

Taxol 유도체들의 생물학적 거동에 관한 연구

연세대학교 보건과학대학 임상병리학과, 원자력병원 핵의학과*

오옥두 · 유대웅 · 임상무*

= Abstract =

Studies on the Biological Behaviors of Taxol Derivatives

Ok Doo Awh, Ph.D., Dae Wung Yoo, M.S. and Sang Moo Im, M.D.*

Department of Medical Technology, College of Health Science, Yonsei University, Wonju,
Kangwon-do, Department of Nuclear Medicine, Korea Cancer
Center Hospital, Seoul, Korea

This study was designed to prospect the ^{111}In -labelled paclitaxel as tumor imaging agent. In order to provide a taxol molecule with a functional group which is able to chelate In-111, taxol-DTPA conjugate and 2'-hemisuccinyltaxol were synthesized by esterification of taxol at C-2' on C-13 carbon with DTPA anhydride and succinic anhydride, respectively. Synthesis yield of the taxol derivatives was 34% for taxol-DTPA and 80% for 2'-hemisuccinyltaxol. Cytotoxicity of the taxol derivatives were measured by MTT method toward cell lines HT29, B16, P388, and CT26. The cytotoxic activities of the taxol derivatives were maintained, although less active than taxol. Radiolabelling of the taxol derivatives were proceeded directly with $^{111}\text{InCl}_3$ or indirectly with ^{111}In -citrate(ligand-exchange method). The ligand-exchange method was not suitable because some precipitates appeared during the reaction. On the contrary, by direct radiolabelling method, we were able to obtain taxol-DTPA- ^{111}In in 100% radiochemical yield. However, 2'-hemisuccinyltaxol was not labelled by both methods. Yield and radiochemical purity of the radiolabelled compound were determined by HPLC, paper chromatography and instant thin layer chromatography. Taxol-DTPA- ^{111}In was characterized to be hydrophilic by lipophilicity test, and nearly non-adhesive to HT29, B16, P388, and CT26 by cell binding affinity test. Binding affinity of the taxol-DTPA- ^{111}In complex to serum proteins was also examined by protein precipitation with 30% trichloroacetic acid. The results showed that 30% of the taxol-DTPA- ^{111}In complex binds with serum proteins.

Key Words : Taxol, DTPA, $^{111}\text{InCl}_3$, Lipophilicity, Binding affinity

서 론

Taxol은 주목과 나무인 *Taxus brevifolia*에서 추출한 diterpene구조를 가진 항암제로서 그 구조(Fig.

1)가 알려져 있으며¹⁾, 항암작용에 대한 연구들이 수행되어 그 약효에 대한 결과들을 보고하고 있다. Taxol은 미세소관에 작용하여 그 약효를 나타내는 것으로 알려져 있다²⁾. 미세소관의 기본 구성 요소는 α tubulin과 β tubulin으로 이루어져 있으며, 이런 $\alpha\beta$ tubulin의 이합체(dimer)들이 외부의 자극 또는 tubulin의 복합체(polymer)간의 농도 차이에 의해 계속적으로 결합과 분리를 반복하면서 그 역할을 하게 된다.

책임저자: 오옥두 강원도 원주시 흥업동 매지리 234번지
연세대학교 보건과학부 임상병리학과
Tel: 0371) 760-2425 Fax: 0371) 760-2195
E-mail: immunoch@dragon.yonsei.ac.kr

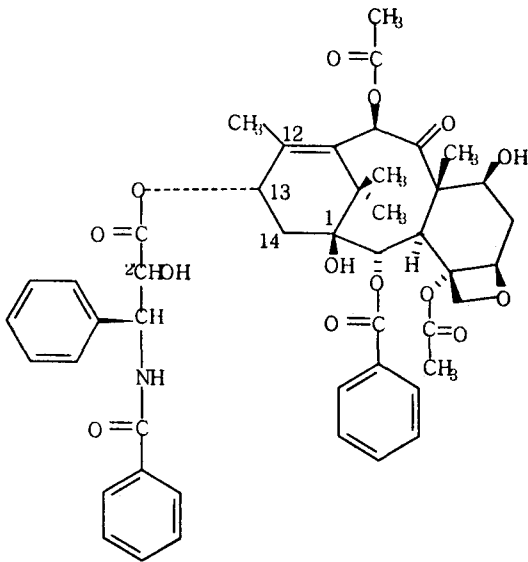


Fig. 1. Structure of taxol.

세포분열시 세포 중앙에 위치하는 염색체에 tubulin polymer가 형성되어 붙고, 다시 tubulin polymer들이 해리되어 각각의 염색체 쌍을 반대방향으로 둘로 나누어서 끌어오게 되는데, taxol은 주로 microtubule의 β tubulin에 작용하며, tubulin의 polymer형성을 저해함으로써 항암효과를 내던 vinca alkoid 등의 약물과는 달리 polymer를 형성한 microtubule의 분해를 억제하여 안정화 시킴으로써 세포 주기의 G2/M 시기에서 세포분열을 막아 암세포의 증식을 멈추게 하고 암세포가 더 이상의 전이없이 소멸되게 하는 작용을 하는 것으로 보고되고 있다³⁻⁵⁾.

현재 taxol은 유방암^{6, 7)}, 난소암⁸⁻¹⁰⁾, 폐암^{11, 12)}, 뇌종양 등¹³⁾에 광범위하게 항암작용을 보이나, 특히 유방암과 난소암에 탁월한 치료효과가 있음이 밝혀졌다. 미국에서는 이의 의약품화를 위하여 phase I-phase III의 실험이 실시되었으며¹⁴⁻¹⁶⁾, 1992년 12월 미국 FDA에서는 기존 약물치료에 실패한 난소암 환자에 한하여 taxol을 사용한 항암치료를 승인하였다^{17, 18)}. 체내투여된 taxol의 체내대사 및 분포과정은 taxol에 삼중수소를 표지하여 연구되었다^{19, 20)}. Taxol은 간에서 cytochrome P450 system에 의해 대사되고, 간, 비장, 심장, 폐, 신장 등에 분포하며 뇌 실질(parenchyma), 경추, 요부신경절, 좌골신경, 고환 등에는 분포하지 않는

것으로 알려져 있다²⁰⁾. 그러나 삼중수소는 저에너지 β 선 방출체로서 체외 직접계측이 불가능하며, 체내 각장기로 집적된 표지된 taxol을 계측하기 위해서는 실험동물을 도살하여 각 장기를 떼어내어 잘게 갈아 액체 섬광체와 혼합한 후 액체섬광계측기(Liquid Scintillation Counter; LSC)를 이용하여 측정하여야 하고 뼈와 같은 장기는 측정이 어렵다.

