

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2019.5.2.152>

# Development of radiotracer for polo-box domain of polo-like kinase 1

Eun Kyoung Ryu

Research Center for Bioconvergence Analysis, Korea Basic Science Institute, 804-1 Ochang Chungbuk 363-883, University of Science and Technology, 217 Gajeong-ro Yuseong-gu Daejeon, 34113, Republic of Korea

## ABSTRACT

Polo-like kinase 1 (Plk1) is crucial regulator of cell cycle progression during mitosis. It is known to highly overexpress in many different tumor types, and has been implicated as a potential antimitotic cancer target. The phosphopeptide, Pro-Leu-His-Ser-p-Thr (PLHSpT), was shown a high level of affinity and specificity for the polo-box domain (PBD) of Plk1. However, the peptide has the limitation of cell permeability. We designed the derivatives to enhance the limitation of PLHSpT using drug delivery system. In addition, we synthesized and evaluated its radiotracer for tumor diagnosis. This review discusses the derivative and radiotracer that are suitable for tumor treatment and diagnosis for PBD of Plk1.

**Key Word:** Polo-like kinase 1, Polo-box domain, PLHSpT, Radiotracer, Tumor, Treatment, Diagnosis

## Introduction

Polo-like kinase 1 (Plk1)은 세포 분열을 위한 유사 분열 중에 염색체를 배열하는 것을 돕는 중요한 조절인자이다(1, 2). 다양한 종류의 종양에서 Plk1 단백질이 과 발현되어 있는 것으로 알려져 있다(3, 4). 그래서 연구자들은 Plk1을 타겟으로 하는 유도체 및 저해제를 개발하여 종양 치료 효과를 확인하고자 하였다(5, 6). 하지만 Plk1를 표적으로 하는 여러 약물들은 생체 내 존재하는 다른 kinase들과의 상호작용 통해 심각한 부작용을 초래하였다(7). 따라서 많은 연구자들이 Plk1 단백질에 선택성이 향상된 약물 개발의 필요성을 인지하고, Plk1 단백질의 kinase 뿐만 아니라, N 말단에 존재하는 polo-box domain (PBD)를 타겟으로 하는 유도체들을 연구하기 시작하였다(8, 9). 그 중 Pro-Leu-His-Ser-p-Thr (PLHSpT) (Kd ~

0.45  $\mu$ M)의 서열을 가진 phosphopeptide가 PBD에 높은 결합력과 종양 세포를 억제하는 결과가 발표되었다(10). 하지만, 펩타이드 기반 유도체로, 세포막을 투과하지 못하는 단점을 가지고 있어서, 종양세포 증식 억제 가능성 여부를 평가하는 실험은 직접 종양세포에 PLHSpT를 주입하여 그 효과를 관찰하였다. 따라서 본 연구에서는 PLHSpT의 세포막 투과의 한계점을 극복해 보고자 drug delivery system을 활용하였다. 즉, PLHSpT 펩타이드를 기반으로 종양 세포막 투과성을 향상시킨 새로운 유도체를 합성하여 종양 치료 효과 및 억제 기전을 살펴보고자 하였다. 펩타이드 기반 유도체의 생체 내에서 약물의 안정성 및 유효성을 높이기 위해 drug delivery system을 활용하는 연구가 활발하다(11, 12). Drug delivery system에서 약물의 표적 방법에는 두가지 접근법이 있는데, 세포막에 도출되어 있는 수용체 등을 활용한 능동적 표적 방법과, 세포막에서의

Received: December 13, 2019 / Revised: December 26, 2019 / Accepted: December 28, 2019

**Corresponding Author :** Eun Kyoung Ryu Research Center for Bioconvergence Analysis, Korea Basic Science Institute, 804-1 Ochang Chungbuk 363-883, University of Science and Technology, 217 Gajeong-ro Yuseong-gu Daejeon, 34113, Republic of Korea  
Tel: 043-240-5091, E-mail: ekryu@kbsi.re.kr

