

Taxol의 방사면역측정을 위한 I-125 표지화합물 합성

연세대학교 보건과학부, 식품의약품안전본부 방사선표준과*, 원자력병원 핵의학과**

오옥두† · 금준섭 · 이양호 · 박용석 · 편웅범* · 최창운**

국문초록: Taxol은 diterpenoid구조를 가진 항암제로서, 난소암과 유방암에 탁월한 효과를 보이지만 다른 항암제와 마찬가지로 독성을 가지고 있어 약물의 체내 혈중농도를 모니터링하는 것이 필요하다. 약물의 혈중농도를 모니터링하는 방법은 HPLC법, ELISA법, RIA법 등이 있으나, RIA법이 민감도 측면에서 또한 간편하다는 점에서 장점이 있다. 본 연구에서는 I-125 표지항원을 이용한 방사면역측정법을 확립하기 위해 먼저 taxol유도체를 합성하였다. 먼저 taxol의 C-13 탄소의 곁가지에 위치한 C-2'부분의 hydroxy기를 succinic anhydride와 반응시켜 2'-hemisuccinyltaxol (I)을 합성(반응수율: 80%)하였다. 또한 tyramine을 ¹²⁵I로 표지하고 gel chromatography를 통해 정제된 [¹²⁵I]iodotyramine (II) (반응수율: 58%)을 얻었다. (I)과 (II)를 반응시켜 2'-[¹²⁵I]iodotyramine-hemisuccinyltaxol (III) (반응수율: 96%)을 얻어 ¹²⁵I 표지항원으로 사용하였다. Taxol에 대한 항체를 획득하기 위해서 (I)을 BSA에 접합 반응시켜 2'-hemisuccinyltaxol-BSA접합체를 합성하였으며, 이것을 토끼에 면역주사하여 anti-taxol serum을 얻었다. 이 항체에 대한 역가 검정실험에서 1:20의 희석비에서 B/F(%)가 약 40%를 보였다. 이와 같은 결과는 2'-[¹²⁵I]iodotyramine-hemisuccinyltaxol을 표지항원으로 한 taxol의 방사면역측정 방법으로 혈청내 taxol의 농도측정이 가능함을 제시해 준다.

서 론

Taxol은 주목과 나무에서 분리된 천연물의 항암제로서 유방암과 난소암의 치료에 탁월한 효과가 있는 것으로 보고되고 있다^{1,9,13}. 암치료에 대한 작용기전은 세포내 미세소관에 작용하여 고분자를 형성한 미세소관의 분해를 억제함으로써 세포주기상 G2/M시기에서 세포분열을 막아 암세포의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다^{2,10}. 그러나 혈중 taxol의 농도가 일정 수준을 벗어나게 될 경우 암세포 뿐만이 아니라 정상세포 중 빠르게 분화하는 세포에도 영향을 주게 되어 백혈구 감소증, 신경세포의 손상, 간 독성, 심장기능저하 등의 심각한 치명적인 부작용 및 소화기계손상, 탈모 등이 관찰되었다고 한다^{5,12}.

Taxol의 체내 농도를 정확히 모니터링하여 약물을 일정농도로 유지하는 것이 부작용을 방지하

고, 약물의 효과를 극대화시킬 수 있다. 약물의 혈중농도를 모니터링을 위해서는 HPLC, ELISA, RIA 등의 방법이 있으나, HPLC법은 장시간의 분석시간이 요구되는 단점^{4,8,11,14}이 있으며, ELISA법은 동시에 많은 시료를 측정할 수 있는 장점이 있으나 다소 낮은 민감도를 나타낸다³. 반면 RIA법은 짧은 시간에 많은 시료를 동시에 측정할 수 있고, 민감도 또한 우수한 것으로 알려져 있다. Taxol의 방사면역측정을 위해 삼중수소를 taxol에 표지한 표지항원을 사용한 연구가 수행된 예를 볼 수 있는 데^{6,7}, 이 경우 삼중수소는 반감기(12.3년)가 길어 방사성 폐기물의 처리가 곤란하며, 낮은 에너지의 β -ray를 방출하여 측정에도 어려운 단점이 있다.