방사성동위원소인 In-111은 3가 금속이온으로 주기를 표상에 group IIIA에 속하며, 지각에 존재치 않아 체내로 섭취되지 않음으로써 체내에 존재하지 않아 그 기능은 알려져 있지 않았으며, 전자포획(electron capture)에 의해 173keV와 247keV의 γ 선 에너지를 방출하고, β 붕괴를 하지 않으며, 67시간의 반감기를 갖는 물리적인 특성을 갖는다. 또한 6배위수를 갖으며 팔면체 구조를 형성하고, 강산성 또는 강염기성에 녹는 특성을 갖는다. In-111은 주로¹¹¹InCl₃의 형태로 공급되고 있으며, Diethylenetriaminepentaacetic acid(DTPA), bleomycin, citrate, lactate, acetate, hydroxyethylthylenediaminetriacetic acid(HEDTA) 등과 표지하여 임상학적 이용에 대한 연구가 진행되어 왔다²¹⁾.

Taxol은 γ 선을 방출하는 방사성동위원소인 In-111으로 표지할 수 있는 작용기(functional group)를 갖지 않아 In-111과 표지하기 위해서는 taxol의 분자구조를 변형하여 taxol 유도체(derivative)를 합성하여야 한다. 현재까지 taxol의 구조에 있어 주로 7번 탄소와 13번 탄소 결까지의 2' 탄소부위의 hydroxyl group을 변형하였다²²⁻²⁵⁾. 이외에도 10번 탄소에 있는 acetyl group을 떼어보거나 13번 탄소의 결까지에 있는 3' 탄소의 phenyl group 등을 다른 물질로 치환시켜 보거나 제거하는 등 여러 부분의 분자변형이 수행되었으며, 이 변형된 유도체에 대한 세포독성능이나 수용성 등에 대한 연구가 병행되어 10번 탄소의 부분 변형시 약물의 작용에는 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 taxol에 대한 photolabelling 등을 수행하기에 가장 적합한 부위로 생각되어지고 있으며, 13번 탄소 결까지의 2' 탄소 부위를 t-BuO로 치환시킬 경우 microtubule의 안정화에 있어 taxol보다 효과가 뛰어나는 밝혀졌다²⁶⁻²⁸⁾. 현재까지 taxol의 구조에 있어, 13번 탄소에 있는 결까지의 구조가 microtubule의 안정화에 중요한 역할을 함이 밝혀졌고, C-2'부분을 부분적으로 변형했을 경우 in vitro상에서 micro-

tubule의 안정화 기능은 다소 약해지지만 in vivo상의 세포독성에는 큰 문제가 없는 것으로 알려져 있다²⁹⁾.

Taxol의 세포독성능(cytotoxicity)시험에는 일반 약물과 마찬가지로 ³H-thymidine uptake법³⁰⁾, XTT법³¹⁾, neutral red법³²⁾, MTT법^{33, 34)}, LDH assay법³⁵⁾ 등이 이용될 수 있다. MTT법은 살아 있는 세포에 의해 MTT가 분해되어 형성된 formazan의 색상을 흡광도로 측정하며, 배지내의 증식된 세포수와 비례하여 흡광도가 커지므로 세포의 증식정도를 측정할 수 있게 된다^{33, 34)}. 이에 반하여 LDH 측정법은 세포의 사멸정도를 측정하는 방법으로, LDH는 모든 포유동물에 존재하는 세포질내 효소로 정상적인 상태에서는 세포막을 통과하지 못하지만 세포막에 손상을 입게 될 경우 막의 투과성이 변화되어 세포 밖으로 유출이 되며, 세포배양액에 방출된 LDH양을 측정하여 세포사멸과 세포막의 손상정도를 알 수 있는 방법이다³⁵⁾.

본 연구에서는 taxol을 γ 선을 방출하는 방사성동위원소인 In-111로 표지하기 위하여, taxol의 C-13결가지(side chain)의 C-2'부분의 hydroxy기를 succinic anhydride 및 DTPA anhydride와 반응시켜 carboxyl acid group을 갖는 2'-hemisuccinyltaxol과 taxol-DTPA를 합성하고, 이들 taxol 유도체들의 세포독성능을 taxol과 함께 MTT법을 이용하여 시험하였다. Taxol-DTPA를 In-111로 표지하여 그 표지수율 및 방사화학적 순도를 보았으며, 이 방사성표지화합물의 몇가지 생물학적 특성과 거동에 대한 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 기기 및 시약

UV분광기는 Wallac사의 ULTROSPEC II를 사용하였고, HPLC는 Millipore사의 Waters 510기종을 사용하였으며, μ BondapakTMC18, 3.9×300mm column을 사용하였다. γ counter는 Wallac사의 Wizard 1480기종을 사용하였고, ELISA reader는 Molecular Devices사의 Emax기종의 microplate reader를 사용하였다.

Gelman Sciences사의 TLC 및 ITLC(instant thin layer chromatography) plate(ITLC-SG 또는 ITLC-SA, 5×20cm)와 Whatman No. 1 chromatography paper를 사용하였고, 24 및 96 well plate는 Nunc사의 제품을 사용하였다.

Paclitaxel(Taxol), DTPA anhydride, succinic anhydride, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide) 등은 Sigma사의 제품을 사용하였고, J.T.Baker사의 metanol과 Merck사의 ethylacetate 및 TCA(trichloroacetic acid), Fluka사의 DMSO를 사용하였다. Visualizing solvent로 H₂SO₄ 54.2ml, molybdic acid 10g, cerium(IV) hydrate 10g, H₂O 880ml를 혼합한 용액을 사용하였고, DMEM(dulbecco's modified eagle's medium), FBS(fetal bovine serum)은 GIBCOBRL사의 제품을 사용하였다.

Indium-111은 무담체(carrier free)형태의 ¹¹¹InCl₃ (2mCi/200 μ l)를 영국의 Amersham사에서 구입 사용하였다.

2. 2'-Hemisuccinyltaxol의 합성

J.G. Leu 등의 방법³⁶⁾을 참고로 하여 실험하였다. 즉, paclitaxel 20mg(0.023mM)과 succinyl anhydride 36mg(0.36mM)를 반응 용기에 넣고, 진공건조장치에서 5시간 동안 감압건조시켰다. 건조 후 반응 용기에 dry pyridine 500 μ l를 가하고 저어주며 18시간 동안 반응시켰다. 반응을 정지시킨 후 pyridine을 제거하였고, 여기에 acetone을 가하고 다시 감압증류하여 pyridine을 완전히 제거하였다. 완전히 건조된 반응혼합물에 증류수 2ml를 넣고 흔들어 줌으로서 반응하고 남은 succinic acid를 녹여 제거하고 감압건조하였다. 여기에 acetone 1ml를 가하여 녹인 후 증류수를 한방울씩 가하여 결정이 형성되기 시작하면 냉장실에 24시간 방치하여 침전이 충분히 형성되게 한 후 여과하여 2'-hemisuccinyltaxol을 얻었다.

정제된 2'-hemisuccinyltaxol결정 소량을 acetone에 녹이고 TLC plate에 점적한 후 전개액(EtOAc: acetone: n-hexane = 4:2:1)을 사용하여 전개시키고 visualizing solution에 적신 후 hot plate상에서 생성물의 band를 확인하여 그 순도를 확인하였고, taxol(5.6×10^{-6} mole/l), 2'-hemisuccinyltaxol(4.6×10^{-5} mole/l), succinyl anhydride(1.4×10^{-2} mole/l)를 methanol에 녹여 UV 흡광도를 측정하였다.

