

## 프로제스테론의 면역원 합성에 관한 물리화학적 연구

박 전 홍 · 권 중 국\*

한국과학기술원 · 서울대학교 수의과대학\*

(1986. 7. 29 接受)

### Physicochemical Study on the Synthesis of Progesterone Immunogen

Jun-hong Park and Jong-kuk Kwun\*

Korea Advanced Institute of Science and Technology

College of Veterinary Medicine, Seoul National University\*

(Received July 29th, 1986)

**Abstract:** Progesterone immunogen has been synthesized and its melting point, Rf-value, UV and IR spectrum have been measured to develop the essential step in antisera production against low molecular weight substance. Mixed anhydride reaction was used to conjugate  $11\alpha$ -hydroxyprogesterone with succinic anhydride. Melting point of one intermediate compound was  $156^{\circ}\text{C}$ , and Rf-value was 0.41 in benzene : acetone : methanol (5 : 5 : 2). Maximum absorbance was measured at 242nm and  $\epsilon$  was  $1.641 \times 10^4 \text{cm}^2/\text{mole}$ . Loss of hydroxy group was observed at 3450nm, and carbonyl group was appeared at 1160nm, 1250nm and 2960nm. These results indicated that the intermediate compound was progesterone hemisuccinate. Maximum absorbance of progesterone bovine-serum albumin(BSA) conjugate was observed at 250nm. Molar ratio of progesterone to BSA was average 15.4 on UV spectrum.

### 서 론

면역반응을 일으키는 가장 작은 물질은 바소프레신(분자량 1080)으로 알려졌다. 스테로이드와 같이 분자량이 500 이하인 것은 단독으로는 항체를 생산할 수 없으나 알부민 등을 결합시킴으로써 스테로이드에 대한 항체를 얻을 수 있다(Erlanger 등, 1959). 이는 Landsteiner의 hapten설을 실험적으로 입증한 것으로 스테로이드에 대한 항체를 방사면역분석법에 이용하게 되었다(Abraham, 1969).

스테로이드에 대한 항체생산에는 스테로이드의 결합 위치, 단백질의 종류, 화학축매의 종류와 길이, 스테로이드와 단백질의 몰비, 면역방법과 기간의 차이가 영향을 주고 있다(Naegle과 Drahovsky, 1980). 대부분의 스테로이드는  $\text{C}_3$ 과  $\text{C}_{17}$  위치에 관능기를 갖지만 프로제스테론의 경우  $\text{C}_{11}$  위치에 단백질을 결합시킬 때 항

체생산능력이 좋아진다(Bauminger 등, 1973, Niswender, 1973). 스테로이드와 단백질의 결합이 항체생산에 미치는 영향은 Kohen 등(1975)과 Kellie 등(1975)이 보고하였으며,  $\text{C}_{11}$  위치의 수산기를 mixed anhydride 반응에 의해 헤미숙신산염으로 변형시킨 후 알부민과 결합시키는 반응이 일반적으로 이용되지만 스테로이드와 단백질의 몰비는 실험조건에 따라 변한다(Midgley와 Niswender, 1970).

본 실험은 저분자량 물질의 면역원화에 따르는 기본 기술을 정립하고자 프로제스테론의 면역원합성과 중간산물의 물리화학적 특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

Mixed anhydride반응(Fig. 1)에 따라 succinic anhydride와  $11\alpha$ -hydroxyprogesterone을 5시간 환류시킨 후 실온에서 식혔다. 그 후 진공건조장치를 이용해 건조시

키고 암갈색 잔유물을 ethyl acetate에 녹인 다음 증류수로 3회 불순물을 제거한 후 5%가성소다액으로 용출시켰다. 다시 ethyl acetate로 2회 불순물을 제거한 후 염산으로 pH 2가 되도록 점적하였다. 백색현탁액을 여과한 다음 벤젠:헥산(1:1)으로 재결정하여 화합물 I 을 얻어 분석에 사용하였다.

화합물 I 을 dimethylformamide에 녹이고 ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide(ECDI)를 증류수에 녹여 20분간 기다린 후 인산완충액(pH 7.8)에 녹인 bovine serum albumin(BSA)와 혼합하여 4°C에서 3일간 저었다. 백색침전물을 증조수(pH 8)에서 또 증류수에서 투석하여 화합물 II 를 얻어 분석에 사용하였다.