Copyright©2019 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

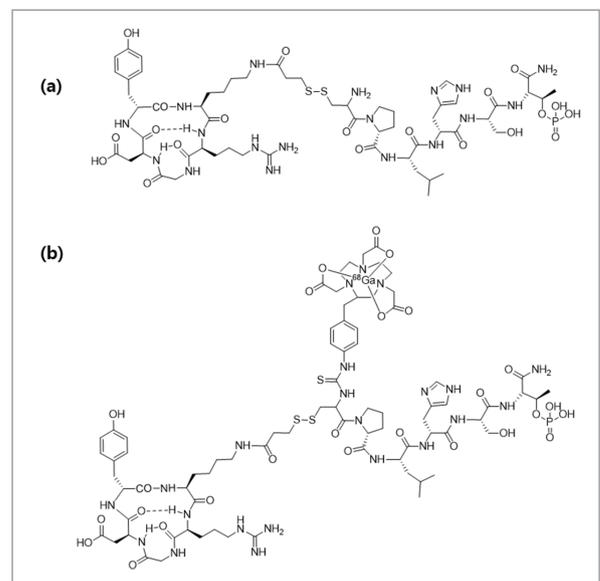
enhanced permeability and retention (EPR) 효과를 활용하여 약물이 수동적으로 확산되는 방법을 이용하는 능동 표적 방법이다(13). Drug delivery system을 이용한 약물의 생체 내 표적 바이오마커 및 단백질에 대한 전달 효율성에서는 능동적 표적 방법이 높은 선택성과 특이성을 가지는 것으로 일반적으로 보고되어 있으나, 여전히 논란의 여지가 있다. 본 연구에서는 세포막의 투과성을 높이기 위해 두 종류의 유도체를 디자인 하였다. 세포막 표면에 분포하고, 특히 종양 세포막에 많이 발현되어 있는 integrin 수용체를 표적 할 수 있는 RGD 펩타이드를 연결하여 능동적 표적 방법의 유도체, cRGDyK-S-S-CPLHSpT를 디자인하였다. 또 하나는 생체 적합성의 물질로, 세포막 투과를 용이하게 도와 drug delivery system에서 많이 사용하고 있는 vitamin E를 펩타이드에 결합시킨 유도체, vitamin E-conjugated PLHSpT (VE-S-S-PLHSpT)를 합성하여 종양 억제 효과를 비교 관찰해 보고자 하였다.

또한 PLHSpT를 바탕으로 하는 유도체를 합성하고, Plk1 PBD를 비침습적으로 표적 하는 방사성추적자를 개발하였다. Plk1 PBD를 표적 하는 방사성추적자 개발은 새로운 시도의 연구로, 종양 진단과 종양 억제제 개발에 매우 중요한 의미를 갖는다. 이 종설에서는 PLHSpT 펩타이드 유도체에 방사성동위원소를 결합하여 이를 PET 영상 장비를 통해 Plk1 PBD를 표적 하여 종양을 진단 및 종양 억제제에 평가에 수행 된 방사성추적자에 대해 알아보았다.

## cRGDyK-S-S-CPLHSpT

Integrin 수용체를 선택적으로 표적 하는 저해제인 RGD는 drug delivery system에 가장 활발히 사용하는 펩타이드이다. 종양 세포에 과 발현되어 있는 integrin 수용체를 선택적으로 결합하여 수용체를 통해 물질을 전달하도록 도와주는 기전으로 알려져 있다. 그리고 RGD와 PLHSpT 사이에 disulfide 결합으로 두 물질을 연결하였는데, 종양세포 내의 glutathione 농도가 높아 가수분해 작용이 일어나 종양 세포 안에