3. Taxol-DTPA 접합체의 합성

2'-Hemisuccinyltaxol의 합성방법을 적용하여 실

협하였다. 즉, paclitaxel 25mg(0.03mM)과 DTPA anhydride 44mg(0.12mM)을 반응용기에 넣고, 실온에서 48시간 동안 반응시켰다. 반응종료후 pyridine을 제거하였으며, 잔류 pyridine의 제거 효율을 높이기 위해 acetone을 약간 가한후 다시 증류시켜 남은 pyridine이 완전히 제거되도록 하였다. 반응혼합물에 methanol 6ml를 가한 후 6시간 동안 저어주고, 4°C, 3,000rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액과 침전층으로 분리하였다. 이중 상층액을 취해 methanol을 제거한 후 ethyl acetate 6ml를 가하고 stirrer로 6시간 동안 저어주었다. 여기에 다시 ethyl acetate 6ml를 가하고 6시간 동안 저은 후 원심분리하여 상층액을 제거하는 과정을 5회 반복하여 정제된 taxol-DTPA를 얻었다.

정제한 taxol-DTPA 접합체를 TLC plate에 점적하고 methanol을 전개용매로 하여 전개시킨 후, TLC 판을 visualizing solution에 적시고, hot plate상에서 생성물의 band를 확인하여 순도를 확인하였다. 또한 taxol 및 taxol-DTPA(5.6×10^{-5} mole/l)는 methanol 용매에 녹이고, DTPA(5.6×10^{-5} mole/l)는 증류수에 녹여 U.V. 흡광도를 측정하였다.

4. Taxol 및 taxol 유도체들의 세포독성능 실험

R.F. Hussain 등의 방법³⁴⁾에 따라 taxol, 2'-hemisuccinyltaxol, taxol-DTPA의 세포독성능실험을 수행하였다. 즉, HT29세포주는 FBS가 10%되고, B16, P388, CT26 세포주는 FBS가 5%되게 첨가된 DMEM 배지에 3일간 배양 후, 100 μ l당 5×10^3 개의 세포가 되도록 상배지로 희석하여 96 well plate (Nuc)에 100 μ l씩 분주하였다. Taxol, taxol-DTPA 접합체, 2'-hemisuccinyltaxol을 100 μ M/ml의 농도가 되도록 DMSO에 녹인 후 FBS 10% 및 FBS 5%가 첨가된 DMEM배지를 분주하여 taxol 및 taxol 유도체들의 최종농도가 1, 2, 10, 20, 100, 200, 1000nM이 되도록 하고 CO₂ 5%, 37°C 항온 항습기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 DMEM에 녹인 MTT(1mg/ml)를 각 well당 50 μ l씩 분주한 후 4시간 동안 항온 항습기에서 배양하였다. 그후 MTT액을 제거하고, 여기에 DMSO 150 μ l씩 분주하여 30분간 formazan을 용해시킨후 540nm에서 microplate reader로 각각의 흡광도를 측정하여 taxol 및

taxol 유도체들의 세포독성능 실험을 수행하였다.

5. Taxol 유도체들의 ¹¹¹In 표지실험

1) 리간드 교환법(Ligand exchange method)

¹¹¹InCl₃(1mCi) 100 μ l를 0.1M citrate 100 μ l와 섞어 상온에서 30분간 반응시켜 ¹¹¹In-citrate를 얻었다. 여기에 2'-hemisuccinyltaxol 및 taxol-DTPA를 DMSO에 1mg/ml의 농도가 되게 만든 용액 100 μ l과 ¹¹¹In-citrate액 100 μ l를 가하고 저어주면서 60분간 상온에서 반응시켰다. 반응후 방사능검출기가 장착된 HPLC를 이용하여 반응수율을 확인하였다.

2) 직접법(Direct method)

2'-Hemisuccinyltaxol 및 taxol-DTPA 접합체를 DMSO에 녹인 용액(1mg/ml) 100 μ l와 ¹¹¹InCl₃ (0.5mCi) 50 μ l를 혼합하여 저어주면서 60분간 상온에서 반응시켰다. 반응종료 후 HPLC를 실시하여 표지반응수율을 결정하였으며, paper, ITLC-SA, ITLC-SG 등을 고정상으로 하고 75% methanol 및 100% methanol을 전개용매로 한 크로마토그래피를 실시하여서도 그 표지반응수율을 결정하였다.

6. Taxol-DTPA-¹¹¹In 접합체의 열안정성 실험

Taxol-DTPA-¹¹¹In을 실험관에 각각 10 μ l씩 분주하여, 4°C, 37°C, 60°C로 항온 유지하면서 1, 3, 6, 24, 48시간 간격으로 크로마토그래피를 실시하여 방사화학적 순도를 결정함으로써 그 열안정성을 비교하였다. 즉, 75% methanol을 전개용매로 한 paper chromatography를 실시하고 1cm 간격으로 paper를 잘라 방사능계측기에서 각 절편들의 방사능을 측정하여 taxol-DTPA-¹¹¹In의 방사능과 이외의 방사능을 측정하여, 그 방사화학적 순도를 결정함으로써 열안정성을 비교하였다.

7. Taxol-DTPA-¹¹¹In의 Lipophilicity 결정실험

J. Imre 등의 방법³⁸⁾을 참고하여 결정하였다. 즉, 증류수 2ml와 n-octanol 2ml를 각각 separate funnel에 넣고, taxol-DTPA-¹¹¹In액 50 μ l를 가하여 잘 섞어준 후, 30분간 방치하여 물층과 유기층이 완전히 분리되게 하였다. 물층과 유기층 각층에서 50 μ l씩 취하여 방사능계측기에서 각각의 방사능을 측정하였다. 유기층에 대한 물층의 방사능비를 환산한 후 그 log 값

을 구하여 lipophilicity를 나타내었다.

8. Taxol-DTPA-¹¹¹In 접합체의 세포결합능 실험

24 well plate에서 HT29, B16, P388, CT26 세포주를 FBS serum 10% 및 5% 첨가된 DMEM배지로 희석하여(5×10^4 개/ml) 각 well당 1ml씩 분주하고, CO₂ 5%, 37°C 항온 항습기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양후 각 well의 상층액을 제거하고, taxol-DTPA-¹¹¹In을 DMEM배지로 희석한 액(1 μCi/1ml)을 각 well당 1ml씩 분주하였다. 분주후 1, 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360분 간격으로 항온 항습기에 각각 배양하고, 배양상층액을 제거하였다. Well당 PBS buffer 1ml로 3회 washing한 후 1% Triton X-100 및 1% SDS 혼합수용액으로 세포를 녹여 test tube에 옮겨 담아 감마계측기로 1분간 각각의 방사능을 계측하였다. 여기에서 전체 방사능에 대한 각 시험관에서의 방사능을 백분율로 환산하여 taxol-DTPA-¹¹¹In의 세포결합능을 환산하였다.