본 연구에서는 상대적으로 반감기가 짧고 전자포획(electron capture) 붕괴양식을 하며 약한 γ -ray를 방출하는 ¹²⁵I로 표지한 항원을 이용한 taxol의 방사면역측정 시스템을 확립하기 위한 기초 실험들을 수행하였다. Taxol의 활성을 변화시키지 않고 ¹²⁵I를 표지하기 위해서 적합한 분자변형을 시도하였다. 또한 taxol에 대한 항체를 얻기 위하여

* 논문접수 1997년 10월 2일, 수정재접수 1997년 12월 22일

† 별책요청저자

carrier protein으로 BSA를 선택하여 합텐접합체를 합성하여 토끼에 면역주사하여 항혈청을 얻고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

Paclitaxel (Sigma Co.), Tyramine (Sigma Co.), Succinic anhydride (Sigma Co.), Pyridine (Sigma Co.), Acetonitrile (Sigma Co.), Sephadex G-25 (Sigma Co.), Isobutyl chloroformate (Sigma Co.), Bovine serum albumin (Sigma Co.), Acetone (Aldrich Co.), Polyvinyl pyrrolidone (Sigma Co.), Na¹²⁵I (5mCi/50μ, Amersham Co.), Chloramine-T (Sigma Co.), UL-TROSPEC II (Wallac Co.), 1209 RACKBETA liquid scintillation counter (Wallac Co.)

2. 실험 방법

2.1 2'-hemisuccinyltaxol의 합성

Taxol (20mg)과 succinic anhydride (36mg)를 반응용기에 넣어 4시간 동안 감압건조시킨 후 정제된 dry pyridine (500μl)에 녹여 18시간 동안 반응시켰다. 반응종결 후 rotary evaporator를 사용하여 pyridine을 제거하였으며, 반응물을 다시 acetone 1ml에 녹인 후 재차 감압증류시켜 잔여 pyridine을 완전히 제거하였다. 여기에 acetone을 다시 가해 녹이고 증류수를 떨어뜨려 2'-hemisuccinyltaxol 결정을 얻었다.

2.2 Tyramine의 ¹²⁵I 표지화합물 합성

Tyramine (5μg/10μl), Na¹²⁵I 수용액 (180μCi), Chloramine-T를 인산염 완충용액 (0.5M, pH=7.4)에 녹인 액 (4μg/5μl)을 차례로 가하고 1분간 vortex mix하여 반응시킨 후, sodium metabisulfite (5μg/10μl)를 넣어 반응을 종결시켰다. 고정상으로 Sephadex G-25, 이동상으로 0.05M HCl수용액을 이용한 column chromatography를 실시하여 정제된 [¹²⁵I]iodotyramine을 얻었다.

2.3 2'-[¹²⁵I]iodotyramine-hemisuccinyltaxol의 합성

2'-hemisuccinyltaxol (5mg)을 DMSO (0.2ml)와 acetonitrile (0.1ml)에 녹이고, isobutylchloroformate (10μl)를 가하여 30분간 반응시키고, 여기에 미리 pH=9.5로 조정된 [¹²⁵I]iodotyramine수용액 (2.5ml)을 넣어 4℃에서 18시간 반응시킨 다음 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 침전을 생성물로 얻었다. 이 생성물을 물로 여러번 씻어주어 미반응의

¹²⁵I가 제거되도록 하여 정제하고 건조시켰다. 정제된 반응 생성물을 acetone에 녹여 TLC판에 점적하고 혼합전개액 (EtOAc: Acetone: n-Hexane=4:2:1)으로 한 TLC를 실시하였다. 크로마토그래피가 끝난 TLC판 위에 Agfa사의 X-ray 필름을 위치시켜 4시간동안 감광시킨 후 현상하여 autoradiogram을 얻었다.

