[UCI]I804:24011-200000232986

*2006*年度 *8*月

博士學位論文

수용성 파클리탁셀 프로드럭의 합성 및 항암 효능

朝鮮大學校 大學院

高分子工學科

柳 範 榮

수용성 파클리탁셀 프로드럭의 합성 및 항암 효능

Synthesis and Anti-Cancer Efficacy of Water-Soluble Paclitaxel Prodrugs

2006 年 *8* 月 日

朝鮮大學校 大學院

高分子工學科

柳 範 榮

수용성 파클리탁셀 프로드럭의 합성 및 항암 효능

指導教授 曺 秉 旭

이 論文을 工學博士學位申請 論文으로 提出함.

2006 年 4 月 日

朝鮮大學校 大學院

高分子工學科

柳 範 榮

柳 範 榮의 博士學位論文을 認准함

委員長	全南大學校	教 授	許 洋 一	印
委員	全南大學校	教 授	韓 銀 美	印
委員	朝鮮大學校	教 授	柳 志 江	印
委員	朝鮮大學校	教 授	洪 鎭 厚	印
委員	朝鮮大學校	教 授	曺 秉 旭	印

2006 年 *6* 月 日

朝鮮大學校 大學院

목 차

LIST OF TABLES
LIST OF FIGURES
ABSTRACT

제 1 장 서 론
1. 1. 파클리탁셀(Paclitaxel, Taxol®) ····· 2
1. 1. 1. 파클리탁셀의 화학구조와 항암작용 기전 ····· 2
1. 1. 1. 파클리탁셀의 문제점 ····· 7
1. 2. 프로드럭을 통한 항암약물의 전달 ····· 10
1. 2. 1. 종양을 표적으로 하는 항암제 ····· 10
1. 2. 2. 능동적 종양 표적항암제 ····· 11
1. 2. 3. 피동적 종양 표적항암제 ····· 12
1. 3. Poly(ethylene glycol)(PEG) ····· 51
1. 3. 1. Poly(ethylene glycol)(PEG)의 기본물성 ····· 51
1. 3. 2. 약물전달제로서의 PEG ····· 61
1. 3. 3. 단백질의 비가역적 PEGylation ····· 71
1. 3. 4. 항암제의 PEGylation ····· 81
1. 4. 본 연구의 내용 및 목적 ····· 25

제 2 장 실 험
2. 1. 시약 및 기기 ····· 29
2. 2. 1. 시약 ····· 29
2. 2. 2. 기기 ····· 29
2. 2. 파클리탁셀 프로드럭의 합성경로 ····· 31
2. 3. 파클리탁셀 유도체들의 합성 ····· 32

2. 3. 1. 2′-TBDMS-paclitaxel의 합성 ····· 23
2. 3. 2. 2′-TBDMS-7-chloromethyloxycarbonyl-paclitaxel의 합성 ····· 43
2. 3. 3. 2′-TBDMS-7-(2-bromoethyloxycarbonyl)-paclitaxel의 합성 ····· 63
2. 3. 4. 2′-TBDMS-7-(2-chloroethyloxycarbonyl)-paclitaxel의 합성 ····· 83
2. 3. 5. 7-chloromethyloxycarbonyl-paclitaxel의 합성 ····· 04
2. 4. $mPEG_{5000}$-succinate의 합성 ····· 24
2. 5. P3의 PEGylation에 의한 프로드럭의 합성 ····· 54
2. 5. 1. $mPEG_{5000}$-succinate를 이용한 P3의 PEGylation ····· 54
2. 5. 1. $mPEG_{20000}$-succinate를 이용한 P3의 PEGylation ····· 84
2. 6. P2a의 PEGylation 및 프로드럭의 합성 ····· 15
2. 6. 1. PEGylated-P2a의 합성 ····· 25
2. 6. 2. PEGylated-P2a로부터 프로드럭의 합성 ····· 25
2. 7. P2b의 PEGylation 및 프로드럭의 합성 ····· 65
2. 6. 1. PEGylated-P2b의 합성 ····· 75
2. 6. 2. PEGylated-P2b로부터 프로드럭의 합성 ····· 75
2. 8. P2c의 PEGylation 및 프로드럭의 합성 ····· 16
2. 8. 1. PEGylated-P2c의 합성 ····· 26
2. 8. 2. PEGylated-P2c로부터 프로드럭의 합성 ····· 26
2. 9. 프로드럭들의 용해도 및 가수분해 실험 ····· 66
2. 10. 암세포에 대한 동물실험 ····· 66

제 3 장 결과 및 고찰

3. 1. $mPEG_{5000}$-succinate의 합성 ····· 76
3. 2. 파클리탁셀 유도체 및 프로드럭의 합성 ····· 96
3. 2. 1. 합성경로 1에 따른 PP7-5000a와 PP7-20000의 합성 ····· 96
3. 2. 2. 합성경로 2에 따른 PP7-5000a의 합성 ····· 38

3. 2. 3. 합성경로 2에 따른 PP7-5000b와 PP7-5000c의 합성 ····· 68
3. 3. 프로드럭의 용해도 및 가수분해 ····· 96
3. 4. PP7-5000a의 B16/F10 흑색종 세포에 대한 항전이능 ····· 102

제 4 장 결 론 ····· 107

REFERENCES ····· 109

LIST OF TABLES

Table 1. Common side chain of taxoids. ····· 3

Table 2. In-vitro and in-vivo results of PEG-camptothecin derivatives. ····· 42

Table 3. In-vitro and in-vivo results PEG-paclitaxel derivatives. ····· 52

Table 4. Gradient condition of Prep-HPLC. ····· 47

Table 5. Water-solubility of paclitaxel and prodrugs. ····· 69

Table 6. Enzymatic hydrolysis rate of paclitaxel prodrugs in rat plasma. ····· 98

Table 7. Non-enzymatic hydrolysis rate of prodrugs. ····· 101

Table 8. Study design of the anti-metastatic potential test of PP7-5000a. ····· 102

Table 9. The effect of PP7-5000a and paclitaxel on the development of B16/F10 melanoma lung colonies in C57BL/6 mice. ····· 401

Table 10. The effect of PP7-5000a and paclitaxel on the lung weight of C57BL/6 mice following i.v. administration of B16/F10 melanoma cells. ····· 105

LIST OF FIGURES

Figure 1. Skeletal types of natural toxoids. ····· 2
Figure 2. C-4/C-5/C-20 functionalization types of taxoids. ····· 4
Figure 3. Chemical structure of paclitaxel. ····· 4
Figure 4. The MELC(murine erythroleukemic cells) cycle. ····· 5
Figure 5. Assembly of tubulin monomers into a microtubule structure. ····· 6
Figure 6. The dynamic behavior of microtubules at equilibrium. ····· 7
Figure 7. Structure-activity relationships of paclitaxel. ····· 8
Figure 8. C-2′carbonate derivatives(a) and phosphate paclitaxel prodrugs (b)synthesized by Bristol-Myers Squibb company. ····· 9
Figure 9. Illustration of the chemical structure of SMANCS. ····· 41
Figure 10. Chemical structure of PEG. ····· 51
Figure 11. Computer simulation of a "conformational" cloud formation by a surface-attached PEG. ····· 61
Figure 12. Effect of PEG molecular weight on PEG accumulation at the tumor tissue and the normal muscle after intravenous injection into mice with tumor mass at their footpad(3 h after injection): (○) tumor tissue, (●) normal muscle. ····· 91
Figure 13. Schematic representation of models for PEG accumulation of low, middle, and higher molecular weights at tumor and normal tissues after intravenous injection. ····· 02
Figure 14. Chemical structure of 20(s)-camptothecin. ····· 22
Figure 15. Hydrolysis mechanism of mPEG-paclitaxel conjugate. ····· 62
Figure 16. Chemical structure of modified prodrugs. ····· 72
Figure 17. Synthetic route of paclitaxel prodrugs. ····· 13

Figure 18. ^{1}H-NMR spectrum of P1($CDCl_3$). ····· 33
Figure 19. ^{1}H-NMR spectrum of P2a($CDCl_3$). ····· 53
Figure 20. ^{1}H-NMR spectrum of P2b($CDCl_3$). ····· 73
Figure 21. ^{1}H-NMR spectrum of P2c($CDCl_3$). ····· 93
Figure 22. ^{1}H-NMR spectrum of P3($CDCl_3$). ····· 14
Figure 23. FT-IR spectrum of $mPEG_{5000}$-succinate(KBr). ····· 34
Figure 24. ^{1}H-NMR spectrum of $mPEG_{5000}$-succinate($CDCl_3$). ····· 44
Figure 25. ^{1}H-NMR spectrum of PP7-5000a($CDCl_3$). ····· 74
Figure 26. ^{1}H-NMR spectrum of PP7-20000($CDCl_3$). ····· 05
Figure 27. ^{1}H-NMR spectrum of PEGylated-P2a($CDCl_3$). ····· 45
Figure 28. ^{1}H-NMR spectrum of PP7-5000a($CDCl_3$). ····· 55
Figure 29. ^{1}H-NMR spectrum of PEGylated-P2b($CDCl_3$). ····· 95
Figure 30. ^{1}H-NMR spectrum of PP7-5000b($CDCl_3$). ····· 06
Figure 31. ^{1}H-NMR spectrum of PEGylated-P2c($CDCl_3$). ····· 46
Figure 32. ^{1}H-NMR spectrum of PP7-5000c($CDCl_3$). ····· 56
Figure 33. FT-IR spectra of (a)$mPEG_{5000}$ and (b)$mPEG_{5000}$-succinate. ····· 86
Figure 34. ^{1}H-NMR spectra of $mPEG_{5000}$ and $mPEG_{5000}$-succinate. ····· 86
Figure 35. ^{1}H-NMR spectra of paclitaxel and P1. ····· 07
Figure 36. ^{1}H-NMR spectra of P1, chloromethyl chloroformate, and P2a. ····· 27
Figure 37. ^{1}H-NMR spectra of P2a and P3. ····· 37
Figure 38. Prep-HPLC chromatogram of crude PP7-5000a. ····· 57
Figure 39. Prep-HPLC chromatogram of crude PP7-20000. ····· 67
Figure 40. ^{1}H-NMR spectra of PP7-5000a and PP7-20000 after Prep-HPLC. ····· 77
Figure 41. UV-spectra of paclitaxel at different concentrations. ····· 97
Figure 42. Calibration curve for absorbance as a function of concentration of the paclitaxel. ····· 08

Figure 43. UV-spectra of prodrugs at a specific concentration. ····· 80
Figure 44. MALDI-TOF spectra of $mPEG_{5000}$-succinate and PP7-5000a. ····· 81
Figure 45. Analytical HPLC chromatogram of PP7-5000a after Prep-HPLC. ····· 82
Figure 46. ^{1}H-NMR spectra of P2a and PEGylated-P2a. ····· 84
Figure 47. Prep-HPLC chromatogram of crude PP7-5000a. ····· 85
Figure 48. ^{1}H-NMR spectra of PEGylated-P2a and PP7-5000a. ····· 86
Figure 49. ^{1}H-NMR spectra of P1, 2-bromoethyl chloroformate, and P2b. ····· 87
Figure 50. ^{1}H-NMR spectra of P1 and P2c. ····· 88
Figure 51. ^{1}H-NMR spectra of PEGylated-P2b and PEGylated-P2c. ····· 90
Figure 52. Prep-HPLC chromatogram of crude PP7-5000b. ····· 91
Figure 53. Prep-HPLC chromatogram of crude PP7-5000c. ····· 91
Figure 54. ^{1}H-NMR spectra of PEGylated-P2b and PP7-5000b. ····· 92
Figure 55. ^{1}H-NMR spectra of PEGylated-P2c and PP7-5000c. ····· 93
Figure 56. UV-spectra of prodrugs at a specific concentration. ····· 94
Figure 57. Analytical HPLC chromatogram of PP7-5000b after Prep-HPLC. ····· 95
Figure 58. Analytical HPLC chromatogram of PP7-5000c after Prep-HPLC. ····· 95
Figure 59. Hydrolysis of prodrugs in rat plasma(%Conc. vs. Time). ····· 97
Figure 60. Hydrolysis of prodrugs in rat plasma(ln[%Conc.] vs. Time). ····· 98
Figure 61. Hydrolysis mechanism of PP7-5000a. ····· 99
Figure 62. Stability of PP7-5000a(pH profile). ····· 101
Figure 63. The effect of PP7-5000a and paclitaxel on the development of B16/F10 melanoma lung colonies in C57BL/6 mice. ····· 101
Figure 64. The effect of PP7-5000a and paclitaxel on the lung weight of

C57BL/6 mice following i.v. administration of B16/F10 melanoma cells. 104

ABSTRACT

Synthesis and Anti-Cancer Efficacy of Water-Soluble Paclitaxel Prodrugs

Ryu, Beom-Young

Advisor : Prof. Jo, Byung-Wook, Ph. D.

Department of Polymer Science & Engineering,

Graduate school of Chosun University

Paclitaxel(Taxol®), a natural diterpene isolated from the bark of *Taxus brevifolia*(Pacific yew), is one of the most effective antitumor agents for the treatment of various human solid tumors such as ovarian carcinoma, breast carcinoma, and melanoma. Unlike other clinical antimitotic agents such as the vinca alkaloids which inhibit the microtubule assembly process, paclitaxel promotes tubulin polymerization and stabilizes the microtubules, therefore cell division is blocked in the late G2 mitotic phase of the cell cycle.

Due to limitations of water-solubility, paclitaxel is currently administered in vehicles containing Cremophor EL® and 49.7 % ethanol(1:1 v/v). The hypersensitivity reaction occurred by Cremophor EL® contained in the formulation when the vehicles are administered intravenously. The symptoms of the hypersensitivity reaction include rapid onset of hypertension, respiratory distress(e. g. bronchospasms), urticaria and rash. In spite of the introduction of the prophylactic use of antihistamines prior to paclitaxel i.v. administration and the extension of the infusion duration time to minimize these allergic reactions, the histamine release effects due to Cremophor EL® are not completely eliminated. In order to overcome these problems, preclinical strategy for i.v. administration of

paclitaxel has focused on the use of prodrugs in a non-Cremophor EL®-containing, as 100 % aqueous as possible, formulation.

In this study, a new series of PEGylated paclitaxel prodrugs increased water solubility of paclitaxel was synthesized. Because the efficacy of prodrug is dependent upon the release rate of the active parent drug, various self-immolating spacer groups were introduced between the PEG solubilizing portion and 7-OH of paclitaxel so as to change the rate of enzymatic hydrolysis. Two ways of synthetic route were instituted by the turns of PEGylation to paclitaxel derivatives. PEGylation of 2′-OH protected paclitaxel derivatives with silyl group(method 2) was much more susceptible than that of 2′-OH paclitaxel derivative(method 1) by reason that nucleophilic reaction of mPEG-succinate could be affected by free 2-OH group. This PEGylation susceptibility on method 2 resulted in 78 % yield of prodrug, higher than 60 % on method 1. Physical properties of prodrugs and mPEG-succinate were not different enough to be separated each other by simple purifying method such as recrystallization and extraction, so Prep-HPLC was used to purify the prodrugs. After Prep-HPLC operated in gradient-eluent condition, the prodrugs were successfully purified, especially purity of PP7-5000a was over 99 %.

The solubility was defined by the amount of the prodrug compound at which the fluidity occurred and the haze was 0.5 or less than. All prodrugs had water-solubility of 400 mg/mL or more and exhibited improved water-solubility significantly, compared to 0.01 mg/mL or less of paclitaxel.

While the PEG-paclitaxel conjugated with simple ester bond was hydrolyzed in rat plasma with a $t_{1/2}$ of about 7 hr, the rates of hydrolysis for the prodrugs containing various self-immolating spacer group showed considerable variation with $t_{1/2}$ being from 0.94 min to 42.7 min in rat plasma. It appeared that by introducing the self-immolating spacer groups within conjugates, decreased steric hindrance of

paclitaxel in enzymatic breakdown process could lead to rapid rate of enzymatic hydrolysis. In case of non-enzymatic hydrolysis, PP7-5000a showed relatively slow hydrolysis rate in PBS and distilled water with $t_{1/2}$ of about 26 hr and 200 hr. These slow rates of non-enzymatic hydrolysis can guarantee the stability of the prodrug against the problem of paclitaxel precipitation caused by hydrolysis.

To evaluate the antimetastaic potential of paclitaxel and PP7-5000a, the effect of the drugs on the development of melanoma lung colonies in C57B/6 mice following i.v. administration of metastatic murine B16/F10 melanoma cells was estimated. Paclitaxel and the prodrug were administered intravenously, once daily for 10 days. Compared to vehicle, % reductions of melanoma lung colonies were 46.9 in the dose of 5 mg/kg paclitaxel, 24.5 in the dose of 5 mg/kg prodrug(0.71 mg paclitaxel equivalent/kg), and 40.0 in the dose of 10 mg/mL prodrug(1.42 mg paclitaxel equivalent/kg). It might be considered that the efficacy of the prodrug, in equivalent dose of paclitaxel, is higher than that of paclitaxel. The enhanced efficacy of paclitaxel by the prodrug might have resulted from the longer circulating lifetime of paclitaxel and the specific affinity of the prodrug for tumor cells.

Keywords : paclitaxel, PEGylation, self-immolating spacer, enzymetic hydrolysis, steric hindrance, antimetastatic potential, circulating lifetime.

제 1 장 서 론

최근 급격한 현대사회로의 발전에 의한 환경오염과 생활습관의 변화 등 여러 가지 요인들로 인하여 암의 종류 및 발생빈도가 날로 증가하는 추세이다. 우리나라의 경우 암으로 인한 사망자수가 2002 년을 기준으로 전체사망자수의 25.5 %에 해당하여 암으로 인한 사망이 사망원인의 1 위를 차지하고 있으며 다른 주요 사망원인인 뇌혈관 질환, 심장질환에 의한 사망은 지난 10여 년 동안 감소하는 반면에 암으로 인한 사망은 지속적으로 증가하고 있다. 우리나라뿐만 아니라, 세계보건기구(World Health Organization)의 산하기구인 국제암연구소(International Agency of Research on Cancer) 소속 기술역학부의 자료에 따르면, 전 세계적으로 매년 620만 명이 암으로 사망하고 1,010만 명이 새롭게 암에 걸린다고 보고하고 있다. 이러한 암이 인류에 주는 심각성으로 인하여 치료방법에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다.

암을 치료하는 방법은 크게 외과적 수술, 방사선요법, 화학요법으로 분류할 수 있으며 그 외에 면역요법, 호르몬요법, 생물학적 치료 등이 있다. 암세포의 발생이 국부적인 경우 국소요법인 수술과 방사선요법이 사용되며, 고형암이지만 초기에 발견되지 못하여 암이 전신에 퍼져있거나 백혈병, 다발성 골수종 등과 같은 혈액암과 악성림프종과 같이 발병초기부터 전신암인 경우 화학요법을 사용해야만 한다. 또한 국소요법에 의한 암의 제거 후에도 눈에 띄지 않는 암세포의 제거 및 재발방지를 위해 화학요법이 병행될 뿐만 아니라 수술 전 암의 크기를 줄여 수술을 용이하게 하는 선행요법으로도 사용되기 때문에 암의 치료방법들 중에서 화학요법이 갖는 비중은 매우 큼을 알 수 있다.

항암화학요법의 치료제로는 1942 년 nitro mustard인 mechlorethamine이 처음 사용된 이래 최근 화학요법제 중에서 가장 주목받고 있는 치료제인 파클리탁셀(Paclitaxel, Taxol®)에 이르기까지 다양한 계열의 많은 화합물들이 암치료를 위한 약물로서 사용되어 왔다.