9. Taxol-DTPA-¹¹¹In 접합체의 혈청단백질과 결합능 실험

건강한 성인 남자의 혈액을 취하여 4°C에서 12시간 방치하여 혈전이 생성되도록 한 후 3,000rpm에서 30분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈청 500 μl에 taxol-DTPA-¹¹¹In 표지화합물 50 μl를 가하고, 37°C

에서 각각 1, 3, 6시간동안 정온유지한 다음 30% trichloroacetic acid 수용액 500 μl를 가하여 섞은 후 4,000rpm에서 30분간 원심분리하였다. 총방사능(T)를 계측하고 상등액을 버리고 침전층 방사능(B)을 계측하여 B/T(%)를 환산함으로써 taxol-DTPA-¹¹¹In의 혈청단백질에 대한 결합능을 결정하였다.

결 과

Paclitaxel 20mg(0.023mM)을 succinyl anhydride 36mg(0.36mM)와 반응시켜 2'-hemisuccinyltaxol

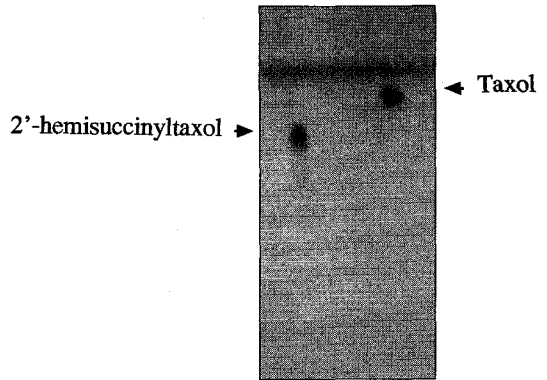


Fig. 2. Thin-layer chromatogram of 2'-hemisuccinyltaxol reaction mixture [developing solution(EtOAc : acetone : n-hexane=4 : 2 : 1)].

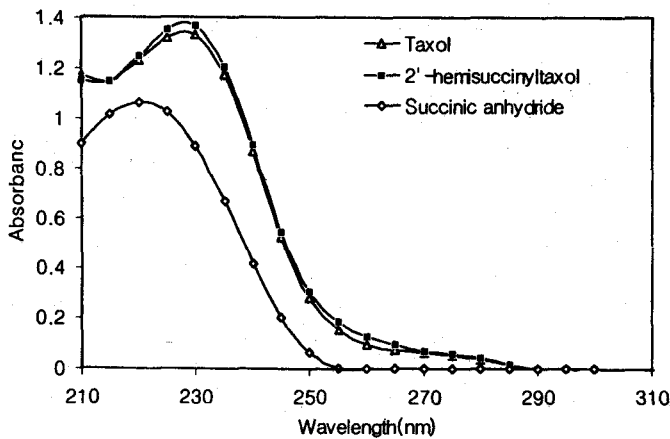


Fig. 3. Ultraviolet spectra of 2'-hemisuccinyltaxol and related substances [2'-hemisuccinyltaxol(4.6×10^{-5} mole/l), taxol(5.6×10^{-6} mole/l), succinic anhydride(1.4×10^{-2} mole/l) were dissolved in MeOH].

nyltaxol 17.8mg을 얻어 79.9%의 반응수율을 나타내었다. 2'-Hemisuccinyltaxol의 TLC 양상은 taxol band의 R_f 값(0.87-0.93)보다 낮은 R_f 값(0.74~0.83)을 나타내었다(Fig. 2). UV 흡광곡선에서 taxol은 227nm에서, 2'-hemisuccinyltaxol은 230nm에서, succinic anhydride는 220nm에서 각각 그 최대흡수 peak가 관찰되었다(Fig. 3).

Paclitaxel 25mg(0.029mM)을 DTPA와 반응(Fig. 4)시키고 정제하여, taxol-DTPA 접합체 12.1mg

(0.01mM)을 얻어 34.5%의 반응수율을 나타내었다. 반응혼합물을 methanol을 전개액으로 하여 상승전개시 taxol-DTPA 접합체의 R_f 값은 0.45-0.5이고, taxol의 R_f 값은 0.9-0.95이었다(Fig. 5). Taxol(5.6×10^{-5} mole/l) 및 taxol-DTPA 접합체(5.6×10^{-5} mole/l)는 MeOH에 녹이고, DTPA(1.3×10^{-3} mole/l)는 증류수에 녹여 210-300nm사이의 흡광도를 측정할 UV 흡광곡선(Fig. 6)에서 taxol은 227nm에서, taxol-DTPA 접합체는 210nm에서 각각 그 최대흡수 peak를 나타

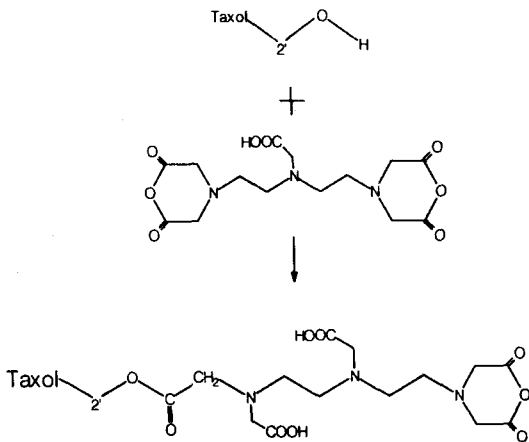


Fig. 4. Synthetic scheme of taxol-DTPA conjugate.

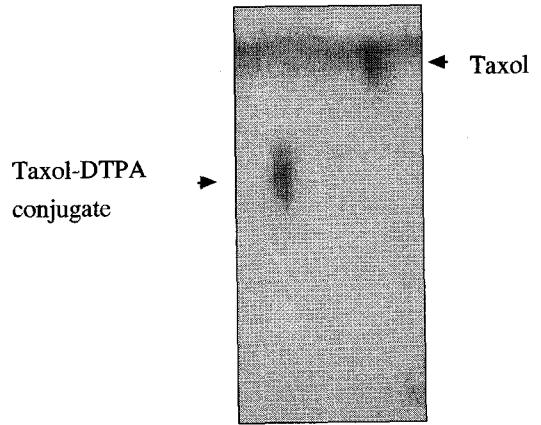


Fig. 5. Thin layer chromatogram of taxol-DTPA conjugate reaction mixture.

