

Taxol 방사면역측정을 위한 ¹²⁵I-Iodotyraminehemisuccinyltaxol (¹²⁵ITHT)의 제조

연세대학교 보건과학대학 임상병리학과¹, 원자력병원 싸이클로트론응용연구실².

이태섭^{1,2}, 오옥두¹, 최태현¹, 김현석¹, 홍준표¹, 이은숙¹, 최창운³, 임상무³.

Preparation of ¹²⁵I-Iodotyraminehemisuccinyltaxol (¹²⁵ITHT) for Competitive Taxol Radioimmunoassay

Tae Sup Lee,^{1,2} M.S., Ok Doo Awh¹ Ph.D, Tae Hyun Choi¹ M.S., Hyun Suk Kim¹ B.S., Jun Pyo Hong¹ B.S., Eun Sook Lee¹ B.S., Chang Woon Choi² M.D. & Ph.D., Sang Moo Lim² M.D.& Ph.D.

Department of Medical Laboratory Science, College of Health Science, Yonsei University¹, Wonju, Korea; Laboratory of Cyclotron Application, Korea Cancer Center Hospital², Seoul, Korea

Purpose : Taxol(Paclitaxel), an antineoplastic agent, has been used in the treatment of ovarian and breast cancers. The determination of optimal Taxol concentrations in human serum was required for enhancing therapeutic effect and maintaining the appropriate Taxol level in blood. This study was aimed to synthesize radiolabeled Taxol derivatives as radiotracer in competitive radioimmunoassay for monitoring Taxol concentrations in blood and to determine the usefulness of its derivatives. **Materials and Methods** : Hemisuccinyltaxol(HT) was synthesized by esterification of Taxol with succinic anhydride. Tyraminehemisuccinyltaxol (THT) was synthesized by coupling of HT with tyramine using isobutylchloroformate as coupling agent and purified by HPLC. By using chloramine-T(5.25 mg/ml, 10 μℓ) as oxidant agent, THT(4 mg/ml, 30 μℓ) was labeled with ¹²⁵I (37 MBq, 1 mCi). To estimate the stability of purified THT, ¹²⁵I-iodotyraminehemisuccinyltaxol (¹²⁵ITHT) was dissolved in 80% acetonitrile aqueous solution; and the solution was incubated at 4°C and 37°C for 7 days. At various time intervals, the stability of THT and ¹²⁵ITHT was monitored. The titer of Taxol monoclonal antibody, 3G5A7, was determined by competitive radioimmunoassay using ¹²⁵ITHT as a labeled antigen. A standard dose-response curve was demonstrated by Taxol competitive radioimmunoassay. **Results** : HT and THT were synthesized with 79.9% and 19.5% yield, respectively. The labeling yield of ¹²⁵ITHT was 93%. After 7 days, the chemical purity of THT was 96.5% at 4°C, and 97.5% at 37°C. After 3 days, ¹²⁵ITHT was stable with 94.7% at 4°C and 93.4% at 37°C. After 7 days, radiochemical purity was diminished to 88.1% at 4°C and 86.1% at 37°C. The titer of Taxol monoclonal antibody, 3G5A7, was determined to 1:256. A standard dose-response curve demonstrated good collinearity (R²=0.971) as Taxol concentration-dependent manner. **Conclusion** : Competitive radioimmunoassay using ¹²⁵I-iodotyraminehemisuccinyltaxol as radiotracer could be used to monitor for concentration of Taxol in the human serum.

(Korean J Nucl Med 2002;36:121-132)

key words : Radioimmunoassay, ¹²⁵I-iodotyraminehemisuccinyltaxol(¹²⁵ITHT), Taxol, Iodine-125

Received Dec. 13, 2001; accepted Mar. 27, 2002

Corresponding Author: Ok Doo Awh, Ph.D.

Department of Medical Laboratory Science, College of Health Science, Yonsei University, 234 Maeji-ri

Heungup-Myun Wonju, 220-710, Korea.

Tel : 033-760-2425, Fax : 033-760-2195

E-mail : immunoch@dragon.yonsei.ac.kr

※ 본 연구는 과학기술부 원자력 연구개발 중·장기 계획 사업의 RI 이용 진료기술개발과제의 연구비 보조로 이루어졌음.

서 론

Taxol(Fig.1)은 주목과 나무인 *Taxus brevifolia*의 껍질에서 추출된 천연물질로 diterpenoid 구조를 가진 항암제¹⁾로서, 세포내 미세소관에 결합하여 미세소관이 tubulin dimer로 해리되는 것을 막고 세포가 분열할 때 metaphase에서 anaphase로의 진행을 막아 세포분열을 억제함으로써 항암효과를 나타낸다²⁾. 미세소관에 영향을 미치는 기존의 vinca alkaloid 등 1) 약물과는 달리 tubulin이 polymer를 형성한 후 미세소관을 안정화시킴으로서 세포분열주기상 G2/M 시기에서의 세포분열을 막아 암세포의 증식을 억제한다³⁾. taxol이 농도에 따라서 미세소관의 구조에 주는 영향은 조금씩 차이가 있으나⁴⁾, 세포내 미세소관의 생리적 특성인 역동성을 낮춤으로써 해서 세포분열을 억제하는 기전으로 항암효과를 보이는 것으로 밝혀졌다⁵⁾.

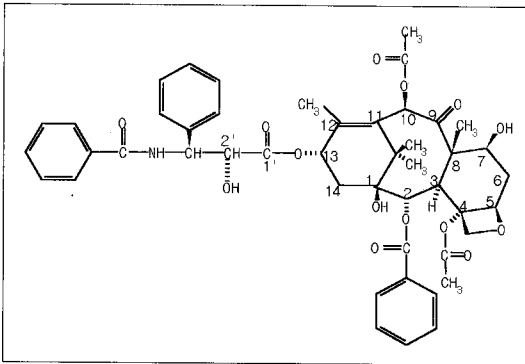


Fig. 1. The chemical structure of paclitaxel (Taxol[®]).

Taxol은 천연추출물로서 수요에 비해서 공급이 부족하므로 taxol을 전합성(total synthesis)하려는 연구와 더불어 물에 대한 용해도가 4 µg/ml 정도로 매우 낮아 용해도가 높은 taxol 유도체를 합성하려는 연구가 시도되고 있다⁶⁻⁷⁾. 현재까지 taxol을 실험실에서 합성하기도 하고 기본구조인 diterpene 형태의 유사물질인 baccatin III로부터 taxol을 합성하는 방법과 *Taxus*종의 식물세포 배양을 통한 방법, 그리고 *T.brevifolia*에서 자라는 *Taxomyces andreanae* 곰팡이의 배양액으로 부터도 taxol을 얻고 있다⁸⁻⁹⁾.