2.4 2'-hemisuccinyltaxol-BSA 접합체의 합성

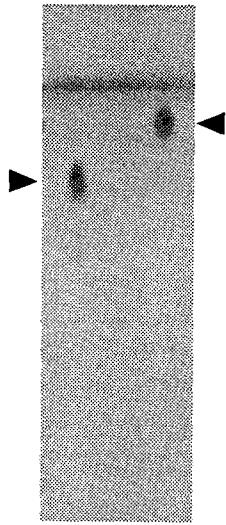
2'-hemisuccinyltaxol (10mg)을 반응용기에 넣고 DMSO (1ml)를 가해 녹인 후 acetonitrile (300μl)과 n-triethylamine (50μl)을 넣은 후 4℃로 냉각 후, isobutylchloroformate (25μl)를 넣어 저어주면서 BSA 수용액 (25mg/3ml, pH=9.5)을 한 방울씩 떨어뜨려 가한 후 pH를 7.5로 맞추고 18시간 동안 반응시켰다. 이 반응 혼합물을 투석막에 넣고 24시간 동안 투석한 후, Centricon 튜브 (MW cutoff: 30,000)에 넣고 1000rpm에서 10분간 원심분리하여 농축하고, 동결건조하여 4℃에서 보관하였다.

2.5 Anti-taxol serum의 생산

2'-hemisuccinyltaxol-BSA 접합체 (6mg)를 생리 식염수 (1.8ml)에 녹이고 complete freund adjuvant (CFA) (1.8ml)와 현탁액을 만든 후 토끼의 목덜미 부근 8~10군데에 피하주사로 1차 면역주사를 하였다. 2차 및 3차 면역주사는 incomplete freund adjuvant (IFA)를 사용한 현탁액을 만들어 4주 간격으로 주사하였고, 최종주사 2주 후 토끼의 귀 정맥으로부터 채혈하여 전혈을 얻었으며, 이것을 3000rpm으로 10분간 원심분리하여 anti-taxol serum을 얻었다.

2.6 Anti-taxol serum의 역가검정

Anti-taxol serum을 RIA buffer (3.5g polyvinyl pyrrolidone/100ml PBS, pH=7.4)를 이용하여 1:4, 1:20, 1:100, 1:500이 되게 각각 희석한 후 시험관에 500μl씩 분주하고, 2'-[¹²⁵I]iodotyramine-hemisuccinyltaxol (약10,000cpm/μl) 2μl를 가하고 잘 섞어 4℃에서 24시간 정온유지하였다. 여기에 20% polyethylene glycol (PEG)수용액 (1ml)을 첨가하여 잘 섞고 30분간 방치한 후 2000rpm에서 5분간 원심분리하여 항원-항체 착물을 침전시켰다. Free form의 방사능(F)는 원심분리 후 상층액을 LSC용 scintillation cocktail (Ready protein) 10ml와 섞어 LSC에서 1분간 측정하여 구하였다. 전체방사능(T)은 20% PEG수용액을 가하기 전의 정온유지 용액을 scintillation cocktail과 섞어 LSC에서 측정하였으며, bound form의 방사능량(B) (B=T-F)을



Left line : 2'-hemisuccinyltaxol
Right line : Taxol

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

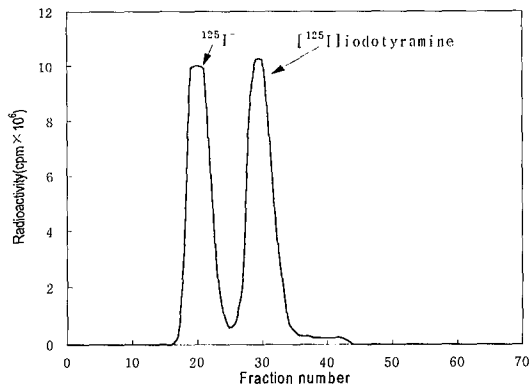


Fig. 2. Gel chromatogram of ^{125}I -labelled tyramine reaction mixture (elution rate: 7drops/min.; eluate: 0.05N HCl).

환산하고 B/T (%)를 구하여 항체역가를 결정하였다.

결 과

Taxol (20mg, 0.0234mM)의 C-13위치, C-2'부분의 hydroxy기와 succinic anhydride를 반응시켜 2'-hemisuccinyltaxol (17.8mg, 0.187mM)을 79.9%의 반응수율로 얻었다. Taxol을 비교물질로 한 TLC 실시하였을 때, taxol의 R_f 값은 0.87~0.93, 2'-hem-

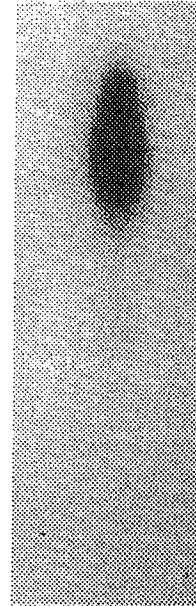


Fig. 3. Autoradiogram of 2'- ^{125}I iodotyramine-hemisuccinyltaxol.