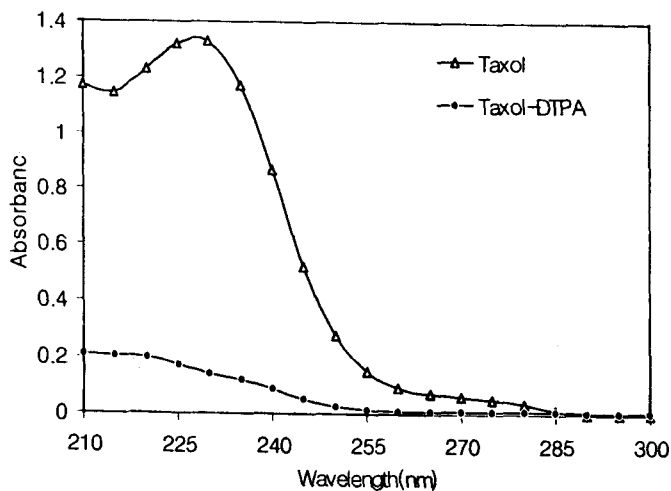


Fig. 6. Ultraviolet spectra of taxol and taxol-DTPA [taxol(5.6×10^{-6} mole/l), taxol-DTPA(5.6×10^{-6} mole/l) were dissolve in MeOH].

였으나, DTPA는 주어진 UV 파장에서는 흡광도를 나타내지 않았다.

HT29, B16, P388, CT26 세포주를 96 well plate에 배양하고 taxol의 유도체와 paclitaxel을 농도별로 넣은 후 MTT법을 이용하여 유도체의 세포독성능을 결정하기 위하여, 배양 plate의 각 well의 흡광도를 측정 한 후 각 농도별로 taxol과 taxol 유도체를 첨가한 실험군의 흡광도의 평균치와 첨가하지 않은 음성대조군의 흡광도 평균치를 식<1>에 의하여 percent survival(%)로 환산하여 IC₅₀을 결정하였다(Table 1).

$$\text{Percent survival(\%)} = \frac{\text{Taxol 유도체 농도별 흡광도}}{\text{음성 대조군의 흡광도}} \times 100 \quad \text{<식 1>}$$

각 세포주에서 taxol과 taxol-DTPA 접합체 및 2'-hemisuccinyltaxol의 IC₅₀ 농도는 Table 1과 같으며, 4가지 세포주에서 모두 taxol의 IC₅₀이 가장 낮았으며 taxol-DTPA 접합체, 2'-hemisuccinyltaxol의 순으로 낮게 나타났다.

Taxol 유도체에 In-111을 표지시키기 위하여 ¹¹¹InCl₃을 citrate와 반응시켜 ¹¹¹In-citrate를 제조하

고, taxol-DTPA나 2'-hemisuccinyltaxol과 citrate가 교환되게 하는 리간드 교환방법에서는 반응도중 침전이 생겨 적합치 않은 것으로 생각되어 실험을 중단하였다. 직접 표지방법에서 표지반응 종결 후 HPLC를 실시하여 Fig. 7의 결과를 얻었다. 그림에서 보는바와 같이, taxol-DTPA 접합체의 경우 방사능검출기를 사용한 HPLC 크로마토그램에서는 3분 40초에서 단일 peak를 보여 반응이 100% 진행되었음을 확인하였다. 2'-Hemisuccinyltaxol의 경우에는 peak는 관찰되지 않아 반응이 진행되지 않았다. 또한, taxol-DTPA-¹¹¹In 표지반응 혼합물을 paper chromatography와 ITLC에서 75% methanol을 전개액으로 상승전개한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 그림에서 보는 바와같이, paper chromatography에서는 0.5-0.6의 R_f값을 갖는 단일 peak가 나타났고, ITLC-SG와 ITLC-SA에서도 R_f값 0.9-1의 단일 peak를 보여 반응이 100% 진행되었음을 재확인하였다. Taxol-DTPA-¹¹¹In의 lipophilicity 측정 실험에서는 -0.85±0.33(n=3)의 결과를 나타내었다.

Taxol-DTPA-¹¹¹In의 세포결합능 결정실험에서는,

Table 1. IC₅₀ of Taxol and Taxol Derivatives
Unit: nM

	Taxol	Taxol-DTPA conjugate	2'-Hemisuccinyltaxol
HT29	8.7	12.4	44.8
B16F4	23.5	60.2	69.7
CT26	25.3	50.3	57.7
P388	25.8	63.2	62.8

Table 2. Serum protein Binding affinity of Taxol-DTPA-¹¹¹In
mean±SD

Elapsed Time	Binding with serum protein(%)
1hr	31.9±2.0
3hr	34.0±1.1
6hr	35.1±0.1

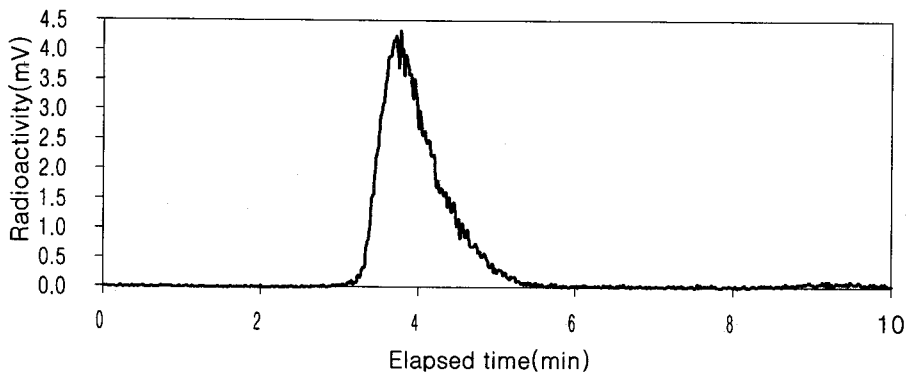


Fig. 7. High performance liquid chromatogram of taxol-DTPA-¹¹¹In labelling mixture.