Taxol은 체내의 세포분화과정에서 DNA 합성에

영향을 주는 다른 약물과는 달리 DNA, RNA, 단백질등의 합성에 영향을 미치지 않으므로 타 항암제에 내성이 생긴 환자에서도 탁월한 항암효과를 기대할 수 있으며, 방사선 치료시 radiosensitizer로도 작용하므로 병행치료시 효과가 있는 것으로 보고되었다¹⁰⁾.

Taxol은 임상 phase I, phase II 실험을 거쳐서 현재까지 phase III 실험이 진행중이며, 1992년 12월 미국 식품의약국 (FDA)은 taxol이 난소암과 유방암에서의 치료효과를 인정하여 다른 항암제 치료에 실패한 말기 난소암, 유방암 환자들에게 사용함을 승인하였다¹¹⁾. 생체내 투여된 taxol은 간에서 cytochrome P450 system에 의해 대사되며, 주로 간, 비장, 심장, 폐, 신장등에 분포하는 것이 taxol의 삼중수소 표지화합물의 동물실험을 통해 밝혀졌으며, 또한 폐암¹²⁾, 뇌종양¹³⁾등에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 항암제의 체내투여시 종양세포 특이성이 적음으로써 야기되는 부작용이 크므로, 이를 최소화하고 치료효과를 극대화하기 위해서는 혈중 약물농도를 정확하게 유지하는 것이 중요하다. taxol을 이용한 약물치료시에도 기존의 화학요법제와 같이 백혈구와 호중구의 감소, 간독성, 심장기능 저하, 소화관 손상, 탈모와 호흡곤란, 저혈압, 혈관부종등의 부작용이 나타나며¹⁴⁾, 최근에는 급성 뇌질환을 유발하는 것으로 보고되었다¹⁵⁾. 따라서 taxol을 이용한 항암 치료시에 유발되는 부작용을 줄이고 치료효과를 높이기 위해서는 약물의 혈중농도 모니터링이 필요하게 된다. 현재까지의 taxol에 대한 측정 방법들은 HPLC측정법이 주로 사용되어져 왔다. 그러나 HPLC법은 검체로부터 taxol을 추출하는 전처리 과정이 있고 추출과정에 따라서 측정감도가 달라지며¹⁶⁾, 검체처리 및 측정시간이 길고 동시에 대량의 시료를 처리할 수 없는 단점이 있다. 효소면역측정법은 동시에 많은 검체를 처리할 수 있으며 측정감도는 0.25~50 nM 정도의 범위를 측정할 수 있는 것으로 보고되었다¹⁷⁾. 그러나 뇌척수액과 같이 극히 저농도의 taxol은 측정할 수 없는 것으로 알려져 있다. 방사면역측정법은 1 nM의 taxol을 측정할 수 있는 것으로 보고되어서 다른 방법에 비해 측정감도가 높다¹⁸⁾. 최근에는 형광물질을 표지한 taxol을 이

용한 방법으로 2 nM 정도의 taxol 농도를 측정할 보고도 있다¹⁹⁾.

본 연구에서는 taxol에 경쟁적인 taxol의 방사성 유도체를 방사성추적자로 사용하기 위하여 taxol과 succinic anhydride를 반응하여 hemisuccinyltaxol을 제조하고, ¹²⁵I를 표지하기 위해서 hemisuccinyltaxol에 tyramine을 도입하여 새로운 taxol 유도체인 tyraminehemisuccinyltaxol을 합성하고자 하였으며, 이를 방사성요오드화하여 [¹²⁵I]iodotyramine hemisuccinyltaxol을 제조한 후, 경쟁적 방사면역측정법의 방사성표지항원으로 사용하여 taxol 농도에 따른 표준 투여응답곡선을 작성함으로써 taxol 농도 모니터링을 위한 방사성추적자로서의 유용성을 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1. Hemisuccinyltaxol의 합성

Taxol 23 mg (MW:853.9, 0.0269 mmol, 1 equiv.) 과 succinic anhydride 41.5 mg (MW: 0.4145 mmol, 15.5 equiv.)을 teflon coated magnetic stirrer와 함께 4 시간 감압 건조후 반응용기에 무수 pyridine 500 μ l를 가하여 stirring하면서 실온에서 18시간 동안 반응시켰다. 반응 종료 후 rotary evaporator로 pyridine을 제거하였으며, 반응 후 남아있는 succinic anhydride는 증류수를 가하여 녹여낸 후 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. Succinic anhydride 제거 후 감압 건조시킨 반응물에 1 ml의 acetone을 가해 완전히 녹인 후, 이어서 4 $^{\circ}$ C로 냉각된 증류수를 한 방울씩 가하면서 hemisuccinyl -taxol의 재결정 형성을 유도하였다. 결정이 생기기 시작할때, 4 $^{\circ}$ C에서 24 시간 방치한 뒤 이를 Whatman filter paper 5A로 여과하여 hemisuccinyltaxol을 얻어 감압건조하였다. 순도 확인은 HPLC (Verian사의 Dynamax SD-200 기종의 isocratic pump와 UV-1 detector)를 실시하였으며 80% acetonitrile 수용액을 이동상으로 분당 0.7 ml의 속도로 μ -Bondapak C18 column을 사용하여 흘러내리며, UV 검출기로 227 nm에서 크래마토그램을 얻었다. 합성한 hemisuccinyltaxol의 분자구조를 알아보기 위하여 taxol과 hemi -succinyltaxol 2

mg을 각각 DMSO-d₆ 1 ml에 녹여 ¹H-NMR spectroscopy (Bruker AMX-500 NMR spectrometer, 500 MHz)로 분석하였다.

