyungpook National University School of Medicine, 680 Gukchaebosang-ro, Joon-gu, Daegu, 702-422, Korea  
Tel: 82-53-420-4947, Fax: 82-53-426-4944, E-mail: yooj@knu.ac.kr

Copyright©2016 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

의 지속여부를 결정해야 하기 때문에 장기적인 관점에서 치료효과를 모니터링 해야 한다. 그러나 방사성요오드가 표지된 ApoPep-1의 경우 Sprague-Dawley흰쥐 (SD-rat)에 투여한 뒤 1시간 후에 혈액을 채취하여 온전하게 남은 방사성요오드가 표지된 펩타이드의 양을 측정해본 결과, 약 60% 정도인 것을 확인하였다. 따라서 장기적인 치료효과의 모니터링에 이를 활용하기 어려울 것으로 예상되었다.

선형의 펩타이드 (linear peptide)는 같은 아미노산으로 구성된 고리형 펩타이드 (cyclic peptide)와 비교하여 단백질분해 효소에 의해 잘 분해되어 온전한 아미노산 구성의 펩타이드로 표적으로 하고 있는 종양세포의 수용체에 도달하지 못하게 되고, 결국 종양을 상대적으로 잘 표적화하지 못하는 것으로 알려져 있다(6,7). 또한 기존에 발표된 일부 논문에서 고리형 펩타이드가 선형 펩타이드 보다 배좌의 유연성 (conformational flexibility)으로 인해 표적에 대한 결합 친화성이 높아지게 되고, 그로 인해 세포투과성이 높아질 수 있다고 보고하였다(8).

앞에서 언급한 연구결과들을 바탕으로 이번 연구에서는 ApoPep-1을 고리화 함으로써 보다 안정적으로 온전한 방사성요오드화 ApoPep-1을 체내에서 오랫동안 유지할 수 있는지를 확인하였고, 뿐만 아니라 세포사멸에 대한 표적 능력을 확인함으로써 장기간의 항암치료효과 모니터링에 적용 가능성에 대해서 살펴 보았다.

## Materials and Methods

### 1. 기기 및 재료

방사성요오드화 반응을 위한 Iodogen 튜브는 Pierce Biochemical Co. (Rockford, IL, USA), 인산완충식염수 (PBS)와 혈청 내 안정성 실험을 위한 소태아혈청 (FBS)은 Hyclone (South Logan, UT, USA)으로부터 구입하였다. 방사성동위원소  $^{131}\text{I}$  용액은 Korea Atomic Energy Research Institute (KAERI, Daejeon, Korea)으로부터 구입하였으며, 사이클로트론 (KIRAMS MC50, Korea Institute of Radiological Medical Sciences, Seoul, Korea)을 이용하여

생산된  $^{125}\text{I}$  용액은 공급받아 사용하였다. 체내 안정성 실험 및 심근경색 동물 모델은 생후 6~8주령의 암컷 SD-rat을 Orient Bio Inc. (Seongnam, Korea)로 부터 구매하여 사용하였고, 자가방사기록사진 (autoradiogram)은 Fluorescent Image Analyzer (FLA-3000, FUJIFILM, Tokyo, Japan)를 이용하여 획득하였다.

### 2. 펩타이드

Cys-Gln-Arg-Pro-Pro-Arg (CQRPPR, 모두 왼쪽 회전성 이성질체) 아미노산 서열의 세포사멸 표적 펩타이드 (ApoPep-1)는 표준 Fmoc 방법을 통해 합성되었으며, 레진으로부터 결합을 끊기 전 아미노 말단 부분에 추가로 타이로신 잔기를 추가 (YCQRPPR, 모두 왼쪽 회전성 이성질체) 하여 주었다. 아미노 말단과 카복시 말단을 각각 아세틸과 아민 그룹으로 치환하였다. 그리고 나서 고성능 액체 크로마토그래피 (Waters, Milford, MA, USA)를 이용하여 정제한 후 액체크로마토그래피 질량분석기로 최종 합성된 펩타이드를 확인하였다. 고리형 펩타이드 (cyclic ApoPep-1)로는 cyclic Cys-Gln-Arg-Pro-Pro-Arg-Tyr (c(CQRPPRy), y: 오른쪽 회전성 이성질체, Pepton, Daejeon, KOREA) 아미노산 서열의 시스테인과 타이로신을 아미드 결합시켜준 펩타이드와 cyclic Cys-Gln-Arg-Pro-Pro-Arg-Tyr-Lys (c(CQRPPRyK), y: 오른쪽 회전성 이성질체, AnyGen, Gwang-ju, Korea) 아미노산 서열의 시스테인과 라이신을 아미드 결합시켜준 펩타이드를 각각 주문 제작하였다.