메탄올에 녹인 화합물 I 을 벤젠:아세톤:메탄올(5:5:2)을 전개용매로 사용하여 Kieselgel F<sub>254</sub> 박층판(Merck)에서 Rf값을 구하고, 분광광도분석기(Varian Model 634)를 사용하여 200~280nm에서 자외선스펙트럼을 얻었다. 브롬화칼륨 펠트로 적외선분광광도분석기(Perkin Elmer Model 735B)를 사용하여 400~4000nm에서 적외선스펙트럼을 얻었다. 용점은 모세관을 이용한 용점측정기(Thomas Arthus)를 사용하여 측정하였다.

## 결 과

재결정으로 얻은 화합물 I 의 용점은 156°C이며 Rf 값은 벤젠:아세톤:메탄올(5:5:2)을 전개용매로 사용하는 경우 0.43이었다. 자외선스펙트럼에서 242nm에서 최대흡광도를 나타내었으며  $\epsilon$ 는  $1.641 \times 10^4 \text{cm}^2/\text{mole}$ 이었다(Fig. 2). 적외선 스펙트럼에서 수산기가

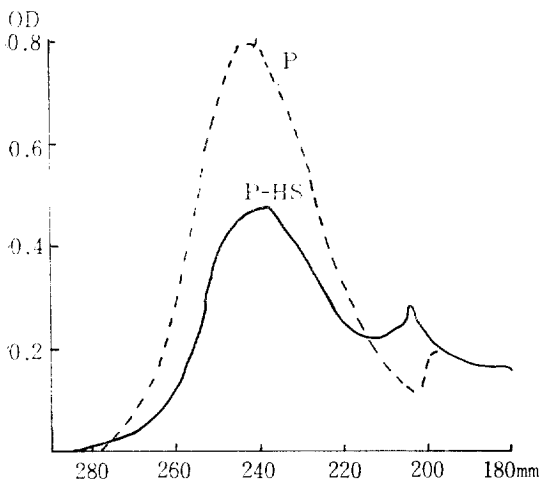


Fig. 2. Ultraviolet spectrum of progesterone hemisuccinate(P-HS). P: 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone.

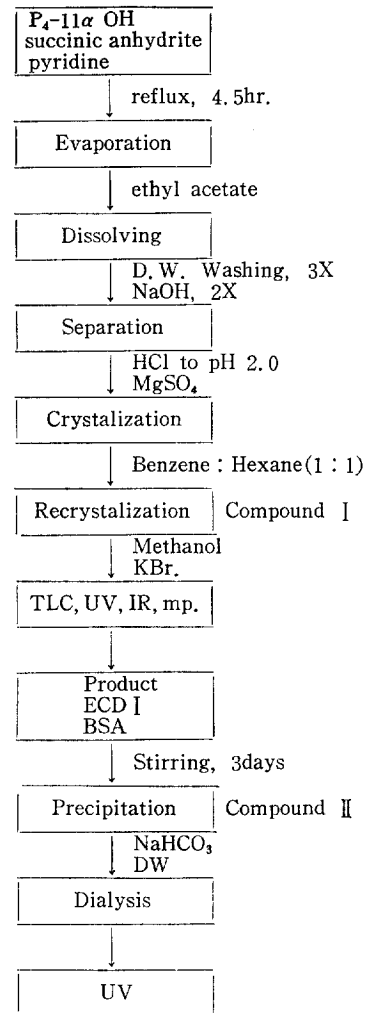


Fig. 1. Diagram of progesterone immunogen synthesis.

감소되어 혼적만 있는(345nm) 반면에 카르보닐기의 특이한(1160nm, 1250nm, 2960nm) 흡광도를 나타내었다(Fig. 3).

화합물 II 와 BSA를 비교하여 프로제스테론과 알부민의 몰비가 평균 15.4였으며 250nm에서 프로제스테론 면역원의 최대흡광도를 나타내었다(Fig. 4).

한편 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone의 용점은 165~166°C였고 Rf값은 0.62였다. 자외선 스펙트럼 최대흡광도는 242nm였다.

