

Zidovudine의 *In Vitro* 세포내 대사물의 측정을 통한 약효 검색법 개발

한규원 · 김길수[†]

이화여자대학교 약학대학

(2002년 8월 10일 접수 · 2002년 9월 17일 승인)

In Vitro Determination of Intracellular Phosphorylated Metabolites of Antiviral Pyrimidine Analogs

Kyu Won Han and Kil Soo Kim[†]

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

(Received August 10, 2002 · Accepted September 17, 2002)

ABSTRACT—In order to assay the efficacy of newly synthesized antiviral compounds, *in vitro* studies of their active intracellular phosphorylated metabolites were established as compared with Zidovudine (ZDV). Antiviral base analogs require intracellular phosphorylation prior to the inhibition of HIV replication. Therefore, antiviral drugs concentrations in plasma have not reflected any direct relationship with activity or toxicity. A method has been developed to measure the concentration of total phosphorylated metabolites inside peripheral blood mononuclear cells using modified commercial radioimmunoassay (RIA). ZDV 5'-monophosphate was synthesized and used as a procedural control for RIA modification. PBMCs were isolated from whole blood and incubated with ZDV for 20 h to allow metabolic phosphorylation. Viable cells were extracted overnight with 60% methanol. After evaporation, the extract was reconstituted in Tris buffer. Samples were split into two fractions, one of which was treated with alkaline phosphatase (AP) to liberate phosphate groups. Concentrations of phosphorylated metabolites were determined by subtracting the concentration of non-AP-treated fraction from that of the treated fraction. Recovery of phosphorylated ZDV from cell extracts was approximately 90%, and reproducibility was acceptable (coefficients of variation <15% for concentrations ≥ 0.25 ng/mL). Intracellular concentrations (0.135~5.019 nmole/ 10^6 cells) followed a nonlinear dose-response relationship over the range 0.015~2.996mM extracellular ZDV, with concentration-dependant saturation.

Key words—Phosphorylated zidovudine, Radioimmunoassay, Peripheral blood mononuclear cells

Zidovudine (ZDV; 3'-azido-2'3'-deoxythymidine; AZT)은 피리미딘 유도체로 1964년에 처음 합성되었고¹⁾ 1985년에 Mitsuya등²⁾에 의해 HIV에 효과가 있음이 보고되었다. 그리고 최초로 FDA에 승인되어 아직까지도 가장 널리 사용되고 있다. ZDV이 세포내로 들어가면 여러 세포 kinase에 의해 5위의 일인산화, 이인산화로 전환되고,^{3,4)} 궁극적으로는 human immunodeficiency virus(HIV)의 복제를 방해하는 삼인산화 형이 되어 약효를 나타낸다.⁴⁾ 즉 ZDV같은 핵산역전사효소 저해제는 대사 효소에 대해 기질과 경쟁해야 하므로 인산화 대사물이 형성되는 양과 속도는 항바이러스 효과에 영향을 준다. 그런데 혈장에서의 약물동태는 많이 연구되었으나,^{5,7)} 혈장에서의 농도는 약물의 독성과 약효를 결정하기에 연관성이 적다. ZDV은 가장 먼저 HIV 감염에 사용

된 약물이므로 그 세포내 대사 과정이 자세하게 밝혀져 있다.^{3,4)} 그리고 ZDV은 수년동안 임상적으로 사용되어 왔기 때문에 인산화 대사물의 세포내 농도 측정을 위한 분석법 개발의 모델약물로 사용할 수 있다. 본 연구에서는 정상 peripheral blood mononuclear cells(PBMCs)를 분리하여 세포내 전체 인산화 대사물의 농도를 혈장 ZDV을 측정하도록 시판되는 radioimmunoassay를 사용하여 측정하였다. 세포내 인산화 대사물의 농도 측정 방법의 개발로 비슷한 작용 경로를 갖는 피리미딘계 약물들의 유효성을 검색할 수 있도록 한다.