### 3. 방사성표지 실험

선형과 고리형 펩타이드 모두 Iodogen 튜브를 이용하여 방사성요오드 ( $^{131/125}\text{I}$ )로 표지하였다. 우선 Iodogen 튜브에 80  $\mu\text{L}$ 의 PBS와 필요한 방사능 양의  $^{131/125}\text{I}$ 를 넣어주었다. 그리고 나서 선형의 YCQRPPR과 고리형 c(CQRPPRy) 펩타이드는 10  $\mu\text{L}$ 의 물에 녹아져 있는 20  $\mu\text{g}$ 의 펩타이드를 넣어주고, 고리형 c(CQRPPRyK)는 10  $\mu\text{L}$ 의 DMSO에 녹아져 있는 20  $\mu\text{g}$ 의 펩타이드를 넣어준 후 실온에서 15분간 약하게

저어주었다. 표지 수율은 이동상으로 10% 아세트산암모늄:메탄올 (3:7)을, 고정상으로 실리카 플레이트를 사용하여 방사선 얇은 막 크로마토그래피 (radio-TLC) 이미지 스캐너 (Bioscan, Inc., Washington DC, USA)를 통해 확인하였다. 표지 된 펩타이드 ( $^{131/124}\text{I-YCQRPPR}$ ,  $^{131/124}\text{I-c(CQRPPRy)}$ ,  $^{131/124}\text{I-c(CQRPPRyK)}$ )는 0.22  $\mu\text{m}$  주사기 필터 (Milipore, Billerica, MA, USA)를 통과시킨 후 고성능 액체크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 역상 GraceSmart C18 컬럼 (5  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  250 mm, Deerfield, IL, USA)에 용매 A (0.1% TFA in water) 100%와 용매 B (0.1% TFA in acetonitrile) 0%로부터 용매 A 0%와 용매 B 100%로 30분 동안 선형변화를 통해 분당 1 mL씩 흘러 보내주었고, UV 크로마토그램은 220 nm 파장을 사용하였다. 분리한 정제물은 항온 수조에서 40°C로 진공회전농축기를 사용하여 농축시킨 후 생리식염수로 다시 녹여내어 in vitro와 in vivo 동물 실험에 사용하였다.

#### 4. 혈청 내 안정성 비교 실험

방사성요오드화 펩타이드 50  $\mu\text{L}$  (3.7 MBq)를 450  $\mu\text{L}$ 의 FBS에 넣고 37°C에서 24시간 동안 약하게 흔들어주며 안정성을 확인하였다. 흔들어주는 동안 정해진 시간에 샘플을 채취하고 방사선 얇은 막 크로마토그래피 이미지 스캐너를 사용하여 탈요오드화 되지 않은 펩타이드와 온전한 펩타이드의 상대적인 양을 확인하였다. 방사선 얇은 막 크로마토그래피의 이동상과 고정상은 앞에서 언급한 조건과 동일하게 진행하였다.

#### 5. 생체 내 안정성 비교 및 분포 확인 실험

생체 내 안정성 테스트를 위해 기존에 보고된 방법을 조금 수정하여 진행하였다 (9,10). 방사성 표지 된 펩타이드 37 MBq을 SD-rat의 꼬리 정맥으로 투여하고, 1시간 후 가슴마취 (산소와 함께 1~2% 아이소플루란)하에 심장에서 채혈을 실시하였다. 채혈을 통해 얻은 혈액을 10분동안 원심분리하여 혈장을 얻어낸 후, 혈장 200  $\mu\text{L}$ 에 100  $\mu\text{L}$ 의 아세트나이트릴:물:트리플루오로아세트산 (50:45:5) 혼합물을 넣어 섞어

주고 4°C에서 10분 동안 보관하였다가 다시 원심분리를 진행하였다. 그리고 나서 상층액을 0.22  $\mu\text{m}$  주사기 필터에 통과시켜준 후 역상 고성능 액체크로마토그래피 (앞에서 언급한 조건과 동일)에 주입하고, 용리액을 1 mL씩 받아 감마카운터 (PerkinElmer, Turku, Finland)로 방사능을 측정하였다.

