

약물 - 고분자물질 결합체 합성연구 : 5-Fluorouracil 과 사람의 혈청 Albumin 및 Poly-L-lysine 결합체 합성

이희주·신혜순·이명걸*·박만기*·김종국*

덕성여자대학교 약학대학, *서울대학교 약학대학

(Received August 30, 1989)

Syntheses of Drug-macromolecule Conjugates: Conjugations of 5-Fluorouracil to Human Serum Albumin and Poly-L-lysine

Heejoo Lee, Hae Soon Shin, Myung Gull Lee*, Man Ki Park*
and Chong Kook Kim*

College of Pharmacy, Duksung Women's University and College of Pharmacy, Seoul National
University, Korea

Abstract—The drug-macromolecule conjugates i.e. 5-fluorouracil-1-acetyl-human serum albumin(FU-AA-HSA, 8) and 5-fluorouracil-1-acetyl-poly-L-lysine(FU-AA-polylys, 9) have been synthesized and purified by sephadex G-25 gel filtration with 0.05M phosphate buffer(pH 7.5). The analyses of conjugates gave the molar ratio of FU-AA : HSA of 70-100:1 and FU-AA: poly-L-lysine of 109:1. The weight percent of FU-AA(as FU-CH₂CO-) in FU-AA-HSA conjugate was 16-22% and the one in FU-AA-polylys was 22.4%.

Keywords □ 5-Fluorouracil, 5-fluorouracil-1-acetic acid, human serum albumin, poly-L-lysine, drug-macromolecule conjugate.

Uracil 유도체인 5-fluorouracil(FU, 1)은 여러 종류의 암에 치료제로 쓰이고 있다. 즉 위장관, 유방, 췌장, 머리·목 등의 선암에 화학요법제로 쓰이고 있다.^{1,2)} 이는 세포내에서 활성물질로 전향한 후(FdUMP 또는 FUTP), DNA 합성을 저해하거나 RNA 내에 삽입되어 RNA 대사 또는 기능상에 손상을 가져와 세포의 증식을 억제하거나 죽인다. FU의 가장 심한 독성은 이들을 오래 투여하였을 때 골수억제작용과 위장관정맥염을 일으키는 것이다. 일반적으로 FU는 정맥주사로 12시간 동안 투여하는데 일주일에 10-15 mg/kg을 투여하기도 하고, 매 4-6주마다 10-15 mg/kg을 매일 5일간 투여한다.³⁾

암치료에 있어 이상적인 약물투여 형태는 충분량의 항암제를 암부위로 직접 공급하고 기타 일반조직에는 영향을 미치지 않는 것이다. 이런 목적을 위하

여 항암성 약물을 고분자물질 즉 사람혈청 albumin (human serum albumin, HSA) 또는 특정 polypeptides 등에 연결시킨 결합체들이 합성되었고 이들의 항암성 작용이 보고된 바 있다.⁴⁻⁶⁾

본 연구자들은 특히 항암성 FU를 고분자물질 즉 사람혈청 albumin 및 poly-L-lysine에 연결시킨 결합체들을 얻어, 이들의 생체내 분포도, 모 FU 유리속도 및 약물효과도를 보고자 하였다.

FU 구조에서 보는 바와 같이 FU를 직접 단백질에 연결시키는 것은 불가능하여 먼저 FU에 어떤 연결체를 붙이고 뒤이어 단백질에 결합시키고자 하였다. 문헌조사 결과 FU의 prodrug 연구로 FU의 N¹ 위치에 여러 치환기들 즉 alkylcarbonyl(-COR'), acyloxyalkyl(-CH₂OCOR'), alkyloxyalkyl(-CH₂OR'), alkylcarbonyl(-CON-

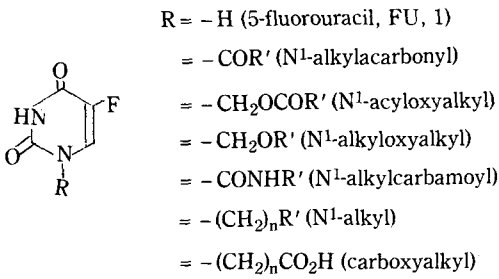


Fig. 1.—Derivative forms of 5-fluorouracil reported.