1.1 파클리탁셀*(Paclitaxel,Taxol®)*

1.1.1 파클리탁셀의 화학구조와 항암작용 기전

주목나무과 식물에서 추출로 얻어지는 taxoid(taxene diterpenoid) 천연화합물들은 그림 1과 같이 tricyclopentadecane 고리체계를 갖거나 그와 유사한 골격을 갖으며 표 1에서처럼 여러 종류의 곁사슬을 갖는다. 또한 그림 2와 같이 중심부위의 골격에는 변화 없이 C-4, C-5, C-20에 여러 종류의 관능기를 갖을 수 있다.[1~5] 이러한 taxoid 화합물들은 세포독성뿐만 아니라 심장독성을 갖는 등 여러 가지 생물학적 작용을 하는 것으로 알려져 있다.[6~12]

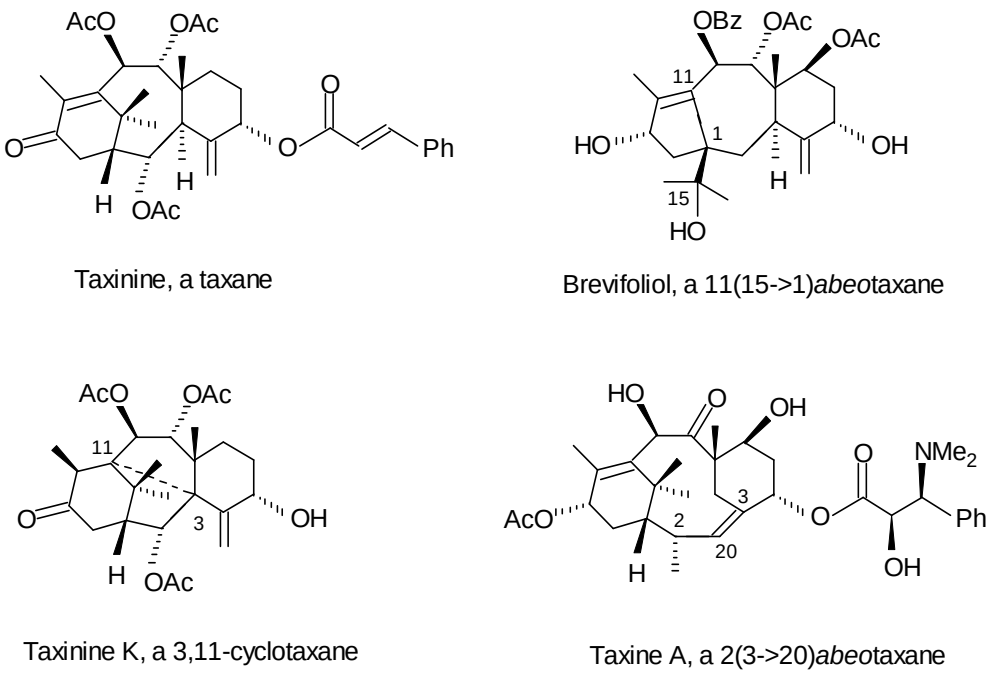
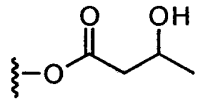
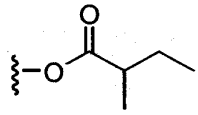
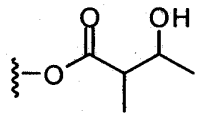
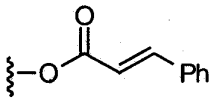
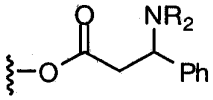
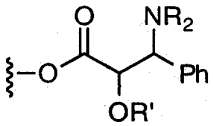
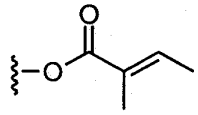
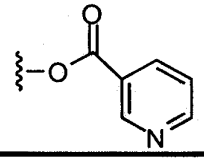


Figure 1. Skeletal types of natural toxoids.

Table 1. Common side chain of taxoids.

Structure	Name	Abbreviation
$-OCOCH_3$	Acetate	Ac
$-OCO(CH_2)_4-CH_3$	Hexanoate	-
$-OCO(CH_2)_2-CH_3$	Butyrate	-
	β-Hydroxybutanoate	-
	α–Methylbutanoate	MeBu
	α-Methyl-β-Hydroxybutanoate	-
	Cinnamate	Cinn
	Winterstein acid	-
	Phenylisoserinate	-
-OCOPh	Benzoate	Bz
	Tiglate	Tigl
	Nicotinate	-

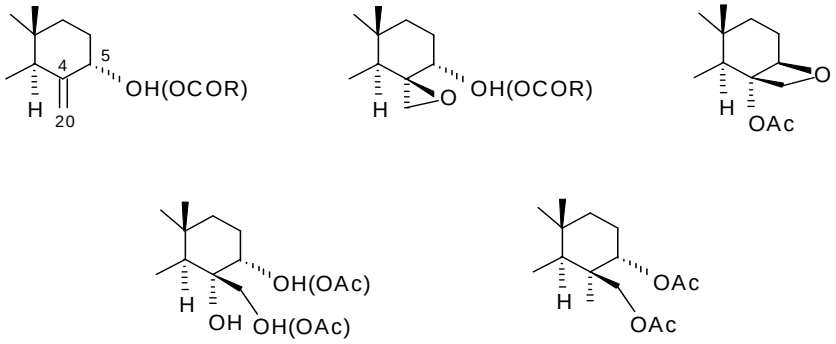


Figure 2. C-4/C-5/C-20 Functionalization types of taxoids.

최근 난소암, 유방암, 폐암 등의 치료효과가 매우 탁월하여 암치료의 화학요법제로 주목받고 있는 파클리탁셀 역시 diterpene계 천연화합물로 태평양 주목나무 껍질로부터 추출되는 taxoid 화합물들 중 하나이다. 1971 년 서부 주목나무로부터 처음으로 추출되었으며 화학명은 5β, 20-epoxy-1, 2α, 4, 7α, 10β, 13α-hexahydrotax-11-en-9-one-4, 10-diacetate-2-benzoate-13-ester with (2R, 3S)-N-benzoyl-3-phenylisoserine으로 그림 3과 같이 매우 복잡한 구조를 갖는 흰색 분말형태의 화합물이다.[13~16)]

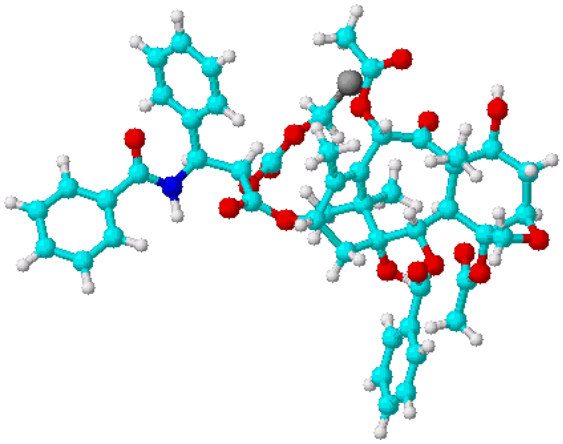


Figure 3. Chemical structure of paclitaxel.

항암제의 종류를 생화학적 작용기전으로 분류하면 알킬화제, 대사 길항제, 인터칼레이터, 핵산 절단제, 유사분열 저해제, 호르몬 및 항 호르몬제, 생리활성 조절제 등으로 나눌 수 있으며, 파클리탁셀은 유사분열 저해제의 범주에 포함된다.[17~19] 유사분열 저해제의 경우 그림 4와 같은 진핵세포의 세포분열 주기 중 유사분열기(M phase)에서 세포증식을 막는 역할을 한다. 하지만 지금까지 알려진 유사분열 저해제와는 달리 파클리탁셀은 튜불린(tubulin) 단백질로 구성된 세포내 미세관(microtubule)과 특이한 상호작용을 함으로써 세포증식을 억제하는 화합물이다.[20]

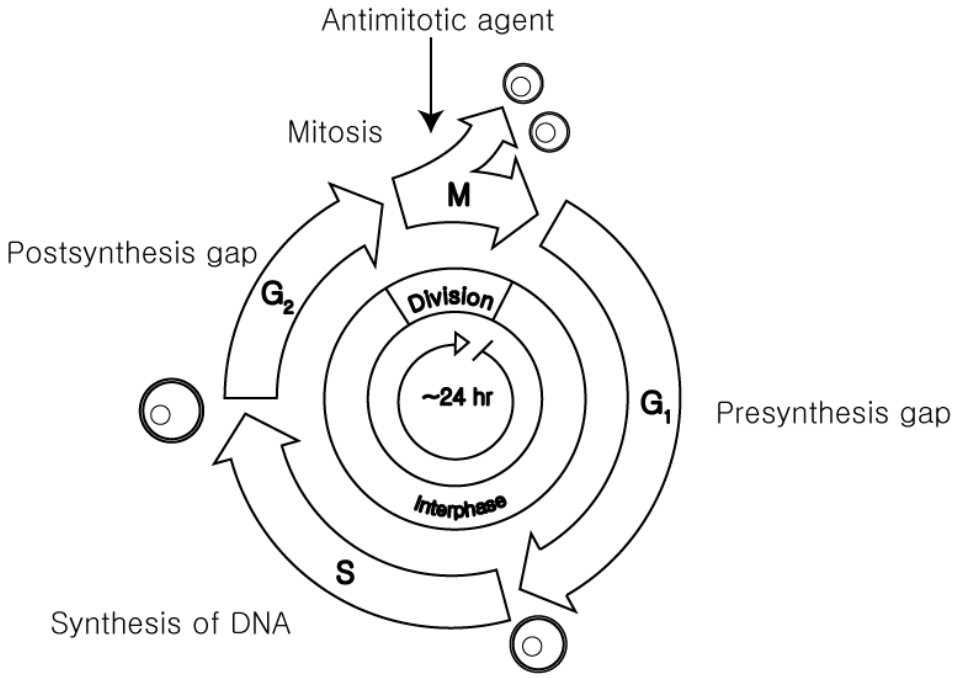


Figure 4. The MELC(murine erythroleukemic cells) cycle.

모든 진핵세포의 유사분열을 통한 세포분열에서 염색체를 분리시키는 방추(spindle)는 미세관들에 의해서 이루어지며, 미세관은 α-튜불린(α-tubulin) 과 β-튜불린(β-tubulin)의 결합에 의해 생성된 헤테로화합물의 중합에 의해서 형성되는데 그 형성과정은 그림 5와 같다. 이 과정에서 튜불린의 농도가 임계농도보다 더 낮아지게 되

면 더 이상 미세관을 형성하지 않게 된다. 미세관의 형성과 밀접한 관련이 있는 임계 농도는 온도, pH 및 미세관과 관련된 단백질 등의 영향을 받으며 또한 파클리탁셀이나 기타 다른 유사분열 저해제들의 영향을 받는다.[21~24)]

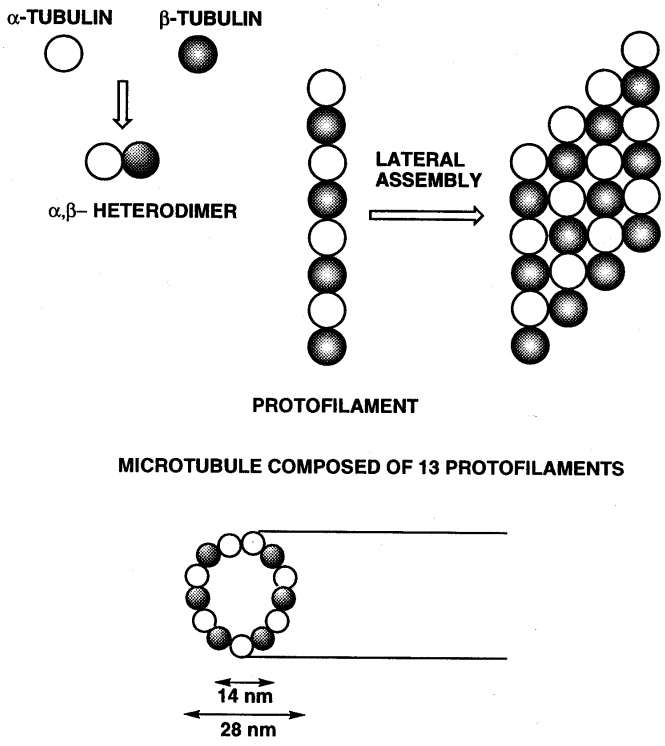


Figure 5. Assembly of tubuline monomers into a microtubule structure.

그림 6과 같이 미세관의 양쪽 끝은 조합되는 한쪽 끝부분(+)과 분해되는 다른 한쪽 끝부분(-)으로 되어 있으며, 평형에서는 튜불린이 미세관을 형성하기 위해 첨가되는 속도와 미세관이 분해되어 다시 튜불린으로 되는 속도가 일정하여 미세관의 길이의 변화는 없지만 vinblastine 또는 파클리탁셀과 같은 유사분열 저해제들이 존재하게 되면 이와 같은 동력학적 거동이 제약을 받게 된다.[25,26)] 파클리탁셀을 제외한 유사분열 저해제의 경우는 튜불린과 직접 상호작용하여 미세관의 형성을 저해하는 반면, 파

클리탁셀은 튜불린에 의해 형성된 미세관과 상호작용하여 미세관의 안정성을 좋게 함으로써 미세관으로부터 튜불린으로의 분해를 저해한다.[27~32] 이러한 미세관과 튜불린사이의 동력학적 거동의 변화는 유사분열기의 세포분열을 저해하여 결국 세포독성이 나타나게 된다.

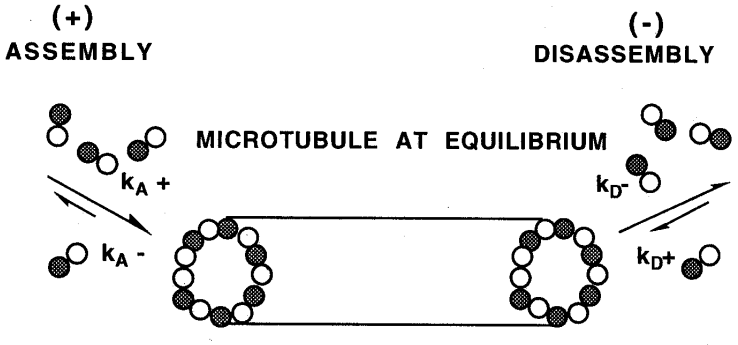


Figure 6. The dynamic behavior of microtubules at equilibrium.

1.1.2 파클리탁셀의 문제점

항암제로서의 우수한 약효에도 불구하고 파클리탁셀은 분자구조상 물에 대한 용해도가 매우 낮기 때문에 제제화에 많은 어려움이 있어 현재 정맥혈관 주사용으로 사용되는 제제의 경우 5 mL 용량의 유리병에 파클리탁셀 30 mg, Cremophor EL® 2.64 g 과 49.7 % 에탄올(1:1 v/v)로 구성되어 있다.[33~35] 이러한 조합의 정맥주사를 통한 처방은 Cremophor EL®에 의한 과민증과 유기용매인 알코올류에 따른 주사부위의 용혈현상, 근증, 근육통증 등의 여러 가지 부작용들이 유발되는 문제점을 가지고 있어 물에서의 용해도를 높이기 위한 파클리탁셀의 근본적 구조변화가 요구됨에 따라 파클리탁셀 유사화합물들의 합성 등 여러 가지 접근이 시도되어 졌다.[36~40]

파클리탁셀의 구조변화에 따른 파클리탁셀 유사화합물 개발에 있어서 파클리탁셀 자체의 구조-활성 관계는 매우 중요한 부분이다. 파클리탁셀은 그림 7를 보면 알

수 있듯이 다양한 작용기를 가지고 있어 구조적 변환 가능성은 많지만 이미 입증된 구조-활성 관계를 고려하여 약효에 반드시 필요한 oxetane ring, 2-benzoate와 4-acetate group, side chain 2R, 3S, 2′-hydroxyl group, 3′-phenyl group 등의 구조변화는 어렵기 때문에 항암활성의 큰 감소 없이 구조를 변화시켜 용해도를 증가시키기 위해서는 일부 구조만이 변화가 가능하다.[41)]

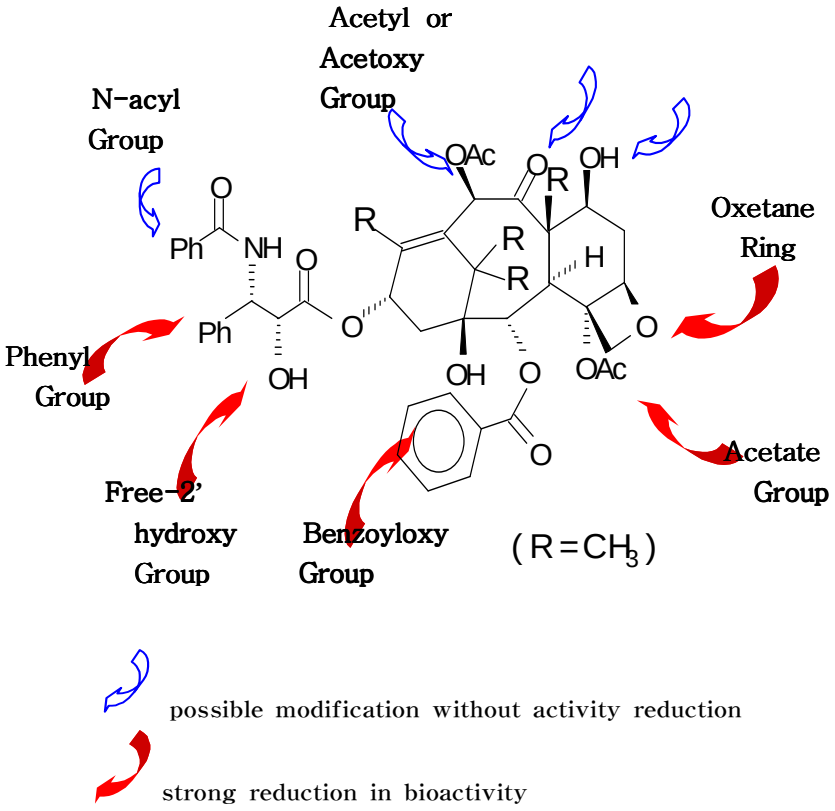
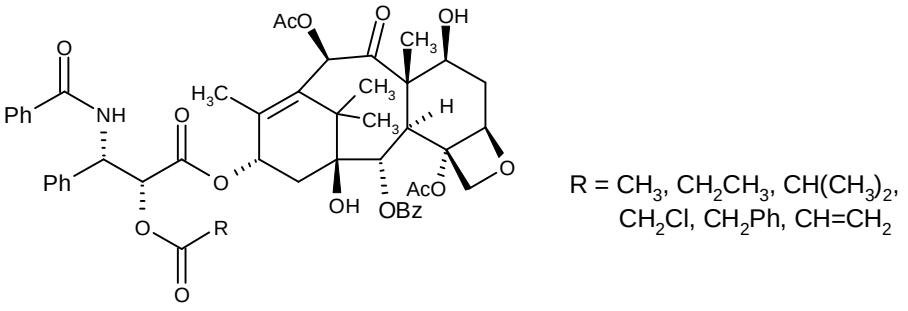


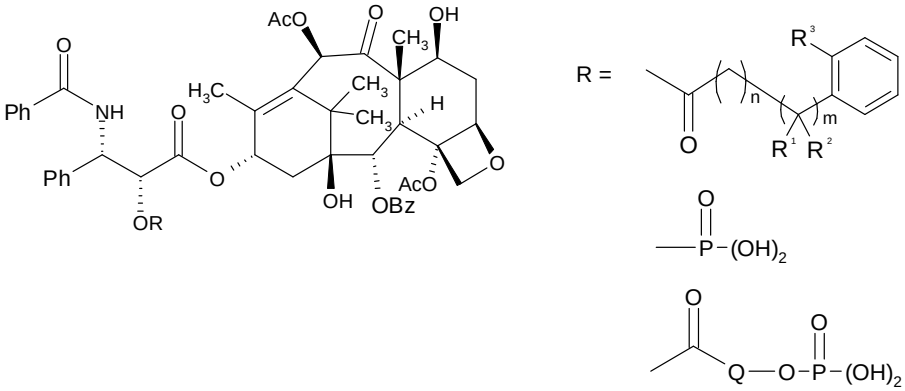
Figure 7. Structure-activity relationships of paclitaxel.