실험방법

시약 및 기기

Zidovudine(이하 ZDV)은 유한양행 연구소로부터 공급을 받았다. Ficoll-Hypaque(Histopaque[®]-1077), Tris Base, Am-

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)3277-3026, E-mail : kskim@ewha.ac.kr

monium Chloride, Trypan Blue, RPMI-1640 Medium, Fetal Bovine Serum, Magnesium Chloride, Bovine Alkaline Phosphatase (18 unit/mg), Sodium Bicarbonate, HEPES, L-Glutamine, 2-Mercaptoethanol, 항생제, Sodium Chloride, Sodium Dihydrogenphosphate, Sodium Phosphate (Diabasic)는 Sigma Co.(MO, U.S.A)에서 구입하여 사용하였고, ZDV-Trac™ (¹²⁵I RIA Kit.)은 DiaSorin Inc. (Stillwater, U.S.A)로부터 구입하였다. 또, 적십자에서 구입한 혈액에서 peripheral blood mononuclear cells(이하 PBMCs)를 분리하여 사용하였다.

ZDV 5'-Monophosphate(ZDVMP)의 합성

이 합성은 핵산의 5위 인산화를 위한 Yoshikawa등⁸⁾의 방법을 준용하였다. Borosilicate test tube에 phosphorous oxychloride 40 μL와 triethyl phosphate 500 μL를 넣고 ZDV 5 mg을 섞어 완전히 녹도록 stirring을 해주었다. 실온에서 6시간 방치하여 반응시켰다. 인산화반응을 완결시키기 위해 diethyl ether 1 mL를 넣어주고, 증류수 동량을 넣어주고 45분 더 방치하였다. 에테르층을 제거하고 수층을 분석 때까지 -20°C에서 보관하였다. 합성한 zidovudine monophosphate(이하 ZDVMP)와 미반응 ZDV은 수층을 200~300 nm에서 UV scan을 하여 확인했다. 또 전 연구에서 확립한 HPLC 분석 조건⁷⁾으로 둘을 분리 확인하였다.

RPMI 배지 제조

3차 증류수 1 L에 RPMI-1640 배지 10.4 g와 HEPES 2.383 g, NaHCO₃ 2 g 및 L-glutamine 0.292 g를 넣고 잘 섞어 0.22 μm-pored nitrocellulose membrane으로 걸러 무균상태로 보관했다. 사용 전에 배지 500 mL에 FBS 50 mL, 항생제 5 mL 및 2-Mercaptoethanol 500 μL를 섞어 사용했다.

Peripheral Blood Mononuclear Cells(PBMCs)의 분리

PBMCs를 분리하기 위해 적십자 혈액원에서 제공하는 신선한 정상 혈구 농축액을 사용하여 PBS로 1:1 희석하였다. 그것을 반량의 Ficoll-Hyaque에 가만히 층적시켜 밀도 차에 의한 원심분리를 1700 rpm(450×g)로 30분 동안 하였다. Ficoll층과 혈장층 사이의 불투명한 세포층을 파스퇴르피펫으로 수집해 3배의 PBS로 세척한다(1200 rpm, 10분). 용혈 완충액(Tris-NH₄CL)을 넣고 37°C에서 5분간 배양해 적혈구를 용해시킨다. 다시 PBS로 세 번 더 세척하였다. 항상 원심 분리 후에는 가라앉은 세포를 풀어 주었다. 이 모든 과정은 무균상태에서 진행했다. 이렇게 수집한 PBMCs를 1% trypan

blue로 염색한 뒤 세포수를 세었다. PBMCs를 10 μL 취해 1% trypan blue 10 μL과 PBS 80 μL를 넣고 살짝 섞어준 뒤 10 μL을 취해 cover glass와 유리판 사이에 기포가 생기지 않게 넣었다. 9구획에서 4개의 구획의 세포수의 수를 현미경으로 세서 다음 식으로 총 세포수를 계산하였다.

$$(\text{총 cell 수}) = (\text{센 cell 수}) / 4 \times (\text{전체 cell mL}) \times 10 \times 10^4$$

혈구 농축액 500 mL에 보통 1.5~2.0 × 10⁸개의 PBMCs를 포함했다.