2. Tyraminehemisuccinyltaxol의 합성 및 분리

Hemisuccinyltaxol 20.5 mg (0.022 mmol)을 teflon coated magnetic stirrer와 함께 반응용기에 넣고 4 시간 동안 감압건조시켰다. 건조된 hemisuccinyltaxol을 dimethylsulfoxide (DMSO) 500 μ l에 녹인후 acetonitrile 250 μ l, n-triethylamine 100 μ l를 넣고 4 $^{\circ}$ C로 냉각시킨 후, isobutylchlorformate 50 μ l를 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응하였다. 여기에 tyramine 3 mg을 미리 pH 9.5로 조정된 약알칼리수용액 3 ml에 녹여 만든 용액을 한 방울씩 가하고, 4 $^{\circ}$ C 냉암소에서 18 시간 동안 반응시켰다. 반응물에 4 $^{\circ}$ C로 미리 냉각된 증류수 1 ml를 가하고 4 $^{\circ}$ C에서 2,500 rpm으로 10 분간 원심 분리하였으며, 이를 5회 반복시행함으로써 tyraminehemisuccinyltaxol을 얻었다. 침전된 것을 감압건조시킨 후 이를 -20 $^{\circ}$ C로 보관하였다. 건조된 tyraminehemisuccinyltaxol반응물을 정제하기 위하여 HPLC를 실시하였다. HPLC로 정제하기 위하여 합성 반응물을 1 mg 씩 소분하여 각각을 acetonitrile 1 ml로 녹인 후 HPLC column에 주입하여 6.8~7.5 분대의 retention time을 갖는 분획을 취하였다. 정지상으로는 C18 μ -Bondapak column을 사용하였고, 이동상으로는 80% acetonitrile 수용액을 사용하였다. 이동상의 유속은 분당 0.7 ml로 하고 UV 흡광도 227 nm에서 측정하였다. 분취하여서 모은 tyraminehemisuccinyltaxol을 1 mg/ml의 농도로 만들어서 이중 20 μ l를 HPLC에 주사하여 그 순도를 확인하였다. 합성한 tyraminehemisuccinyltaxol의 분자구조를 알아보기 위하여 tyramine -hemisuccinyltaxol 2 mg을 DMSO-d₆ 1 ml에 녹여 ¹H-NMR spectroscopy로 분석하였다.

3. Tyraminehemisuccinyltaxol의 ¹²⁵I 표지

Tyraminehemisuccinyltaxol을 absolute methanol에 4 mg/ml이 되게 녹인 용액중 30 μ l(113.53 nmole)를

취해 반응관에 teflon coated stirrer와 함께 넣고, 10 mCi/100 μ l의 방사능 농도를 가진 Na^{125}I (100mCi/ml, Amersham Co, USA) 10 μ l 첨가한 후 30 초간 stirring하였다. Chloramine-T 10 μ l (230nmole, 5.25 mg/ml, 0.5 M phosphate buffer, pH 7.5)를 넣어서 70 초 동안 stirring 하여 방사성요오드화하고 sodium metabisulfite 10 μ l (276 nmole, 5.25 mg/ml, 0.5 M phosphate buffer, pH 7.5)를 넣어서 반응을 종료하였다. 반응물내에 존재하는 인산염을 제거하기 위해서 240 μ l의 absolute acetonitrile을 반응액에 첨가한 후에 실온에서 $\times 2,500$ rpm으로 10 분간 원심분리하여 상층액을 취함으로써 acetonitrile에 녹아 있는 ^{125}I -iodotyraminehemisuccinyltaxol을 얻었다. 이 용액중 20 μ l를 HPLC column에 주사하고 이동상을 80% acetonitrile 수용액으로 하여 분당 0.7 ml로 하고 각 분획은 5 drop/tube씩 받아서 이중 10 μ l를 취해 LSC (liquid scintillation counter)를 이용하여 방사능을 측정함으로써 방사크로마토그램을 얻었다. 그리고 방사화학적 순도를 확인하기 위하여 ^{125}I -iodotyraminehemisuccinyltaxol 분획중에서 20 μ l를 취하여 HPLC를 다시 실시하여 분획당 350 μ l/0.5 min씩 받아서 이중 100 μ l 취해서 LSC를 이용하여 방사능을 측정함으로써 방사크로마토그램을 얻어 방사화학적 순도를 결정하였다.

4. Tyraminehemisuccinyltaxol과 ^{125}I -iodotyraminehemisuccinyltaxol의 안정성 실험

Tyraminehemisuccinyltaxol을 1 mg/ml의 농도가 되도록 80% acetonitrile 수용액에 녹인 후, 0.5 ml씩 소분하여 각각을 4 $^{\circ}$ C와 37 $^{\circ}$ C로 보관하였다. 0.5 일, 1 일, 2 일, 3 일, 7 일 후 각각의 시료에서 20 μ l씩 취하여서 HPLC를 실시하여 그 순도를 확인하였다. 각 시간대별로 얻어진 tyraminehemisuccinyltaxol의 HPLC peak 면적을 최초 tyraminehemisuccinyltaxol의 peak 면적에 대한 비율로 계산하여 그 순도를 확인함으로써 tyraminehemisuccinyltaxol의 안정성을 결정하였다. ^{125}I -iodotyraminehemisuccinyltaxol을 80% acetonitrile 수용액에 일정농도가 되게 희석하고 이를 4 $^{\circ}$ C와 37 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 0.5 일, 1 일, 2 일, 3 일, 7 일등의 시간대별로 시료를 취해 HPLC를 실시

하였다. 분획당 350 μ l/0.5 분씩 받아서 이중 200 μ l를 취해 LSC로 각각의 방사능을 측정하였다. 각 시간별로 얻어진 ^{125}I -iodotyraminehemisuccinyltaxol의 peak 면적을 최초 ^{125}I -iodotyraminehemisuccinyltaxol의 peak 면적에 대한 비율로 계산하여, 그 방사화학적순도를 확인함으로써 ^{125}I -iodotyraminehemisuccinyltaxol의 안정성을 확인하였다.

5. ^{125}I -iodotyraminehemisuccinyltaxol을 이용하여 단클론항체의 역가 측정

^{125}I -iodotyraminehemisuccinyltaxol을 10% DMSO가 첨가된 RIA buffer (10 mM phosphate buffered saline, pH=7.4, 0.1% gelatin, 0.1% Tween 20, 0.1% sodium azide, 10% polyvinyl pyrrolidone)로 희석하여 100 μ l당 20,000 cpm이 되도록 희석하고 이를 eppendorf tube에 넣었다. 여기에 단클론 항체를 각각 1: 1, 1: 2, 1: 4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1,024이 되게 RIA buffer로 희석한 용액 100 μ l씩 넣고 잘 혼합한 후 37 $^{\circ}$ C에서 12 시간 동안 정온유지시켰다. 각 tube에 RIA buffer에 녹인 2% bovine γ -globulin (BGG)을 100 μ l씩 넣고 잘 혼합한 뒤에 RIA buffer에 녹인 20% polyethylene glycol (PEG) -MW6,000 수용액을 1 ml씩 가해 잘 섞고, 4 $^{\circ}$ C에서 20 분간 $\times 14,000$ rpm으로 원심분리하여 상층액과 침전층을 분리하였고, 이중 상층액을 취하여 액체설팅계수기(Wallac Co, RACKBETA Model 1209)에서 그 방사능을 측정하고 이를 전체 방사능에서 감하여 결합형의 방사능을 산정하였다. 추가적으로 taxol에 대한 항체를 첨가하지 않은 시험관의 침전층의 방사능을 측정하여 비특이적인 결합을 확인하였다.