체내에서 효소에 의해 가수분해 되어 원래의 약물인 파클리탁셀로 전환되는 수용성 파클리탁셀 유사화합물을 개발하기 위한 노력의 일환으로 1993 년에 Bristol-Myers Squibb사에서는 그림 8과 같이 파클리탁셀의 2′-탄소와 7-탄소 위치에 여러 가지 치환체가 결합된 carbonate 화합물을 합성하였을 뿐만 아니라 phosphatase와 같

은 효소에 의한 분해와 자발적인 분해가 연속적으로 일어날 수 있는 여러 가지 인산염 파클리탁셀 프로드럭을 합성하였다. 그러나 이러한 화합물들은 주사용수에서의 불안정성과 10 mg/ml의 한정된 수용성으로 인하여 제제화에 문제점을 보였다.[42,43)]



(a)



(b)

Figure 8. C-2′carbonate derivatives(a) and phosphate paclitaxel prodrugs(b) synthesized by Bristol-Myers Squibb company.

1.2 프로드럭을 통한 항암약물의 전달

항암제의 개발을 위해 많은 과학자들이 세포생물학적 및 분자생물학적인 접근방법을 통해 연구해왔지만 암의 치료방법에서 가장 큰 문제점은 대부분의 경우 정상세포와 악성세포인 종양세포들과의 구분이 모호하여 정량적으로 효과적인 치료가 어렵다는 것이다. 특히 정상세포와 종양세포가 공유하고 있는 특성들은 종양만을 치료하는 화학요법제의 개발에 걸림돌이 되고 있다.

1.2.1 종양을 표적으로 하는 항암제

정상세포와 종양세포간의 유사성으로 인하여 종양만을 선택적으로 공격하기 위해서는 우선적으로 고려되는 사항은 종양부위의 국부화이다. 이러한 관점에서 시도될 수 있는 방법 중 하나는 종양과 관련된 특정 항원을 인식하면서 방사선 동위원소를 운반하는 항체와 대사 표지자를 활용하는 MRI(magnetic resonance imaging) 기술이다. 일단 종양의 위치를 감지하게 되면 종양에 직접 항암제를 주사하거나 약을 포함하는 수화겔을 배치 또는 종양의 중심부로 인도되는 혈액에 주입하는 방법을 통해 종양을 치료할 수 있다. 하지만 이러한 접근방법은 전이되거나 미세전이된 암에서 효과적인 치료를 기대하기는 어렵다.

종양에 직접 주입이 어렵거나 전이암처럼 치료제의 물리적 전달이 국부화되지 않는 경우라면 이상적으로 종양만을 공격목표로 하기 위해서는 전이된 임파절과 종양 덩어리의 선택적 인식이 높은 항암제의 체계적인 투여방법을 사용해야 한다. 특히 정상세포와 조직과는 공동인식이 거의 없거나 전혀 없고 많은 양의 항암제가 효과적으로 종양세포에 잡히거나 특정장기를 목표로 해야 한다. 비활성이거나 약한 활성의 약으로써 혈액안에서 순환되면서 모약을 방출하는 프로드럭의 경우 종양에 대한 활성과 활성잠재력이 필수적으로 요구되어진다. 이러한 종양을 표적으로 하는 치료방법은 크게 능동적인 방법과 피동적인 방법으로 구분된다.

1.2.2 능동적 종양 표적항암제

종양표지자에 대한 선택적 친화력을 갖는 시약을 사용하여 능동적으로 종양을 공격하는 항암제의 공격목표 부위는 세포레벨에서 악성 종양세포와 관련된 세포막 구성단백질, 수용체(receptor), 당단백질 또는 지질단백질로서 정상세포에서는 보이지 않고 종양의 괴사영역에서만 나타나거나 종양을 통과하는 혈관과 같은 보조조직과 관련되어 있다. 일반적으로 능동적 종양 표적항암제는 종양세포와 선택성이 있는 표적시약부분과 표적시약에 의해 전달되는 항암제부분으로 구성되어 있다. 능동적 종양 표적항암제의 표적시약부분은 정상세포의 인식 없이 종양세포에만 선택성을 갖고 결합할 수 있는 능력이 요구된다. 또한 표적이 아닌 세포와의 대사작용을 하는 시약을 피해 활성의 손실 없이 적재된 항암제의 유효량이 전달되어야 하며 암과 관련된 부위에서만 축적되고 신체에서 빠르게 제거될 수 있어야 한다. 항암제가 세포독성 화합물과 그 유사화합물인 점을 고려할 때 위 조건을 충족시키기 위해서 비활성이면서 목표부위에만 특정적으로 작용할 수 있도록 변형시킨 프로드럭의 개념이 도입되었다.[44)]

능동적 종양 표적항암제의 표적 시약으로는 항체, 호르몬 수용체 리간드와 비타민, 바이러스, 양분전달제 등이 사용된다. 특히 항체는 특정 항원과 가장 선택적인 상호작용을 하기 때문에 종양과 관련된 항원을 인식하는 항체의 경우 암에 대한 좋은 표적시약으로 고려되어져 IgG 또는 F(ab′)2, Fab, Fab′ 분절 등과 같이 손상되지 않은 항체가 표적시약으로 사용되어 왔다. 모노클론(monoclone) 항체를 사용하였을 경우 백혈병이나 림프종과 같은 혈액암에는 상당한 효과를 보여주는 것으로 보고되었지만 고형암에서는 항체의 0.001~0.01 % 만이 고형암에 도달할 뿐 많은 양이 종양주변 근육공간에 잡혀 좋은 결과를 보여주지는 못하였다.[45~50)] 이와 같은 고형암에 대한 낮은 약효는 종양과 관련된 밀집한 섬유기질과 내피층에 의해 형성되는 방벽에 의한 약물의 차단에 기인하며 또한 종양세포의 단단한 쌓임과 림프액 배수의 부재에 따른 높은 간극압력으로 발생하는 종양중심부로의 물집유입의 차단 및 불특정 결합과 포획에 기인한다고 제안되었다.[51,52)] 이외에도 종양과 관련된 많은 항원들이 확인되고 항체들의 특성이 밝혀짐에 따라 리보솜 금지단백질과 같은 종양혈관 선택성 항체를 이용하여 종양

혈관의 형성을 막음으로써 항암효과를 보이는 항암제 등 다양한 항체-항암제 컨쥬게이트(conjugate)들에 대한 연구들이 진행되고 있다.[53~59]

1.2.3 피동적 종양 표적항암제

피동적 종양 표적항암제라는 새로운 접근방법은 종양의 미세혈관구조에 따른 종양혈관의 과잉투과와 종양조직의 림프액 방출시스템의 비성숙으로 인하여 가능하게 되었다.[60~66] 종양의 미세혈관은 종양이 발생한 장기와 조직이 종양발생 이전에 가지고 있는 혈관과 혈관생성 요인의 방출에 의해 새롭게 생성된 혈관으로 구성된다. 종양덩어리 내에서 약뿐만 아니라 영양분의 분포는 혈류와 혈관의 직경, 길이, 수 등 기하학적인 형태에 의존하게 되는데, Jain 등 여러 학자들에 의해 종양의 혈관구조는 종양의 발생된 위치 및 종양의 유형과 성장속도에 따라 변하며 종양혈관 내에서의 점성저항 때문에 적혈구의 흐름속도가 정상조직보다 종양에서 더 느리다고 제안되었다.[67~71] 종양이 성장함에 따라 반괴사영역과 안정한 혈관화 영역이 형성되고 추가로 세포층이 첨가되면서 대사경사가 발생하며 이때 형성된 종양혈관의 공간 기하형태와 거시적 미시적 형태가 정상혈관과는 다르며 이러한 특성들로 인하여 종양으로의 약의 분배는 불균일하게 된다고 보고되었다.[72~74]

종양의 혈관전도도와 투과성은 정상세포보다 높아 다공성이며 양전하를 갖는 분자일수록 투과성이 더 크다. 구멍의 크기와 투과성은 종양의 유형뿐만 아니라 부분적으로 혈액 속 면역단백질의 환경에 따라 변하게 된다. 또한 종양의 높은 간극흐름압력은 확산과 대류에 의해 지배되는 분자운동, 즉 분자의 출입과 머무름에 중요한 역할을 담당한다. 큰 종양일수록 혈관 교환변화가 감소하며 종양 중심에서의 대류전달은 종양의 외부보다 더 적게 된다. 종양과 연관된 위와 같은 해부학적 특성 및 압력경사는 더 큰 분자일수록 정상세포보다는 종양에 더 오래 머물러 축적될 수 있음을 의미한다.[75~81]

피동적으로 종양에 축적되어 종양을 치료하는 피동적 종양 표적항암제는 여러 특성들이 요구된다. 우선, 종양에 축적될 수 있도록 충분한 순환수명을 가져야 하고 정

상조직으로의 축적은 거의 없으면서 원하는 약의 국부농도를 달성하기 위해서는 목표로 하는 세포들에 의해서 받아들여 질 수 있는 능력이 필요하다. 또한 순환과정 도중 약의 활성 및 잠재활성의 감소를 막기 위해 목표가 아닌 세포와 대사작용을 하는 물질을 피함으로써 항암활성이 원하는 부위로 전달될 수 있어야 한다. 이러한 피동적 종양 표적항암제에서 요구되는 조건을 충족시키기 위해서 고분자와 저분자항암제 컨쥬게이트의 사용이 제안되었다.[82,83)]

고분자와의 화학적 결합에 의해 만들어진 고분자-항암제 컨쥬게이트와 같은 프로드럭이 저분자 항암제의 약효를 개선시킬 수 있다는 전망으로부터 dextran, inulin, polysaccharide B와 다양한 블록 공중합체들이 개발되었다.[84~91)] 고분자를 이용한 컨쥬게이트들 중 Maeda와 그 동료들에 의해 합성된 polystyrene-co-maleic acid half-n-butylate(SMA)와 세포독성 화합물인 neocarzinostatin(NCS)의 컨쥬게이트(SMANCS)의 경우(그림 9) 면역억제 또는 골수독성이 거의 없으면서 간동맥 처방에 의한 초기 간암의 치료효과가 있음이 많은 사례에서 발견되었다. Maeda는 SMANCS의 고분자부분이 종양축적과 머무름을 촉진시키며, 이러한 고분자의 향상된 투과와 머무름 효과는 종양혈관구조와 혈류에 영향을 받는다고 보고하였다. 또한 프로드럭이 종양축적을 선호하는 경향을 보이기 위해서는 컨쥬게이트에 사용되는 고분자의 분자량이 5만 이상이어야 한다고 제안하였다.[92~94)]

SMANCS 이외에도 carboxymethyl dextran, alginic acid, polyglutamate 또는 carboxymethyl cellulose 등의 고분자를 이용한 daunorubicin의 컨쥬게이트와 doxorubicin의 N-(2-hydroxypropyl) methylacrylamide(HPMA) 컨쥬게이트 등 여러 가지 고분자-항암제 컨쥬게이트들에 대한 연구 및 임상실험들이 진행되어 왔다.[95~97)]

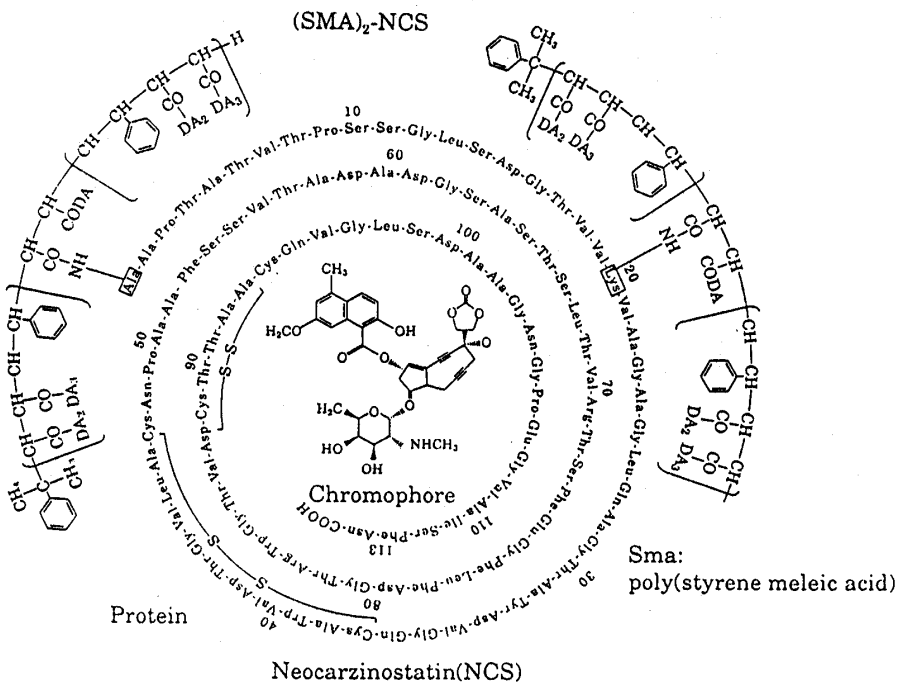


Figure 9. Illustration of the chemical structure of SMANCS.

1.3 Poly(ethylene glycol)(PEG)

*1.3.1 Poly(ethylene glycol)(PEG)*의 기본물성

PEG는 일반적으로 ethylene oxide 수용액의 음이온중합에 의해 제조되는 polyether diol로 그림 10과 같은 구조를 갖는 ether계 고분자화합물이다. anhydrous methanol 또는 methoxyethoxy ethanol 등을 이용한 중합의 개시는 methoxy-PEG (mPEG)과 같은 한쪽 말단의 수산화기가 mono-alkyl로 치환된 PEG를 합성 가능케 하며, 중합반응의 조절을 통하여 낮은 분자량분포(Mw/Mn < 1.05)를 갖는 다양한 분자량의 중합체를 얻을 수 있다. PEG는 양친성 화합물로써 극성과 비극성의 중간적인 성질을 띠여 물에 용해될 뿐만 아니라 대부분의 유기용매에 용해되며 그 구조적 단순성에도 불구하고 여러 가지 특이한 물성을 갖기 때문에 최근 생화학의 많은 응용분야에서 널리 사용되고 있다.[98)]

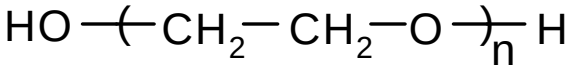


Figure 10. Chemical structure of PEG.

수용액환경일 때 PEG는 동일한 분자량을 갖는 다른 물질에 비하여 상당히 큰 배제부피를 갖는 유동성 분자임을 고분자사슬의 이완시간 측정과 겔 투과 크로마토그래피를 이용한 실험에서 확인할 수 있다. 이러한 성질로 인하여 단백질의 반발을 유발하기 때문에 가장 낮은 단백질 또는 세포흡수를 보인다. 그 결과 면역시스템에 의해 인식되는 단백질과의 결합과 박테리아의 표면성장을 막음으로써 비면역성과 비항원성을 보인다.[99,100)] 또한 분자량이 400 이하인 경우 약간의 독성을 보일 수 있지만 신장이나 간장의 경로를 통하여 쉽게 제거될 수 있으며, 분자량이 클 경우 거의 독성을 보이지 않기 때문에 다양한 약물과 배합하여 인간의 정맥에 주입하거나 경구 및 피부로의 사용이 FDA에 의해 인증되었을 뿐만 아니라, PEG 자체가 HT-29 직장암세포의 자살

을 유도하는 것으로 Roy에 의하여 보고되었다.[101] 특히 PEG 말단에 존재하는 수산화 작용기는 다른 약물과의 화학반응을 통한 결합형성이 용이하기 때문에 물에 용해되지 않는 약물에 수용성인 PEG를 도입시켜 수용액화 할 수 있다는 큰 장점을 가지고 있다.

1.3.2 약물 전달제로서의 *PEG*

PEG을 이용하여 약물을 전달시키기 위한 컨쥬게이션 방법으로는 약물에 PEG을 비가역적이거나 가역적인 공유결합을 통해 도입시키는 방법과 이온적 또는 친유성 상호작용을 통해 회합체를 형성시키는 방법이 있다. 이와 같은 방법들의 적절한 활용으로 약물의 생리활성 및 순환수명 또는 약물방출의 속도를 고려한 여러 형태의 PEG-약물 컨쥬게이트가 가능하다.

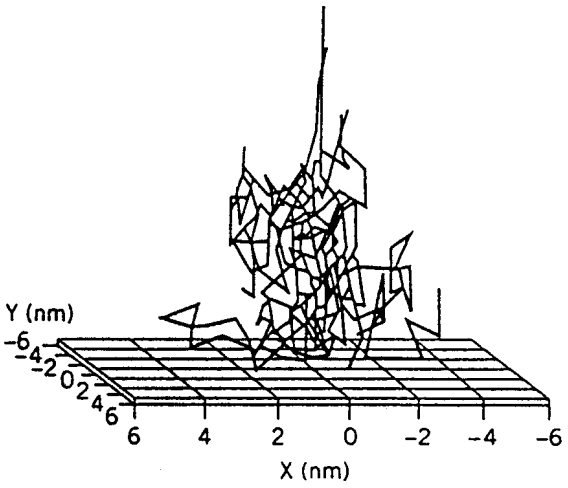


Figure 11. Computer simulation of a "conformational" cloud formation by a surface-attached PEG.

약물의 안정성을 높이는 역할을 수행하고 순환수명을 연장시키는 PEG의 기전은 완전히 밝혀지지 않았지만 인식과 수용에 있어서 PEG의 입체장애효과에 의해 분자레벨에서는 퇴화효소 또는 수용체와의 상호작용이 감소하며 세포레벨에서는 세망내피계와 옵소닌화에 의한 포획이 차단되기 때문이다. 이러한 PEG의 효과에 기여하는 중요한 요인은 PEG사슬의 유연성이라고 Torchilin에 의해 제안되었다.[102,103] 그림 11과 같이 PEG사슬은 구조적 구름을 형성하여 접촉부위를 보호하게 되며 PEG분자의 수와 위치는 접촉부위를 보호하는 정도와 순환시간의 연장정도에 영향을 준다.[104] 비록 비가역적 공유결합에 의한 컨쥬게이트 역시 활성유지가 가능함에도 불구하고 입체장애에 따른 약물의 활성금지 현상을 방지하여 프로드럭의 효율을 증진시키기 위해서는 비가역적인 공유결합에 의한 컨쥬게이트에 비해 가역적인 컨쥬게이트가 더 이상적임을 알 수 있다.