그리고 생체 내 분포 확인 실험을 위해 표지 된 펩타이드 0.74 MBq을 SD-rat의 꼬리정맥으로 투여하고, 5시간 뒤에 경추를 탈골시켜 희생시켰다. 심장으로부터 혈액을 채취하고 다른 중요 조직들은 모아 혈액을 잘 제거한 후 무게를 측정하고 감마카운터를 이용해 방사능을 측정하였다. 조직에 축적된 방사성 동위원소의 양은 조직의 무게당 넣어진 방사성동위원소의 퍼센트 (%ID/g)로 계산하였다.

#### 6. 심근경색 동물 모델

동물에 관련된 모든 절차 및 실험은 경북대학교 동물실험윤리위원회로부터 승인을 받아 지침에 따라 수행하였다(승인 번호: 2016-0100). 기존에 잘 알려진 화학약물 처리를 통한 심근경색 동물 모델을 제작하였다(11,12). 아이소프로테레놀 (몸무게 기준 150 mg/kg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 2 mL의 생리식염수에 녹여 SD-rat의 흉부 부근 피하에 주사해주었다. 24시간 뒤에 동일한 양의 아이소프로테레놀을 동일한 방법을 통해 다시 한번 주사해주고, 24시간이 지난 뒤 자가방사 기록법 실험에 사용하였다.

#### 7. 조직 염색 및 자기방사 기록법

심근경색 동물 모델에 7.4 MBq의  $^{124}\text{I-c(CQRPPRyK)}$ 를 꼬리정맥으로 투여한 후 5시간 뒤에 20 mL의 생리식염수로 심장을 관류해주고 떼어내었다. 그리고 심근경색이 잘 유발되었는지 확인하기 위해 심장을 1 mm 두께의 절편으로 박절하여 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 염색을 실시하였다. 박절한 조직을 1% TTC 용액 (PBS, pH 7.4)에 담귀 37°C에서 15분간 보관해준다. 그리고 TTC 용액을 제거하고 4% 파라포름알데하이드에 30분 동안 고정시킨 후 조직을 꺼내어 조직의 염색 정도를 확인하였다. TTC 염색 후 같은 조

직을 영상판에 올려 카세트 (BAS-IP MS 2325, FUJIFILM)에서 1시간 동안 노출시키고 축적된 방사능량을 Fluorescent Image Analyzer (FLA-3000)로 기록하였다.