6. ^{125}I -iodotyraminehemisuccinyltaxol을 이용하여 Taxol 농도에 따른 표준투여응답곡선 작성

위의 방법 5와 동일한 조건에서의 taxol 농도에 따른 경쟁적 억제를 통한 표준투여 응답곡선을 작성하기 위해서 ^{125}I -iodotyraminehemisuccinyltaxol을 10% DMSO가 첨가된 RIA buffer (10 mM phosphate buffered saline, pH=7.4, 0.1% gelatin, 0.1% Tween

20, 0.1% sodium azide, 10% polyvinyl pyrrolidone) 로 희석하여 100 μ l 당 20,000 cpm이 되도록 희석하여 eppendorf tube에 넣고, taxol을 1% DMSO가 첨가된 RIA buffer로 녹여서 100 μ l에 각각 0.0 M, 1.0 pM, 10 pM, 100 pM, 1.0 nM, 10 nM, 100 nM가 되게 하여 taxol 농도 증가에 따른 방사능을 측정하였다. 단 클론 항체는 1: 32 의 역가를 사용하여서 실험하였다. B (Bound form) / F (Free form)의 분리 방법으로는 20% PEG와 2% BGG를 이용한 침전법을 사용하였다. Taxol이 첨가되지 않은 tube의 결합형의 방사능을 B₀로 표시하고, taxol 첨가된 각각의 농도에서 측정된 결합형의 방사능을 B로 하여 B/B₀(%)를 종축으로 하고, 첨가된 taxol 농도를 횡축으로 하여 표준투어응답곡선을 작성하였다.

79.9%이었다. 이때 반응수율은 완전히 건조한 합성물을 미량 취하여 80% acetonitrile 수용액을 이동상으로 하여 HPLC를 실시하여 확인하였다. 이동상의 속도는 0.7 ml/min이었고, C18 μ -Bondapak column 으로 확인한 결과 합성된 hemisuccinyltaxol 은 2.72 분의 retention time을 보였고, 합성에 사용된 taxol은 동일한 조건에서 5.56 분의 retention time을 나타내었다. HPLC방법으로 확인된 합성된 hemisuccinyltaxol의 순도는 100% 이었으며 Fig. 2에 나타내었다. Hemisuccinyltaxol의 1H-NMR 분석으로 C2'-H의 peak가 4.59 ppm에서 5.55 ppm으로 이동하였음을 확인하여 succinic anhydride가 C-2'위치에서 반응이 일어남을 알 수가 있었다.

결 과

1. Hemisuccinyltaxol의 합성

Taxol 23 mg (0.0269 mmol)과 succinic anhydride 41.5 mg (0.4145 mmol)을 반응시켜 hemisuccinyltaxol 20.5mg (0.0215 mmol)을 얻어 반응수율은

2. Tyraminehemisuccinyltaxol의 합성 및 그 안정성

Hemisuccinyltaxol 20.5mg (0.0215 mmol)과 tyramine 3.0 mg (0.0218 mmol)을 반응시켜 tyraminehemisuccinyltaxol 4.5 mg (0.0041 mmol)을 얻어 반응수율은 19.5% 였다. HPLC를 이용하여

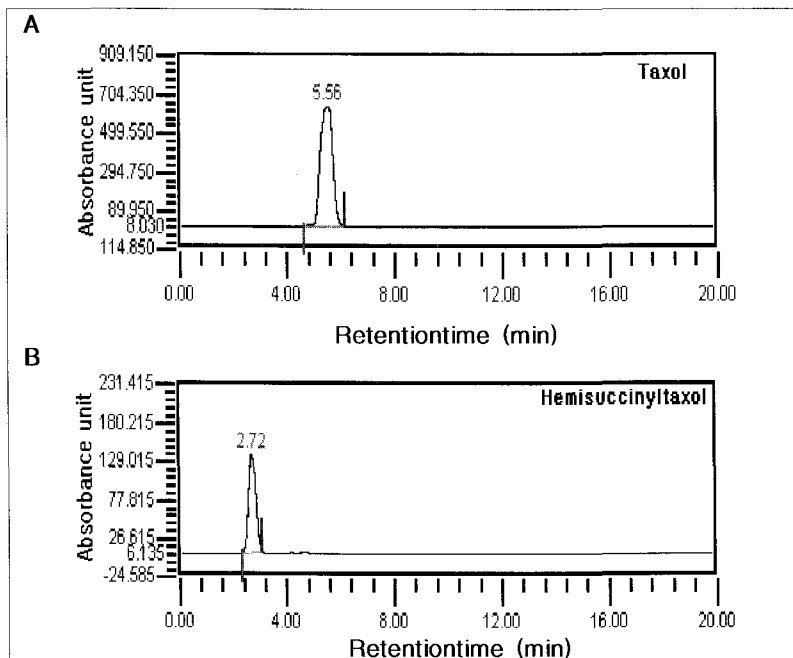


Fig. 2. HPLC chromatograms of taxol (A) and hemisuccinyltaxol (B).
 HPLC condition - mobile phase : acetonitrile / H₂O(4/1), flow rate : 0.7ml/min, column : μ -Bondapak C-18.
 Retention time of taxol 5.56 min and hemisuccinyltaxol was 2.72 min.

Table 1. Stability of Tyraminehemisuccinyltaxol(THT) in 80% Acetonitrile Aqueous Solution
Unit : Chemical purity(%), n=3※

Temp.	Elapsed Time (day)				
	0.5	1	2	3	7
4℃	100	100	99.2	97.8	96.5
37℃	99.9	99.9	99.3	98.9	97.5

※ Data were calculated by HPLC analysis using the following equation ;

$$\frac{\text{peak areas of THT in each elapsed time}}{\text{peak areas of THT in the zero time}} \times 100(\%)$$

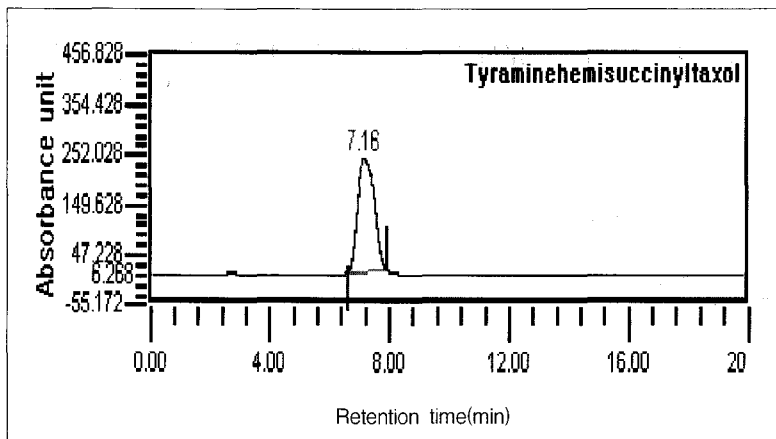


Fig. 3. HPLC chromatogram of tyraminehemisuccinyltaxol.