1.3.3 단백질의 비가역적 *PEGylation*

치료제로서 단백질의 잠재적 가치는 우수함에도 불구하고 많은 인간의 치료단백질은 짧은 순환반감기와 낮은 안정성으로 인하여 사용에 어려움을 겪고 있으며 치료효과를 얻기 위해서는 많은 양의 사용이 요구되어 면역반응을 발생시킬 확률이 크다는 단점을 가지고 있다.[105] 단백질이 갖는 단점을 보완하기 위해서 mPEG과 공유결합시키는 방법(PEGylation)이 Abuchowki, Davis와 공동연구자들에 의해 1977년에 최초로 보고되었다.[106] PEGylation에 의한 PEG 컨쥬게이트는 순환반감기의 주목할 만한 증가를 보였으며 생리활성을 유지하면서 면역반응성과 항체반응의 감소를 보였다. 이러한 장점들로 인하여 단백질의 약물전달분야에서 PEGylation의 활용이 활기를 띄게 되었으며, 면역결핍과 관련된 질병치료에 사용이 승인된 Enzon사의 PEGylated bovine adenosine deaminase(ADAGEN®)의 성공적인 상업화를 필두로 급성 임파구성 백혈병 치료를 위한 생리활성 단백질인 L-asparaginase의 PEG 컨쥬게이트(ONCASPAR®), C형 간염치료를 위한 PEG modified α-interferon (PEG- INTRON®) 등 단백질의 전달

을 위한 PEG의 사용이 광범위하게 진행되고 있다.[107~110)]

1.3.4 항암제의 *PEGylation*

대부분의 저분자 항암제는 물에 거의 녹지 않기 때문에 약물전달에 있어 많은 어려움을 발생시키고 정상세포로의 작용에 의한 여러 부작용을 유발한다. PEG는 이러한 항암제들의 수용성화에 대한 수단으로써 뿐만 아니라 SMANCS와 HPMA-Dox 공중합체의 연구에서 밝혀졌듯이 통상적인 고형암이 갖는 거대분자 약물에 대한 증가된 투과와 머무름(EPR) 효과로 인한 약전달 수단으로써의 활용이 가능한 이상적인 화합물이다.

Ikada와 그 동료들에 의하여 종양의 증가된 투과와 머무름 효과에 따른 PEG의 종양축적 및 순환수명은 PEG의 분자량에 의존함이 보고되었다.[111)] 이 실험에서 종양의 유무에는 상관없이 PEG의 분자량이 증가함에 따라 혈액에서 검출되는 PEG의 양은 증가하였고 그림 12에서와 같이 실험에 사용된 모든 분자량의 PEG가 정상세포보다는 종양세포에 상당히 많은 양이 더 축적되며, 특히 분자량이 20만인 경우 가장 많이 축적됨을 보였다. 그림 13은 이러한 결과를 종합하여 약물전달 시스템에서 PEG 분자량과 종양축적 및 순환수명과의 상관관계를 나타낸 것으로 PEG의 분자량이 증가할수록 신장에 의해 제거되는 PEG량의 감소에 의한 순환수명의 증가와 증가된 투과와 머무름 효과에 의한 축적량의 증가를 보인다.

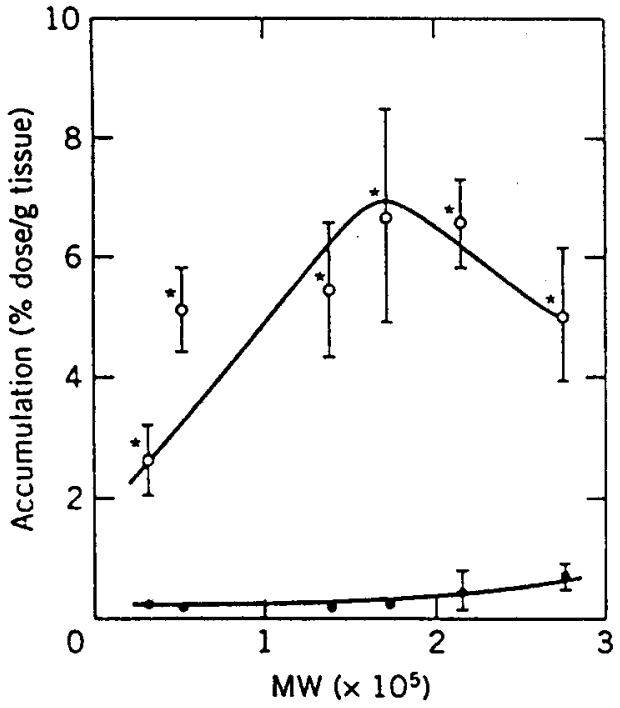


Figure 12. Effect of PEG molecular weight on PEG accumulation at the tumor tissue and the normal muscle after intravenous injction into mice with tumor mass at their footpad(3 hr after injection): (○) tumor tissue, (●) normal muscle.

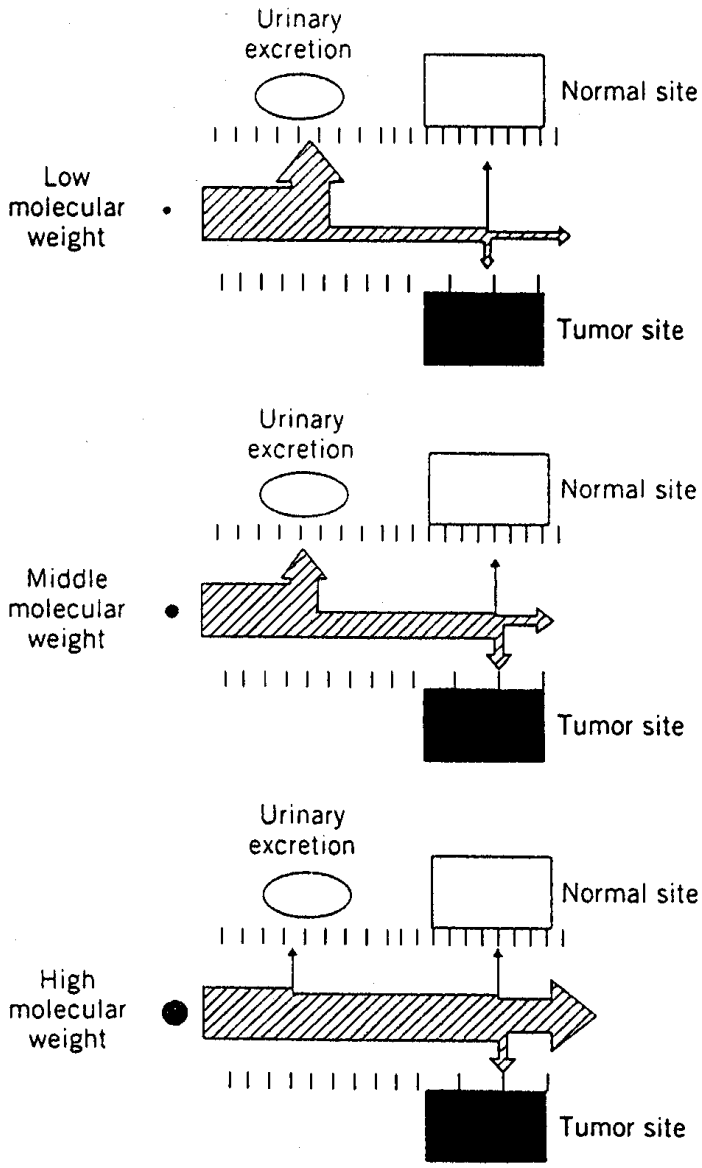


Figure 13. Schematic representation of models for PEG accumulation of low, middle, and higher molecular weights at tumor and normal tissues after intravenous injection.

약물전달 분야에서 고분자-단백질의 영구결합에 의한 PEGylation이 성공적인 반면 저분자의 항암제에 대한 PEGylation의 경우 임상적으로 우수한 화합물이 되지는 못했다. 예로 안정한 amide결합에 의한 doxorubicin의 PEG 컨쥬게이트는 단지 in-vitro 결과만 보고되었고 영구적인 PEGylation에 의한 PEG-파클리탁셀 컨쥬게이트는 in-vitro에서 모약보다 약효가 10^3 배 낮음이 보고되었다.[112,113] 이러한 약효감소 현상은 거대한 PEG 치환체가 목표로 하는 세포로의 활성을 막거나 좋은 약효를 얻을 수 있는 농도까지 세포에 도달하지 못하기 때문에 발생되는 것으로 항암제의 전달을 위한 PEG-항암제 컨쥬게이트의 약효를 증대시키기 위해서는 영구적인 PEGylation이 아닌 보다 더 효과적인 접근방법이 요구된다.

신약개발 분야에 포함되는 프로드럭의 설계는 약전달의 최적화와 연관된다. 프로드럭은 모약의 유도체로써 생리적으로는 비활성이지만 신체내에서 효소에 의한 변형으로 활성을 갖는 약을 방출하기 때문에 모약보다 향상된 전달성질을 갖는다. 특히 PEG 컨쥬게이트의 경우 프로드럭의 용해도는 항상 모약보다 월등히 우수하여 모약의 물에 녹지 않는 성질을 극복하기 때문에 보다 효과적인 약전달이 가능하다. 약의 방출속도는 PEG-약물의 결합에 의존하기 때문에 컨쥬게이트를 형성하는 결합의 안정성과 조절된 분해는 프로드럭의 효능을 결정한다.[114~116]

일반적으로 프로드럭에 가장 많이 사용되는 결합은 esters, carbonates와 hydrazones와 같은 가수분해 가능한 결합 또는 효소에 의해 분해 가능한 결합이다. 또한 특정 amide결합은 peptidase 또는 cathepsins에 의해 리소좀부분에서 뿐만 아니라 혈청 내에서 분해될 수 있다. 사용된 특정 결합의 분해로 고분자부분과 모약부분으로 나누어지면서 효과적이고 지속적인 방법으로 모약의 방출이 가능하게 되는데, 프로드럭의 이러한 형태는 두 부분으로 구성된 프로드럭 또는 두 부분으로 분해되는 프로드럭이라고 한다. 두 부분으로 분해되는 프로드럭 중 문헌에서 가장 빈번하게 모습을 나타내는 결합은 ester결합으로 모약의 수산화작용기에 쉽게 유기산작용기로 결합시킬 수 있기 때문이다. 그 예로 1994 년에 합성된 파클리탁셀의 2'-PEG_{5000} esters를 들 수 있으며 pH 7.4의 PBS 완충용액에서 5.5 시간의 반감기 값과 rat 혈청에서 1시간의 반감기 값을 보임으로써 프로드럭의 기능으로써의 분해가 예상된 형태로 일어남

을 알 수 있었다.[117)]

두 부분으로 분해되는 프로드럭에 대한 연구는 Enzon사의 연구진에 의해서 캄토세신(camptothecin), 파클리탁셀과 포도필로톡신(podophyllotoxin, Podo)과 같은 항암제의 전달을 위해 광범위하게 진행되었다. 캄토세신은 camptotheca acuminata라는 나무에서 추출되는 alkaloid 화합물로써 그림 14와 같은 lactone 고리와 3차 알코올의 특징적 구조를 가지고 있으며 세포복제와 성장을 위해 필요한 DNA 복구효소인 topoisomerase의 금지작용 화합물로 파클리탁셀과 유사하게 물에 대한 용해도가 매우 낮다는 단점이 있다.[118,119)] 물에 대한 용해도 문제를 해결하기 위해서 사용된 최초의 방법은 아미노그룹을 이용하여 염의 형태를 갖는 프로드럭을 합성하는 것이었으나 분자량 40,000의 PEG carboxylic acid의 PEGylation을 이용한 non-ionic α-alkoxy ester의 형태로 수용화 시킬 수 있음이 1990 년에 보고되었다.[120,121)] 20-캄토세신 $PEG_{40,000}$ ester (PEG-α-CPT) 프로드럭은 물에 대해 0.0025 mg/mL인 캄토세신의 용해도를 200 mg/mL로 향상시킴은 물론 in-vivo에서 가수분해에 의해 점진적으로 캄토세신을 방출하였다. 또한 활성에 필수적인 lactone 고리가 생리학적 조건에서 PEG에 의해 안정화됨을 보였다.[122)]

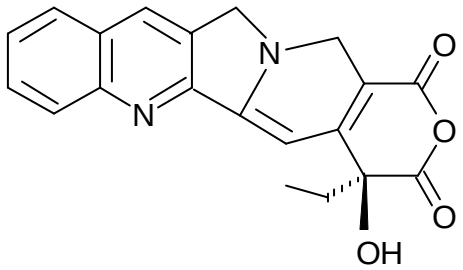
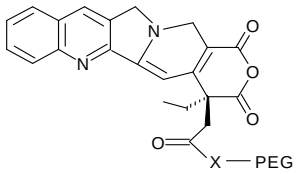


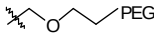
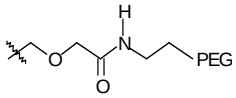
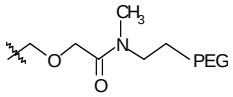
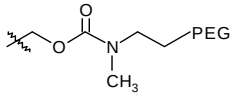
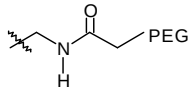
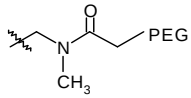
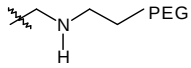
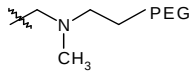
Figure 14. Chemical structure of 20(s)-camptothecin.

파클리탁셀과 캄토세신의 단순한 α-alkoxy esters의 약효가 증명되면서 프로드럭의 혈장내 반감기를 변화시키고 치료효과를 증진시키기 위한 노력으로 PEG부분과 약물의 작용기 사이에 다양한 간격자(spacer)그룹을 도입시키는 방법이 고려되었고 캄토세신, 파클리탁셀과 Podo의 프로드럭에 응용된 실험들이 보고되었다.[123,124] 표 2에서 볼 수 있듯이 PBS 완충용액(pH 7.4)에서 다양한 PEG-간격자-캄토세신 프로드럭들의 가수분해 속도변화에 따른 반감기가 낮게는 0.2 시간에서 높게는 102 시간까지 변화하였다. 이러한 가수분해속도의 변화는 NH 또는 NH(C=O) 작용기의 분자내 이웃도움에 기인하는 것이며 컨쥬게이트내 아미노산의 간격자그룹의 종류에 따라 α-치환에 의한 입체장애는 효소적 분해와 비효소적 분해에 있어서 속도차이를 분명하게 하였다.[125] In-vitro에서의 속도론적 변화는 in-vivo에서 약물의 약효와 안정성에 영향을 줄 수 있으며 단순히 속도론적 변화에 따른 영향뿐만 아니라 간격자종의 특성은 프로드럭의 효용성에 밀접한 관계가 있다.[126] 특정 아미노산 간격자의 도입은 pH 또는 esterase에 의해 아미노산과 캄토세신 사이에 위치하는 ester결합의 가수분해가 쉬운 반면 또다른 아미노산의 도입은 종양에서 exo-peptidase 또는 단백질 가수분해 효소(proteinase)들에 의해서 PEG와 아미노산 사이에 위치한 amide결합의 분해가 초기에 촉진될 수 있다. 후자의 경우 lactone의 안정화에 의한 증가된 생리활성을 갖는 아미노산-캄토세신 컨쥬게이트를 생성하게 된 후 ester결합이 분해되어 캄토세신을 방출하게 된다. 그 대표적인 예가 PEG와 캄토세신을 alanine으로 결합시킨 프로드럭(PROTHECAN®)이며 임상실험 결과 부위종양과 만성적인 질환에서 항암효과를 보이는 것으로 보고되었다.[127]

PEG-파클리탁셀 프로드럭에서도 간격자의 도입이 시도되었다.[125] 캄토세신과 동일하게 glycine을 이용한 PEG-glycine-파클리탁셀이 Greenwald와 그 동료들에 의해서 합성되었으며 세포독성평가와 IC_{50}분석 및 종양축적 연구결과가 보고 되었다.[128] 표 3은 세포독성과 가수분해 속도를 나타낸 것으로 표본과 비교했을 때 컨쥬게이트의 경우 21.8 일의 수명증가를 보였고 순수 파클리탁셀 보다 19 일의 수명증가를 보였으며 전체투여량 100 mg/kg에서 수명이 82 %까지 증가하는 독성완화 효과를 보였다. 또한 전체 모델에서 종양성장억제 효과가 10 % 증가함을 보였다. Glycine을 alanine 간격자

Table 2. In-vitro and in-vivo results of PEG-camptothecin derivatives.

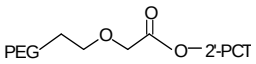
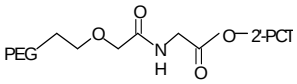


X-PEG	IC_{50}(nM) P388/O	$t_{1/2}$(h)		P388 in-vivo[a)]		
		PBS pH 7.4	Rat Plasma	Mean time to death(days)[b)]	%ILS[c)]	Survivors on day 40
Control	-	-	-	13.0	-	0/10
Camptothecin	7			38.0*	192	7/10
	15	27	2	38.0*	192	9/10
	16	5.5	0.8	17.4†	34	4/10
	21	27	3	31.6*†	143	6/10
	18	28	5	23.4	80	0/10
	12	40	6	35.0*	169	8/10
	15	97	10	19.3*†	48	0/10
	24	12	3	30.6*	135	0/10
	42	102	>24	21.4*†	65	0/10

[a)]Camptothecin or prodrug derivatives were given in equivalent dose of camptothecin(total dose of 16 mg/kg) daily[intraperitoneal ×5], 24h following an injection of P388/0 cells into the abdominal cavity with survival monitored for 40 days. [b)]Kaplan-Meier estimates with survivors censored. [c)]Increased life span(%ILS) is (T/C-1)×100. *Significant(P<0.001) compared to control(untreated). † Significant(P<0.001) compared to camptothecin.

로 바꿔 사용한 PEG-alanine-파클리탁셀의 경우 물에 대한 용해도는 파클리탁셀 5 mg/mL에 해당하는 125 mg/mL로 많은 향상을 보임과 동시에 단순한 ester 결합의 프로드럭와 비교했을 때 낮은 독성과 in-vivo에서 증가된 항암활성을 보였다.[123)]

Table 3. In-vitro and in-vivo results PEG-paclitaxel derivatives.

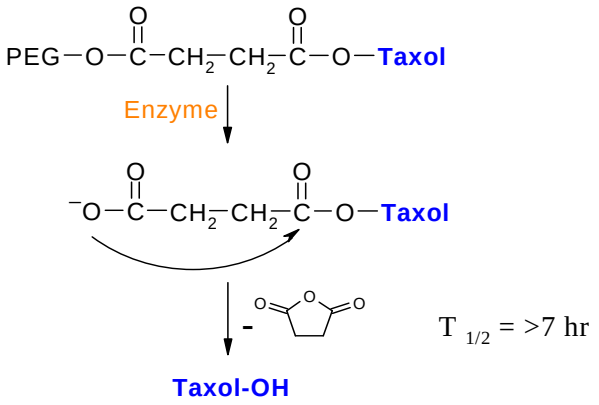
Compound	IC_{50}(nM) P388/O	$t_{1/2}$(h)		P388 in-vivo[a)]		
		PBS pH 7.4	Rat Plasma	Total dose (mg/kg)	Mean time to death(days)[b)] [cures/group]	%ILS[c)]
Control	-	-	-	-	13.2±1.2[0/10]	-
Paclitaxel	6	-	-	75	17.5±1.7[0/10]	33
				100	13.7±1.3[0/10]	4
	10	5.5	0.4	75	19.0±1.1[0/10]	44
	14	7.0	0.4	75	21.8±1.0[0/10]	65
		28	5	100	24.0±8.9[1/10]	82

[a)]Paclitaxel or prodrug derivatives were given, in equivalent dose of paclitaxel, daily [intraperitoneal(i.p.)×5], 24h following an injection of P388/0 cells into the abdominal cavity with survival monitored for 40 days. [b)]Kaplan-Meier estimates with survivors censored. [c]Increased life span(%ILS) is (T/C-1)×100.