— 오옥두 외 2인 : Taxol 유도체들의 생물학적 거동에 관한 연구 —

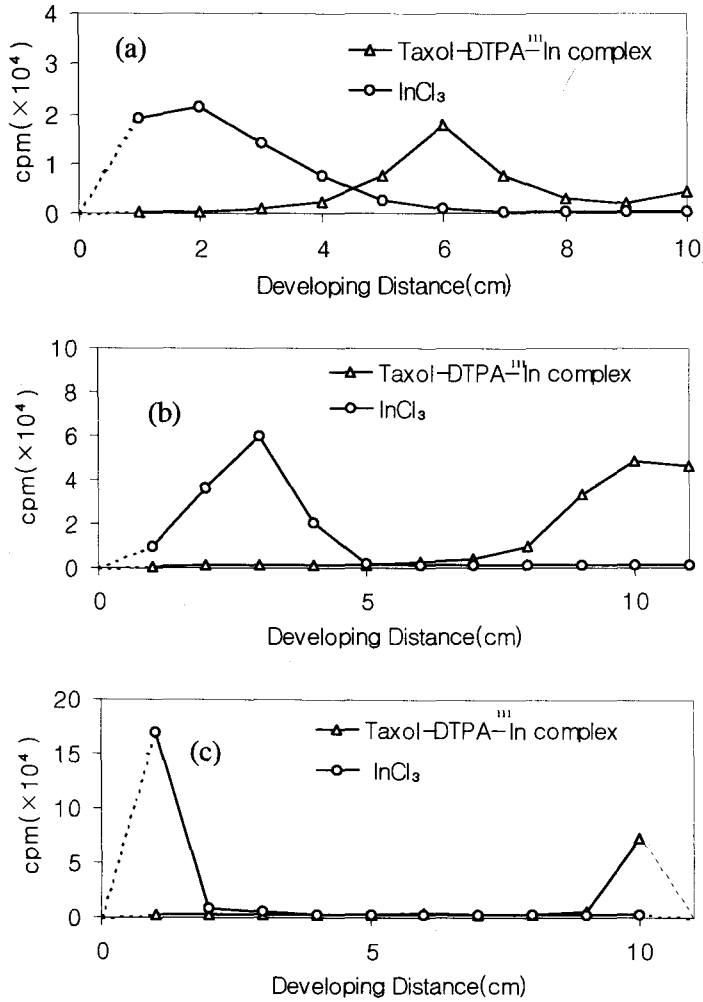


Fig. 8. Radiochromatogram of taxol-DTPA-¹¹¹In complex and ¹¹¹InCl₃ [(a): paper chromatography, (b): ITLC-SG, (c): ITLC-SA, developing solvent; 75% MeOH].

HT29, B16, P388, CT26 세포주 모두에서 시간별로 측정된 방사능이 0-50cpm으로 background에 가까와 백분율화하였을 때 거의 0에 가까운 수치를 보여 이들 세포에는 거의 결합이 되지 않은 것을 관찰하였다. 인 혈청에 대한 taxol-DTPA-¹¹¹In의 결합능 실험에서, Table 2와 같은 결과를 구하였다. Table 2에서 보는 바와 같이, 37℃에서 정온 유지하는 시간이 1시간일 경우 31.9%, 3시간의 경우 34%, 6시간에서는 35.1%로 시간이 길어짐에 따라 침전층의 방사능이 약간 증가하였다.

고 찰

Taxol의 분자구조 변형은 taxol의 C-13 결가지 C-2'부분의 hydroxyl기와 DTPA anhydride 및 succinic anhydride를 반응시켜 ester를 만들고, 결과적으로 carboxyl acid기를 유도하기 위한 실험을 수행하였다. Taxol의 구조에는 C-13 결가지 C-2'부분 이외에도 C-7 및 C-1 부분에도 hydroxy기가 있으나, C-7 위치의 hydroxy기는 2차 알콜, C-1위치의 hydroxyl기는 3차 알콜구조를 가지고 있다. C-13 결

가지 C-2' 위치의 hydroxy기도 2차 알콜의 구조를 가지나 노출이 커 carboxylic acid anhydride와 반응이 잘 이루어 지나, C-13 및 C-1 위치에 있는 hydroxy기의 경우 반응이 거의 진행되지 않는 것으로 알려져 있다²⁴⁾. Taxol-DTPA 접합체 합성실험에서는 34%의 반응수율을 나타내었다. 이는 pyridine을 반응용매로 사용하여 반응을 시켰으나 DTPA가 pyridine에 녹지 않아 taxol 분자와 충분한 접촉을 하지 못하였으며, 정제과정에 있어 결합하지 못한 DTPA와 taxol의 추출 과정이 많아 그에 따른 손실에 따른 것으로 생각된다. 반응시간을 48시간으로 늘려 장시간 반응시킴으로 반응수율을 높이고자 하였고, 정제과정이 짧아 상대적으로 손실이 작을 것으로 생각되는 재결정방법을 시도하였으나, taxol-DTPA 접합체의 결정이 생기지 않아 재결정하지 못하였다. 또한 합성반응에서 반응용매인 pyridine을 0.5ml를 사용하였을 때 녹지 않고 부유된 DTPA에 의해 pyridine이 고체화되는 현상이 관찰되어 이를 막기 위해 pyridine을 1ml로 늘려서도 반응시켜 보았으나 반응수율의 향상은 관찰되지 않았다.

2'-Hemisuccinyltaxol의 경우, 80% 정도의 높은 수율을 나타내었다. 이는 Leu 등³⁶⁾이 얻은 70%의 반응수율보다 높은 것으로 taxol과 succinic anhydride와의 반응시간을 18시간으로 충분히 시키고, 결정을 형성하는 시간도 24시간 정도로 충분히 늘려줌으로써 반응수율이 향상된 것으로 생각된다. Taxol-DTPA 접합체 합성실험에서와는 달리 반응용매인 pyridine에 taxol 및 succinic anhydride가 모두 잘 녹아 실험상의 어려움도 없었다. 반응종료 후 rotary evaporator를 이용하여 pyridine을 제거할 때, pyridine의 완전제거가 어려웠으며, 아세톤을 약간 가하여 다시 증류함으로써 제거효율을 높일 수 있었다.

본 연구에서 사용한 세포주는 HT29, B16, P388, CT26이었다. HT29 세포주는 사람에서 분리된 colonic adenocarcinoma cell로 FBS serum 10% 첨가된 DMEM배지 또는 RPMI배지에서 자란다. B16F4 세포주는 melanoma cell이고, P388 세포주는 leukemia cell이며, CT26 세포주는 colorectal carcinoma cell로 모두 마우스에서 분리되었으며 FBS serum 5% 첨가된 DMEM에서 잘 자라는 특성이 있다. Taxol 유도체는 taxol에 비하여 세포독성능이 약간 감소하였고, 2'-hemisuccinyl taxol이 taxol-

DTPA 접합체에 비하여 약간 더 감소하였다. 이는 Swindell 등이 13번 탄소 결합지 2' 위치의 구조를 부분적으로 변형하면 in vitro에서는 세포독성능이 약간 감소하나 in vivo에서는 차이가 나지 않았다고 보고내용²⁹⁾과 일치하였다. 또한 in vitro에서 사람의 종양에서 분리한 human 세포가 마우스의 종양세포인 murine계 세포보다 민감하며 murine 세포의 경우 taxol에 대한 저항성을 띠는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서도 세포분열을 50% 억제하는 약물의 농도인 IC₅₀은 taxol 및 taxol 유도체에서 human 세포인 HT29 세포주가 나머지 murine계 세포주에 비하여 낮은 값을 나타내 taxol 및 taxol 유도체에 민감함과 taxol 유도체가 세포독성능을 크게 잃지 않았음을 확인하였다.