HPLC condition - mobile phase : acetonitrile / H₂O(4/1), flow rate : 0.7ml/min, column : μ-Bondapak C-18.

Retention time of tyraminehemisuccinyltaxol was 7.16 min.

결정한 정제된 tyraminehemisuccinyltaxol의 순도는 100%였다. 정제된 tyraminehemisuccinyltaxol의 retention time은 7.16 분이였으며 Fig. 3에 나타내었다. tyraminehemisuccinyltaxol의 1H-NMR분석을 통하여 tyramine의 aromatic ring이 있음을 확인하였다. tyraminehemisuccinyltaxol을 80% acetonitrile 수용액에 녹여 4℃와 37℃에 보관하면서 화학적순도를 결정함으로써 안정도를 알아본 결과는 Table 1과 같다. tyraminehemisuccinyltaxol은 4℃에서 0.5 일, 1 일, 2 일, 3 일, 7 일후 각각 100%, 100%, 99.2%, 97.8%, 96.5%의 순도가 유지되었고, 37℃에서는 99.9%, 99.9%, 99.3%, 98.9%, 97.5%의 순도가 유지되었다.

3. Tyraminehemisuccinyltaxol의 ¹²⁵I 표지 및 표지 화합물의 안정성

Chloramine-T를 이용하여 tyraminehemisuccinyltaxol에 ¹²⁵I를 표지하고 HPLC를 실시하여 각 분획들의 방사능을 액체섬광계수기로 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 액체섬광계수기로 측정한 ¹²⁵I-iodotyraminehemisuccinyltaxol의 ¹²⁵I 표지수율은 93%였다.

Taxol을 전구체로 하여 ¹²⁵I-iodotyramine hemisuccinyltaxol을 제조하는 전반적인 과정을 Fig. 5에 나타내었다. ¹²⁵I-iodotyraminehemisuccinyltaxol을 80% acetonitrile 수용액에 희석하여 각각을 4℃와 37℃에서 0.5 일, 1 일, 2 일, 3 일, 7 일 동안 방치 후, HPLC를 이

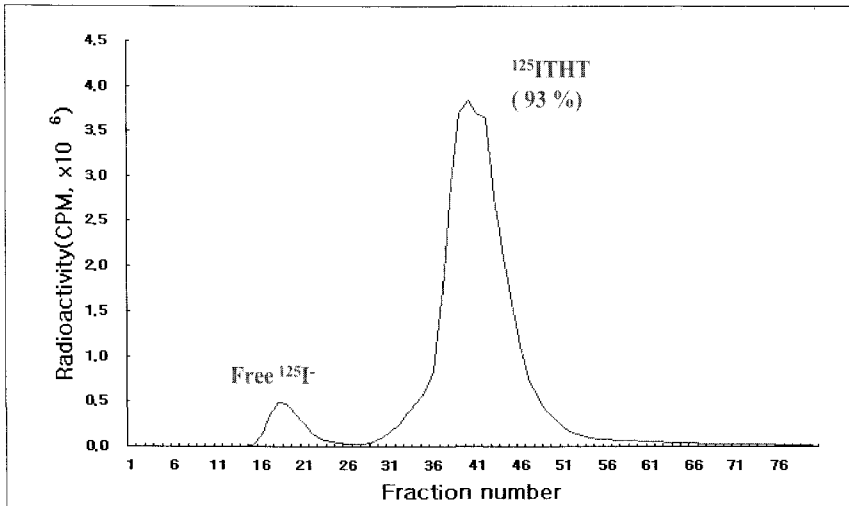


Fig. 4. HPLC radiochromatogram of ^{125}I iodotyraminehemisuccinyltaxol reaction mixture. HPLC condition - mobile phase : acetonitrile / H₂O(4/1), flow rate : 0.7 ml/min, elution rate : 5 drop/tube, column : μ -Bondapak C-18. Radiolabeling yield of [^{125}I]iodotyraminehemisuccinyltaxol was 93%. Radioactivity in each fractions was counted by liquid scintillation counter.

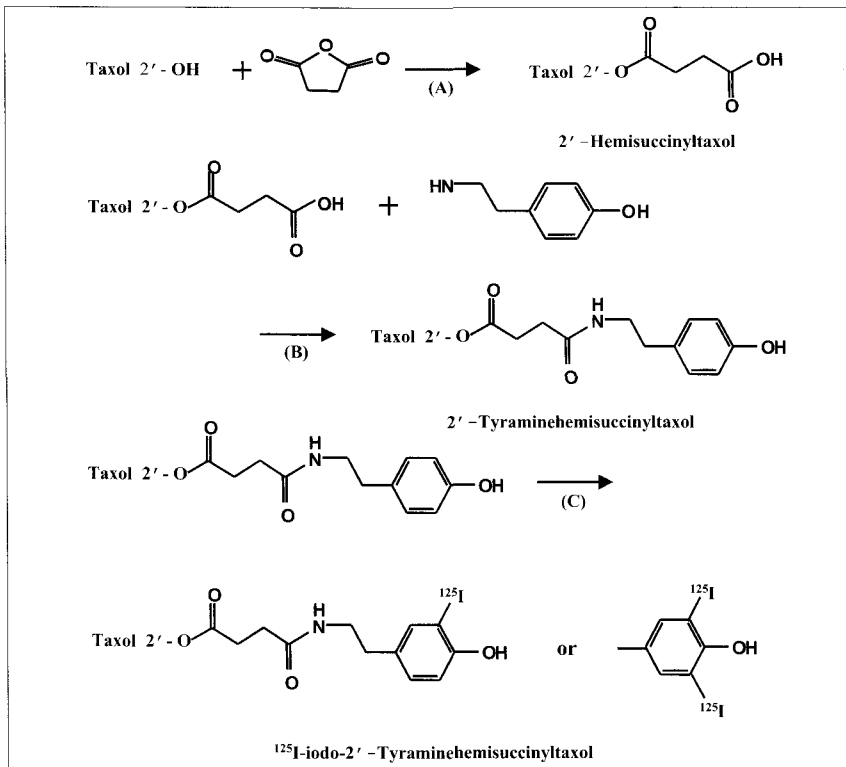


Fig. 5. Preparation scheme of [^{125}I]iodotyraminehemisuccinyltaxol.

(A) anhydrous pyridine, 18hr, R.T.

(B) acetonitrile, dimethylsulfoxide(DMSO), n-triethylamine, isobutylchloroformate, 18hr, R.T.

(C) chloramine-T, 90sec, R.T, sodium metabisulfite.