1.4 본 연구의 내용 및 목적

파클리탁셀은 난소암, 유방암, 폐암 등에 매우 탁월한 치료효과를 보임에도 불구하고 물에 대한 용해도가 매우 낮아 제제화로 인한 여러 부작용을 유발시키기 때문에 우선 제제화에 따른 문제점을 극복하기 위한 한 방법으로 수용성 고분자인 mPEG을 이용하여 수용성 프로드럭을 합성함으로써 모약인 파클리탁셀의 물에 대한 용해도를 향상시켜 현재 사용되는 제제를 대체할 수 있는 약물을 개발하고자 하였다.

mPEG을 이용한 수용성 파클리탁셀 프로드럭의 합성에 있어 항암활성을 고려한 분자설계는 필수적으로 요구되는 사항이다. 프로드럭의 약효는 항암활성을 나타내는 성분인 모약의 방출속도와 상관관계가 있으며 모약의 방출속도는 가수분해속도에 의존하게 된다. 그림 15는 mPEG-succinate와 파클리탁셀 컨쥬게이트의 효소에 의한 가수분해 기전으로 단순 ester 결합에 의하여 컨쥬게이트가 형성된 경우 파클리탁셀의 구조적인 입체장애로 인하여 친핵성 공격에 의한 가수분해가 어려워 비교적 느린 가수분해 속도($T_{1/2} \geq 7h$)를 보인다. 분자량이 크지 않은 프로드럭에서 이러한 느린 가수분해 속도는 혈액순환과정 중 항암활성을 갖는 모약이 프로드럭으로부터 방출되기 전에 활성이 낮은 프로드럭 상태로 신장을 통하여 상당량 제거되는 것을 가능하게 함으로써



U.S. Patent 5,648,506

Figure 15. Hydrolysis mechanism of mPEG-paclitaxel conjugate.

프로드럭의 약효를 감소시키는 원인이 된다. 이와 같이 느린 가수분해 속도에 기인한 약효감소의 문제점을 해결하기 위하여 그림 16의 구조와 같이 수용성 증가를 위한 mPEG-succinate와 항암활성을 갖는 모약인 파클리탁셀 사이에 여러 종류의 self-immolating 역할을 수행할 수 있는 간격자의 도입을 시도하였다. 구조변경에 따른 약효감소를 고려하여 2′-OH가 아닌 7-OH에 간격자를 도입함으로써 파클리탁셀 유도체들을 합성하였고 그 유도체들의 PEGylation을 통해 프로드럭을 합성하였다. 또한 프로드럭의 합성경로를 달리함으로써 프로드럭들의 수득율과 순도를 향상시키고자 하였다.

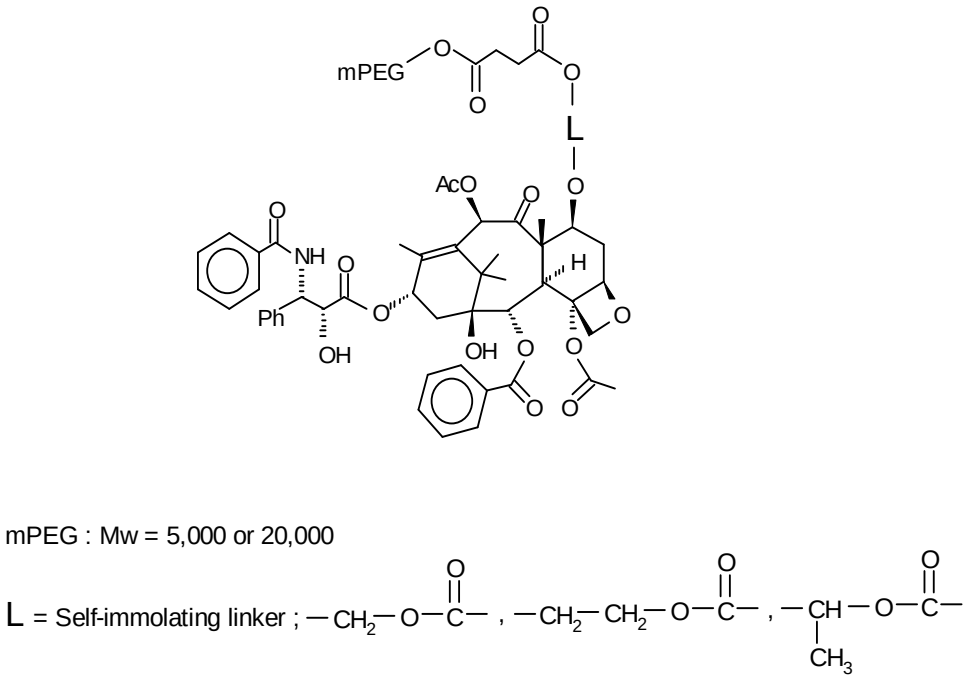


Figure 16. Chemical structure of modified prodrugs.

최종적으로 합성된 프로드럭들의 가수분해 속도를 측정하여 self-immolating 간격자 구조와 가수분해 속도와의 상관관계를 조사함과 동시에 B16/F10 흑색종 세포들(melanoma cells)을 정맥주사한 C57B/6 mice에서 프로드럭과 파클리탁셀의 항전이능(anti-metastatic potential)을 비교 조사함으로써 프로드럭의 가수분해 속도가 약효에 미치는 영향을 밝히고자 하였으며, 이와 같은 프로드럭의 구조와 약효의 상관관계를 토대로 보다 더 우수한 약효를 갖는 프로드럭의 개발에 대하여 새로운 접근방법을 모색하고자 하였다.

제 2 장 실 험

2.1 시약 및 기기

2.1.1 시 약

Imidazole, succinic anhydride, 1-chloroethyl chloroformate, 2-Bromo ethyl chloroformate(Aldrich Co.), chloromethyl chloroformate(TCI Co.), tert-butyldimethylsilyl chloride, 18-crown-6, sodium iodide(Fluka Co.), 파클리탁셀(Brystol-Mayers Squibb Co.)은 특별한 정제과정을 거치지 않고 그대로 사용하였다. 분자량이 20,000인 mPEG-succinate의 경우 Sunbio 사 제품을 사용하였고 분자량이 5,000인 mPEG-succinate의 경우 succinic anhydride와 mPEG(Fluka Co.)를 이용하여 자체 합성하여 사용하였다. 또한 합성에 사용된 용매는 적절한 정제과정을 거친 후 사용하였으며 액체 크로마토그래피에 사용된 이동상 용매는 Merck 사의 HPLC grade acetonitrile과 3차 증류수를 여과장치를 이용하여 감압여과 후 사용하였다.

2.1.2 기 기

화합물의 합성여부와 특성조사 및 정제를 위해 사용된 기기는 다음과 같다.

FT-NMR spectrometer : JEOL JNM-LA 300
FT-IR spectrometer : Shimadzu 8601 PC
HPLC : Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector
Altech ELSD(Evaporative Light Scattering Detector)
Waters 1525 Binary HPLC Pump
Xterra® RP 5 μm 4.6×250 mm C_{18} Column
Phenomenex® Luna 5 μm 4.6×250 mm C_{18} Column

Prep-LC : Xterra® RP 7 μm 19×300 mm C_8 Column

Waters Delta-Prep 4000

UV-visible spectrophotometer-1601

MALDI-TOF spectrophotometer

Hazemeter : NHD-300A, Nippon denshoku IND

2.2 파클리탁셀 프로드럭의 합성경로

본 실험에서는 2가지 경로를 통해 파클리탁셀 프로드럭을 합성하였으며 합성 경로는 그림 17과 같다.

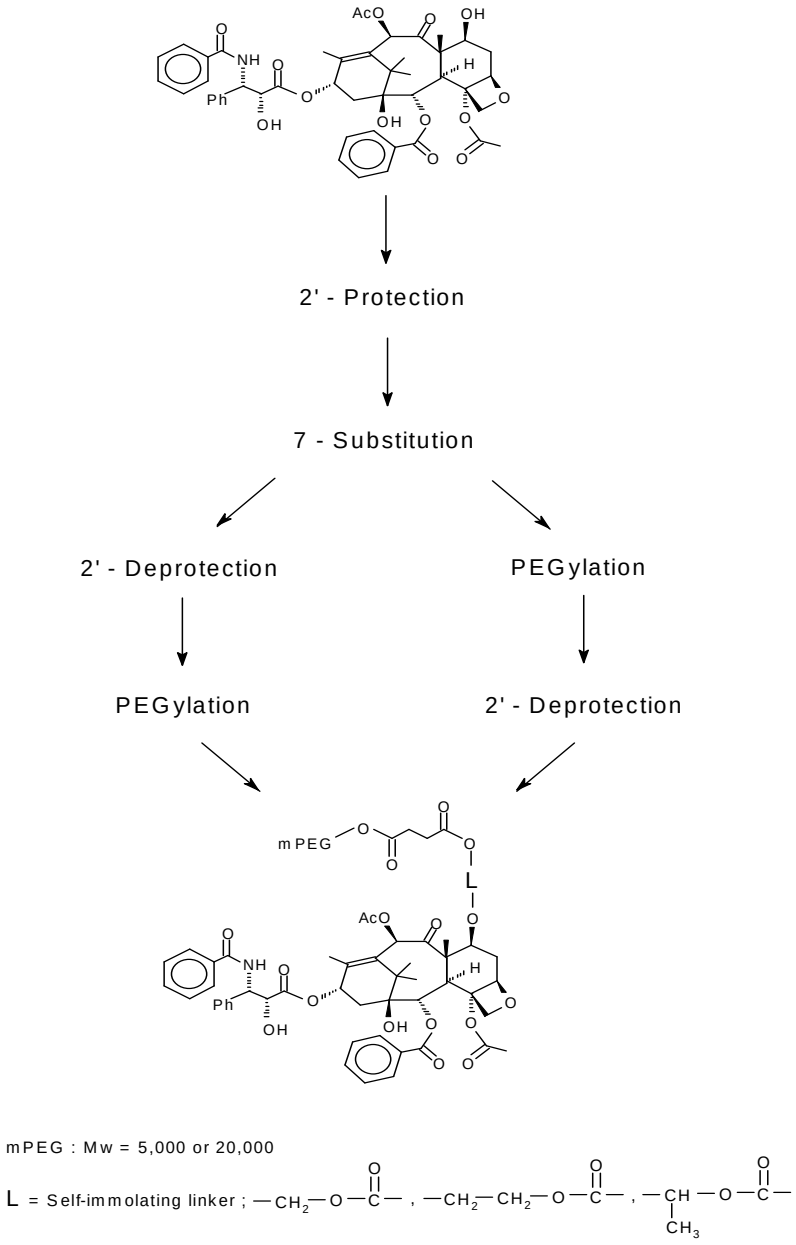


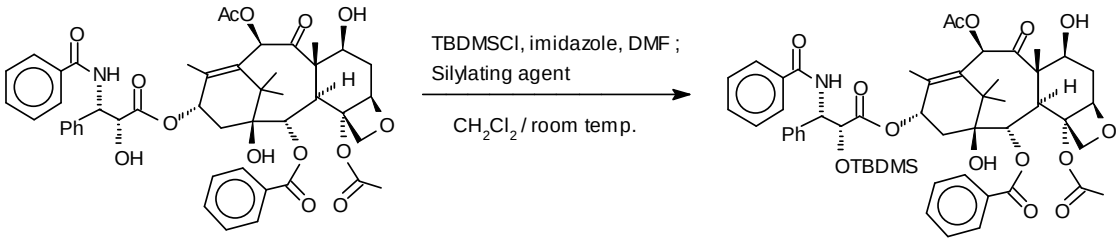
Figure 17. Synthetic route of paclitaxel prodrugs.

2.3 파클리탁셀 유도체들의 합성

*2.3.1 2′-TBDMS-paclitaxel(P1)*의 합성

2′-TBDMS-paclitaxel(P1)은 scheme 1과 같은 방법으로 합성하였다.

Scheme 1.



P1

파클리탁셀(500 mg, 0.5855 mmol)을 dichloromethane(DCM) 10 mL에 녹이고, 여기에 TBDMSCl(617.8 mg, 4.0985 mmol)과 imidazole(558.1 mg, 8.1970 mmol)을 DMF 1 mL에 녹인 silylating agent 용액을 가한 후 12 시간 동안 실온에서 교반시켰다. TLC(ethyl acetate:n-hexane = 1:1)로 반응여부를 확인한 후 반응이 끝난 혼합용액을 dichloromethane 20 mL로 희석하고 5 % HCl 수용액과 증류수를 이용하여 수회 세척하였다. 회수된 유기층을 magnesium sulfate로 탈수처리한 후 용매를 감압 건조하여 얻은 흰색의 고체화합물을 diethyl ether, ethyl acetate와 petroleum ether로 재결정하여 생성물 540 mg(수득률 : 95 %)을 얻었다.

^{1}H-NMR, 300 MHz($CDCl_3$, ppm) ; 0.80(s, 9H, *tert*-butyl), -0.02(s, 3H, $-CH_3$), -0.26(s, 3H, $-CH_3$)

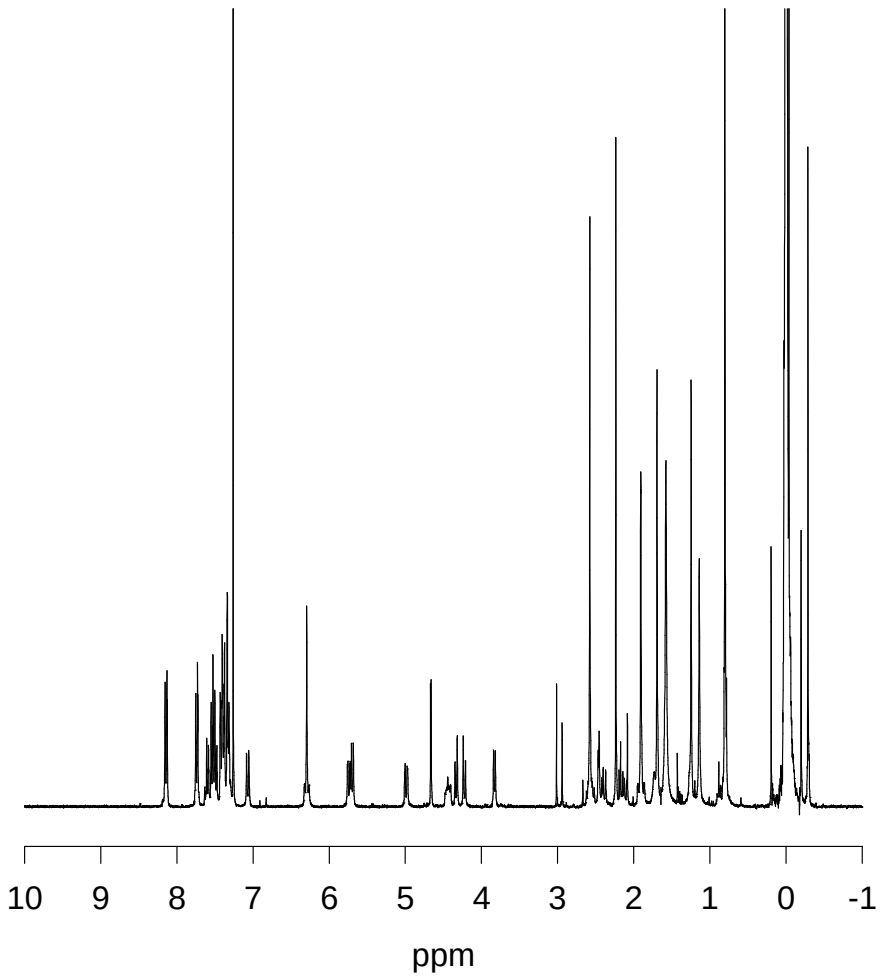
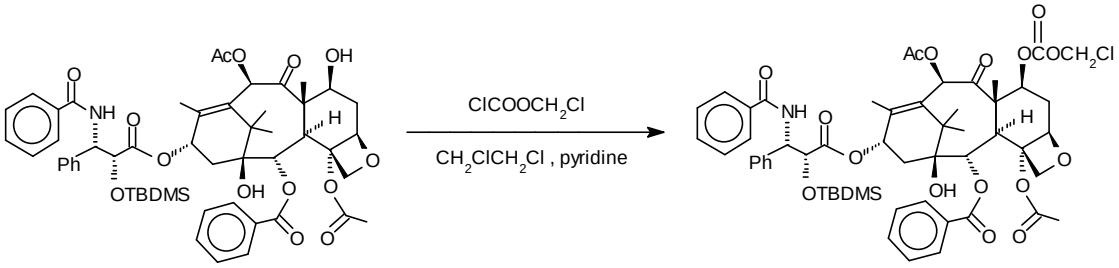


Figure 18. ^{1}H-NMR spectrum of P1($CDCl_3$).

*2.3.2 2′-TBDMS-7-chloromethyloxycarbonyl-paclitaxel*의 합성

2′-TBDMS-7-chloromethyloxycarbonyl-paclitaxel(P2a)은 scheme 2와 같은 방법으로 합성하였다.

Scheme 2.



P2a

P1(540 mg, 0.5577 mmol)을 먼저 1,2-dichloroethane와 pyridine(502.9 μL, 6.3578 mmol)의 혼합용매에 녹이고, chloromethyl chloroformate(719.1 μL, 4.462 mmol)을 천천히 첨가하였다. 이 때 반응기의 내부온도가 상승하는 것을 막기 위해 얼음중탕을 사용하였다. 14 시간 동안 실온에서 교반시킨 후 TLC(ethyl acetate:n-hexane = 1:1)로 반응여부를 확인하고 반응이 끝난 혼합용액을 1,2-dichloroethane 20 mL로 희석하여 5 % HCl 수용액과 포화 $NaHCO_3$ 수용액으로 수회 세척하였다. 회수된 유기층을 magnesium sulfate로 탈수처리한 후 용매를 감압 건조하여 얻은 흰색의 고체화합물을 diethyl ether, ethyl acetate와 petroleum ether로 재결정하여 생성물 572 mg(수득률 : 97 %)을 얻었다.