약물적용과 배양조건

ZDV을 200 mg을 정밀하게 달아 10 mL의 PBS에 녹여 20 mg/mL로 하여 0.22 μm 주사기용 여과필터를 사용하여 무균상태로 표준액을 만들었다. 위에서 수집한 PBMCs에 RPMI 배지를 넣고 균일하게 섞은 후, 배지 5 mL의 한 접시당 1×10⁷~2.5×10⁷개의 PBMCs가 포함되도록 나누어 배양접시에 넣었다. 각 배양접시에 ZDV 표준액에서 ZDV 이 20~400 μg 사이로 포함되도록 넣어준 후 잘 섞어주었다. 각 배양접시를 37°C, 5% CO₂ 하에서 20시간 배양했다.

약물의 추출

각각의 배양액을 원심분리(1200 rpm, 10분)하여 배지를 제거한 후 PBS로 3번 세척했다. 각각의 배양한 PBMCs에 60% 메탄올 5 mL를 넣고 -20°C에서 하룻밤 추출시켰다. 추출액을 Speed Vac centrifuge로 농축시켜 잔사를 만들었다. 정량까지 -80°C에서 보관했다.

탈인산화

위의 세포 잔사를 0.2 M Tris/1 mM MgCl₂ (pH9.5) 완충액 500 μL에 녹인 후 두 구획으로 나누었다. 한 구획에는 0.6 mg/mL bovin alkaline phosphatase (18 unit activity/mg)을 동량 넣고 37°C 항온조에서 30~60분간 적용시켜 탈인산화를 시킨다. 정량할때까지 -20°C에서 보관한다. 또 인산화 효소의 활성도 실험을 위해 앞서 합성한 ZDVMP도 위와 같은 조건으로 탈인산화 시켰다.

Radioimmunoassay

ZDV-Trac RIA kit (INCSTAR I-125 4 μCi)를 사용하여 세포내 ZDV의 농도를 측정했다.

검량선 작성-ZDV-Trac RIA kit에 포함된 standards를 사용해 borosilicate glass tube에 0 standard, ZDV 0.25, 0.99,

4.2, 17.4, 63.7 및 229 ng/mL 표준액 각각의 200 μ L를 넣고 125 I ZDV Trac 100 μ L와 ZDV-Trac antiserum 100 μ L 넣은 후 강하게 섞어주었다. 실온에서 2시간 반응시킨 후 double-antibody precipitating complex 500 μ L를 넣고 강하게 섞어서 다시 실온에서 30분 방치했다. 각각의 tube를 20분간 1000 \times g로 원심분리한 후 재빨리 상층액을 제거하고 5분간 흡수지 위에 얹어 두었다. 이 각각의 tube를 Gamma Counting System으로 1분동안 counts per minute(CPM)을 측정하였다. Total count tube는 125 I ZDV Trac만 넣고, nonspecific binding tube(NSB)는 0 standard 300 μ L에 ZDV-Trac antiserum만 넣지 않고 위와 같은 조작을 했다.

PBMCs에서 인산화 대사물의 측정-PBMCs에 배양해 추출하고 탈인산화시킨 sample을 100 μ L씩 취해 borosilicate tube에 넣고 위의 standard와 같은 방법으로 처리했다. 앞에서 구한 ZDV 검량선의 범위(0.25~274 ng/mL)내에 들어가지 않는 경우는 정량성이 떨어지므로, 농도가 더 클 경우에는 125 I ZDV kit에 포함된 인산완충액으로 희석해 사용했다(보통 21배). 60% 메탄올 PBMCs 추출액을 반으로 나누어 한 쪽은 탈인산화를 시켜 전체 ZDV의 농도를 나타내고 탈인산화를 시키지 않은 부분은 인산화되고 남은 ZDV이 된다. 그러므로 구한 농도의 두 배를 해주어야 했다. 희석한 sample은 RIA로 구한 농도를 희석한 배수로 곱해 구했다. 탈인산화 시킨 전체 ZDV의 농도와 탈인산화시키지 않은 부분과의 ZDV 농도의 차가 인산화된 ZDV 약물 농도에 해당한다($ZDV_{total} - ZDV = ZDVP$).