Table 2. Stability of [¹²⁵I]iodotyraminehemisuccinyltaxol(125I-THT) in 80% Acetonitrile Aqueous Solution
Unit : Radiochemical purity(%), n=3*

Temp	Elapsed Time (day)				
	0.5	1	2	3	7
4℃	98.6	96.2	96.6	94.7	88.1
37℃	98.7	95.8	96.3	93.4	86.1

* Data were calculated by HPLC analysis and liquid scintillation counter (LSC) counting using the following equation ;

$$\frac{\text{peak areas of THT in each elapsed time}}{\text{peak areas of THT in the zero time}} \times 100(\%)$$

용하여 분리하고 이를 액체섬광계수기로 측정하여 ¹²⁵I free form의 양을 확인하여 이들의 방사화학적 순도를 각각 결정함으로써 그 안정성을 알아 보았다. 측정된 peak의 최초 면적비를 기준으로 각 시간별 면적비를 계산함으로써 ¹²⁵I-iodotyraminehemisuccinyltaxol의 각 시간대별 방사화학적 순도를 Table. 2에 나타내었다.

¹²⁵I-iodotyraminehemisuccinyltaxol은 4℃에서는 각각 98.6%, 96.2%, 96.6%, 94.7%, 88.1%이었으며,

37℃에서는 각각 98.7%, 95.8%, 96.3%, 93.4%, 86.1%의 방사화학적 순도를 나타내었다.

4. 방사면역측정법을 이용한 단클론항체의 역가

[¹²⁵I]iodotyraminehemisuccinyltaxol을 방사성 표지 항원으로 사용한 taxol에 대한 단클론항체의 역가를 구하기 위하여 종축은 B/T(%), 횡축은 항체의 희석 배율로하여 나타내었다(Fig. 6). 침전 보조제로 2%

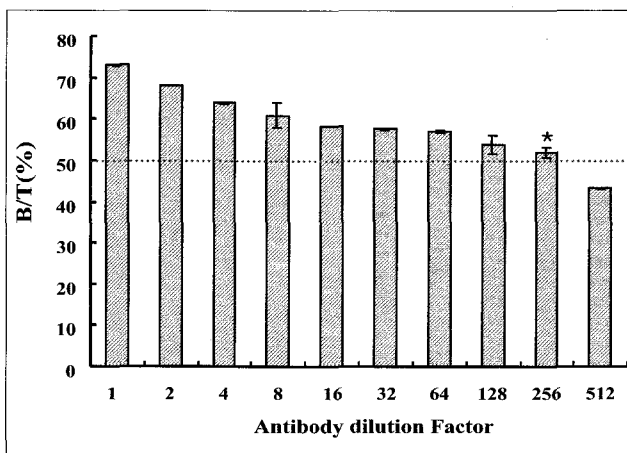


Fig. 6. Determination of antibody titer of monoclonal antibody 3G5A7 using [¹²⁵I]iodotyraminehemisuccinyltaxol. Antibody titer(Asterisk) of 3G5A7 was 1:256, in case B/T(%) was 50% above. Antitaxol monoclonal antibody, 3G5A7, was produced from hybridoma established by fusion between hyperimmunized mouse spleen cell that hyperimmunized Balb/C mice injected intraperitoneally with hemisuccinyltaxol-BSA emulsified in complete Freund's adjuvant and non-secreting myeloma cell, sp2/O-Ag14, and selected with HAT(hypoxanthine, Aminopterin, Thymidine) medium. Competitive radioimmunoassay for taxol was experimented by BGG coupled PEG precipitation method. Radioactivity in tubes was counted by liquid scintillation counter.

$$B/T(\%) = \frac{\text{counts bound form}}{\text{counts total radioactivity of applied radiotracer}} \times 100 (\%)$$

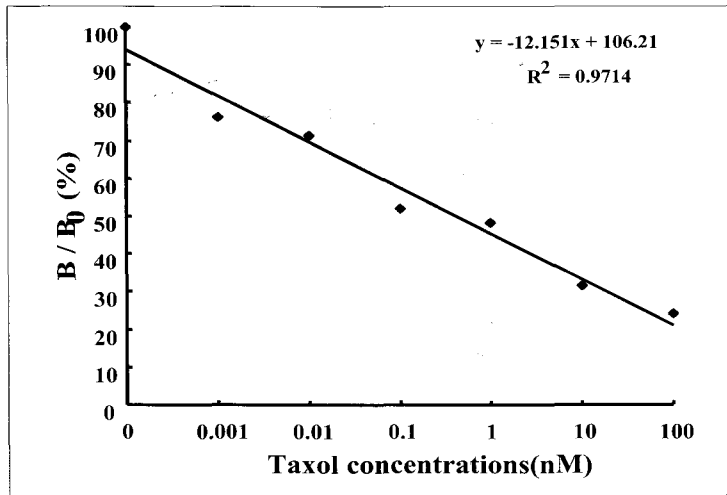


Fig. 7. Standard dose-response curve of monoclonal antibody, 3G5A7 (antibody titer 1: 32) according to the concentration of taxol using RIA. Taxol concentration increased from 0 nM to 100 nM. A standard dose-response curve demonstrated showed good colinearity (R²=0.971) as taxol concentration-dependent manner.

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{counts bound in each taxol concentration}}{\text{counts bound in the absence of labeled radiotracer}} \times 100(\%).$$

BGG를 반응혼합물에 가하고, 20% PEG 수용액을 가해 bound form(B)을 침전시켜 free form(F)과 분리하였다. 액체섬광계수기로 계측하는 경우 bound form 대신에 free form을 측정하여 총 방사능에서 감해서 결합형의 방사능을 산정하였다. 단클론 항체의 역가는 B/T(%)가 50% 이상이 되는 항체의 역가를 나타내므로 1: 256임이 확인되었다. BCG-PEG 침전법에 의한 비특이적인 결합의 B/T(%)는 19%로 확인되었다.

5. 방사면역측정법을 이용한 단클론 항체의 taxol 농도에 따른 표준 투여응답곡선

Taxol 농도가 증가함에 따라서 서로 경쟁적인 관계에 있는 ¹²⁵I-iodotyraminehemisuccinyltaxol과 항체간의 결합형이 감소하게 되고 이러한 경쟁적인 방법을 이용하여 표준투여응답곡선을 작성하였다 (Fig. 7). Taxol이 첨가되지 않은 tube의 방사능을 B₀로 하고 농도별로 taxol이 첨가된 tube의 값을 B로 하여서 종축을 B/B₀로 하고, 횡축을 taxol 표준 농도 용액으로 하여서 표준투여응답곡선을 작성하였다. 단 클론 항체를 이용한 표준투여응답곡선에서 B/B₀(%)값이 50%인 농도를 taxol 농도 측정한계로

보았으며, 그 값은 4.6 nM 이었다.