^{1}H-NMR, 300 MHz($CDCl_3$, ppm) ; 6.01(d, 1H, J=6.60Hz, -OCOOC<u>H</u>$_2$-Cl), 5.61~ 5.55 (m, 1H, 7-CH-), 5.53(d, 1H, J=6.60Hz, -OCOOC<u>H</u>$_2$-Cl), 0.80(s, 9H, *tert*- butyl), -0.02(s, 3H, -CH_3), -0.26(s, 3H, -CH_3)

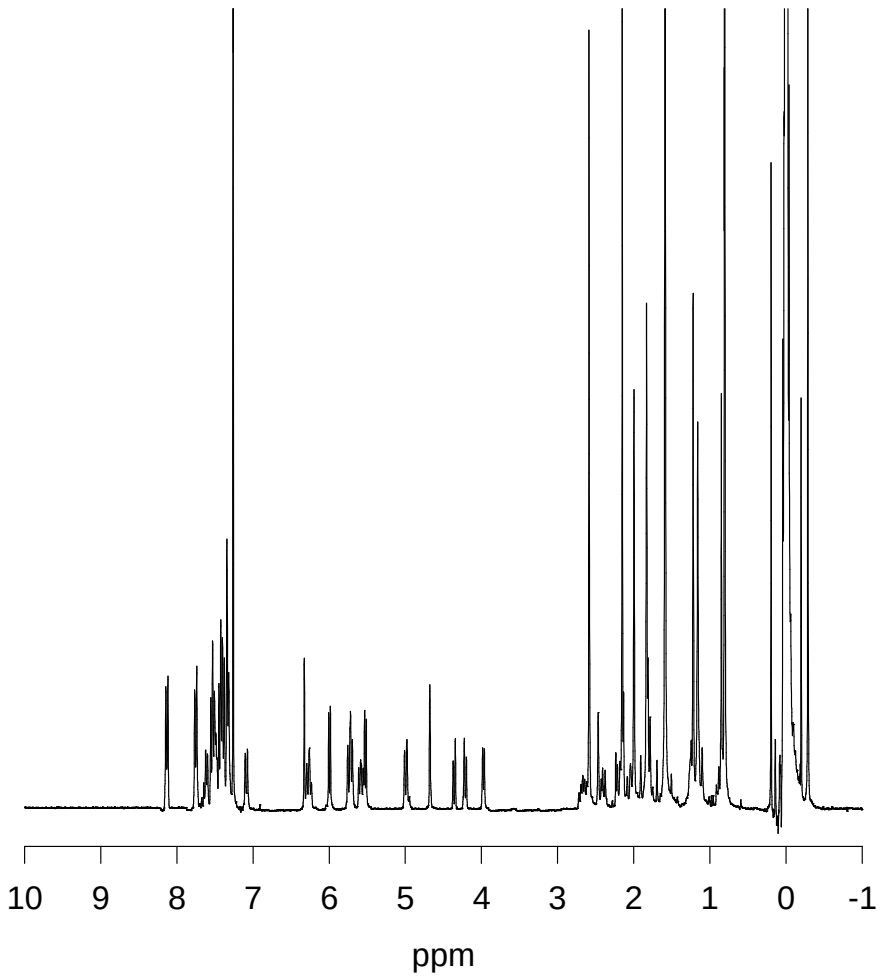
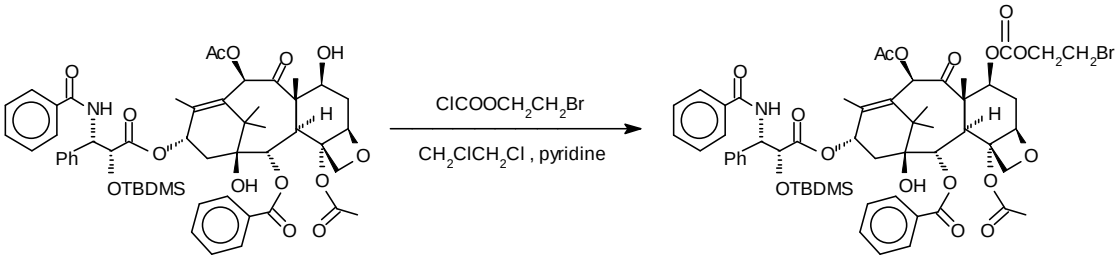


Figure 19. ^{1}H-NMR spectrum of P2a($CDCl_3$).

*2.3.3 2′-TBDMS-7-(2-bromoethyloxycarbonyl)-paclitaxel*의 합성

2′-TBDMS-7-(2-bromoethyloxycarbonyl)-paclitaxel(P2b)은 scheme 3과 같은 방법으로 합성하였다.

Scheme 3.



P2b

P1(540 mg, 0.5577 mmol)을 먼저 1,2-dichloroethane와 pyridine(502.9 μL, 6.3578 mmol)의 혼합용매에 녹이고, 2-bromoethyl chloroformate(478.1 μL, 4.462 mmol)을 천천히 첨가하였다. 이 때 반응기의 내부온도가 상승하는 것을 막기 위해 얼음중탕을 사용하였다. 14 시간 동안 실온에서 교반시킨 후 TLC(ethyl acetate:n-hexane = 1:1)로 반응여부를 확인하고 반응이 끝난 혼합용액을 1,2-dichloroethane 20 mL로 희석하여 5 % HCl 수용액과 포화 $NaHCO_3$ 수용액으로 수회 세척하였다. 회수된 유기층을 magnesium sulfate로 탈수처리한 후 용매를 감압 건조하여 얻은 흰색의 고체화합물을 diethyl ether, ethyl acetate와 petroleum ether로 재결정하여 생성물 599 mg(수득률 : 96 %)을 얻었다.

^{1}H-NMR, 300 MHz($CDCl_3$, ppm) ; 5.70~5.50(m, 1H, 7-CH-), 4.54~4.44(m, 2H, -C<u>H</u>$_2$-CH$_2$- Br), 3.55(t, 2H, -CH$_2$-C<u>H</u>$_2$-Br), 0.80(s, 9H, *tert*-butyl), -0.02(s, 3H, -CH$_3$), -0.26(s, 3H, -CH$_3$)

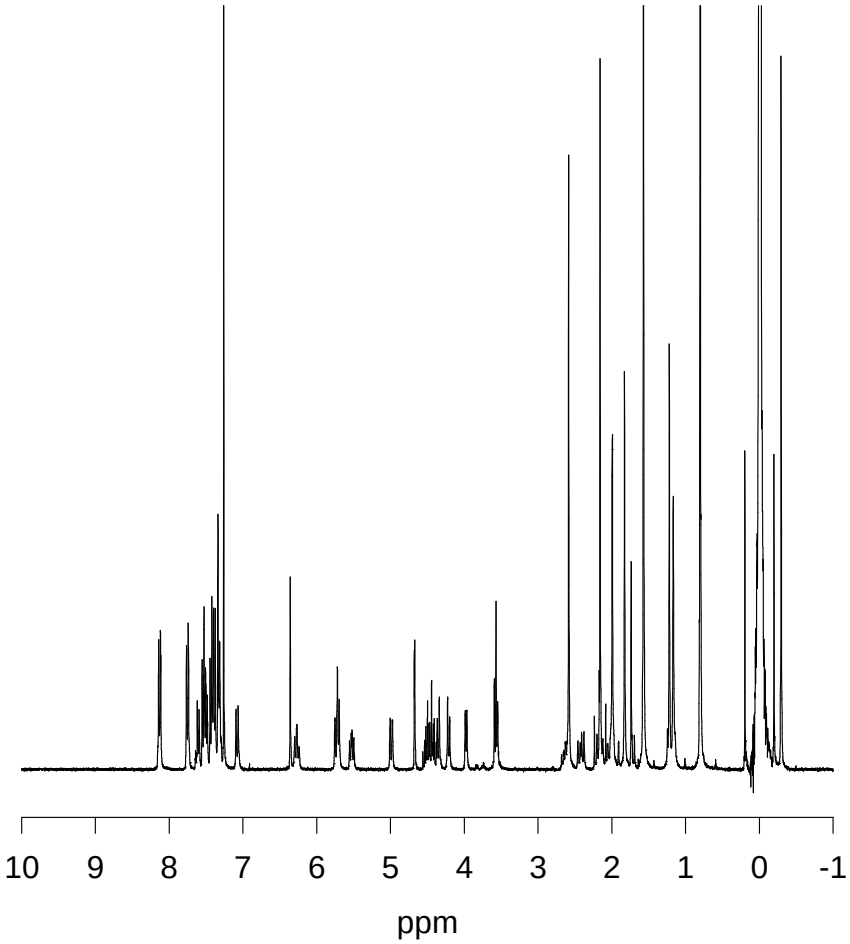
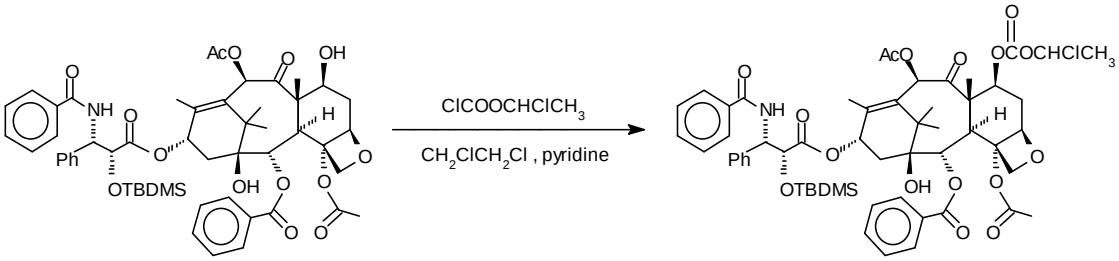


Figure 20. ^{1}H-NMR spectrum of P2b($CDCl_3$).

*2.3.4 2′-TBDMS-7-(1-chloroethyloxycarbonyl)-paclitaxel*의 합성

2′-TBDMS-7-(1-chloroethyloxycarbonyl)-paclitaxel(P2c)은 scheme 4와 같은 방법으로 합성하였다.

Scheme 4.



P2c

P1(540 mg, 0.5577 mmol)을 먼저 1,2-dichloroethane와 pyridine(502.9 μL, 6.3578 mmol)의 혼합용매에 녹이고, 1-chloroethyl chloroformate(481.4 μL, 4.462 mmol)을 천천히 첨가하였다. 이 때 반응기의 내부온도가 상승하는 것을 막기 위해 얼음중탕을 사용하였다. 14 시간 동안 실온에서 교반시킨 후 TLC(ethyl acetate:n-hexane = 1:1)로 반응여부를 확인하고 반응이 끝난 혼합용액을 1,2-dichloroethane 20 mL로 희석하여 5 % HCl 수용액과 포화 $NaHCO_3$ 수용액으로 수회 세척하였다. 회수된 유기층을 magnesium sulfate로 탈수처리한 후 용매를 감압 건조하여 얻은 흰색의 고체화합물을 diethyl ether, ethyl acetate와 petroleum ether로 재결정하여 생성물 581 mg(수득률 : 97 %)을 얻었다.

^{1}H-NMR, 300 MHz($CDCl_3$, ppm) ; 6.52~6.46(q, 1H, OCOO-C<u>H</u>CH_3-Cl), 5.50~ 5.44(m, 1H, 7-C<u>H</u>-), 2.15(d, 3H, OCOO-CHC<u>H$_3$</u>-Cl), 0.80(s, 9H, *tert*-butyl), -0.02(s, 3H, -CH_3), -0.26(s, 3H, -CH_3)

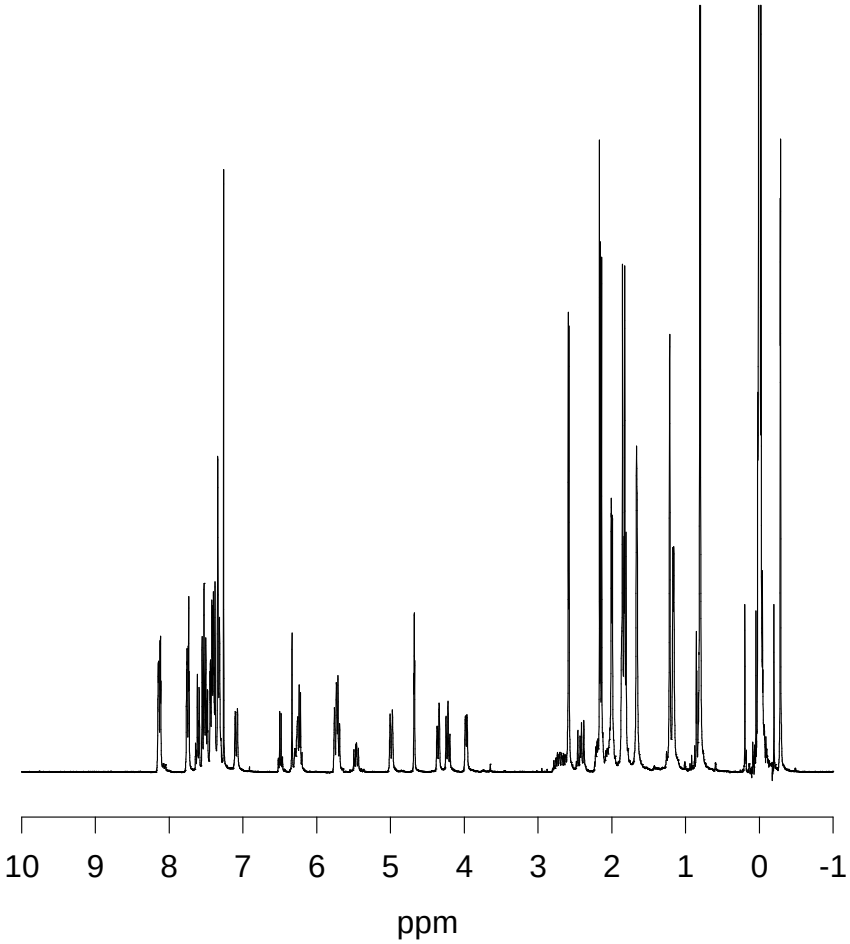
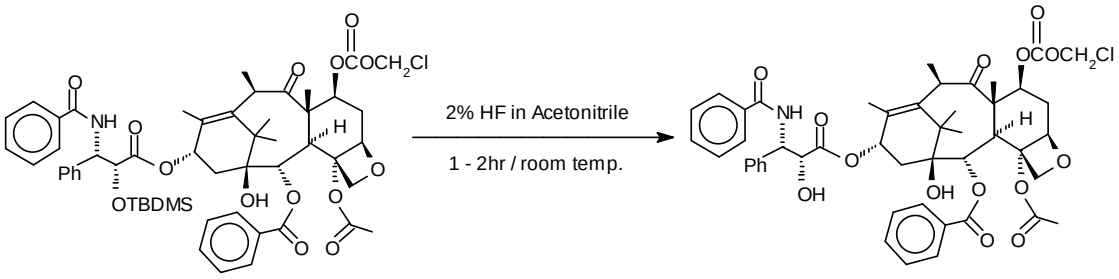


Figure 21. ^{1}H-NMR spectrum of P2c($CDCl_3$).

*2.3.5 7-chloromethyloxycarbonyl-paclitaxel*의 합성

7-chloromethyloxycarbonyl-paclitaxel(P3)은 scheme 5와 같은 방법으로 합성하였다.

Scheme 5.



P2a(500 mg, 0.4714 mmol)를 acetonitrile 9.6 mL에 녹인 용액에 50 % HF용액(in actonitrile)을 0.4 mL 첨가하여 전체용액의 HF농도를 2 %로 조절한 후 상온에서 1~2 시간 동안 교반시켰다. 10 분 간격으로 TLC(ethyl acetate:n-hexane = 1:1)를 이용하여 반응여부를 확인하고 반응이 끝난 혼합용액을 과량의 $NaHCO_3$ 포화수용액으로 중화시킨 후 dichloromethane을 사용하여 추출하였다. 회수된 유기층을 magnesium sulfate로 탈수처리한 후 용매를 감압 건조하여 얻은 흰색의 고체화합물을 diethyl ether, ethyl acetate와 petroleum ether로 재결정하여 생성물 384 mg(수득률 : 86 %)을 얻었다.

^{1}H-NMR, 300 MHz($CDCl_3$, ppm) ; 5.99(d, 1H, J=6.24Hz, -OCOOC$\underline{H}_2$-Cl), 5.53 (d, 1H, J=6.24Hz, -OCOOC$\underline{H}_2$-Cl), 3.57(d, 1H, 2′-O$\underline{H}$)

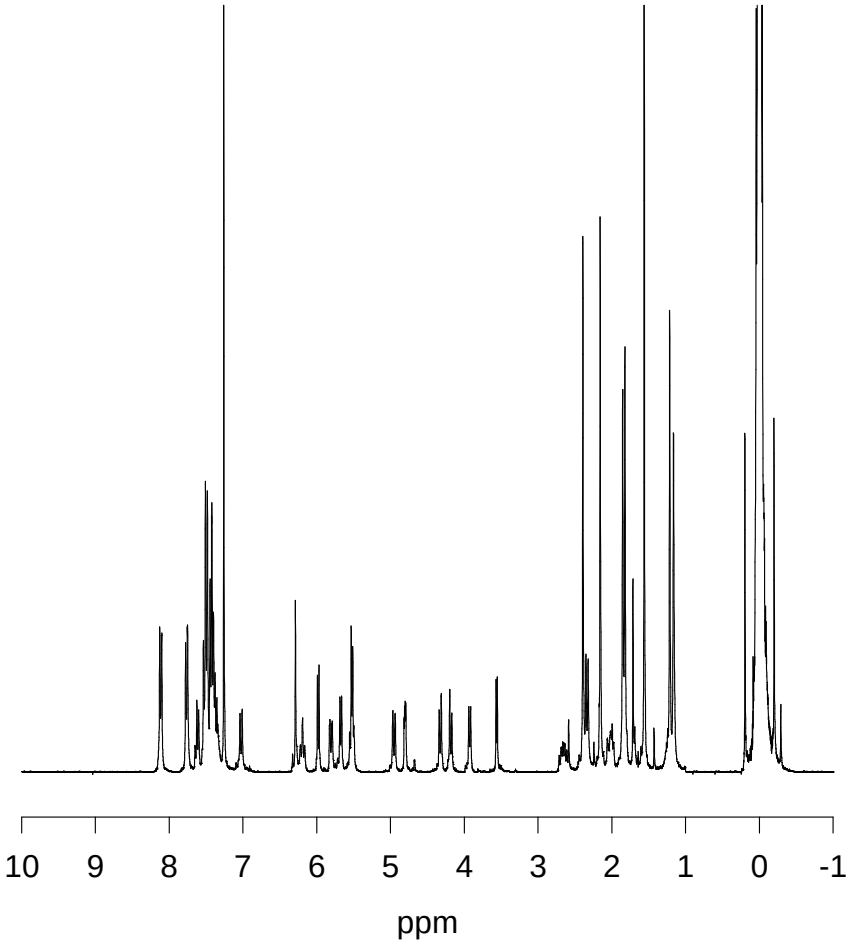
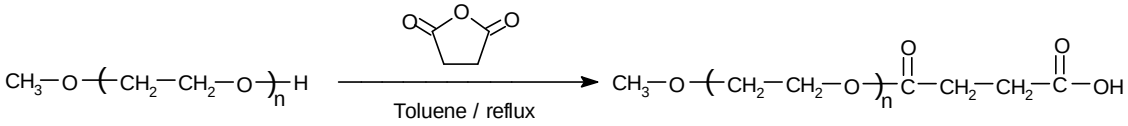


Figure 22. ^{1}H-NMR spectrum of P3($CDCl_3$).

*2.4 mPEG$_{5000}$-succinate*의 합성

파클리탁셀 유도체들의 PEGylation을 위한 mPEG$_{5000}$-succinate는 scheme 6과 같은 방법으로 합성하였다.

scheme 6



분자량 5,000인 mPEG(5 g, 1 mmol)과 succinic anhydride(2 g, 20 mmol)을 toluene 300 mL와 혼합한 후 14 시간 동안 환류시켰다. 반응이 끝난 혼합용액을 상온까지 냉각시켜 생성된 미반응 침전물을 여과한 후 여액의 용매를 회전증발기를 사용하여 제거하였다. 이때 생성된 흰색의 고체화합물을 acetone으로 재결정하여 생성물 4.69 g(수득률 : 92 %)을 얻었다.