결과 및 고찰

합성한 ZDVMP의 확인 및 수득률

Yoshikawa등⁸⁾에 의한 방법으로 합성한 수층을 UV spectroscopy로 200~300 nm에서 scanning을 하였더니 235 nm에서 최저 흡수대를 265에서 최대 흡수대를 보여 보고된 ZDV에 관한 UV profile과 같았다.^{7,9)} 유기용매층의 잔류 triethyl phosphate는 증발시켜 제거하므로 합성생산물은 수층에만 존재한다. 이 수층을 전 논문에서 확립한 HPLC 정량 조건으로 찍어본 결과, 유지시간이 4.0분대와 6.8분대에 두 개의 peak가 나타났다(Figure 1). 6.8분대의 피크는 ZDV control과 비교해 보아 ZDV으로 생각된다. 그리고 4.0분대의 fraction을 받아 다시 UV scan한 결과가 ZDV과 같아 ZDV 유사 물질임을 알 수 있었다. 또 합성한 수층에 alkaline phosphatase(AP)를 30분 적용시킨 후 HPLC를 찍은 결과 4.0분대의 peak가 사라졌다. 그리고 6.8분대의 ZDV peak가 증가했다. 이것으로 4.0분대의 peak는 인산화 ZDV(ZDVMP)

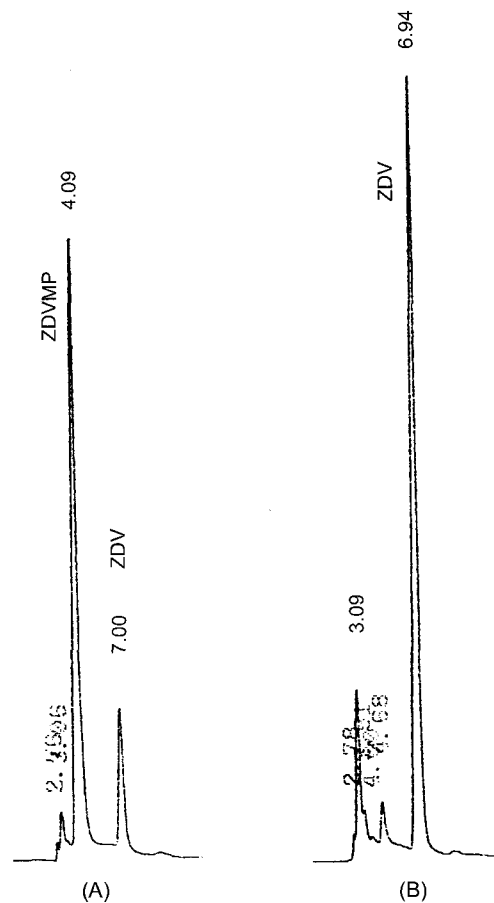


Figure 1-HPLC chromatogram of (A) phosphorylation reaction products (B) phosphorylation reaction products after treatment with AP.

으로 사료된다. HPLC 피크면적과 RIA로 측정된 농도를 비교하여 수득률을 계산한 결과 87.2%였다.

인산화 ZDV의 탈인산화

ZDVMP를 Tris/MgCl₂ 완충액에 1 mg/mL AP를 37°C에서 적용시킨 결과 필요한 만큼 완전히 ZDV으로 전환되었음이 HPLC chromatogram으로 확인되었다(Figure 1). ZDVMP의 효소 반응 시간도 30, 45 및 60분을 실험한 결과, 30분이상 적용시킬 필요는 없었다. PBMCs에서의 ZDVMP의 농도와 ZDVMP control를 비교한 결과가 유의적인 차이를 보이지 않는 것으로 PBMCs에서부터 효소 저해 작용은 없는 것으로 사료된다.

RIA를 위한 검량선

Gamma count system으로 1분간 측정된 CPM의 평균값을 계산했다. 그리고 다음과 같은 식으로 계산해 B/B₀%를 계산한 다음, B/B₀% 대 log 농도로 검량선을 그렸다.