HR') 또는 carboxyalkyl(-(CH₂)_nCO₂H) 등이 연결된 유도체들이 합성되어 있었다(Fig. 1).⁷⁾ 이들 중 일부는 prodrug 으로 개발되고 있고 [alkylox-yalkyl 유도체인 1-(2-tetrahydrofuryl)-5-flu-

orouracil⁸⁾ 및 alkylcarbamoyl 유도체인 1-hex-ylcarbamoyl-5-fluorouracil⁹⁾], 이들이 체내에서 분해되어 모 FU를 유리시켜 활성형 FU로 전향함이 보고되고 있었다.

FU의 N¹에 위의 어떤 형태로 연결을 하고 다른 쪽 끝에 amino 기나 carboxylic acid 기를 가지고 있어 단백질에 amide 결합으로 연결시킬 수 있는 FU 유도체를 얻어보고자 하였다. 여러형태의 유도체를 시도하였으나 유도체가 쉽게 모 FU로 돌아가고 안정하지 못했고, 결국 FU의 N¹에 alkyl 화를 시키고, 단백질에 amide로 연결시킬 수 있는 FU의 유도체를 합성하게 되었다(Fig. 2). 이 보고서에서는 FU의 결합형 유도체 합성과 이의 단백질 즉 사람의 혈청 albumin 및 poly-L-lysine에 결합과

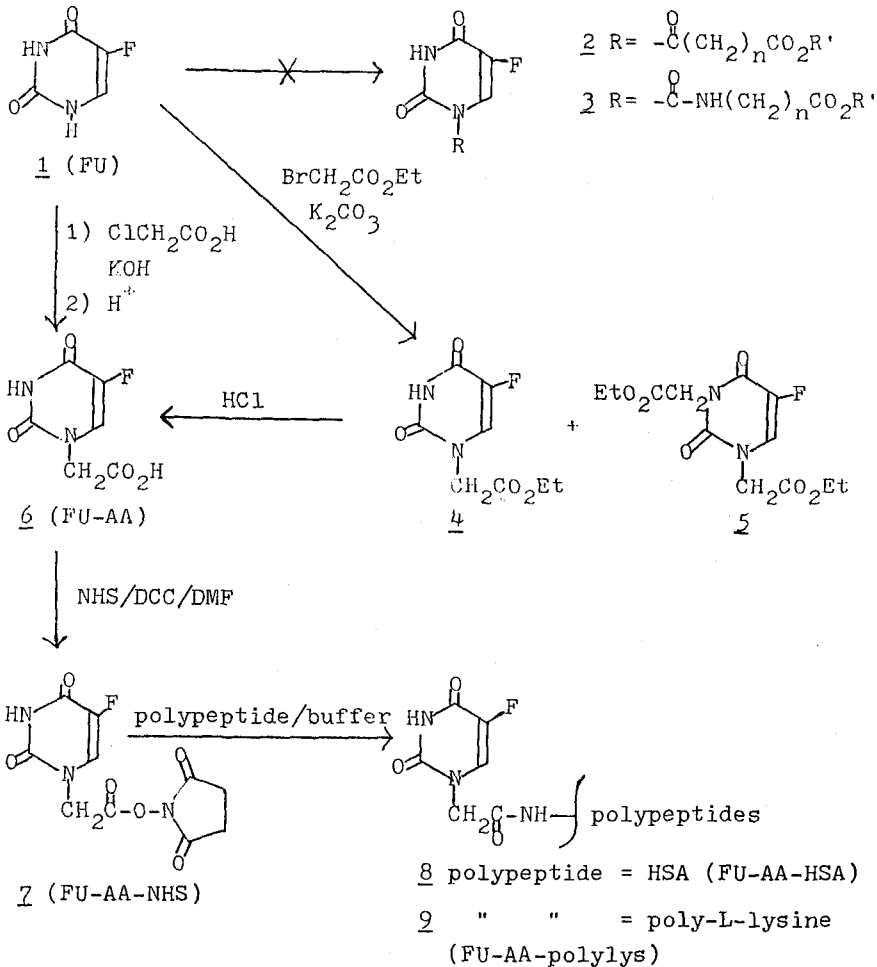


Fig. 2.—Syntheses of 5-fluoracil analogues and formations of FU-AA-polypeptide conjugates.