FT-IR(KBr, cm^{-1}) ; 1736(C=O stretching)

^{1}H-NMR, 300 MHz($CDCl_3$, ppm) ; 4.30~3.38(m, mPEG), 2.68~2.61(m, 4H, OCO-C$\underline{H}_2$-C$\underline{H}_2$CO)

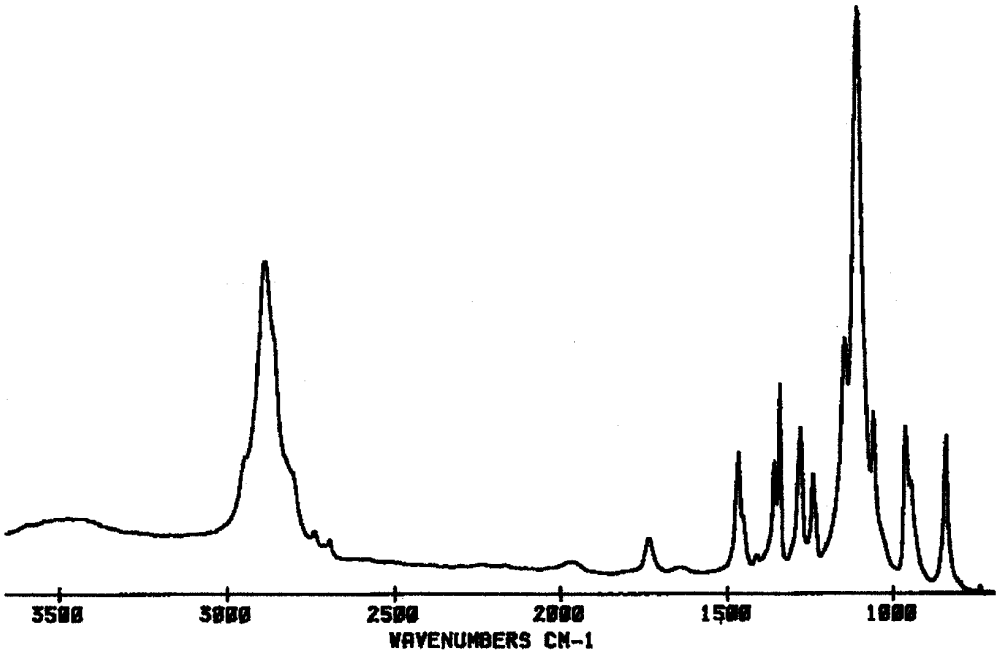


Figure 23. FT-IR spectrum of $mPEG_{5000}$-succinate(KBr).

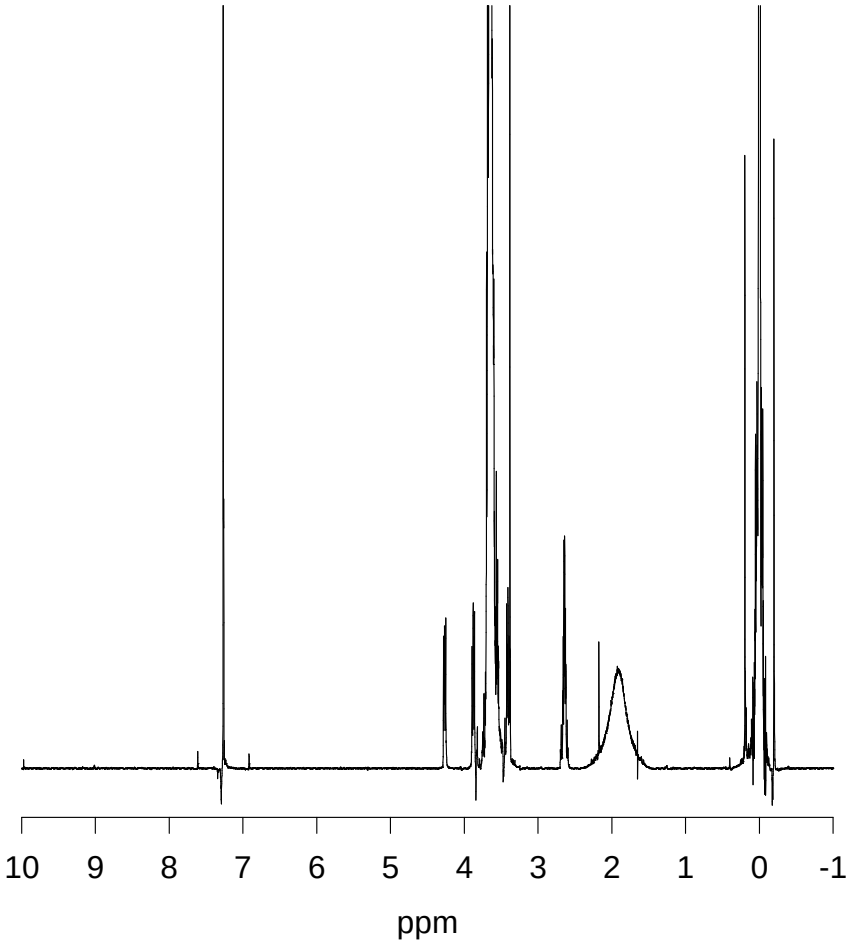


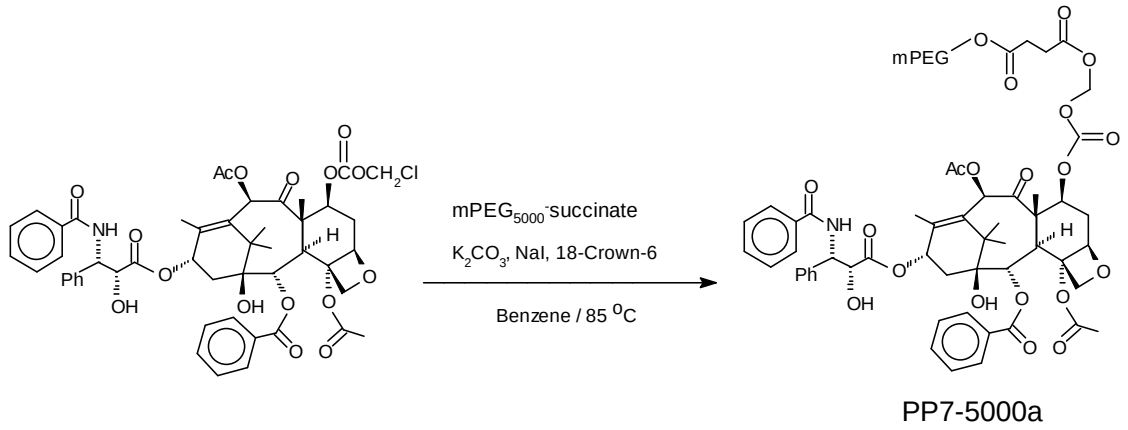
Figure 24. ^{1}H-NMR spectrum of mPEG$_{5000}$-succinate(CDCl$_3$).

2.5 P3의 PEGylation에 의한 프로드럭의 합성

2.5.1 mPEG$_{5000}$-succinate를 이용한 P3의 PEGylation

mPEG$_{5000}$-succinate를 파클리탁셀 유도체인 P3에 PEGylation하여 프로드럭(PP7-5000a)을 합성하였으며, 그 합성방법은 scheme 7과 같다.

scheme 7



P3(500 mg, 0.5283 mmol)과 mPEG$_{5000}$-succinate(3.23 g, 0.6340 mmol)를 benzene 50 mL에 녹인 용액에 K_2CO_3(131 mg, 0.9509 mmol), NaI(238 mg, 1.5849 mmol)과 18-Crown-6(98 mg, 0.3698 mmol)를 넣고 85 ℃에서 24 시간 동안 환류시켰다. 반응이 끝난 용액을 상온까지 냉각시킨 후 회전증발기를 사용하여 용매를 제거하였다. 이때 생성된 고체혼합물을 dichloromethane으로 용해시키고 용해되지 않은 염은 여과를 통해 제거한 후 여액을 5 % HCl 수용액으로 수회 세척하였다. 유기층을 회수하여 용매를 회전증발기로 증발시키고, 생성된 고체혼합물을 acetone으로 재결정한 후

Prep-LC를 통해 최종 생성물 1.91 g(수득률 : 60 %)을 얻었다.

Prep-LC를 실행함에 있어 이동상 용매로는 acetonitrile과 3차 증류수를 사용하였고 시간에 따라 용매조성에 구배를 주었으며 20 mL/min의 유속에서 Xterra® RP 7 μm 19×300 mm C_8 Column을 사용하여 분취하였다.

^{1}H-NMR, 300 MHz($CDCl_3$, ppm) ; 5.89(d, 1H, J=5.87Hz, -OCOOC$\underline{H}_2$-O-), 5.72 (d, 1H, J=5.87Hz, -OCOOC$\underline{H}_2$-O-), 4.39~3.38(m, mPEG)

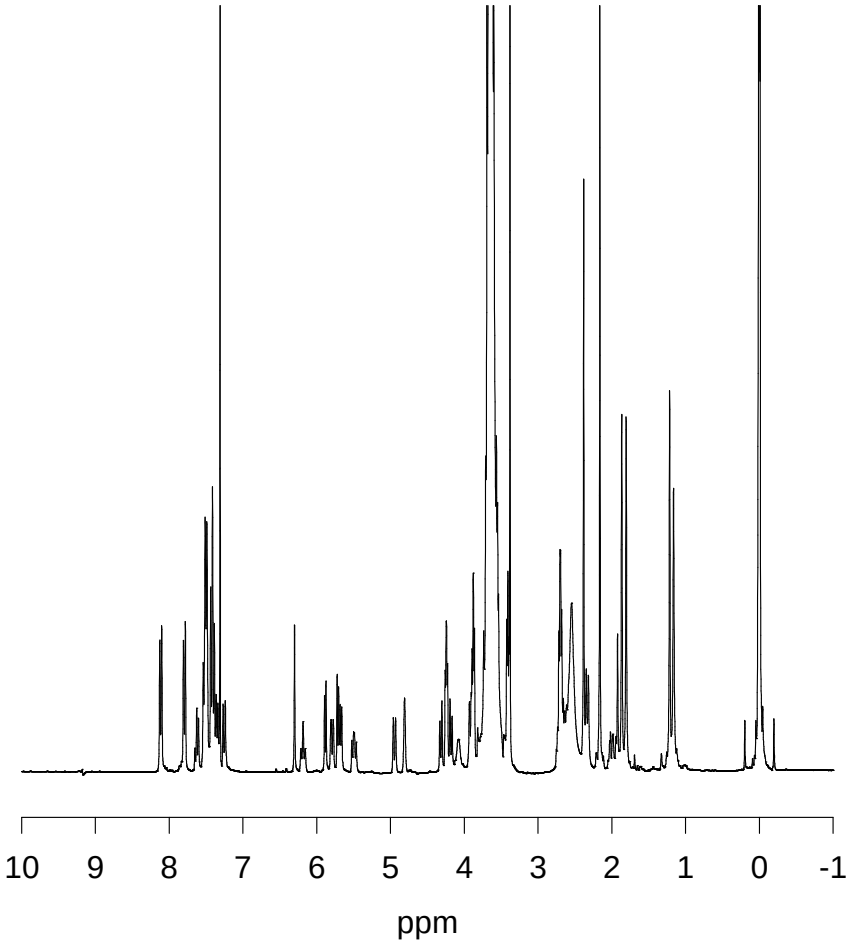
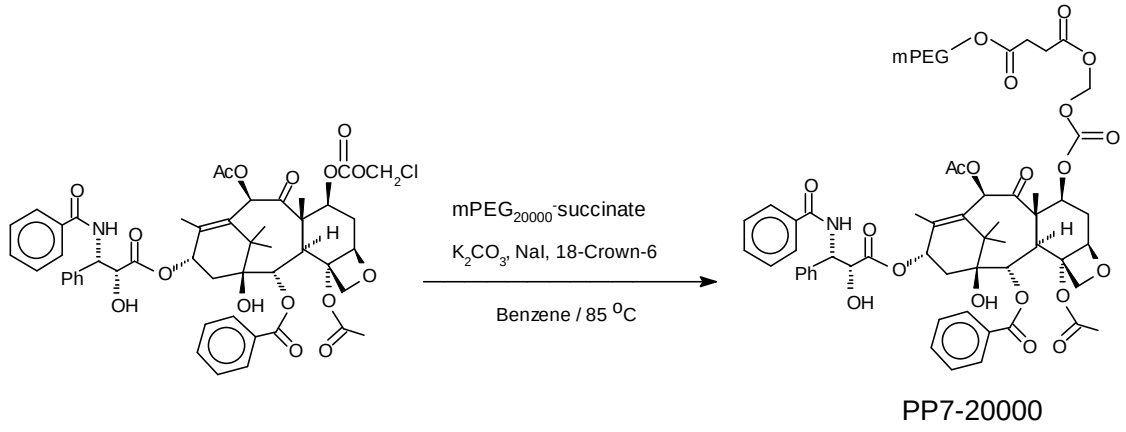


Figure 25. ^{1}H-NMR spectrum of PP7-5000a($CDCl_3$).

2.5.2 mPEG$_{20000}$-succinate를 이용한 P3의 PEGylation

mPEG$_{20000}$-succinate를 파클리탁셀 유도체인 P3에 PEGylation하여 프로드럭(PP7-20000)을 합성하였으며, 그 합성방법은 scheme 8과 같다.

scheme 8



P3(500 mg, 0.5283 mmol)과 mPEG$_{20000}$-succinate(12.74 g, 0.6340 mmol)를 benzene 200 mL에 녹인 용액에 K_2CO_3(131 mg, 0.9509 mmol), NaI(238 mg, 1.5849 mmol)과 18-Crown-6(98 mg, 0.3698 mmol)를 넣고 85 ℃에서 48 시간 동안 환류시켰다. 반응이 끝난 용액을 상온까지 냉각시킨 후 회전증발기를 사용하여 용매를 제거하였다. 이때 생성된 고체혼합물을 dichloromethane으로 용해시킨 후 용해되지 않은 염은 여과를 통해 제거하고 여액을 5 % HCl 수용액으로 수회 세척하였다. 유기층을 회수하여 용매를 회전증발기로 증발시키고, 생성된 고체혼합물을 acetone으로 재결정한 후 Prep-LC를 통해 최종 생성물 5.10 g(수득률 : 48 %)을 얻었다.

Prep-LC를 실행함에 있어 이동상 용매로는 acetonitrile과 3차 증류수를 사용하였고 시간에 따라 용매조성에 구배를 주었으며 20 mL/min의 유속에서 Xterra® RP

7 μm 19×300 mm C_{18} Column을 사용하여 분취하였다.

^{1}H-NMR, 300 MHz($CDCl_3$, ppm) ; 5.88(d, 1H, J=5.85Hz, -OCOOC<u>H</u>$_2$-O-), 5.71 (d, 1H, J=5.85Hz, -OCOOCH_2-O-), 4.39~3.38(m, mPEG)

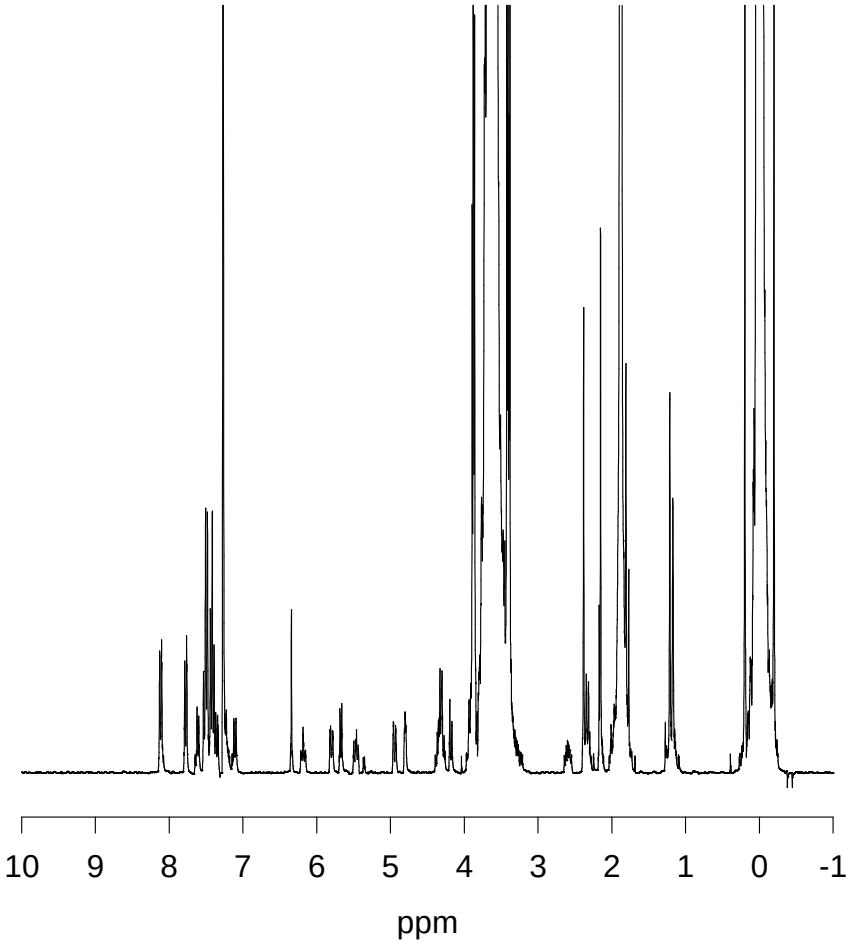
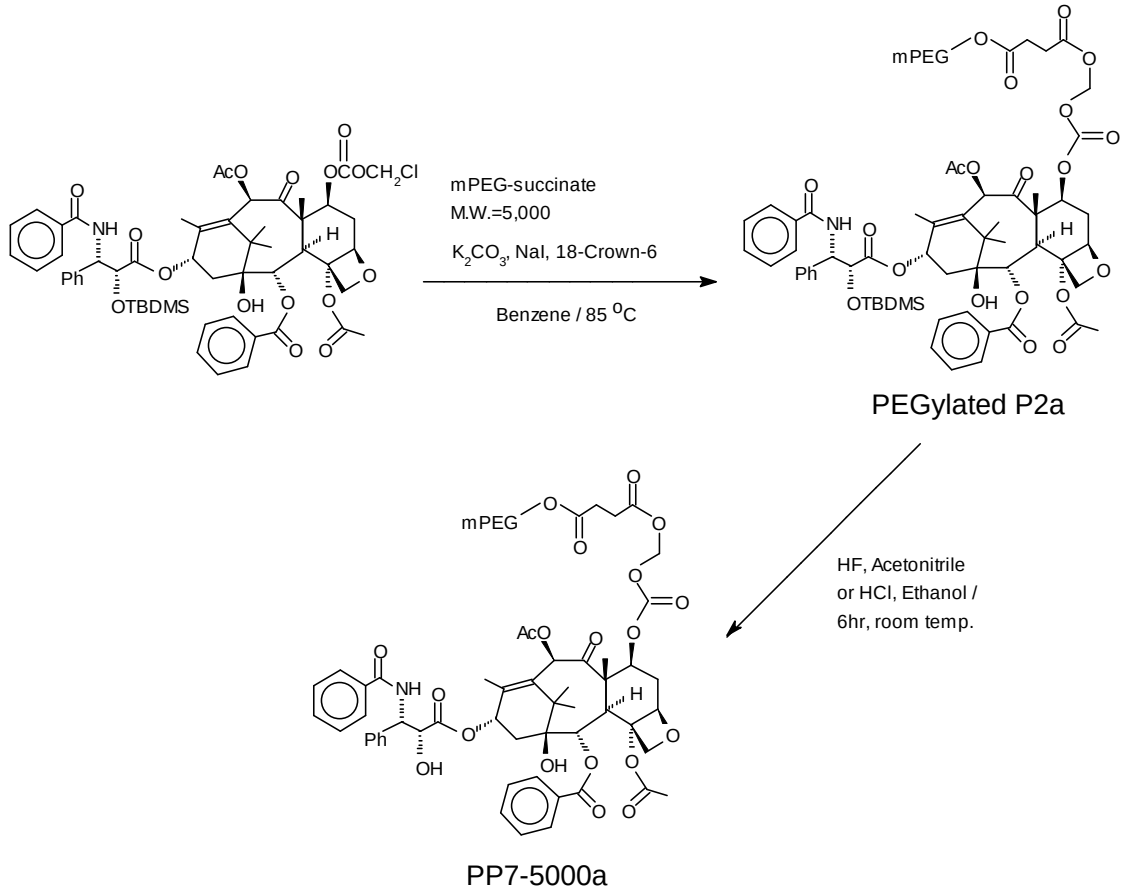


Figure 26. ^{1}H-NMR spectrum of PP7-20000($CDCl_3$).