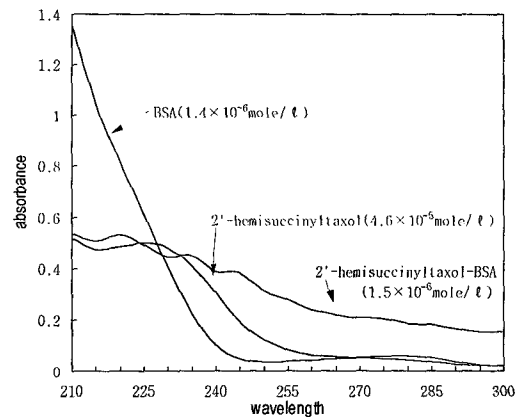


Fig. 4. Ultraviolet spectra of 2'-hemisuccinyltaxol-BSA conjugate and related substances.

isuccinyltaxol의 R_f 값은 0.74~0.83이었다 (Fig. 1). Tyramine에 대한 ^{125}I 의 표지반응은 Chloramine-T 방법을 사용하였을 때, 58%의 표지반응수율을 보였으며, gel chromatography를 실시하여 미반응의 ^{125}I -와 ^{125}I iodotyramine를 순수하게 분리할 수 있었다 (Fig. 2). 2'-hemisuccinyltaxol과 ^{125}I iodotyramine을 반응시키고, 침전형태의 반응혼합물을 충분히 물로 씻어줌으로써 2'- ^{125}I iodotyramine-hemisuccinyltaxol을 순수하게 얻을 수 있었다. 이때 반응물의 순도를 검정하기 위하여 정제된 반응생성

Table 1. Determination of anti-taxol serum titers

Rabbit No.	Titer	CPM	F/T (%) [*]	B/T (%) [*]
1	1:4	4527.0	46.77	53.23
	1:20	5799.8	59.92	40.08
	1:100	8357.7	86.35	13.65
	1:500	9243.5	95.50	4.50
2	1:4	5687.7	58.73	41.27
	1:20	6106.7	63.09	36.91
	1:100	7990.6	82.55	17.45
	1:500	9267.9	95.75	4.25
3	1:4	6198.6	64.04	35.96
	1:20	7506.3	77.55	22.45
	1:100	8378.7	86.56	13.44
	1:500	8654.4	89.41	10.59
4	1:4	6551.0	67.68	32.32
	1:20	7324.3	75.67	24.33
	1:100	8283.7	85.58	14.42
	1:500	9718.2	100.40	-0.4
5	1:4	5767.9	59.59	40.41
	1:20	7221.7	74.61	25.39
	1:100	7840.0	81.00	19.00
	1:500	9928.0	102.57	-2.57
NSB	1:200	9458.6	97.72	2.28
Total		9679.3	100	0

^{*}calculated by $\text{cpm}/\text{total cpm} \times 100$

^{**}calculated by $100 - \text{F/T} (\%)$

물을 TLC를 실시한 후, TLC판을 autochromatography를 하여 하나의 반점을 확인함으로써 반응 혼합물의 순도를 검증할 수 있었다 (Fig. 3).

2'-hemisuccinyltaxol과 BSA를 반응시켜 얻은 2'-hemisuccinyltaxol-BSA에서 BSA 한 분자당 2'-hemisuccinyltaxol이 몇 분자와 결합하였는가를 보기 위하여, BSA, 2'-hemisuccinyltaxol, 2'-hemisuccinyltaxol-BSA의 UV Spectra (Fig. 4)를 얻었다. 이들의 spectrum을 이용하여 환산된 BSA 한 분자당 결합된 2'-hemisuccinyltaxol의 분자수는 7.5개이었다. 2'-hemisuccinyltaxol-BSA를 면역주사하여 얻은 taxol에 대한 항혈청의 역가는 Table 1과 같다.