서 disulfide 결합이 쉽게 끊어지는 것으로 알려져 있다(14-16). 따라서 본 유도체는 총 3 단계의 시스템으로 약물이 핵 속에 Plk PBD에 전달될 수 있도록 고안하였다. 먼저 1단계는, cRGDyK-S-S-CPLHSpT 유도체가 integrin 수용체를 통해 중앙 세포막을 통과하고, 2단계는 세포 내에서 disulfide 결합이 끊어져 RGD 부분과 PLHSpT 부분이 서로 분리 된다. 3단계는 PLHSpT 부분만이 핵 속으로 전달되어 Plk1 PBD와 단백질-펩타이드 상호작용이 일어날 수 있도록 하고, 그로 인해 약물의 효과를 볼 수 있도록 유도체를 합성하였다(Figure 1) (17). 본 연구에서 사용한 종양세포는 integrin 수용체와 Plk PBD 발현양이 높다고 알려져 있는 U87MG와 Hela 중앙 세포를 사용하였다. 중앙 세포 (Hela 세포) 억제 효과에서는 농도에 비례하여 중앙세포 증식을 억제하였는데, 24시간 동안 관찰한 결과 IC<sub>50</sub> 값이 75 μM이었다. 대조군으로 RGD와 PLHSpT 펩타이드 사이에 disulfide bond가 없는 유도체, cRGDyK-Asp-CPLHSpT에서는 중앙 세포 증식 억제 효과가 전혀 없었다. 이 결과를 통해 disulfide 결합의 중요성을 알 수 있었는데, 중앙 세포내에서 예상대로 disulfide 결합이 끊어지고, 오로지 PLHSpT 부분만이 Plk1 PBD에 영향을 줄 수 있다는 것을 알 수 있었다. 본 유도체의 메커니즘을 규명하기 위해 세포분열 시 변화를 관찰하였는데, 중앙세포의 세포분열 과정



**Figure 1.** Structure of cRGDyK-S-S-CPLHSpT (a) and <sup>68</sup>Ga-NOTA-cRGDyK-S-S-CPLHSpT (b)

중에 유도체가 작용하여 세포의 분열을 억제하고, 세포 사멸 과정을 통해 종양세포가 죽는 것을 확인하였다. 종양이 이식되어 있는 동물 모델을 만들어 *in vivo*에서의 종양 치료 효과를 3일 간격으로 4 mg/kg 양으로 주사하여 19일동안 관찰하였다 (n = 5). 종양의 크기가 19 일째에는 대조군에 비해서 치료군에서 60%이상 감소되어 있는 것을 확인하였고, 종양 조직 염색 실험을 통해 *in vitro*의 결과와 마찬가지로 종양세포가 사멸된 결과를 관찰하였다. 따라서 본 연구에서 개발한 유도체의 종양 치료 효과를 종양 이식 동물 모델에서 살펴볼 수 있었다. Plk1 PBD를 PET을 통해 영상을 획득하기 위해서 cRGDyK-S-S-CPLHSpT에 방사성 동위원소,  $^{68}\text{Ga}$ 과 배위 결합을 위한 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid (NOTA)를 합성하였다(17). 그리고  $^{68}\text{Ga}$ 를 표지하여 새로운 종양 표적 방사성추적자를 합성하여 PET에서 종양 진단 가능성을 평가하고자 하였다. 표지 한 방사성추적자를 Hela와 U87MG 종양 세포와 함께 시간 별 변화를 관찰하였는데, 두 종양 세포에서 시간에 비례하여 종양 섭취가 증가되었다 (Hela cell:  $1.51 \pm 0.03$ ,  $2.10 \pm 0.13$ , and  $3.10 \pm 0.20$  % of uptake at 30, 60, and 120 min, U87MG cell:  $1.49 \pm 0.10$ ,  $1.35 \pm 0.22$ , and  $2.82 \pm 0.15$  % of uptake at 30, 60, and 120 min). 억제 실험에서는 cRGDyK (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )과 함께 관찰한 결과, integrin 수용체가 많이 발현되어 있다고 알려진 U87MG 종양 세포에서 방사성추적자의 섭취가 50%로 감소되는 것을 관찰하였다.