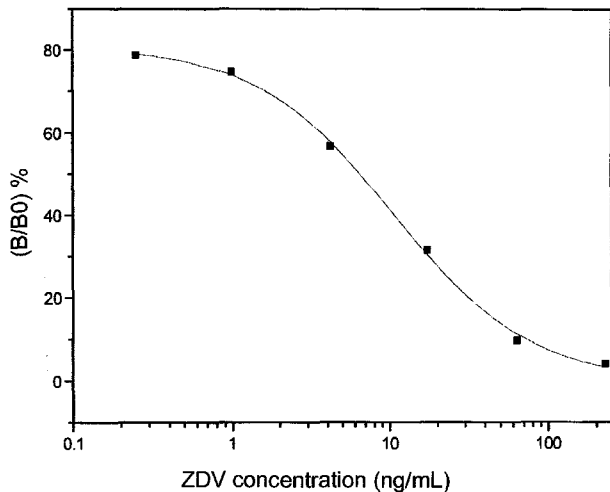


Figure 2—ZDV-Trac sample standard curve.

$$\text{XatY}_{20}=2.63003 \quad \text{XatY}_{80}=41.83036$$

$$\text{B/B}_0\% = \frac{[\text{STANDARD, UNKNOWN SAMPLE}] - [\text{NSB}]}{[\text{STANDARD}] - [\text{NSB}]}$$

단위 : Average Counts Per Minute (CPM)

검량선은 ZDV 농도에 Figure 2와 같이 ZDV 농도에 비례해서 줄어드는 log-logit plot을 나타내었고, 식은 다음과 같다.

$$\text{sigmoidal(logistic) fit : } Y = A_1 - A_2 / 1 + (X/X_0)^p$$

$$(A_1=80.953, A_2=-0.23337, \text{XatY}_{50}(X_0)=10.489, \text{Power}(p)=1.0022)$$

이 검량선에서 2.63003 ng/mL에서 41.83036 ng/mL 사이에서는 직선성이 성립한다($r^2=0.998$).

RIA로의 인산화 ZDV의 측정

세포내 측정 농도 범위에서 인산화 ZDV 농도 측정을 위해 RIA의 여러 파라미터를 조절해야 한다. 즉 희석할 때 사용하는 인산완충액(pH 7.9), Tris/MgCl₂ 완충액(pH 9.5), 탈인산화시킬 때 넣는 AP의 존재, 그리고 RIA 측정 전에 세포내 인산화 ZDV를 ZDV^{5'}로 전환시킬 때의 오차등을 말한다.

Table I—Tris buffer and alkaline phosphatase effect on radioimmunoassay

Sample (n=6)	[ZDV], ng/mL±S.D	CV%
Low control	105.7±3.5	3.3
Low control in Tris	99.53±6.3	2.5
Low control in Tris+AP	130.5±8.9	7.9
High control	902.6±16.7	3.1
High control in Tris	931.2±20.1	1.5
High control in Tris+AP	938.4±29.3	2.6

ZDV, zidovudine; CV, coefficient of variation; AP, alkaline phosphatase

Tris/MgCl₂ 완충액과 AP의 영향을 시험하기 위해 RIA kit serum control를 인산완충액으로 희석한 것, Tris/MgCl₂ 완충액으로 희석한 것 및 1 mg/mL AP를 넣은 Tris/MgCl₂ 완충액으로 희석한 것을 RIA로 측정했다. 그 결과가 Table I에 있다. normal control과 Tris/MgCl₂를 넣은 control 사이에는 유의적인 차이가 없었다. ZDV antibody는 pH 7.9~9.5 사이에서 안정하므로¹⁰⁾ 이 RIA 측정시 Tris 완충액의 사용은 큰 영향을 주지 않을 것으로 사료된다. 그리고 고농도의 AP가 없는 control과 있는 control 사이에도 유의적인 차이가 없었다. 그런데 저농도에 AP를 넣은 경우에는 coefficient of variation(CVs)이 7.9%로 유의적인 차이가 인정된다. 즉 AP는 RIA 측정시 저농도의 sample에서 assay variability를 증가시키는 것으로 사료된다. 또한 AP는 double-antibody reagent를 넣었을 때 단백질전물의 크기를 증가시키는 것으로 보고되었다.¹⁰⁾ 그러나 ZDV antibody는 ZDV 대사물을 AP로 탈인산화시키는 전처리가 꼭 필요하다. 그러므로 되도록 AP의 양과 시간을 줄여 반응시켜야 한다.