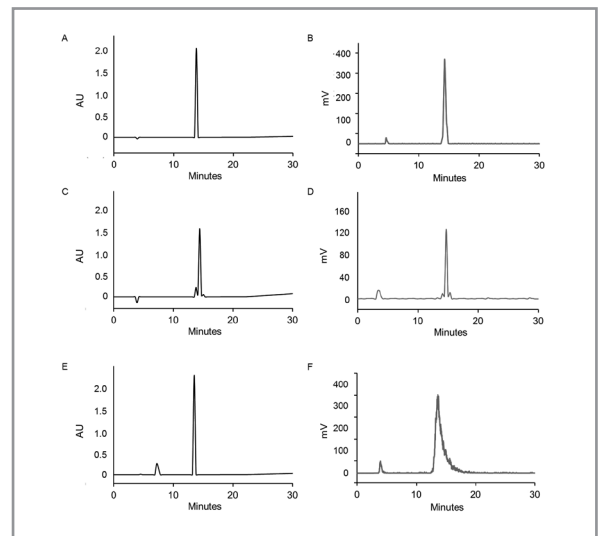
## Results and Discussion

### 1. 펩타이드 합성 및 방사성표지

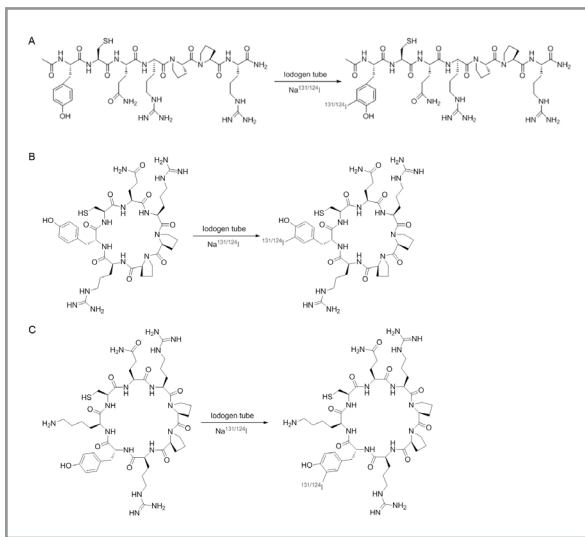
선형의 YCQRPPR 펩타이드를 방사성요오드로 표지하기 위해 타이로신 잔기를 도입하였으며, 아미노 말단과 카르복시 말단을 각각 아세틸과 아민 그룹으로 치환해주었다. 그리고 선형 펩타이드와의 안정성 비교를 위한 고리형의 c(CQRPPRy)와 c(CQRPPRyK) 펩타이드는 각각 시스테인과 타이로신, 시스테인과 라이신의 아미드 결합을 통해 고리화시켜 주었다. 선형 YCQRPPR 펩타이드는 98% 이상의 화학적 순도로 합성되었고, 고리형 c(CQRPPRy)와 c(CQRPPRyK) 펩타이드는 각각 99%, 95% 이상의 화학적 순도로 합성되었다. 세가지 펩타이드 모두 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)로 정제하였으며, 질량 분석을 통해 측정된 값과 계산된 값이 잘 일치하는 것으로 합성된 펩타이드를 확인하였다(YCQRPPR 계산 값: 959.48, 실험값: 960.5; c(CQRPPRy) 계산 값: 899.42, 실험값: 901;

c(CQRPPRyK) 계산 값: 1029.2, 실험값: 1030).

준비된 펩타이드는 타이로신 잔기에  $^{131}\text{I}$  또는  $^{124}\text{I}$ 를 이용하여 방사성표지반응을 진행하였다(Figure 1). 타이로신의 페놀 (phenol) 고리에 산화제인 Iodogen을 이용하여 친전자성 반응으로 쉽게 직접적인 요오드화가 가능하였다(13,14).  $^{131}\text{I}$ 을 이용한 표지수율은 각각 YCQRPPR 펩타이드가 약 96%, c(CQRPPRy) 펩타이드가 약 82%, c(CQRPPRyK) 펩타이드가 약 96%였으며, 표지된 펩타이드는 정제 후 98% 이상의 방사화학적 순도를 나타내었다(Figure 2).



**Figure 2.** UV and a radioactivity traces of radiolabeled (A, B),  $^{131}\text{I}$ -YCQRPPR, (C, D)  $^{131}\text{I}$ -c(CQRPPRy), and (E, F)  $^{131/124}\text{I}$ -c(CQRPPRyK).



**Figure 1.** Chemical structure of (A) YCQRPPR and  $^{131/124}\text{I}$ -YCQRPPR, (B) c(CQRPPRy) and  $^{131/124}\text{I}$ -c(CQRPPRy), (C) c(CQRPPRyK) and  $^{131/124}\text{I}$ -c(CQRPPRyK).

### 2. 혈청 내 안정성 비교

선형과 고리형 펩타이드의 안정성을 비교하기 위해 *in vivo* 실험에 앞서 *in vitro* 상에서 테스트를 진행해 보았다. 최종적으로 정제를 마친 표지된 세가지 펩타이드를 FBS에 넣고 37°C에서 24시간 동안 저어주며 방사선 얇은 막 크로마토그래피 (TLC)를 사용하여 테스트 기간 동안 이탈된  $^{131}\text{I}$ 이온의 양과 단백질 분해된 펩타이드의 양을 비교해 보았다. 그 결과 FBS에서 24시간이 경과한 후에 선형  $^{131}\text{I}$ -YCQRPPR 펩타이드의 경우 약 28%의 이탈된  $^{131}\text{I}$ 이온이, 고리형  $^{131}\text{I}$ -c(CQRPPRy)와  $^{131}\text{I}$ -c(CQRPPRyK) 펩타이드는 각각 상대적으로 적은 5.8%와 4.9%의 이탈된  $^{131}\text{I}$ 이온

이 떨어져 나왔음을 확인할 수 있었다. 이는 고리형 펩타이드가 선형 펩타이드에 비해 FBS상에서 탈요오드화에 상대적으로 안정적이라는 것을 말해준다(Figure 3A). 다음으로 단백질분해 효소에 의해 분해되는 정도를 비교해보았다. FBS에서 24시간 후 선형  $^{131}\text{I}$ -YCQRPPR과 고리형  $^{131}\text{I}$ -c(CQRPPRy) 펩타이드의 경우 약 88%이상 펩타이드가 분해되었으나, 고리형  $^{131}\text{I}$ -c(CQRPPRyK) 펩타이드는 약 6%정도만 분해된 것을 확인하였다(Figure 3B). 이는 기존에 보고된 논문들에서도 언급하였듯이, 고리형태를 띠더라도 고리를 형성하는 방법에 따라 단백질분해 효소에 대한 안정성에 차이가 있을 수 있다는 것을 다시 한번 확인시켜주는 결과이다(15).