¹¹¹InCl₃를 taxol 유도체와 표지반응시키는 과정에서 ¹¹¹In-citrate을 이용한 리간드 교환방법과 ¹¹¹InCl₃를 직접 taxol 유도체에 표지시키는 방법 모두 시도하였다. 리간드 교환방법의 경우 In-111 표지 반응도중 침전물의 생성이 관찰되어 적용하기 어려웠으며, In-111의 직접 표지방법에서는 1-10mg/ml의 taxol-DTPA 농도에서는 반응중 침전이 생성되지 않았다. 따라서 리간드 교환법은 본 실험에는 적용하기 어려워 직접법으로 taxol-DTPA-¹¹¹In표지 생성물을 얻었다. 이와 같은 현상은 0.1M의 citrate 용액의 농도가 높아 DMSO가 소량이라도 들어가면 상대적으로 citrate의 용해도가 떨어져 침전이 생기는 것으로 생각되어진다. 반응 수율은 HPLC, paper, ITLC 등의 크로마토그래피로 확인한 결과 모두 100%이었다. HPLC로 수율을 확인할 때 표지혼합물을 역상 HPLC column을 통과시켜 단일 peak를 확인하였으나, ¹¹¹InCl₃를 In-111 free form 형태로 통과시킬 때, column에 흡착이 일어나 통과하지 못하였다. 따라서 paper chromatography(PC)와 instant thin layer chromatography(ITLC)를 통해 표지반응수율을 확인하였다. HPLC의 이동상으로 사용하였던 75% methanol을 전개용매로 한 PC와 ITLC에서 ¹¹¹InCl₃는 원점에 남았고, taxol-DTPA-¹¹¹In 표지화합물은 중간정도의 단일 peak를 나타내어 반응이 100% 이루어 졌음을 확인할 수 있었다.

방사성의약품의 여러가지 물성 중 lipophilicity는 체내대사과정의 mechanism을 설명할 수 있는 한 요인으로써 방사성의약품의 세포내로의 통과를 예측하는데 이용된다. 유기물층으로 사용한 n-octanol은 비중

이 낮아 수용액중으로 사용한 증류수와 혼합한 후 5분 이내에 두층으로 나뉘어 상층에 위치하였다. 본 연구에서는 Taxol-DTPA-¹¹¹In를 혼합후 잘 섞어 37°C에서 30분간 방치하여 두층이 완전히 분리되게 하였다. 유기물층에 대한 수용액층의 방사능비의 log 값은 -0.8로 나타났으며, 이는 taxol-DTPA-¹¹¹In 이 친수성을 가짐을 의미하게 된다 그러나 음의 값이 크지 않아 세포막에 대한 침투성이 어느 정도는 있을 것으로 예측해 볼 수 있다. 지용성이 클 경우에 방사성의약품이 유기질막(lipoidal membrane)을 통과하여 세포내 결합이 가능하다³⁷⁾고 알려져있다. 따라서 taxol-DTPA-¹¹¹In 표지화합물의 세포결합능은 적을 것으로 예측되었으며, HT29, B16, CT26, P388 세포주를 사용한 세포결합능실험에서 측정방사능 cpm이 자연방사능에 가까운 수치를 보여 표지화합물의 수용성으로 인해 세포의 유기질막을 통과하지 못함으로써 세포결합능이 낮아진 것으로 사료된다.

In vitro에서 방사성표지화합물의 혈청단백질과의 결합능실험은 단백질을 침전시키는 방법으로 trichloroacetic acid, ammonium sulfate, uranylacetate, alcohol, perchloric acid를 사용하는 침전법과 젤여과 방법등이 알려져 있으며 각 방법들은 같은 시료에 대해서도 결과의 차이가 심하다³⁸⁾. 따라서 동일한 조건과 방법을 사용하여 상대적인 비교만이 가능하다. 본 연구에서는 30% trichloroacetic acid(TCA)방법으로 혈청단백질과의 결합능을 결정하였고, 약 30% 정도의 결합능을 보였다. 혈청단백질이나 적혈구와의 결합이 작을수록 노배설이 빠르고 골 집적율이 증가한다³⁹⁾고 알려져 있다. 체내에서 taxol-DTPA-¹¹¹In이 투여될 경우 약 1/3 만이 혈청단백질과 결합하여 거동하고 나머지는 유리상태로 거동할 것임을 예측해 볼 수 있다.

요 약

본 연구에서는 항암제인 taxol의 ¹¹¹In 방사성표지화합물을 합성하여 암진단제로서의 이용 가능성을 보기 위한 기초 연구를 수행하였다. Taxol의 ¹¹¹In 표지화합물을 얻기 위해 taxol구조에서 C-13의 곁가지에 있는 C-2' 부분의 hydroxyl기를 DTPA anhydride 및 succinic anhydride와 반응시켜 taxol-DTPA와 2'-hemisuccinyltaxol을 합성하였다. 반응수율은 taxol-

DTPA 접합체의 경우 34%이었으며, 2'-hemisuccinyltaxol은 80%이었다. MTT법을 사용하여 HT29, B16, P388, CT26 세포주에서 taxol-DTPA와 2'-hemisuccinyltaxol의 세포독성능실험에서는 taxol 보다는 못미치나 그 세포독성이 유지됨을 확인하였다. 합성된 taxol 유도체들을 리간드 교환법과 직접법을 사용하여 In-111을 표지하였다. Taxol-DTPA 접합체의 In-111 표지반응의 경우, 리간드교환법은 반응도중 침전이 생겨 반응이 어려워 직접법으로 In-111 표지화합물을 얻을 수 있었으며 그 표지수율은 100%이었다. 2'-hemisuccinyltaxol은 두 방법을 모두 시도하였으나 반응이 진행되지 않음을 확인하였다. In-111의 taxol-DTPA 접합체 및 2'-hemisuccinyltaxol에 대한 표지반응 수율은 HPLC, paper, instant thin-layer chromatography를 실시하여 결정하였다. Lipophilicity의 실험에서는 친수성임이 확인되었으며, 세포결합능의 실험에서는 HT29, B16, P388, CT26 세포주와의 결합이 매우 낮음을 나타내었다. 혈청단백질과의 결합능을 보기위하여 30% trichloroacetic acid 법을 수행하였으며, 약 30%정도만이 혈청단백질과 결합하여 그 값이 크지 않았다.

REFERENCES

- 1) Wani MC, Taylor HL, Wall ME: *Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemia and antitumor agent from taxus brevifolia.* *J Am Chem* 1971;93(3):2325-2327
- 2) Schiff PB, Fant J, Horwitz SB: *Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol.* *Nature* 1979;277(22):665-667
- 3) Caploro M, Shanks J, Ruhlen R: *How to taxol modulates microtubule disassembly.* *J Biol Chem* 1994;269(38):23399-23402
- 4) Schiff PB, Horwitz SB: *Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells.* *Pro Natl Acad Sci USA* 1980;77(3):1561-1565
- 5) Mafredi JJ, Parness J, Horwitz SB: *Taxol binds to cellular microtubules.* *J cell biol* 1982;94:688-696
- 6) Holmes FA, Walters RS, Theriault RL, Forman AD, Newton LK, Raber MN, Buzdar AU, Frye DK, Hortobagyi GN: *Phase II trial of taxol, and active drug in the treatment of metastatic breast*