## 고 찰

프로제스테론에 단백질을 결합시킬 수 있는 위치는 C<sub>1</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>20</sub>, C<sub>21</sub>이며(Kohen 등, 1975), 이 중 C<sub>11</sub>위치에 단백질을 결합시킬 때 프로제스테론에 대한

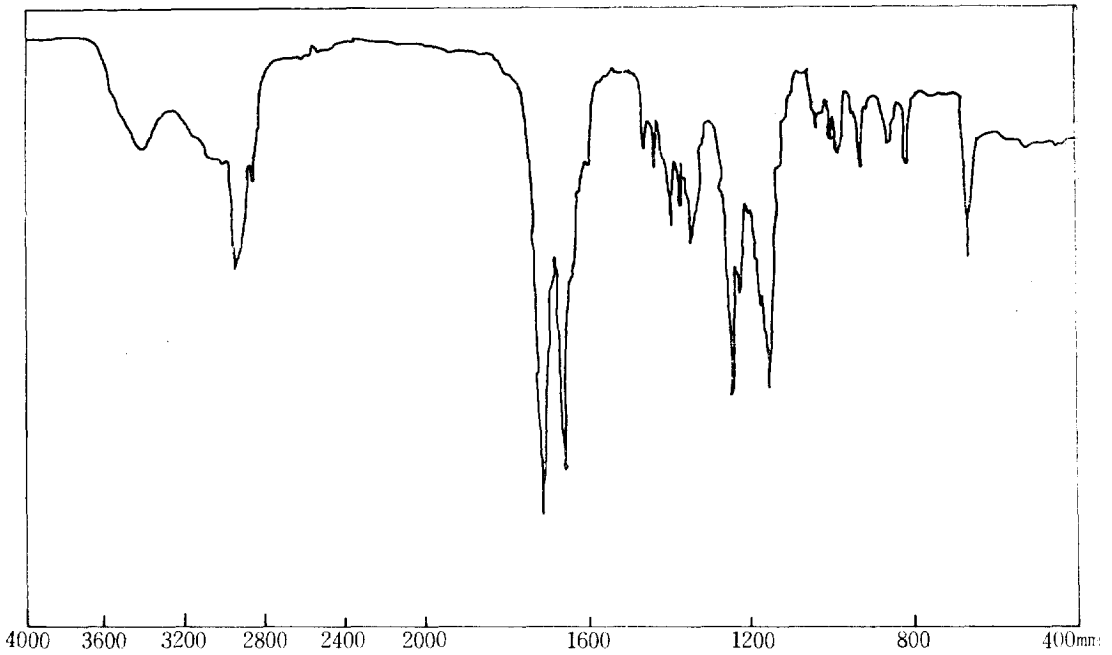


Fig. 3. Infrared spectrum of progesterone hemisuccinate.

특이 항체를 얻을 수 있다(Niswender, 1973). 이 C<sub>11</sub> 위치에 수산기를 결합시키는 것은 미생물을 이용하거나 화학반응으로 할 수 있으나 본 실험에서 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone으로 반응시켰다.

본 실험결과 화합물 I의 융점은 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone의 융점 165~166°C보다 낮은 156°C로 이는 Erlanger 등(1959)의 결과와 일치하나 Kohen 등(1975)의 152~153°C보다는 높은 값이었다. 이런 차이는 재결정을 통한 불순물의 제거에 기인한 것으로 사료된다.

화합물 I의 Rf값은 0.43이고 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone은 0.62였다. 이는 Erlanger 등(1959)의 Rf값과 일치하는 수치이나 화합물 I에서만 관찰되는 유선형은 카르보닐기 때문으로 사료된다.

자외선스펙트럼에서 최대흡광도는 화합물 I와 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone이 모두 242nm에서 관찰되었다. 이는 화합물 I의 작용기의 길이가 변화 없음을 나타낸 것으로 사료된다. 적외선스펙트럼에서 화합물 I은 1160nm, 1250nm, 2960nm에서 높은 흡광도를 나타낸 반면에 3450nm에서 낮은 흡광도를 나타내었다. 이는 C<sub>11</sub> 위치의 수산기가 카르보닐기로 치환된 것을 나타낸 것으로 사료된다. 이상의 결과로 미루어 화합물 I은 프로제스테론 헤미숙시네이트로 간주된다.

프로제스테론을 단백질과 결합시키는 과정에서 유기

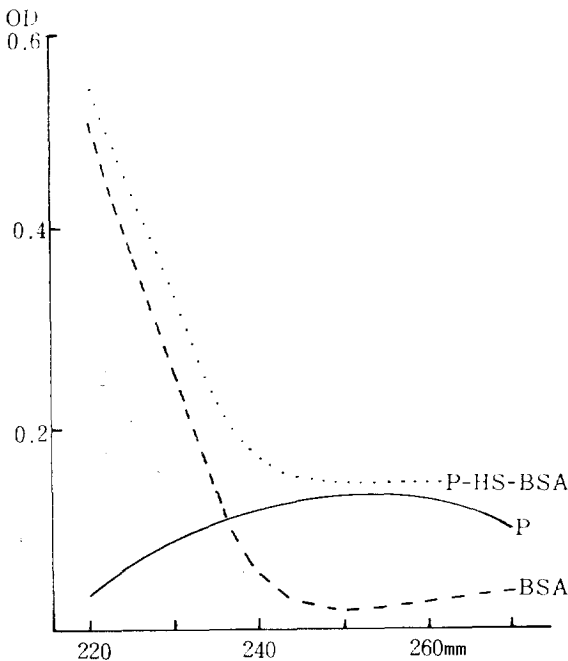


Fig. 4. Ultraviolet spectrum of progesterone-BSA conjugate (P-HS-BSA).