PET 영상을 획득하기 위해, 5 주령 누드 마우스 피하 층에 U87MG 종양 세포를  $1 \times 10^6$ 개 주사하여 고휘 종양을 유발한 모델을 만들었다. 이후  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-

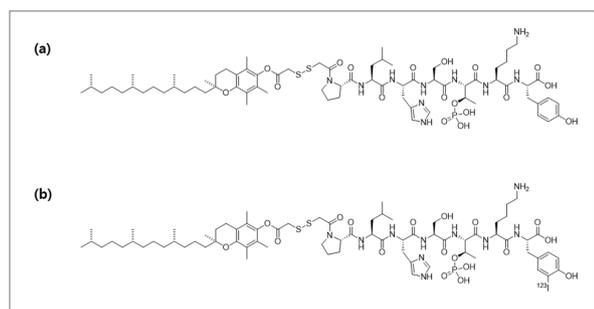


Figure 2. Structure of VE-S-S-PLHSPT (a) and  $^{125}\text{I}$ -radiolabeled VE-S-S-PLHSPT (b)

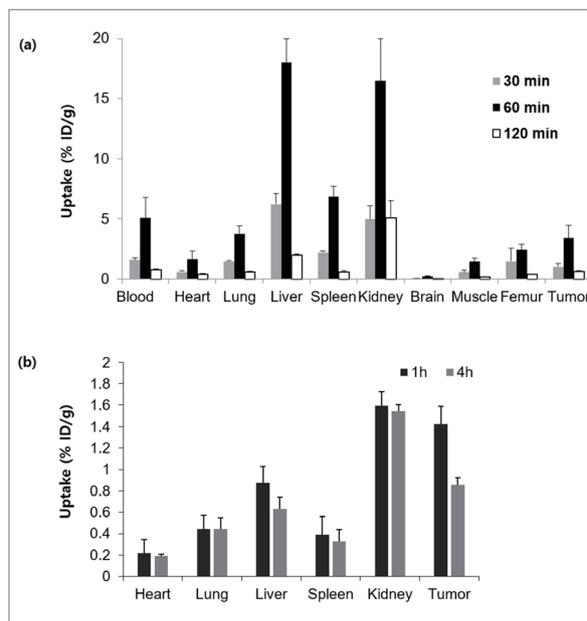


Figure 3. Biodistribution of  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-cRGDyK-S-S-CPLHSPT (a) and  $^{125}\text{I}$ -radiolabeled VE-S-S-PLHSPT (b)

cRGDyK-S-S-CPLHSPT를 꼬리 정맥 주사하여 PET를 통해 종양 방사성추적자를 평가하였다. PET에서는 주사 후 각 30, 60, 120분 일 때 종양에서 유의한 이미지와 정량 값 ( $1.22 \pm 0.11$ ,  $1.45 \pm 0.1$ , and  $0.85 \pm 0.05$  standardized uptake values, SUV)을 확인하였다. 종양/근육 조직의 비율을 관찰한 결과, 주사 1시간 후 3.03으로 종양/근육 조직 섭취 비율이 가장 높았다. Biodistribution 실험에서도 PET 영상 결과와 유사한 패턴의 조직 섭취를 관찰하였는데, 특히 종양 조직에서는 주사 후 30, 60, 120분 후 각각  $1.02 \pm 0.25$ ,  $3.40 \pm 1.10$ , and  $0.62 \pm 0.05$  %ID/g의 정량 값을 확인하였다(Figure 3(a)). 따라서 cRGDyK-S-S-CPLHSPT 유도체의 *in vitro/in vivo* 종양 치료 효과를 확인하였으며,  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-cRGDyK-S-S-CPLHSPT는 PET을 통한 종양의 진단 가능성을 확인함으로써, 다중 기능의 유도체를 개발한 연구 결과이다. 하지만 여전히, 본 연구에서 개발한  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-cRGDyK-S-S-CPLHSPT 방사성추적자가 Plk1 PBD를 직접적으로 결합하여 종양을 진단하는 것인지에 대한 여부를 확인하는 연구가 더 필요하다. Plk1 PBD 타겟 종양 표적 방사성추적자로는 처음 시도한 것으로, 그 의미가 큰 연구 결과라고 생각한다.