고 찰

Taxol은 세포내 미세소관에 영향을 주어 세포분열시기중 G2/M 시기를 억제하거나 세포의 신호전달체계의 phosphoregulatory pathway에 영향을 주어 암세포의 apoptosis를 유발시켜 항암효과를 나타낸다(5). 현재 임상실험 phase III를 수행중이며, 임상 적용시 많은 부작용들이 보고되고 있다(4-15). Taxol 사용시에 나타나는 여러 가지 부작용을 최소화하는데는 혈중 약물농도를 적당히 유지하는 것이 필요하다. Taxol의 농도를 측정하는 방법중 HPLC법은 taxol 추출을 위한 전처리과정이 있고 다량의 시료를 처리할수 없는 단점이 있다. 본 실험에서는 ¹²⁵I를 이용하여 새로운 방사성표지화합물인 [¹²⁵I]iodotyraminehemisuccinyltaxol을 합성하여 taxol 혈중농도를 측정할 수 있는 경쟁적 방사면역측정법에 적용할수있는지를 확인하고자 하였다.

Taxol에 ¹²⁵I를 표지하기 위해 먼저 taxol과 succinic anhydride를 반응시켜 hemisuccinyltaxol을 합성하였다. 반응 용매로 pyridine을 사용하였는데

반응 종료후 pyridine의 제거에는 소량의 acetone을 반복첨가하여서 제거하였고, 재결정과정을 통하여 hemisuccinyltaxol을 얻었다. 재결정을 통하여 얻어진 hemisuccinyltaxol의 합성수율은 79.9%이었으며 HPLC상에서 100% 순도를 보였다. Hemisuccinyltaxol에 tyramine과 반응시켜서 amide bond를 형성하기 위해서 isobutylchloroformate를 coupling agent로 사용하였다. 반응시 DMSO를 반응용매로 사용했으며 반응조건이 4℃이므로 결빙현상을 방지하기 위해 acetonitrile을 소량 첨가하였다. 반응 종료후 침전물이 형성되었고, 이를 4℃로 냉각된 증류수를 첨가후 원침하여서 반응하지 않은 tyramine을 제거하였다.

Tyraminehemisuccinyltaxol의 합성시 반응 몰비는 1:1인 경우가 가장 좋은 결과를 나타내었다. Tyraminehemisuccinyltaxol의 분리정제에는 HPLC를 사용하였는데 합성후에 건조된 tyraminehemisuccinyltaxol 반응물을 소분해서 HPLC를 실시하여 6.8~7.5 분대의 분획을 취하여 정제된 tyraminehemisuccinyltaxol을 얻었다. 1H-NMR 분석에서는 taxol의 C2'-H에 succinic anhydride가 ester 결합이 형성되었음을 확인하였고 또한 tyramine이 hemisuccinyltaxol의 carboxyl group에 결합됨을 확인할 수 있었다. tyraminehemisuccinyltaxol의 안정도를 검사하기 위해서 80% acetonitrile 수용액에 1 mg/ml의 농도로 희석하여서 4℃와 37℃에 보관하였다. 각 시간별로 20 μ l씩 취하여 HPLC를 통하여 화학적 순도를 확인하였는데, 7 일 까지도 4℃에서 96.5%, 37℃에서 97.5%로서 안정한 화합물임을 알 수 있었다.

Tyraminehemisuccinyltaxol에 125 I를 표지하기 위해 산화제인 Chloramine-T를 사용하였고 표지수율은 93.9%였다. 합성시 Na 125 I와 tyraminehemisuccinyltaxol의 몰비는 1: 252로 하였을 경우 가장 높은 표지 수율을 나타내었고, 1:42로 한 경우는 10%정도의 표지 수율을 나타내었다. Kakabakos 등¹⁹⁾의 연구에서 tyramine의 Na 125 I 표지시 tyramine : Na 125 I의 몰비가 300:1로 방사성요오드화하였을 경우 [125 I]mono-iodotyramine만이 합성되었다는 연구결과와 비교해 볼 때 본 실험의 경우에서도 125 I-mono-iodotyraminehemisuccinyltaxol이 합성된 것으로 토의되었다.

125 I-iodotyraminehemisuccinyltaxol 합성시 tyraminehemisuccinyltaxol이 비수용성이므로 methanol에 녹여서 방사표지를 수행하였으며, HPLC 분리시에 사용되는 acetonitrile에 의하여 반응중에 사용한 인산염완충용액성분이 침전이 일어나서 미리 acetonitrile을 첨가하여 인산염을 제거한 후에 HPLC로 분리정제하였다.

125 I-iodotyraminehemisuccinyltaxol의 안정성은 3 일까지는 4℃와 37℃에서 각각 94.7%와 93.4%이며, 7 일 경과후에는 88.1%와 86.1%로 감소하는 것으로 나타나 비교적 안정한 것으로 생각되었고, 125 I-iodotyramine-hemisuccinyltaxol은 제조후 7 일까지는 방사면역측정에 사용 가능할 것으로 토의되었다.

125 I-iodotyraminehemisuccinyltaxol을 방사성추적자로 이용한 경쟁적 방사면역측정법을 통한 단클론 항체인 3G5A7의 항체 역가산정시 비특이적결합의 B/T(%)값이 19%로 비교적 높게 나타나서 이를 줄이는 연구가 계속되어야 할 것으로 토의되었다. 다클론항체의 경우 taxol 특이항체의 역가가 너무 낮아서 표준투여 응답곡선을 작성할 수 없었고, 단클론항체의 경우 역가를 1:256으로 산정하였다. 표준투여응답곡선 작성시 taxol 농도증가에 따라서 경쟁적으로 항체와 결합하여 높은 직선성(R²=0.971)을 나타내었다. 생체내 24시간 taxol을 투여시 혈중농도는 대략 100 nM 이상(이므로20), 작성된 표준투여응답곡선을 이용하여 환자혈청내의 taxol 농도를 산정할 수 있을 것으로 보았다.