정과 반응 결과 결합체내 FU-AA와 단백질의 결합 정도에 대한 분석결과를 보고하고자 한다.

실험방법

시약 및 재료—아래와 같이 구입하여 사용하였다.

5-Fluorouracil(중외 제약회사로부터 기증); Human serum albumin(HSA, 녹십자회사로부터 기증); Poly-L-lysine·HBr(m, w, 62, 500, Sigma-Chemical Co.); N, N'-dicyclohexylcarbodiimide(DCC, Sigma Chemical Co.); N-hydroxysuccinimide(NHS, Aldrich Chemical Co.); Ethyl bromoacetate(BrCH₂CO₂Et, 동경화성공업); Silica gel(0.063-0.200 mm) 및 TLC(Merck Co.); Sephadex G-25(Pharmacia LKB).

기타 시약 및 용매는 시판 일급 또는 특급시약을 이용하였다.

사용기기—아래의 기기를 이용하여 각 data를 얻었다.

mp(Bock-Monoscop M Werk-NR 7999, Germany); IR(Perkin-Elmer 1310); NMR(Varian FT-80A); UV(Pye Unicam, UV Spectrophotomete SP 8-100).

Ethyl 5-fluorouracil-1-acetate(4)의 합성—문헌의 방법을 응용하였다.¹⁰⁾ 즉 K₂CO₃ 분말(44 mmol)을 촉매로 하여 FU(40 mmol)와 ethyl α-bromoacetate(44 mmol)을 DMF 용액에서 하루 가열반응하여 생성물을 얻었다. 용매 제거 후 silica gel column(전개용매 10% MeOH-CHCl₃)을 써서 분리하여 diethyl 5-fluorouracil-1,3-diacetate(5, mp 89-91°C)과 ethyl 5-fluorouracil-1-acetate를 얻었다. Ethyl 5-fluorouracil-1-acetate(4) 총 수율은 50% 정도였으며, 이의 NMR spectrum은 문헌과 유사하였다.

5-Fluorouracil-1-acetic acid(FU-AA, 6)의 합성—(A)문헌¹⁰⁾의 방법에 따라 KOH로 용액의 pH를 10으로 유지하며 FU(40 mmol)과 α-chloroacetic acid(40 mmol)을 반응시켜 침상 결정의 FU-AA(6)를 얻었다. 수율 47.8%; mp 272-274°C (lit.¹⁰⁾ mp 276-277°C); R_f 0.17(20%

MeOH-5% AcOH-CHCl₃); UV(H₂O, pH 7) λ_{max} 274 nm(ε 6900). NMR spectrum은 문헌 보고와 유사하였다.

(B) 합성해서 얻은 ethyl 5-fluorouracil-1-acetate(4)를 강 HCl 용액에서 가열 가수분해하여 FU-AA(6)을 얻었다. 제반 성질은 (A)반응에서 얻은 것과 같았다.

N-Hydroxysuccinimide ester of 5-fluorouracil-1-acetic acid (FU-AA-NHS, 7)의 합성—합성한 FU-AA(6, 2.5 mmol) 및 NHS(2.75 mmol)를 DMF(15 ml)에 녹이고 냉조에서 교반하며 DCC(2.75 mmol)를 가해주었다. 반응은 냉조에서 하룻밤 동안 지속하고 반응액에 ethyl acetate를 가하여 침전을 여과 제거하였다(N, N'-dicyclohexylurea, DCU, mp 223-224°C). 모액을 증류 제거하고, 얻어진 고형물질을 ethyl acetate로 세척한 후 건조하여 FU-AA-NHS(7, mp 204-206°C, 수율 78%)를 얻었다. 이는 그 이상 더 정제하지 않고 다음 반응에 직접 사용하였다.