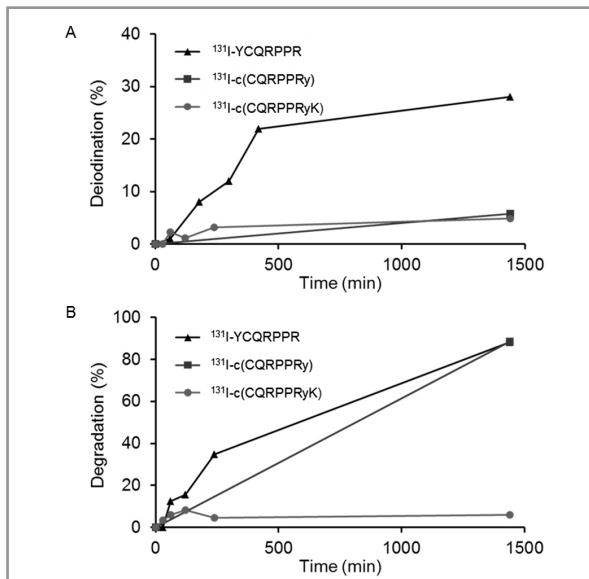


Figure 3. In vitro stability of linear and cyclic peptides in FBS as indicated by (A) the percentage of free  $^{131}\text{I}$  ions and (B) the amount of intact peptide.

### 3. 생체 내 안정성 및 분포 확인

FBS에서의 안정성 비교실험을 통해 고리형  $^{131}\text{I}$ -c(CQRPPRyK) 펩타이드가 고리형  $^{131}\text{I}$ -c(CQRPPRy)보다 안정한 것을 확인하였으므로, in vivo 안정성 테스트는  $^{131}\text{I}$ -c(CQRPPRyK) 펩타이드에 대해서만 진행한 후 기존에 보고한 선형  $^{131}\text{I}$ -YCQRPPR 펩타이드와 비교해 보았다. 고리형  $^{131}\text{I}$ -c(CQRPPRyK) 펩타이드를 SD-rat에 투여하고 1시간 후 HPLC를 이용하여 펩타이드의 대사 물질을 확인해본 결과 약 87%의 온전한  $^{131}\text{I}$ -c(CQRPPRyK)

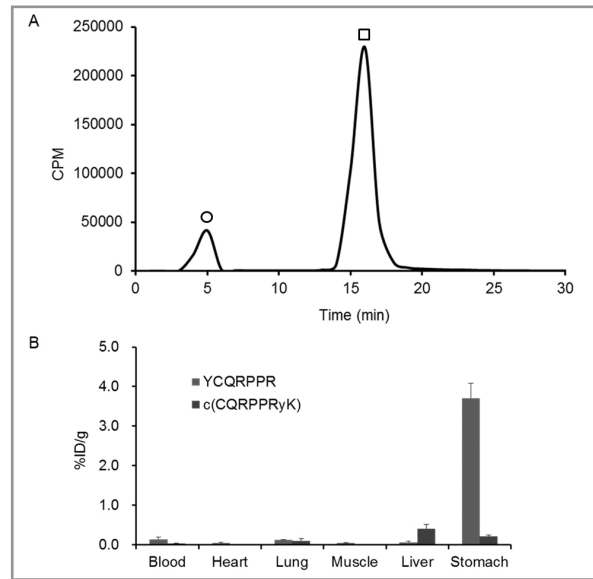


Figure 4. (A) In vivo stability of  $^{131}\text{I}$ -c(CQRPPRyK) in rat blood at 1 h post-injection. Circle (○) indicates free  $^{131}\text{I}$  ions and square (□) indicates intact peptide. (B) Comparative biodistribution data of  $^{131}\text{I}$ -YCQRPPR and  $^{131}\text{I}$ -c(CQRPPRyK) at 5 h post-injection.