## Vitamin E-conjugated PLHSpT

Vitamin E는 항암효과, 산화방지제, 혈전용해제 등의 효과로 잘 알려져 있다(18). 특히 친유기성의 특성을 가진 vitamin E는 drug delivery system에서 세포막 투과를 위한 전달체 역할로 많이 보고되어 있다 (19, 20). 본 연구에서는 vitamin E와 Plk1 PBD 저해제인 펩타이드, PLHSpT를 결합시켜 lipophilicity를 향상시켜 세포막의 투과를 향상시키고자 하였다. 앞 연구와 마찬가지로 그 물질 사이에는 종양 세포 환경에 의해 결합이 끊어질 수 있도록 disulfide 결합으로 연결하여, vitamin E-conjugated PLHSpT (VE-S-S-PLHSpT)를 합성하였다(Figure 2) (21).

*In vitro* 종양 세포 억제 실험은 Plk1 PBD가 많이 발견되어 있다고 알려진 Hela 종양 세포에서 수행하였다. 합성한 유도체의 각 농도 (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 10, 50, 400, 200 and 500  $\mu$ M)로 종양 세포 증식 억제 실험을 한 결과, IC<sub>50</sub> 값이 148.71  $\mu$ M로 관찰 되었다. 앞 실험의 능동적 표적 방법인 cRGDyK-S-S-CPLHSpT 유도체의 결과 (IC<sub>50</sub> = 75  $\mu$ M)와 비교해 본다면 cRGDyK-S-S-CPLHSpT가 좀 더 우수한 종양 세포 증식 억제 효과가 있음을 알 수 있다. 하지만 본 실험 한 가지의 결과만으로 cRGDyK-S-S-CPLHSpT 유도체, 즉 능동적 표적 방법이 종양 억제 효과가 더 우수하다고 단정짓기에는 무리가 있으며, 다른 비교 실험이 필요하다. VE-S-S-PLHSpT 유도체 역시 농도 차이에 의한 종양 세포 증식 효과를 확인할 수 있었다. 개발한 VE-S-S-PLHSpT 유도체의 세포분열 시 억제 효과를 규명하기 위해 cell cycle arrest 실험을 진행하였다. 그 결과 VE-S-S-PLHSpT가 종양 세포 분열을 억제하는데, 특히 세포분열 과정 중 G2/M기 때 세포 분열을 억제하는 것을 관찰하였으며, cRGDyK-S-S-CPLHSpT과 마찬가지로 종양 세포의 세포 사멸을 유도하는 기전을 확인하였다. Plk1 PBD를 PET을 통해 영상을 획득하기 위해서 VE-S-S-PLHSpT와 방사성 동위원소 <sup>123</sup>I/<sup>124</sup>I를 사용하여 iodogen tube 방법을 통해 radioiodination을 진행하였다. 표지 한 방사성추적자를 Hela 종양 세포와 함께 시간 별 변화를 관찰하였는데, 종양 세포에서 시간에 비례하여 종양 섭취가 증