본 실험결과로 볼 때 임상에서 taxol을 투여하는 종양치료에 대한 화학요법시 경쟁적 방사면역측정법으로 표준투여응답곡선을 작성하고 그 혈중농도를 결정함에 있어 새로운 방사성표지화합물인 125 I-iodotyraminehemisuccinyltaxol을 이용할 수 있을 것으로 기대되며, 정확한 혈중농도 모니터링에 의하여 치료효과를 극대화할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

목적: Taxol(Paclitaxel)은 난소암과 유방암의 치료제로 사용되고 있으며, 치료시 적절한 체내 혈중

농도를 유지함으로써 치료효과를 극대화하기 위해서는 taxol의 혈중농도를 측정하는 것이 필요하다. 본 실험에서는 taxol의 혈중농도를 측정할 수 있는 방사면역측정시스템에 표지항원으로 사용할 수 있는 taxol 유도체의 방사성표지화합물을 합성하고, 이를 이용하여 방사면역측정법을 시행할 수 있는지의 여부를 확인하고자 하였다. **대상 및 방법:** Taxol과 succinic anhydride를 무수 pyridine을 용매로 하여 반응시켜 hemisuccinyltaxol을 합성하고, 합성된 hemisuccinyltaxol과 tyramine을 isobutyl-chloroformate를 coupling agent로 사용하여 tyraminehemisuccinyltaxol을 합성하고 HPLC로 분리 정제 하였다. 산화제인 Chloramine-T(5.25 mg/ml, 10 μ l)를 사용하여 tyraminehemisuccinyltaxol(4 mg/ml, 30 μ l)에 ¹²⁵I(1 mCi)를 방사성요오드화하고 HPLC를 이용하여 표지수율을 산정하였다. 정제된 tyraminehemisuccinyltaxol과 ¹²⁵I-iodotyraminehemisuccinyltaxol을 80% acetonitrile 수용액에 녹여 4℃와 37℃로 보관하면서, 각 시간대별로 화학적 순도와 방사화학적 순도를 결정하여 그 안정도를 HPLC를 이용하여 확인하였다. [¹²⁵I]iodotyraminehemisuccinyltaxol을 방사성표지항원으로 사용하여 taxol에 대한 단클론항체(3G5A7)의 역할을 검증하였으며, 0 ~ 100 nM 농도범위에서 taxol 농도의 증가에 따른 표준투여응답곡선을 작성하였다. **결과:** Hemisuccinyltaxol은 79.9%의 수율로 합성되었으며, tyraminehemisuccinyltaxol의 합성수율은 19.5%였다. ¹²⁵I-iodotyraminehemisuccinyltaxol의 표지수율은 93%이었다. tyraminehemisuccinyltaxol은 7일까지도 96.5% 이상의 순도를 보여 비교적 안정함을 확인하였으며, ¹²⁵I-iodotyraminehemisuccinyltaxol은 3일까지는 93.4% 이상으로 안정하였고 또한 7일 경과시에는 86.1% 이상의 순도를 보였다. taxol에 대한 단클론항체(3G5A7)의 역할을 검증하여 1:256의 역가를 나타냄을 확인하였으며, taxol 농도에 따른 표준투여응답곡선은 taxol과 방사표지 taxol 유도체간에 경쟁적으로 사용되어 직선성 ($R^2=0.971$)을 나타내었다. **결론:** taxol의 경쟁적 방사면역측정법의 방사성 추적자로서 방사성표지 taxol 유도체인 ¹²⁵I-iodotyraminehemisuccinyltaxol을 이용한 방법이 유용함을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E. Plant Antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemia and antitumor agent from taxus brevifolia. *J. Am. Chem. Soc.* 1971;93(3):2325-7.
2. Sheiff, P.B., Horwitz, S.B. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980; 77(3):1561-5.
3. Kumar, N. Taxol-induced polymerization of purified tubulin. *J. Biol. Chem.* 1981;256(20): 10345-441.
4. Derry, W.B., Wilson, L., Jordan, M.A. Substoichiometric binding of taxol suppresses microtubule dynamics. *Biochemistry.* 1995;34: 2203-11.
5. Fan W. Possible mechanism of paclitaxel-induced apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 1999;57(11):1215-21.
6. Nicolaou, K.C., Riemer, C., Kerr, M.A., Rideout, D., Wrasidlo, W. Design, synthesis and biological activity of protaxol. *Nature.* 1993;364(29):464-6.
7. Nicolaou, K.C., Yang, Z., Liu, J.J., Ueno, H., Nantermet, P.G., Guy, R.K. et al. Total synthesis of taxol. *Nature.* 1994;367(6464) :630-4.
8. Ellis, D.D., Zeldin, E.L., Brodhagen, M., Russin, W.A., McCown, B.H. Taxol production in nodule cultures of Taxus. *J. Nat. Prod.* 1996;59(3):246-50.
9. Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*. an endophytic fungus of pacific yew. *Science* 1993;260 (5105):214-6.
10. Tishler, R.B., Schiff, P.B., Geard, C.R., Hall, E.J. Taxol: a novel radiation sensitizer. *Int. Radiation Oncol. Biol. Phys.* 1991;22:613-7.
11. Trimble, E.L., Adams, J.D., Vena, D., Hawkins, M.J., Friedman, M.A., Fisherman, J.S., et al. 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.
12. Ettinger, D.S. Taxol in the treatment of lung cancer. *Monogr. Natl. Cancer. Inst.* 1993;15: 177-9.
 13. Forastiere, A.A., Neuberg, D., Taylor, S.G., Deconti R., Adam, G. Phase II evaluation of taxol in advanced head and neck cancer: and the Eastern Cooperative Oncology Group trial., *Monogr. Natl. Cancer Inst.* 1993;15: 181-4.
 14. Walker, F.E. Paclitaxel(Taxol[®]): Side Effects and Patient Education Issues. *Semin. Oncol. Nursing.* 1993;9(4):6-10.
 15. Neito Y., Cagnoni P.J., Bearman S.I., Shpall E.J., Matthes S., DeBoom T. Acute encephalopathy: a new toxicity associated with high-dose paclitaxel. *Clin. Cancer. Res.* 1999;5(3):501-506.
 16. Huizing M.T., Rosing H., Koopman F., Keung A.C., Pinedo H.M., Beijnen J.H. High-performance liquid chromatographic procedure for the quantitative determination of paclitaxel (taxol) in human urine. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 1995;664(2):373-82.
 17. Leu, J.G., Chen, B.X., Schiff, P.B., Erlanger, B.F. Characterization of polyclonal and monoclonal anti-taxol antibodies and measurement of taxol in serum. *Cancer. Res.* 1993;53:1388-91.
 18. O'Boyle, K.P., Wang, Y., Schwartz, E.L., Regl, D.L., Einzig, A., Dutcher, J.P., et al. Development of two radioimmunoassays to detect paclitaxel in sera and in cerebrospinal, ascitic, and pleural fluids. *Cancer* 1997;79(5): 1022-30.
 19. Kakabakos. S. E., Livaniou. E., Evangelatos. S. A. Isolation of mono- and di-iodine-¹²⁵ tyramines for conjugation labelling. *Eur. J. Nucl. Med.*, 1991;18:952-4.
 20. Bicamumpaka, C., Page, M. Development of a fluorescence polarization immunoassay (FPIA) for the quantitation determination of paclitaxel. *J. Immunol. Methods.*1998;212:1-7.