- cancer. J Natl Cancer Inst* 1991;83:1797-1805
- 7) Hruban RH, Yardley JH, Donehower RC, Boitnott JK: *Taxol toxicity: Epithelial necrosis in the gastrointestinal tract associated with polymerized microtubule accumulation and mitotic arrest. Cancer* 1989;63:1944-1950
 - 8) McGuire WP, Rowinsky EK, Rosenshein NB, Grumbine FC, Ettinger DS, Armstrong DK, Donehower RC: *Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. Ann Intern Med* 1989;111:273-279
 - 9) Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC: *Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. J Natl Cancer Inst* 1990;82:1247-1259
 - 10) Trimble EL, Adams JD, Vena D, Hawkins MJ, Friedman MA, Fisherman JS, Christian MC, Cannaletta R, Onetto N, Hayn R, Arbusk SG: *Paclitaxel for platinum-refractory ovarian cancer: results from the first 1,000 patients registered to National Cancer Institute referral center 9103. J Clin Oncol* 1993;11:2405-2410
 - 11) Chang AY, Kim K, Glick J, Anderson T, Karp D, Johnson D: *Phase II study of taxol, merbarone, and piroxantrone in stage IV non-small-cell lung cancer: the Eastern Cooperative Oncology Group results. J Natl Cancer Inst* 1993;85:388-394
 - 12) Ettinger DS: *Taxol in the treatment of lung cancer. Monogr Natl Cancer Inst* 1993;15:177-179
 - 13) Forastiere AA, Neuberg D, Taylor SG, Deconti R, Adam G: *Phase II evaluation of taxol in advanced head and neck cancer and Eastern Cooperative Oncology Group trial. Monogr Natl Cancer Inst* 1993;15:181-184
 - 14) Grem JL, Tutsch KD, Simon KD, Alberti DB, Willson JKV, Tormey DC, Swaminathan S, Trump D: *Phase I study of taxol administered as a short I.V. infusion daily for 5 days. Cancer treatment Reports* 1987;71:1179-1184
 - 15) Greco FA, Hainsworth JD: *Paclitaxel(Taxol): Phase I/II trial comparing 1-hour infusion schedules. Semin Oncology* 1994;21(5):Suppl 8:3-8, 1994
 - 16) Johnson DH: *Phase III trial(E5592) comparing cisplatin plus etoposide with cisplatin plus paclitaxel at two dose levels for treatment of advanced non-small-cell lung cancer. Eastern cooperative oncology group. J Natl Cancer Inst Monogr* 1995;19:61-63, 1995
 - 17) Marin V: *Overview of paclitaxel(Taxol). Seminars in Oncology Nursing* 1993;9(4):2-5, 1993
 - 18) Bookman MA, Ozols RF: *Future directions for paclitaxel(Taxol) in the treatment of ovarian cancer. Seminars in Oncology Nursing* 1993;9(4):21-22
 - 19) Lesser GJ, Grossman SA, Eller S, Rowinsky EK: *The distribution of systemically administered [³H]-paclitaxel in rats: a quantitative autoradiographic study. Cancer Chemother Pharmacol* 1995;37:173-178
 - 20) Jamis-Dow CA, Klecker RW, Katki AG, Collins JM: *Metabolism of taxol by human and rat liver in vitro: A screen for drug interactions and interspecies differences. Cancer Chemother Pharmacol* 1995;36:107-114
 - 21) Thakur ML: *Gallium-67 and Indium-111 Radiopharmaceuticals. International J Applied Radio Isotopes* 1977;28:183-201
 - 22) Mathew AE, Mejillano MR, Nath JP, Himes RH, Stella VJ: *Synthesis and evaluation of some water-soluble prodrugs and derivatives of taxol with antitumor activity. J Med Chem* 1992;35:145-151
 - 23) Mellado W, Magri NF, Kingstone DG, Arenas RG, Orr GA, Horwitz SB: *Preparation and biological activity of taxol acetates. Biochem Biophys Res Commun* 1984;124(2):329-336
 - 24) Deutsch HM, Hernandez GM, Narayanan VL, Suffness M, Zalkow LH: *Synthesis of congeners and prodrugs 3 water-soluble prodrugs of taxol with potent antitumor activity. J Med Chem* 1989;32:788-792
 - 25) Nicolaou KC, Riemer C, Kerr MA, Rideout D, Wrasidlo W: *Design, synthesis and biological activity of protaxol. Nature* 1993;364:464-466
 - 26) McKay DB: *Structure-activity study on the actions of taxol and related taxanes on primary cultures of adrenal medullary cells. J Pharmacology & Experimental Therapeutics* 1988;248(3):1302-1307
 - 27) Voegelien FG, Guenald D, Lavelle F, Goff MT, Mangatal, Potier P: *Relationships between the structure of taxol analogues and their antimetabolic activity. J Med Chem* 1991;32(3):992-998
 - 28) Grover S, Rimoldi JM, Molinero AA, Chaudhary AG, Kingstone DG, Hamel E: *Differential Effects of Paclitaxel analogs Modified at Positions C-2, C-7, and C-3' on Tubulin Polymerization and Polymer Stabilization: Identification of a Hyperactive Paclitaxel Derivative. Biochemistry* 1995;34:3927-3934

- 29) Swidell S, Krauss NE, Horwitz SB, Ringel I: *Biologically active Taxol analogues with deleted A-ring side chain substituents and variable C-2' configuraton. J Med Chem* 1991;34:1176-1184
- 30) Leu JG, Chen BX, Schiff PB, Erlanger BF: *Characterization of Polyclonal and Monoclonal Anti-taxol Antibodies and Measurement of Taxol in Serum. Cancer Res* 1993;59:1388-1391
- 31) Kanto T, Wada K, Kawashima M, Sato Y, Yamauchi M: *High-sensitivity antitumor drug sensitivity testing. Oncology* 1994;51(6):535-539
- 32) Riddle RJ, Clothier RH, Balls M: *An evaluation of three in vitro cytotoxicity assays. Food Chem Toxicol* 1986;24(6-7):469-471
- 33) Gerlier D, Thomasset N: *Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. J Immunol Methods* 1986;94:57-63
- 34) Hussain RF, Nouri AM, Oliver RT: *A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. J Immunol Methods* 1993;160:89-96
- 35) Weidmann E, Brieger J, Jahn B, Bergmann L, Mitrou PS: *Lactate dehydrogenase-release assay a reliable, nonradioactive technique for analysis of cytotoxic lymphocyte-mediated lytic acticity against blasts from acute myelocytic leukmia. Ann Hematol* 1995;70:153-158, 1995
- 36) Loberg MD, Corder AT, Fields et al: *Transport of Tc-99m complexes through the blood-brain barrier, In Sorenson JA(Coordinator); Radiopharmaceuticals II, proceeding of the 2nd International Symposium, New York, Soc. Nucl Med* 1979;449
- 37) Imre J: *Chromatographic and biologic comparison of ^{99m}Tc-DMSA prepared by direct labelling and ligand exchange reaction. J Radional Nucl Chem Lett* 1984;87:301-305
- 38) Saha GB, Boyd CM: *A study of protein binding of ^{99m}Tc-MDP in plasma. Int J Nucl Med Biol* 1979;6:201-206
- 39) Weidmann E, Brieger J, Jahn B, Bergmann L, Mitrou PS: *Lactate dehydrogenase-release assay a reliable, nonradioactive technique for analysis*