5-Fluorouracil-1-acetic acid와 human serum albumin의 결합체 (FU-AA-HSA, 8)의 형성—HSA(500 mg)을 0.05 M Na₂HPO₄ 완충용액(pH 9) 5 ml에 녹이고 냉조에서 교반한다. FU-AA-NHS(500 mg)을 dimethylformamide(DMF, 약 3 ml)에 녹여 6시간에 걸쳐 HSA 용액에 주사기로 소량씩 가해주었다. 반응액은 3 N NaOH 용액을 써서 pH 9로 계속 유지하였고 하룻밤 동안 냉조에서 반응시켰다. 반응액은 원심분리하여 침전물을 제거하고, Sephadex G-25와 완충액(pH 7.5)을 써서 FU-AA와 결합한 단백질 분획을 분리하였다. 저분자물질들(FU-AA, NHS 등)과 달리 FU-AA-HSA 결합체는 TLC(20% MeOH-5% AcOH-CHCl₃)상에서 원점으로부터 상회하지 않았다. 모든 결합체 분획은 40 ml 이었고 분획 ml당 들어 있는 단백질의 양과 결합된 FU-AA 양을 아래와 같이 분석하였다.

회수된 HSA 양—Biuret 반응¹¹⁾을 써서 HSA의 농도변화(0-2 mg/ml)에 따른 UV 흡수변화(540 nm)를 이용한 표준곡선을 얻고, 이것에 준하여 회수한 단백질 분획을 분석한 결과 13.44 mg/ml의 단백질이 회수되었으며 결과적으로 정량적으로 회수

Table I.—The states of conjugate solutions: FU-AA-HSA (8), FU-AA-HSA treated with NH_2OH and FU-AA-polylys (9)

Conjugate solution	Component	Concentration		Molecular ratio	Weight %
		M	mg/ml		
FU-AA-HSA	FU-AA	2.87×10^{-2}	4.88	$\frac{\text{FU-AA}}{\text{HSA}} = 128$	$\frac{* \text{FU-AA} \times 100}{\text{FU-AA-HSA}} = 26.6$
	HSA	2.24×10^{-4}	13.44		
FU-AA-HSA treated with NH_2OH	FU-AA	7.2×10^{-3}	1.22	$\frac{\text{FU-AA}}{\text{HSA}} = 95$	$\frac{* \text{FU-AA} \times 100}{\text{FU-AA-HSA}} = 21.8$
	HSA	7.3×10^{-5}	4.38		
FU-AA-polylys	FU-AA	2.4×10^{-3}	0.4	$\frac{\text{FU-AA}}{\text{polylys}} = 109$	$\frac{* \text{FU-AA}}{\text{FU-AA-poly}} = 22.4$
	polylys	2.2×10^{-5}	1.38		

*FU-AA = FU- CH_2CO (mw 171)

되었다.

HSA 에 결합된 FU-AA(FU- CH_2CO -)의 양 -FU-AA 의 농도변화($0-2 \times 10^{-4}$ M)에 따른 UV 274 nm 에서의 흡수변화 표준곡선을 얻고, 적정농도로 희석한 결합체액의 흡수도를 측정하여 계산한 결과 FU- CH_2CO - (분자량 171) 양으로 4.88 mg/ml 가 함유되었다. 이들을 기초로 결합체내의 FU-AA 의 weight percent 와 HSA 분자당 FU-AA 의 결합비를 계산하여 Table I 에 기록하였다.

FU-AA-HSA 결합체(8)에 NH_2OH 처리¹²⁾-얻은 FU-AA-HSA 결합체 용액 2ml 에 3N NH_2OH 용액 1ml 을 가하고 상온에서 1.5시간 교반하였다. 반응액을 Sephadex G-25 column 과 pH 7.5 완충액을 써서 단백질 분획을 분리하였다. 이 용액은 Biuret 반응결과 단백질이 4.38 mg/ml (7.3×10^{-5} M) 이었고, 결합체내 FU-AA(FU- CH_2CO)는 1.22 mg/ml (7.2×10^{-3} M) 이었다. 이 때 결합체내 FU-AA 의 weight percent 와 polylys 에 대한 FU-AA 의 mole 비는 Table I 과 같다.