재현성과 전환률은 한 번에 실험했는데 그 결과가 Table II에 있다. PBMCs에서의 ZDVMP 60% MeOH 추출액과 동등한 농도의 ZDVMP의 60% MeOH액을 비교했다. 전환률은 두 농도에서 모두 82.3 및 95.6%로 좋은 경향을 보였는데 RIA 측정과정 중 상층액 제거 과정에서의 10%가량의 손실 때문으로 사료된다. 재현성은 고농도에서는 control과

Table II—Reproducibility and recovery of ZDVMP from cell extracts

Sample (n=7)	Background [ZDV] ^A	Total [ZDV]	[ZDV ^M]	Recovery (%)
Low control ^B	0.201±0.07(32.6)	1.198±0.57(31.0)	0.997	82.3
Low ZDVMP	0.582±0.085(15.8)	1.402±0.52(24.8)	0.820	
High control	0.354±0.257(65.8)	3.958±0.35(10.7)	3.604	95.6
High ZDVMP	0.405±0.0398(23.4)	3.851±0.25(15.6)	3.446	

ZDVMP; ZDV^{5'}-monophosphate. ng/mL

^A±S.D(%coefficient of variation)

^BNo cell or cell extract in control.

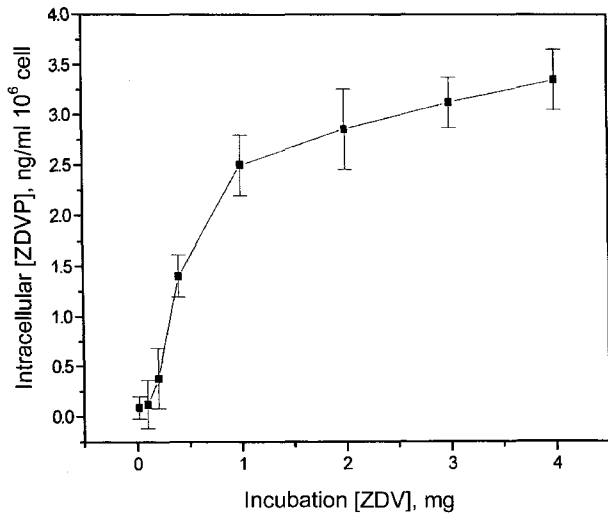


Figure 3—Dose-response relationship between extracellular ZDV concentration and intracellular concentration of total phosphorylated ZDV in PBMCs.

세포추출액의 CVs가 10.7 및 15.6%로 고농도에서의 AP처리하는 적합하다고 사료된다. 그러나 저농도에서의 CVs는 31.0 및 24.8%로 AP에 의해 RIA variability가 증가되는 것을 알 수 있었다. 그래서 약 3 ng/mL 이상에서야 assay 재현성이 있는 것으로 사료된다.

세포외와 세포내 ZDV 농도의 상관성

세포의 ZDV 농도와 세포내 인산화 ZDV 농도 사이의 관계를 알아보기 위해 신선한 혈액에서 PBMCs(80% lymphocyte, 20% monocyte)를 분리하고 정한 농도로 20시간 배양하여 세포내 인산화 ZDV 농도를 측정하였다. 그 용량 곡선은 Figure 3에서처럼 농도 의존적인 비선형 용량 곡선을 보여준다.