고 찰

2'-hemisuccinyltaxol의 합성시 사용한 용매인 pyridine을 완전하게 제거되지 않은 경우 결정형성

과정에서 oily product의 형성이 자주 관찰되었으며, TLC상에서도 tailing 현상이 관찰되었다. 이와 같은 경우에는 반응혼합물에 acetone을 다시 가하고 증류하여 pyridine을 완전히 제거시켜 줌으로서 문제를 해결할 수 있었다. Tyramine에 대한 ¹²⁵I의 표지 반응 후 gel-chromatography를 이용한 분리과정에서 iodo-bead를 산화제로 사용한 경우는 4개의 peak가 나왔으나, Chloramine-T를 산화제로 사용한 경우에는 free form의 ¹²⁵I-및 [¹²⁵I]iodotyramine의 두 개의 peak만이 관찰되어 tyramine의 방사표지반응에는 Chloramine-T를 사용하는 것이 좋을 것으로 생각되었다. 2'-hemisuccinyltaxol과 [¹²⁵I]iodotyramine의 반응은 pH에 따라 반응의 정도가 달라지는 것이 관찰되었는데 pH 9.0 근처에서 약 96%의 반응수율을 나타내었다. 이와 같은 현상은 alkali 상태에서 amine의 친핵성이 커져 peptide synthesis의 진행이 용이해지기 때문으로 여겨진다. 그리고 반응 후 용매, free ¹²⁵I⁻ 등은 물에 대한 용해도가 크나 침전형태로 얻어진 생성물인 2'-[¹²⁵I]iodotyramine-hemisuccinyltaxol은 물에 거의 녹지 않아 증류수로 충분히 씻어줌으로써 이들을 제거할 수 있었다.

Taxol자체의 분자량은 작아서 단독으로는 항체 생성이 되지 않으므로 carrier protein으로 BSA를 접합시켜 면역원 (immunogen)으로 사용하였다. 2'-hemisuccinyltaxol에 대한 BSA의 접합반응시 pH가 낮아지는 경향이 있어 단백질의 변성을 막기 위해 pH를 7.5로 유지하는 것이 중요하였다. 표지 항원 2'-[¹²⁵I]iodotyramine-hemisuccinyltaxol과 면역시킨 토끼로부터 얻은 항혈청을 반응시켜 항체 역가를 결정하였다. 방사면역측정을 위해서는 항혈청내 항체의 B/T (%)가 50%수준은 되어야 하나 본 실험에서 얻은 taxol에 대한 항체역가가 전반적으로 낮아 1:4와 1:20에서 B/T값이 각각 53.2%와 40.1%이었다. 그러나 이러한 낮은 항체역가를 높이기 위해서 실험동물을 잘 선택하여 추가면역 시기를 조절하고, bound form과 free form 분리 방법의 개선을 위한 연구가 더 진행된다면, ¹²⁵I를 표지항원으로 한 taxol의 방사면역측정법이 가능할 것으로 토의하였다.