펩타이드를 확인할 수 있었으며, 약 13%의 펩타이드로부터 탈요오드화된  $^{131}\text{I}$  이온을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 in vivo에서 기존에 본 연구팀에서 보고하였던 선형  $^{131}\text{I}$ -YCQRPPR 펩타이드 (약 60%의 온전한 펩타이드, 약 35%의 탈요오드화된  $^{131}\text{I}$  이온)에 비해 고리형  $^{131}\text{I}$ -c(CQRPPRyK) 펩타이드가 약 45% 정도 더 안정하다는 것을 보여준다(Figure 4A). 이를 다시 한번 검증하기 위해 방사성 표지된 선형과 고리형 펩타이드를 SD-rat 투여한 후 위에 측정된 방사능량을 측정해 본 결과, 선형  $^{131}\text{I}$ -YCQRPPR 펩타이드의 경우 약 3.7%ID/g, 고리형  $^{131}\text{I}$ -c(CQRPPRyK) 펩타이드는 0.2%ID/g으로 약 18배 이상 높은 축적량을 보여주었다(Figure 4B). 생체 내에서 탈요오드화된 방사성 요오드 이온은 주로 나트륨 요오드 공수송체 (sodium iodide symporter)가 많이 발현되는 갑상선이나 위에 축적되는 것은 이미 보고된 현상으로(16,17), 생체 내에서 위에 대한 방사능의 축적량을 고려하였을 때 고리형  $^{131}\text{I}$ -c(CQRPPRyK) 펩타이드가 선형 펩타이드에 비해 안정하다는 것을 생체 내 분포 실험을 통해서도 확인할 수 있었다. 그리고 위 뿐만 아니라 혈액을 포함한 다른 중요 장기들에 대해서도 방사능 축적량을 비교해 보았다. 대부분의 장기에서 비슷한 축적량을 보였으나, 간에서 선형 펩타이드의

경우 0.06%ID/g의 측정량을 보인 반면 고리형 펩타이드는 0.41%로 약 7배 정도 높은 측정량을 확인하였다. 이는 물에 대한 용해도가 10 mg/mL인 선형 YCQRPPR 펩타이드 보다 0.5 mg/mL인 고리형  $\alpha$ (CQRPPRyK) 펩타이드의 친유성이 높아 간에 대한 축적량이 더 높은 것으로 생각된다(18).