5-Fluorouracil-1-acetic acid 와 poly-L-lysine 결합체(FU-AA-polylys, 9) 형성-Polylys(500 mg)을 0.05 M 인산완충 용액(pH 9) 5ml 에 녹이고, 냉조에서 교반하며 FU-AA-NHS(500 mg)을 분말상태로 소량씩 6시간에 걸쳐 가해주었다. 반응간에 K_2CO_3 분말을 가해 반응액을 pH 7-8로 유지해 주었다(반응액이 너무 alkali 쪽이면 polylys 이 석출함). 반응액은 냉실에서 하룻밤 동안 반응시키고, 원심분리하여 침전을 제거하였다. 액층을

Sephadex G-25와 전개용매로 인산완충액(pH 7.5)를 써서 분리하여 FU-AA-polylys 결합체(9)을 얻었다(FU-AA-polylys 분획 역시 TLC 상에서 상회하지 않았다). 모은 결합체 분획은 68ml 이었고, 결합체 상태는 아래와 같이 분석하였다.

회수된 Polylys 양-Biuret 반응을 써서 HSA 을 표준액으로 하여 분석하니 결합체액에 단백질 양은 1.38 mg/ml 이었고, 총 순수 회수량은 94 mg 이었다($1.38 \text{ mg/ml} \times 68 \text{ ml}$, Sephadex column 분리시 결합체와 저분자물질 혼합체 분획이 많이 얻어졌으나 농축 재분리하지 못했다).

Polylys in 에 결합된 FU-AA(FU- CH_2CO -로)의 양-HSA 결합체에서와 같이 FU-AA 의 농도변화에 따른 UV 흡수도(274 nm) 변화 표준곡선을 이용하여 측정하니 FU- CH_2CO - 양으로 0.4 mg/ml 이었다. 이들을 기초로한 FU-AA-polylys 결합체(9)내의 FU-AA 의 weight percent 와 polylys 에 대한 결합 FU-AA 의 mole 비는 Table I 과 같다.

결과 및 고찰

단백질에 결합을 위한 FU 유도체 합성-단백질에 결합을 위한 FU 의 유도체로 체내에서 FU 를 잘 유리시켜 주리라 예상되는 기능기로 FU 에 결합되고, 다른 한쪽에 단백질에 amide 형태로 결합시킬 수 있는 amino 기나 carboxyl 기를 가진 그런 화합물을 합성하고자 하였다. 최초로 시도한 것은 FU 의 N¹에 carbonyl 기로 연결되는 유도체를 시

도하였다(Fig. 2에 화합물 2). 그러나 이와 같은 유도체는 이웃 carboxylic acid기 때문인지 쉽게 가수분해되어 모 FU로 돌아가 유도체를 순수분리 정제할 수가 없었다. 한편 FU의 N¹에 carbamoyl기로 연결된 유도체(화합물 3)도 마찬가지로 말단 carboxylic acid기가 유리되는 즉시 가수분해되어 모 FU를 유리시켰다. 즉 이들은 여분의 기능기로서 FU의 N¹ 결합상태가 기존의 prodrug들에서 보다도 훨씬 용이하게 가수분해되는 듯하다(예: 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil⁹⁾는 경구적으로 유효). 그리하여 보다 안전성 있는 유도체로 FU의 N¹에 alkyl 상태로 결합시키고 여분의 carboxyl기를 가진 연결형 유도체로 구상한 것이 5-fluorouracil-N¹-acetic acid(6)이었다.