결 론

ZDV와 같은 염기 유도체인 항감염성 약물은 세포내로 들어가 인산화 효소에 의해 인산화되어 viral DNA elongation을 제해해야 약효를 나타낸다. 그러므로 실제적인 약물의 유효 농도를 결정하고 독성을 줄이기 위해서는 활성형인 인산화 대사물의 세포내 농도를 결정해 줄 필요가 있다. 다음은 ZDV의 세포내 인산화 대사물의 측정을 위해 RIA를 사용하여 얻은 결론이다. 합성한 ZDVMP는 UV scan과 HPLC로 확인하였고 수득률이 87.2%였다. Tris/MgCl₂ 완충액(pH9.5)은 고농도나 저농도 모두에서 CVs가 약 3%로 큰 영향을 주지않았다. AP는 고농도에서는 CVs 2.6%로 영향이 적으

나 저농도에서는 CVs 7.9%로 유의적인 차이가 인정된다. AP에 의한 ZDV으로의 전환률은 고농도나 저농도 모두 95.6과 82.3%로 실험 과정 중의 손실 10%가량을 빼주면 좋은 활성을 갖는다. 재현성은 고농도에서는 control과 세포추출액의 CVs가 10.7 및 15.6%로 고농도에서의 AP처리하는 적합하다고 사료된다. 그러나 저농도에서의 CVs는 31.0 및 24.8%로 AP에 의해 RIA variability가 증가되는 것을 알 수 있었다. 세포외 ZDV의 농도와 세포내의 전체 인산화된 ZDV의 농도와의 상관성과 측정을 위한 실험에서 농도 의존적인 비선형 용량-반응 곡선을 나타내었다. PBMCs에 ZDV를 0.015~2.996 mM로 적용한 결과 0.135±0.114~5.019±0.3 nmole/10⁶ cells의 세포내 인산화 ZDV 농도를 나타내었다. 즉 세포외의 약물농도와 세포내 약물농도는 비례적이지 않으므로, 혈장내에서의 약물 농도만으로 정확한 항바이러스 효능을 나타내는지를 판단할 수 없다. 그러나 세포내에서의 인산화 대사물의 농도는 매우 낮아 측정하기 어려우므로 보다 민감한 분석방법으로 RIA를 사용하여 ZDV를 실험하였다. 전 연구⁷⁾에서 항감염성 약물로 합성된 피리미딘 계열의 LJ142와 LJ143도 실제 활성형인 인산화 대사물의 세포내 농도를 측정하기 위한 방법을 확립하고 ZDV과 비교해 약효를 검색할 필요가 있다.

감사의 말씀

본 연구는 보건장학회의 후원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Horwitz JP, Chua J, Noel M, and Nucleosides V. The monomesylates of 1-(2'-deoxy-B-D-lyxofuranosyl)thymidine. *J. Org. Chem.* **29**, 2074-2078 (1964).
- 2) Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, St. Clair MH, Lehrman SN, Gallo RC, Bolognesi D, Barry DW, and Broder S. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BWA509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7096-7100 (1985).
- 3) Furman PA, Fyfe JA, St. Clair MH, Weinhold K, Rideout JL, Freeman GA, Lehrman SN, Bolognesi DP, Broder S, Mitsuya H, et al. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8333-7 (1986).
- 4) Tornevikn Y, Jacobsson B, Britton S, and Eriksson S.

- Intracellular metabolism of 3'-azidothymidine in isolated human peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **7**, 751-9 (1991).
- 5) Collins JM, and Unadkat JD. Clinical pharmacokinetics of zidovudine: an overview of current data. *Clin. Pharmacokinet.* **17**, 1-9 (1989).
- 6) Laskin OL, de Miranda P, and Blum MR. Azidothymidine steady-state pharmacokinetics in patients with AIDS and AIDS-related complex. *J. Infect. Dis.* **159**, 745-7 (1989).
- 7) 한규원, 정낙신, 김길수, 흰쥐에서 피리미딘 계열 항감염성 약물의 체내 동태, *약제학회지*, 제30권, 제2호, p113-118 (2000).
- 8) Yoshikawa M, Kato T, and Takenishi T. Studies of phosphorylation, Selective phosphorylation of unprotected nucleosides. *Bull. Chem. Soc. Japan.* **42**, 3505-8 (1969)
- 9) Burrough-Wellcome 3'-azido-3'-deoxythymidine chemical data sheet.
- 10) Stretcher BN, Pesce AJ, Wermeling JR, and Hurtubise PE. In vitro measurement of phosphorylated zidovudine in peripheral blood leucocytes. *Therapeutic Drug Monitoring*, **12**, 481-489 (1990).