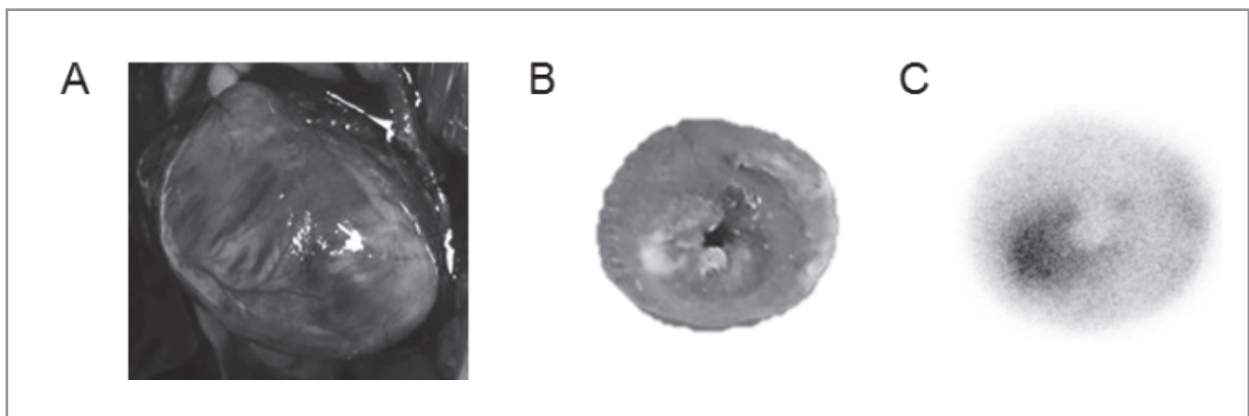
#### 4. 조직 염색 및 자가방사 기록법

앞선 실험들을 통해 선형  $^{131}\text{I}$ -YCQRPPR 펩타이드 보다 고리형  $^{131}\text{I}$ - $\alpha$ (CQRPPRyK) 펩타이드가 안정성 면에서 우수하다는 것을 확인하였지만, 고리형태에서도 세포사멸에 대한 표적능력이 유지되어야 영상 프로브로서의 기능을 할 수 있으므로 세포사멸 동물 모델에 대한 표적 능력을 검증해 보았다. 세포사멸 동물 모델로는 SD-rat에 합성 카테콜아민 베타 교감신경 작용제 (beta adrenergic agonist)인 아이소프로테레놀을 처리하여 세포독성 유리기 (free radical) 생성을 유도함으로써 심장 기능장애를 유발시킨 급성 심근경색 동물 모델을 사용하였다(11). 급성 심근경색 단계에서는 허혈성 손상으로 인해 세포사멸과 세포괴사가 동시에 발생하게 되고, 이러한 동물 모델을 이용하여 선형 ApoPep-1 펩타이드에 형광염료를 컨쥬게이션하여 표적화 하는 연구결과가 이미 보고되었기 때문에 본 연구에서도 급성 심근경색 동물 모델을 사용하게 되었다(19-21). 방사성 표지 된 고리형  $^{124}\text{I}$ - $\alpha$ (CQRPPRyK) 펩타이드 투여 후 5시간 뒤에 떼어낸

심장의 심근경색 유발 유무를 확인하기 위해 TTC 염색을 실시하였다. 조직염색 결과 심근경색으로 인해 손상을 받은 부분은 흰색, 건강한 심근은 붉은 색으로 염색이 되어 뚜렷한 색의 차이를 보였고, 이를 통해 심근경색이 잘 유발되었다는 것을 확인할 수 있었다(Figure 5B). TTC 염색에 사용하였던 동일한 심근샘플을 이용하여 자가방사 기록법으로 고리형  $^{124}\text{I}$ - $\alpha$ (CQRPPRyK) 펩타이드의 심근경색 병변에 대한 축적 유무를 확인해 보았다(Figure 5C). 그 결과 TTC 염색에서 흰색으로 염색되었던 병변과 일치되는 부분에서 자가방사 기록 사진 (autoradiography)의 높은 신호를 관찰함으로써 고리형태의  $^{124}\text{I}$ - $\alpha$ (CQRPPRyK) 펩타이드 역시 세포사멸 표적이 가능하다는 것을 확인하였다. 이는 선형의 펩타이드를 고리형태로 변환시켰음에도 중요 아미노산 서열이 그대로 존재하기 때문에 표적능력을 잃지 않은 것으로 생각된다(22).

#### Conclusion

선형 ApoPep-1과 고리형 ApoPep-1 펩타이드의 안정성 비교 실험을 진행하기 위해 산화제인 Iodogen을 이용하여 타이로신 잔기에 성공적으로 표지를 진행할 수 있었다. FBS와 생체 내 대사물질 분석을 통해 고리형  $^{131}\text{I}$ - $\alpha$ (CQRPPRyK) 펩타이드가 가장 안정하다는 것을 확인할 수 있었고, 또한 생체 내 분포확인 실험에서도 위에 측정된 방사능량을 비교함으로써 기존 선형  $^{131}\text{I}$ -YCQRPPR 펩타이드에 비해 탈요오드



**Figure 5.** (A) Photographic image of infarct lesion in the heart of myocardial infarction model. (B) TTC staining of the myocardial infarction heart section. (c) An ex vivo autoradiogram of the same heart section.

화 된 요오드 이온의 양이 상대적으로 적다는 것을 다시 한번 확인할 수 있었다. 그리고 심근경색 동물 모델에서 허혈성 손상으로 인한 세포사멸 병변을 고리형  $^{124}\text{I-c(CQRPPRyK)}$  펩타이드가 잘 표적화 하는 것을 자가방사 기록법을 통해 확인하였다. 본 연구결과를 바탕으로 방사성요오드화된 고리형  $^{124}\text{I-c(CQRPPRyK)}$  펩타이드가 선형 펩타이드에 비해 체 내에서 보다 안정적으로 오랫동안 유지될 수 있을 것으로 생각되며, 이러한 안정성을 통해 항암치료효과 모니터링과 같은 장기간의 세포사멸 추적 영상에 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

## Acknowledgments

이 연구는 한국연구재단중견연구자지원사업(2016R1A2B4011546), 플랫폼구축사업 (2016M2C2A1937986)의 지원을 받았으며, 다른 이해관계는 없음을 밝힙니다.