FU-AA(6)는 기존에 보고된 화합물이며¹⁰⁾ 유사한 과정을 걸쳐 합성하여(Fig. 2) NMR 등을 써서 구조를 확인하였다(mp 272-274°C; lit. 276-277°C). 다만 두 가지 합성 경로(Fig. 2)에 있어서 FU에 ClCH₂CO₂H를 반응시켜 FU-AA를 직접 분리하는 방법보다(미반응 FU와 FU-AA 그리고 무기물간에 분리가 어려움)은 FU에 BrCH₂CO₂Et를 반응시키고 FU-N¹-monoacetate를 분리하고(일부 FU-N¹, N³-diacetate 형성, silica gel column 분리가 용이), 뒤이어 가수분해 하는 것이 분리방법에 있어 용이하고, 순수하게 FU-AA를 얻을 수 있었다. 두 가지 방법 모두가 수율은 50% 정도였다.

단백질에 결합시키기 위해 FU-AA의 carboxylic acid기를 DCC를 촉매로 하여 NHS ester로 전환하여 FU-AA-NHS(7)을 얻었다. 이 NHS ester기는 비교적 반응성이 크나 수용액에서도 amino기와 반응하여 amide 결합을 형성시켜주는 활성 ester기로 잘 알려져 있다.¹²⁾

FU-AA-HSA 결합체(8)—인산완충액 pH 9에 녹인 HSA과 DMF에 녹인 활성화된 FU-AA-NHS ester(7)를 weight 1:1의 비율로 반응시켜 FU-AA-HSA 결합체(8)를 형성하였고(Fig. 2), 결합체는 Sephadex G-25 column을 써서 분리하였다. 분리된 FU-AA-HSA 용액은 냉동건조하여 백색분말로 얻었으며, 일부 용액을 써서 회수 결합 단백질의 양 및 HSA 분자에 대한 FU-AA 결합비

를 구하였다. 즉 Biuret 반응¹¹⁾을 써서 HSA의 농도변화에 따른 UV 흡수도(540nm)의 변화 표준곡선을 얻고, 이에 준해 얻은 결합체 용액의 단백질 농도를 구하고(Table I), 회수된 총 단백질 양을 구하였다. 이 반응결과 결합체 분리 후에 단백질 회수량은 대체로 정량적이었다.

FU-AA-HSA 결합체내에 결합된 FU-AA 양은 FU-AA(6)의 농도변화에 따른 UV 흡수도 변화(274nm) 표준곡선을 이용하여 결합체 용액내 FU-AA의 mole 농도를 얻었고(Table I), 이를 용액내 HSA의 mole 농도와 비교하였다. 즉 HSA 분자당 결합된 FU-AA 분자수는 반응마다 차이가 있었으나 대체로 70-100(최대 128) 정도였다.

얻은 결합체내 FU-AA가 어떤 형태(amide 또는 ester)로 결합하였는지를 알아보기 위해 NH₂OH¹²⁾ 용액을 처리하여 보았다(Table I). 실험의 방법으로 처리한 결과 결합체내 FU-AA가 약 25% 정도가 분리되어 나갔다. 이는 FU-AA가 HSA내에 약한 ester 형태로 결합되었던 것이 NH₂OH에 의해 보다 안전한 amide 결합형태로 바뀌면서 HSA으로부터 분리되어 나간 것으로 사료된다. 이러한 결과는 이 FU-AA-HSA 결합체가 체내 투여되었을 때 먼저 약한 결합형태들(ester)이 모 FU를 유리시켜주고 뒤이어 보다 안전한 결합형태들이 분해되며 FU를 유리시켜 주어 지속적으로 모 FU를 유리시켜 주리라 기대된다.

결합체내 FU-AA(FU-CH₂CO-로)의 결합 정도를 weight %로 계산하니 대체로 16-22%(최고 26.6%)이었다.