가되었다 ( $3.48 \pm 0.16$ ,  $3.59 \pm 0.32$ ,  $4.26 \pm 0.32$ , and  $5.35 \pm 0.54$  % of uptake at 1, 4, 16 and 120 h). 억제 실험에서는 VE-S-S-PLHSpT (180  $\mu$ M)과 함께 처리하여 시간 별로 관찰한 결과, 24 시간 후에 50%의 방사성섭취가 감소되는 결과를 얻음으로써, 특이성을 확인할 수 있었다. PET 종양 영상을 획득하기 위해 종양이 이식되어 있는 동물 모델을 준비하였다. 누드 마우스 피하 층에 Hela 종양 세포를  $5 \times 10^6$ 개 주사하여 고형 종양을 유발한 모델을 만들었다. 이후 <sup>123</sup>I/<sup>124</sup>I-radiolabeled VE-S-S-PLHSpT를 꼬리 정맥 주사하여 PET를 통해 종양 방사성추적자를 평가하였다. PET에서는 주사 후, 종양 조직에서 유의한 이미지와 정량 값 ( $1.60 \pm 0.42$ , and  $0.85 \pm 0.13$  %ID/g at 1 and 4 h)을 확인하였다. 그리고 <sup>123</sup>I/<sup>124</sup>I로 표지 한 방사성추적자들의 단점으로 상대적으로 다른 방사성동위원소로 표지 한 방사성추적자에 비해 생체 내 안정성이 낮다는 것을 알 수 있었다. 특히 갑상선과 방광 조직에서 높은 방사능의 섭취를 보였다. Biodistribution 실험에서도 PET 영상 결과와 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 종양 조직에서는 주사 후 1, 4 시간 후 각각  $1.42 \pm 0.16$ 와,  $0.86 \pm 0.06$  %ID/g의 정량 값으로 시간에 비례하여 방사능의 섭취가 감소하는 것을 확인하였다(Figure 3(b)). 따라서 VE-S-S-PLHSpT 유도체도 *in vitro/in vivo*에서 종양 억제 및 치료 효과를 확인하였으며, <sup>123</sup>I/<sup>124</sup>I-radiolabeled VE-S-S-PLHSpT는 PET을 통한 종양의 진단 가능성을 하였다. 이번 실험의 결과에서는 두 유도체에 대한 결과를 비교해 보자면, 능동적 표적 방법으로 종양 세포에 많이 발견되어 있는 integrin 수용체를 표적 하여 세포막을 투과시키는 방법의 결과들이 *in vitro/in vivo* 실험 모두에서 종양 억제 평가뿐만 아니라, 종양 진단 가능성 면에서도 향상된 것으로 보인다. 하지만 PLHSpT 펩타이드를 기반으로 한 두 유도체 모두 Plk1 PBD와의 단백질-펩타이드 상호작용에 의한 약물 효과를 확인하였으며, 종양 치료제로 발전 가능성을 확인하였다. 그리고 앞으로 본 연구 결과를 바탕으로 Plk1 PBD에 대한 선택성과 특이성이 향상 된 유도체 개발 연구를 진행하고자 한다.

## Conclusion

PLHSpT 펩타이드 유도체에 방사성 동위원소를 결합하여 Plk1 PBD 단백질을 표적으로 하여, 종양을 진단 하는 영상 및 종양 억제제를 평가한 방사성추적자 결과를 살펴보았다. 이번 연구 결과들을 통해서도 알 수 있듯이 PLHSpT 펩타이드는 종양에 과 발현 되어 있는 Plk1 PBD 단백질과 결합력이 높기 때문에 그 결과를 바탕으로 방사성추적자 개발에 대한 연구를 수행하기에 용이 하였다. 그러나 펩타이드 기반 방사성추적자 개발에 있어서 가장 큰 단점이 생체 내 안정성에 대한 평가도 앞으로 수행해야 하는 과제라 여겨진다. 이와 같이 Plk1 PBD 타겟으로 하는 방사성추적자 개발 연구가 시작 단계이기 때문에 많은 문제점들을 해결할 수 있는 실험들이 앞으로 수반 되어야 한다. 그럼에도 불구하고 Plk1 PBD를 기반으로 한 방사성추적자 개발 연구는 종양과의 높은 친밀도 및 선택성의 장점이 있기 때문에 새로운 방사성추적자 개발을 기대한다.

## Acknowledgements

이 논문은 국가과학기술연구회의 재원으로 시행되는 창의형 융합연구사업으로 지원받았습니다(연구과제 관리 코드: CAP-17-03-KRIBB). 이권에 대한 문제 (conflict of interest)를 일으킬 수 있는 상업적인 관련성은 없습니다.