## References

- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35:495-516.
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997;88:347-354.
- Fuchs Y, St eller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* 2011;147:742-758.
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-1462.
- Kwak W, Ha YS, Soni N, Lee W, Park S-I, Ahn H, An GI, Kim I-S, Lee B -H, Yoo J. Apoptosis imaging studies in various animal models using radio-iodinated peptide. *Apoptosis* 2015;20:110-121.
- Roxin Á, Zheng G. Flexible or fixed: a comparative review of linear and cyclic cancer-targeting peptides. *Future Med Chem* 2012;4:1601-1618.
- Kwon Y-U, Kodadek T. Quantitative comparison of the relative cell permeability of cyclic and linear peptides. *Chem Biol* 2007;14:671-677.
- Driggers EM, Hale SP, Lee J, Terrett NK. The exploration of macrocycles for drug discovery - an underexploited structural class. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:608-624.
- Cai H, Li Z, Huang C-W, Shahinian AH, Wang H, Park R, Conti PS. Evaluation of copper-64 labeled AmBaSar conjugated cyclic RGD peptide for improved microPET imaging of integrin  $\alpha\beta3$  expression. *Bioconjugate Chem* 2010;21:1417-1424.
- Pandya DN, Bhatt N, An GI, Ha YS, Soni N, Lee H, Lee YJ, Kim JY, Lee W, Ahn H, Yoo J. Propylene cross-bridged macrocyclic bifunctional chelator: a new design for facile bioconjugation and robust  $^{64}\text{Cu}$  complex stability. *J Med Chem* 2014;57:7234-7243.
- Li H, Xie Y-H, Yang Q, Wang S-W, Zhang B-L, Wang J-B, Cao W, Bi L-L, Sun J-Y, Miao S, Hu J, Zhou X-X, Qiu P-C. Cardioprotective effect of Paeonol and Danshensu combination on isoproterenol-induced myocardial injury in rats. *PLOS ONE* 2012;7:e48872.
- Lim KH, Ko D, Kim J-H. Cardioprotective potential of Korean Red Ginseng extract on isoproterenol-induced cardiac injury in rats. *J Ginseng Res* 2013;37:273-282.
- Seevers RH, Counsell RE. Radioiodination techniques for small organic molecules. *Chem Rev* 1982;82:575-590.
- Fani M, Maecke HR. Radiopharmaceutical development of radiolabelled peptides. *Eur J Nucl Med Mol I* 2012;39:11-30.
- Howell SM, Fiacco SV, Takahashi TT, Jalali-Yazdi F, Millward SW, Hu B, Wang P, Roberts RW. Serum stable natural peptides designed by mRNA display. *Sci Rep-UK* 2014;4:6008.
- Ajjan R, Watson P, Findlay C, Metcalfe R, Crisp M, Ludgate M, Weetman A. The sodium iodide symporter gene and its regulation by cytokines found in autoimmunity. *J Endocrin* 1998;158:351-358.
- Clewell RA, Merrill EA, Yu KO, Mahle DA, Sterner TR, Fisher JW, Gearhart JM. Predicting neonatal perchlorate dose and inhibition of iodide uptake in the rat during lactation using physiologically-based pharmacokinetic modeling. *Toxicol Sci* 2003;74:416-436.
- Chou CH, Evans AM, Fornasini G, Rowland M. Relationship between lipophilicity and hepatic dispersion and distribution for a homologous series of barbiturates in the isolated perfused in situ rat liver. *Drug Metab Dispos* 1993;21:933-938.
- Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res* 1996;79:949-956.
- Hegstad AC, Ytrehus K, Myklebust R, Jørgensen L. Ultrastructural changes in the myocardial myocytic mitochondria: crucial step in the development of oxygen radical-induced damage in isolated rat hearts? *Basic Res Cardiol* 1994;89:128-138.
- Acharya B, Wang K, Kim I-S, Kang W, Moon C, Lee B-H. In vivo imaging of myocardial cell death using a peptide probe and assessment of long-term heart function. *J Control Release* 2013;172:367-373.
- Ngambenjawong C, Gustafson HH, Pineda JM, Kacherovsky NA, Cieslewicz M, Pun SH. Serum stability and affinity optimization of an M2 macrophage-targeting peptide (M2pep). *Theranostics* 2016;6:1403-1414.