FU-AA-poly-L-lysine 결합체(9)—Poly-L-lysine·HBr 염을 인산 buffer(pH 9)에 녹인 후 FU-AA-NHS를 분말형태로 소량씩 첨가하여 결국 1:1의 비(weight 비)로 반응하였다. Poly-L-lysine의 반응에 있어서는 pH조절이 매우 중요하였다. 즉 반응액의 pH가 너무 alkali 쪽으로 치우치면 poly-L-lysine 자체가 석출하고, 너무 산성쪽으로 치우치면 결합반응이 이루어지지 않았다. 반응액의 pH는 7-8로 유지해 주어야 한다. 반응 후 Sephadex G-25 column과 인산완충액(pH 7.5)를 써서 FU-AA-polylys 결합체(9)를 분리하였다. 분

리한 결합체액내에 단백질 양은 FU-AA-HSA 에서와 마찬가지로 Biuret 반응을 이용하여 구했으며 이 반응은 컷희 반응으로 단백질의 회수가 매우 낮았다(18.8%). 한편 결합체내에 poly-L-lysine 분자당 결합된 FU-AA 의 분자비는 앞에 FU-AA-HSA 에서와 같은 방법으로 구하여 109이었고, FU-AA 의 weight %는 Table I에서와 같이 22.4%이었다.

결 론

널리 알려진 항암성 약물인 5-fluorouracil 을 5-fluorouracil-1-acetic acid 유도체로 하여 체내 carrier 로 고려되고 있는 고분자물질 human serum albumin 및 poly-L-lysine 에 결합하여, FU-AA-HSA (8) 및 FU-AA-polylys(9)의 결합체를 합성하였다. FU-AA-HSA 결합체내에 HSA 분자당 FU-AA 분자결합은 70-100이었고, 결합체내 FU-AA 의 weight %는 16-22%이었다. FU-AA-polylys 결합체에서는 poly-L-lysine 분자당 FU-AA 의 분자결합이 109이었고, FU-AA 의 weight %는 22.4%이었다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단지원 1986년 목적기초연구의 일환으로 진행된 것으로 지원해 주신 과학재단에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Balis, F.M., Holcenberg, J.S., and Bleyer, W.A., Clinical pharmacokinetics of commonly used anticancer drugs. *Clin. Pharmacokin.*, **8**, 202 (1983).
- 2) Gilman, A.G., Goodman, L.S., Rall, T.W., and Murad, F., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 7th Ed., MacMillan Publishing Co., New York, p. 1268 (1985).
- 3) Meyers, C.E., Diasio, R., Eliot, H.M., and Chabner, B.A., Pharmacokinetics of the fluoropyrimidines: Implications for their clinical use. *Cancer Treat. Rev.*, **3**, 175 (1976).
- 4) Trouet, A. and Masquelier, M., A covalent linkage between daunorubicin and proteins that is stable in serum and reversible by lysosomal hydrolase as required for a lysosomatropic drug carrier conjugate *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Aca. Sci.*, **79**, 626 (1982).
- 5) Ryser, H.J.P. and Shen, W.C., Conjugation of methotrexate to poly-L-lysine increases drug transport and overcomes drug resistance in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 3867 (1978).
- 6) Kato, Y., Saito, M., Fukushima, H., Takeda, Y. and Hara, T., Antitumor activity of 1-*D*-arabinofuranosylcytosine conjugated with polyglutamic acid and its derivatives. *Can. Res.*, **44**, 25 (1984).
- 7) Ahmad, S., and Ozaki, S., Nagase, T., Ilgo, M., Takuzen, R., and Hoshi, A., A facile method for synthesis of N-acyloxymethyl-5-fluorouracils, as a class of antitumor agents. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 4137 (1987).
- 8) Yasumoto, M., Yamawaki, I., Marunaka, T. and Hashimoto, S., *J. Med. Chem.*, **21**, 738 (1978).
- 9) Hoshi, A., Ilgo, M., Nakamura, A., Inomata, M., Kuretani, K.: Antitumor activity of 1-alkylcarbamoyl derivatives of 5-fluorouracil against L1210 leukemia. *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 161 (1978).
- 10) Tada, M., Antineoplastic agents. The preparation of 5-fluorouracil-1-acetic acid derivatives. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **48**, 3427 (1975).
- 11) 한국 생화학 교재 편찬위원회, 비우렛 반응에 의한 단백질의 정량. 신폴 실험생화학, 탐구당, p. 255 (1987).
- 12) 이희주, 혈청 3, 5, 3'-triiodothyronine 측정을 위한 효소-면역 분석의 개발연구. 약학회지, **27**, 117 (1983).