참 고 문 헌

1. David GI Kingstone, Samaranayake G, Ivey CA (1990): The Chemistry of Taxol, A clinically

- useful Anticancer Agent. *Journal of Natural Products*, **53**(1): 1-12.
2. Diaz JF and Andreu M (1993): Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: Reversibility, Ligand Stoichiometry and Competition. *Biochemistry*, **32**: 2747-2755.
 3. Grothaus PG, Raybould TJG, Bignami GS, Lazo CB and Byrnes JB (1993): An enzyme immunoassay for the determination of taxol and taxanes in Taxanes in Taxus sp. tissues and human Plasma. *J Immuno Method*, **158**: 5-15.
 4. Hoke II, SH, Cooks G, Chang CJ, Kelly RC, Qualls SJ, Alvarado B, McGuire MT and Snader KM (1994): Determination of Taxanes in Taxus Brevifolia exreacts by Tandem Mass Spectrometry and High-Performance Liquid Chromatography. *J Natl Prod*, **57**(2): 277-286.
 5. Hruban RH, Yardley JH, Donehower RC and Boitnott JK (1989): Taxoltoxicity. *Cancer*, **63**: 1944-1950.
 6. Leu JG, Chen BX, Schiff PB and Erlanger BF (1993): Characterization of Polyclonal and Monoclonal Anti-taxol Antibodies and Measurement of Taxol in Serum. *Cancer Res*, **59**: 1388-1391.
 7. Leu JG, Jech KS, Wheeler NC, Chen BX and Erlanger BF (1993): Immunoassay of taxol and Taxol-like compound, in plant extracts. *Life Science*, **53**: 183-187.
 8. Longnecker SM, Donehower RC, Cates AE, Chen TL, Brundrett RB, Grochow LB, Ettinger DS and Colvin M (1987): High-Performance Liquid Chromatographic Assay for Taxol in Human Plasma and Urine and Pharmacokinetics in a Phase I Trial. *Cancer Treatment Reports*, **71**(1): 53-59.
 9. Mastropaolo D, Camerman A, Luo Y, Brayer GD and Camerman N (1995): Crystal and molecular structure of paclitaxel. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**: 6920-6924.
 10. Parmess J and Horwitz SB (1981): Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. *J Cell Biol*, **91**: 479-487.
 11. Vergniol JC, Bruno R, Montay G and Frydman A (1992): Determination of taxotere in human plasma by a semiautomated high-performance liquid chromatographic method. *J Chromatography*, **582**: 273-278.
 12. Walker FE (1993): Taxol: Side effects & Patient Education Issue. *Seminars in Oncology Nursing*, **9**(4): 6-10.
 13. Wani MC, Taylor HL and Wall ME (1971): Plant Antitumor agent. VI. Isolation and Structure of Taxol, a Novel antileukemia and antitumor agent from Taxus brevifolia. *J Am Chem*, **93**(3): 2325-2327.
 14. Willey TA, Bekos EJ, Gaver RC, Duncan GF and Tay LK (1993): HPLC procedure for the quantitative determination of Paclitaxel in human plasma. *J Chormatoraphy*, **621**: 231-238.

=Abstract=

**Synthesis of I-125 Labelled Compound of Taxol Analogue
for Radioimmunoassay**

**Ok-Doo Awh[†], Jun-Sub Kum, Yang-Ho Lee, Yong-Serk Park,
Woong-Beum Pyun* and Chang-Hoon Choi****

Division of Health Science, Yonsei University, Wonju, Kangwon 220-710, Korea

**Division of Radiation Standards, Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea*

***Department of Nuclear Medicine, Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea*

Taxol, an anticancer drug that has diterpenoid conformation, has been used as an effective chemotherapeutical agent in the treatment of breast and ovarian cancers. Because of its toxicity like other anticancer drugs, monitoring the taxol level in serum is important procedure during cancer therapy. The various monitoring methods using HPLC, ELISA, and RIA have been adopted, and RIA technique is known to be superior than other methods in terms of sensitivity and convenience.

In this study, in order to develop taxol RIA system using ¹²⁵I labelled antigen, first of all we synthesized taxol derivatives. 2'-hemisuccinyltaxol was obtained with about 80% yield by esterification of taxol at C-2' hydroxyl group on C-13 carbon with succinic anhydride. [¹²⁵I]iodotyramine was prepared with 58% labelling yield by radioiodination of tyramine and purified by gel chromatography. 2'-[¹²⁵I]iodotyramine-hemisuccinyltaxol, ¹²⁵I labelled antigen for taxol RIA, was synthesized with 96% yield from conjugation of 2'-hemisuccinyltaxol and [¹²⁵I]iodotyramine. Anti-taxol serum was produced from the rabbit immunized with 2'-hemisuccinyltaxol-BSA synthesized by 2'-hemisuccinyltaxol and BSA. The antiserum titer was determined by RIA using 2'-[¹²⁵I]iodotyramine-hemisuccinyltaxol. The titer of 1:20 was obtained with about 40% of B/T. The results suggest that taxol RIA using ¹²⁵I labelled antigen can be applied to monitor the taxol level in serum.

Key Words: Taxol, BSA-taxol, 2'-hemisuccinyltaxol, Anti-taxol serum, 2'-[¹²⁵I]iodotyramine-hemisuccinyltaxol

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 3(2): 125-130, December, 1997]

[†]Corresponding author