## Reference

- Glover DM, IM Hagan, and AA Tavares, Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes Dev* 1998; 12(24): p. 3777-87.
- van de Weerd BC and RH Medema, Polo-like kinases: a team in control of the division. *Cell Cycle* 2006; 5(8): p. 853-64.
- Holtrich U, G Wolf, A Brauning, T Karn, B Bohme, H Rubsamen-Waigmann, and K Strebhardt, Induction and down-regulation of PLK, a human serine/threonine kinase expressed in proliferating cells and tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(5): p. 1736-40.
- Simizu S and H Osada, Mutations in the Plk gene lead to instability of Plk protein in human tumour cell lines. *Nat Cell Biol* 2000; 2(11): p. 852-4.
- Lee KS, JE Park, YH Kang, TS Kim, and JK Bang, Mechanisms underlying Plk1 polo-box domain-mediated biological processes and their physiological significance. *Mol Cells* 2014; 37(4): p. 286-94.
- McInnes C, M Mezna, and PM Fischer, Progress in the discovery of polo-like kinase inhibitors. *Curr Top Med Chem* 2005; 5(2): p. 181-97.
- Baby B, P Antony, W Al Halabi, Z Al Homedi, and R Vijayan, Structural insights into the polypharmacological activity of quercetin on serine/threonine kinases. *Drug Des Devel Ther* 2016; 10: p. 3109-3123.
- Guan R, P Tapang, JD Levenson, D Albert, VL Giranda, and Y Luo, Small interfering RNA-mediated Polo-like kinase 1 depletion preferentially reduces the survival of p53-defective, oncogenic transformed cells and inhibits tumor growth in animals. *Cancer Res* 2005; 65(7): p. 2698-704.
- Liu X, M Lei, and RL Erikson, Normal cells, but not cancer cells, survive severe Plk1 depletion. *Mol Cell Biol* 2006; 26(6): p. 2093-108.
- Yun SM, T Moulaei, D Lim, JK Bang, JE Park, SR Shenoy, F Liu, YH Kang, C Liao, NK Soung, S Lee, DY Yoon, Y Lim, DH Lee, A Otaka, E Appella, JB McMahon, MC Nicklaus, TR Burke, Jr., MB Yaffe, A Wlodawer, and KS Lee, Structural and functional analyses of minimal phosphopeptides targeting the polo-box domain of polo-like kinase 1. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16(8): p. 876-82.
- Cho K, X Wang, S Nie, ZG Chen, and DM Shin, Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(5): p. 1310-6.
- Danhier F, O Feron, and V Preat, To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting

- of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release* 2010; 148(2): p. 135-46.
13. Torchilin V, Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63(3): p. 131-5.
  14. Gillies RJ, N Raghunand, ML Garcia-Martin, and RA Gatenby, pH imaging. A review of pH measurement methods and applications in cancers. *IEEE Eng Med Biol Mag* 2004; 23(5): p. 57-64.
  15. Khrantsov VV and RJ Gillies, Janus-faced tumor microenvironment and redox. *Antioxid Redox Signal* 2014; 21(5): p. 723-9.
  16. Vaupel P and A Mayer, Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26(2): p. 225-39.
  17. Kim SM, S Yoon, N Choi, KS Hong, RN Murugan, G Cho, and EK Ryu, In vivo tumor imaging using polo-box domain of polo-like kinase 1 targeted peptide. *Biomaterials* 2012; 33(29): p. 6915-25.
  18. Yang C, T Wu, Y Qi, and Z Zhang, Recent Advances in the Application of Vitamin E TPGS for Drug Delivery. *Theranostics* 2018; 8(2): p. 464-485.
  19. Cao N and SS Feng, Doxorubicin conjugated to D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS): conjugation chemistry, characterization, in vitro and in vivo evaluation. *Biomaterials* 2008; 29(28): p. 3856-65.
  20. Dietrich M, MG Traber, PF Jacques, CE Cross, Y Hu, and G Block, Does gamma-tocopherol play a role in the primary prevention of heart disease and cancer? A review. *J Am Coll Nutr* 2006; 25(4): p. 292-9.
  21. Yim MS, NK Soung, EH Han, JY Min, H Han, EJ Son, HN Kim, B Kim, JK Bang, and EK Ryu, Vitamin E-Conjugated Phosphopeptide Inhibitor of the Polo-Box Domain of Polo-Like Kinase 1. *Mol Pharm* 2019.