용매에 녹아있는 프로제스테론의 카르복실기의 불용성은 mixed anhydride 반응을 어렵게하므로 아세트산수용액에 1, 2-dihydro-2-ethoxyquinoline-1-carboxylate를 넣어 프로제스테론과 알부민을 결합시키는 것이 좋다고 보고된 바 있다(Corrie, 1983).

본 실험에서는 인산완충액(pH 7.8)을 사용하여 프로제스테론과 알부민과의 결합시킨 바 물비는 최저 4.4에서 22.9였다. 이는 면역원으로서 물비가 최저 15에서 20이상인 것이 바람직하다고(Corrie, 1983)한 점이나, Lindner 등(1972)의 물비 28에 비하여 낮은 값이나 물비의 차이는 프로제스테론과 단백질을 혼합시키는 순서와 수용액의 산도에 의해서 영향을 받는다는 점에 비추어 이들에 의한 결과로 생각된다.

## 결 론

프로제스테론의 면역원합성과 중간산물의 물리화학적 특성을 규명코자 succinic anhydride와 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone을 mixed anhydride 반응으로 체결정한 바 화합물 I의 Rf값은 0.43, 최대흡광도 242nm였으며, 1160nm, 1250nm, 2960nm에서 카르보닐기의 특이한 흡광도가 관찰되었으며, 프로제스테론과 BSA를 공유 결합시킨 결과 물질함비는 평균 15.4였다.

**謝辭**: 본 연구를 수행하는데 있어서 여러가지로 도와주신 한국과학기술원 김정일 박사님, 이재용씨, 건국대학교 김종배 박사님, 단국대학교 김춘수 박사님께 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Abraham, G.E. (1969) Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 $\beta$ . *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 29:866~870.
- Bauminger, S., Lindner, H.R. and Weinstein, A. (1973) Properties of antisera to progesterone and to 17-hydroxyprogesterone elicited by immunization with the steroids attached to protein through position 7. *Steroids*, 21:847~856.
- Corrie, J.E.T. (1983) Production of anti-hapten sera in rabbits. In: Hunter, W.M. and Corrie, J.E.T. (eds). *Immunoassay for clinical chemistry*. 2ed. Churchill Livingstone Inc., Edinburgh, pp.469~472.
- Erlanger, B.F., Borek, F., Beiser, S.M. and Lieberman, S. (1959) Steroid-protein conjugates. Preparation and characterisation of bovine serum albumin with progesterone, deoxycorticosterone and estrone. *J. Biol. Chem.*, 234:1090~1094.
- Kellie, A.E., Lichman, K.V. and Samarajeewa, P. (1975) Chemistry of steroid-protein conjugate formation. In: Cameron, E.H.D., Hillier, S.G., Griffiths, K. (eds) *Steroid immunoassay*. Alpha Omega Publishing Ltd., Cardiff. pp.33~60.
- Kohen, F., Bauminger, S. and Lindner, H.R. (1975) Chemistry of steroid-protein conjugate formation. In: Cameron, E.H.D., Hillier, S.G., Griffiths, K. (eds) *Steroid immunoassay*. Alpha Omega Publishing Ltd., Cardiff. pp.33~60.
- Lindner, H.R., Perel, E., Friedlander, A. and Zeitlin, A. (1972) Specificity of antibodies to ovarian hormones in relation to the site of attachment of the steroid hapten to the peptide carrier. *Steroids*, 19:357~375.
- Midgley, A.R. and Niswender, G.D. (1970) Steroid assay by protein binding. *Acta Endocrin. Kbh.*, 14:320.
- Naegle, W. and Drahovsky, M. (1980) Radioimmunoassay of steroid hormones. 2ed, Springer-Verlag. Berlin. pp.55~72.
- Niswender, G.D. (1973) Influence of the site of conjugation on the specificity of antibodies to progesterone. *Steroids*, 22:413~424.