2.6 P2a의 PEGylation 및 프로드럭의 합성

P2a를 PEGylation한 후 TBDMS를 제거하는 경로로 프로드럭인 PP7-5000a를 합성하였으며, 그 합성방법은 scheme 9과 같다.

scheme 9



*2.6.1 PEGylated-P2a*의 합성

P2a(500 mg, 0.4714 mmol)과 $mPEG_{5000}$-succinate(2.89 g, 0.5657 mmol)를 benzene 50 mL에 녹인 용액에 K_2CO_3(117 mg, 0.8485 mmol), NaI(212 mg, 1.4142 mmol)과 18-Crown-6(87 mg, 0.3300 mmol)를 넣고 85 ℃에서 24 시간 동안 환류시켰다. 반응이 끝난 용액을 상온까지 냉각시킨 후 회전증발기를 사용하여 용매를 제거하였다. 이때 생성된 고체혼합물을 dichloromethane으로 용해시킨 후 용해되지 않은 염은 여과를 통해 제거하고 여액을 5 % HCl 수용액으로 수회 세척하였다. 유기층을 회수하여 용매를 회전증발기로 증발시키고, 생성된 고체혼합물을 acetone으로 재결정하여 최종 생성물 3.29 g(수득률 : 95 %)을 얻었다.

^{1}H-NMR, 300 MHz($CDCl_3$, ppm) ; 5.90(d, 1H, J=5.50Hz, -OCOOC$\underline{H}_2$-O-), 5.71 (d, 1H, J=5.50Hz, -OCOOCH_2-O-), 4.39~3.38(m, mPEG), 0.80(s, 9H, *tert*- butyl), -0.02(s, 3H, -CH_3), -0.26(s, 3H, -CH_3)

*2.6.2 PEGylated-P2a*로부터 프로드럭의 합성

PEGylated-P2a(1.00 g, 0.1632 mmol)를 acetonitrile 27 mL에 녹인 용액에 50 % HF용액(in actonitrile)을 3 mL 첨가하여 전체용액의 HF농도를 5 %로 조절한 후 상온에서 6 시간 동안 교반시켰다. HF용액이 아닌 HCl수용액을 사용하는 경우에는 ethanol 용매하에서 전체용액의 HCl농도를 2 %로 조절하였으며 상온에서 48 시간 동안 교반시켰다. 1 시간 간격으로 반응용액을 회수하여 ^{1}H-NMR로 반응여부를 확인하였다. 반응이 끝난 혼합용액을 과량의 $NaHCO_3$ 포화수용액으로 중화시킨 후 dichloromethane으로 추출하여 얻은 유기층을 5 % HCl 수용액으로 수회 세척하였다. 회수된 유기층을 magnesium sulfate로 탈수처리하고 용매를 회전증발기로 증발시켜 생성된 고체혼합물을 acetone으로 재결정한 후 Prep-LC를 통해 최종 생성물 765 mg (수득률 : 78 %)을 얻었다.

Prep-LC를 실행함에 있어 이동상 용매로는 acetonitrile과 3차 증류수를 사용하였고 시간에 따라 용매조성에 구배를 주었으며 20 mL/min의 유속에서 Xterra® RP 7 μm 19×300 mm C_8 Column을 사용하여 분취하였다.

^{1}H-NMR, 300 MHz($CDCl_3$, ppm) ; 5.89(d, 1H, J=5.87Hz, -OCOOC<u>H</u>$_2$-O-), 5.72 (d, 1H, J=5.87Hz, -OCOOC<u>H</u>$_2$-O-), 4.39~3.38(m, mPEG)

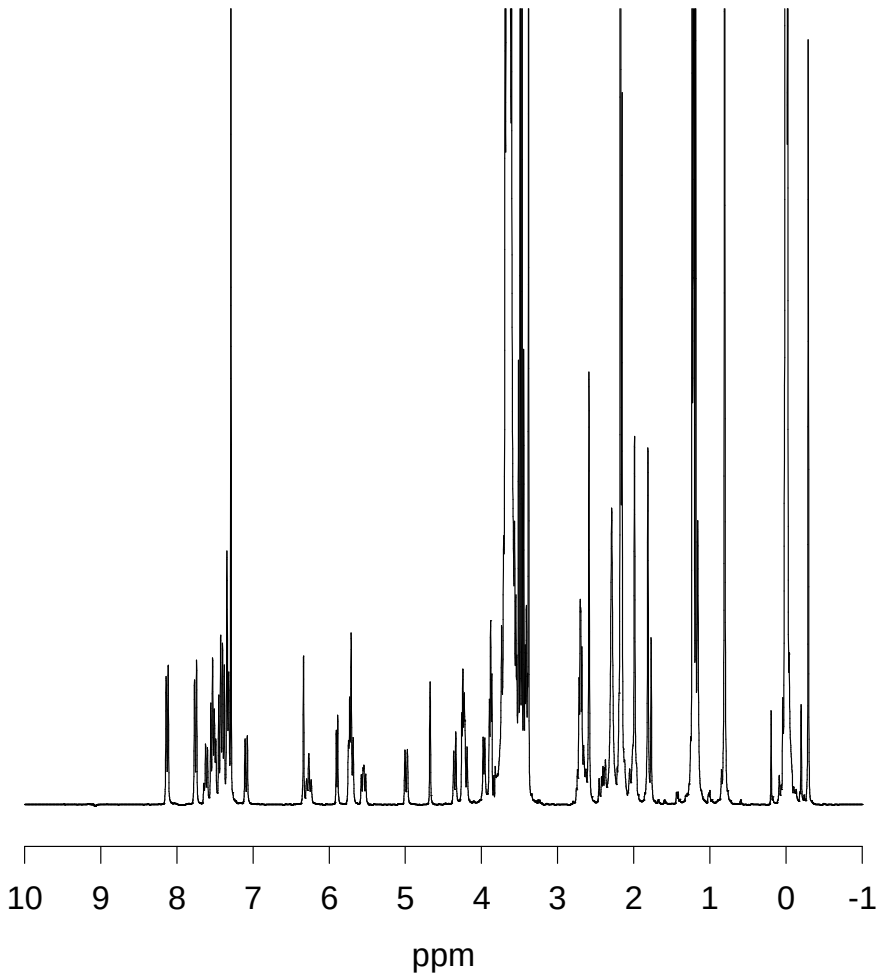


Figure 27. ^{1}H-NMR spectrum of PEGylated P2a($CDCl_3$).

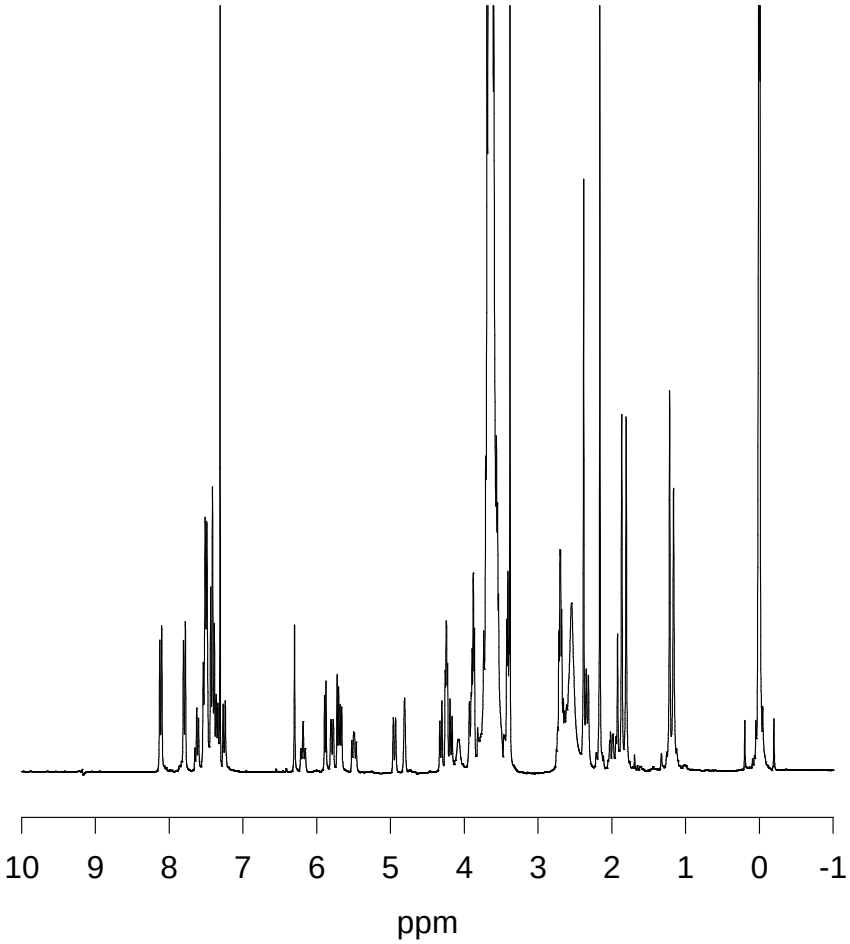
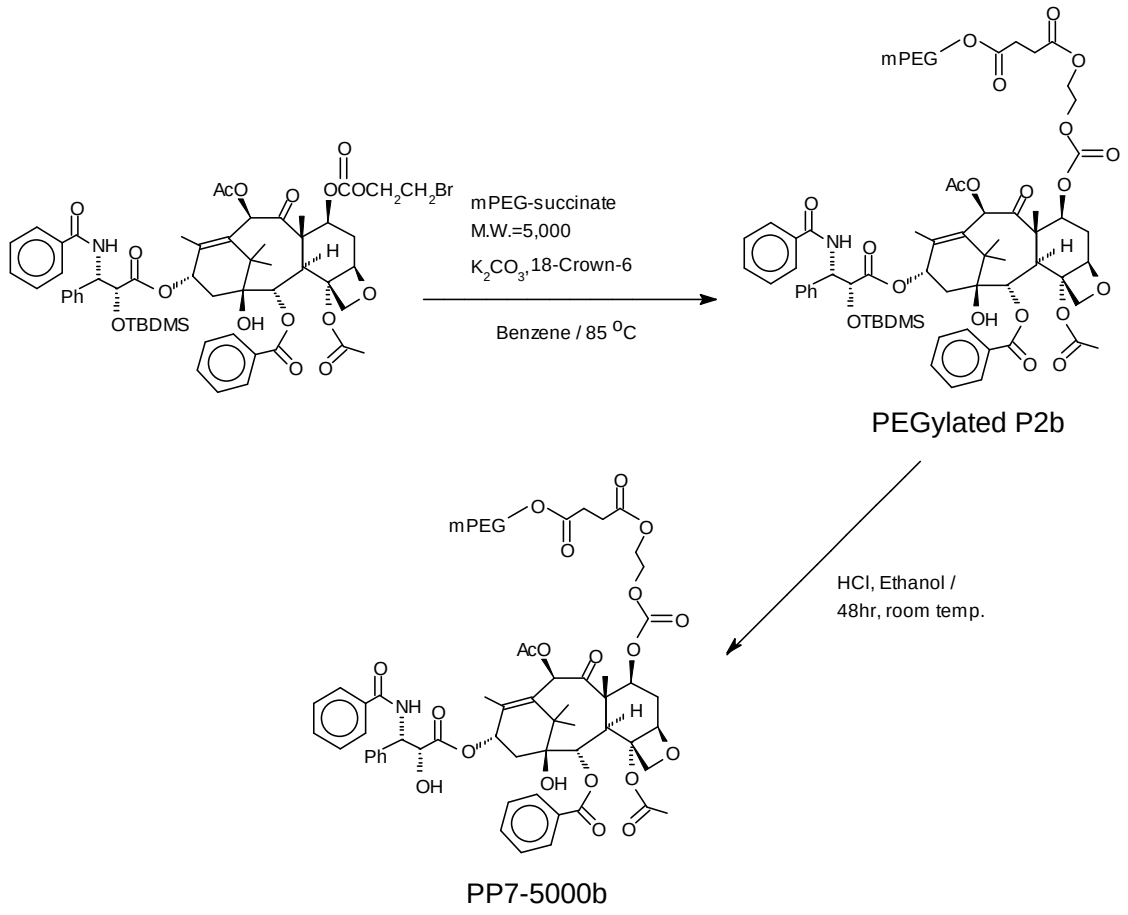


Figure 28. ^{1}H-NMR spectrum of PP7-5000a($CDCl_3$).

2.7 P2b의 PEGylation 및 프로드럭의 합성

P2b를 PEGylation하여 $mPEG_{5000}$-succinate와 파클리탁셀 사이의 간격자구조에 ethylene을 갖는 프로드럭(PP7-5000b)을 합성하였으며, 그 합성방법은 scheme 10과 같다.

scheme 10



*2.7.1 PEGylated-P2b*의 합성

P2b(500 mg, 0.4468 mmol)과 $mPEG_{5000}$-succinate(2.73 g, 0.5362 mmol)를 benzene 50 mL에 녹인 용액에 K_2CO_3(111 mg, 0.8042 mmol), 과 18-Crown-6(83 mg, 0.3128 mmol)를 넣고 85 ℃에서 24 시간 동안 환류시켰다. 반응이 끝난 용액을 상온까지 냉각시킨 후 회전증발기를 사용하여 용매를 제거하였다. 이때 생성된 고체혼합물을 dichloromethane으로 용해시킨 후 용해되지 않은 염은 여과를 통해 제거하고 여액을 5 % HCl 수용액으로 수회 세척하였다. 유기층을 회수하여 용매를 회전증발기로 증발시키고, 생성된 고체혼합물을 acetone으로 재결정하여 최종 생성물 3.16 g(수득률 : 96 %)을 얻었다.

^{1}H-NMR, 300 MHz($CDCl_3$, ppm) ; 5.51~5.45(q, 1H, 7-CH-), 4.26(t, 2H, -C$\underline{H}_2$-CH_2-OCO), 4.39~3.38(m, mPEG), 0.80(s, 9H, *tert*- butyl), -0.02(s, 3H, -CH_3), -0.26(s, 3H, -CH_3)

*2.7.2 PEGylated-P2b*로부터 프로드럭의 합성

PEGylated-P2b(1.00 g, 0.1629 mmol)를 acetonitrile 27 mL에 녹인 용액에 50 % HF용액(in actonitrile)을 3 mL 첨가하여 전체용액의 HF농도를 5 %로 조절한 후 상온에서 6 시간 동안 교반시켰다. HF용액이 아닌 HCl수용액을 사용하는 경우에는 ethanol 용매하에서 전체용액의 HCl농도를 2 %로 조절하였으며 상온에서 48 시간 동안 교반시켰다. 1 시간 간격으로 반응용액을 회수하여 ^{1}H-NMR로 반응여부를 확인하였다. 반응이 끝난 혼합용액을 과량의 $NaHCO_3$ 포화수용액으로 중화시킨 후 dichloromethane으로 추출하여 얻은 유기층을 5 % HCl 수용액으로 수회 세척하였다. 회수된 유기층을 magnesium sulfate로 탈수처리하고 용매를 회전증발기로 증발시켜 생성된 고체혼합물을 acetone으로 재결정한 후 Prep-LC를 통해 최종 생성물 785 mg (수득률 : 80 %)을 얻었다.

Prep-LC를 실행함에 있어 이동상 용매로는 acetonitrile과 3차 증류수를 사용하였고 시간에 따라 용매조성에 구배를 주었으며 20 mL/min의 유속에서 Xterra® RP 7 μm 19×300 mm C_8 Column을 사용하여 분취하였다.

^{1}H-NMR, 300 MHz($CDCl_3$, ppm) ; 5.51~5.45(q, 1H, 7-CH-), 4.26(t, 2H, -C<u>H</u>$_2$ -CH$_2$-OCOO), 4.39~3.38(m, mPEG)

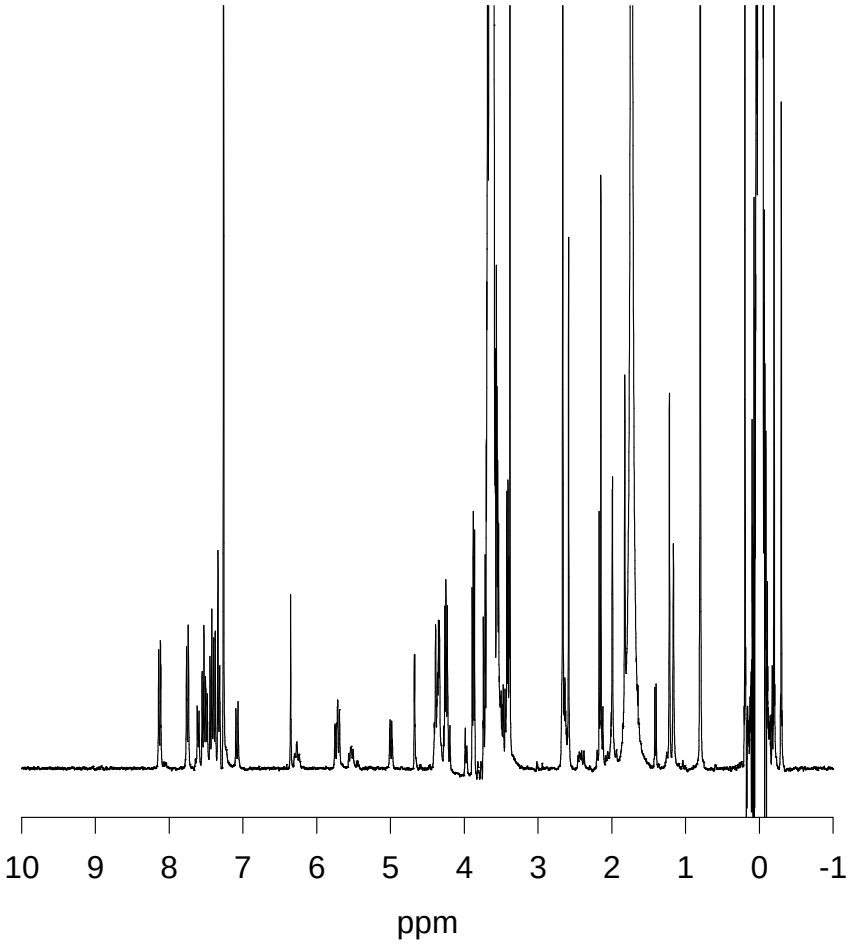


Figure 29. ^{1}H-NMR spectrum of PEGylated P2b($CDCl_3$).

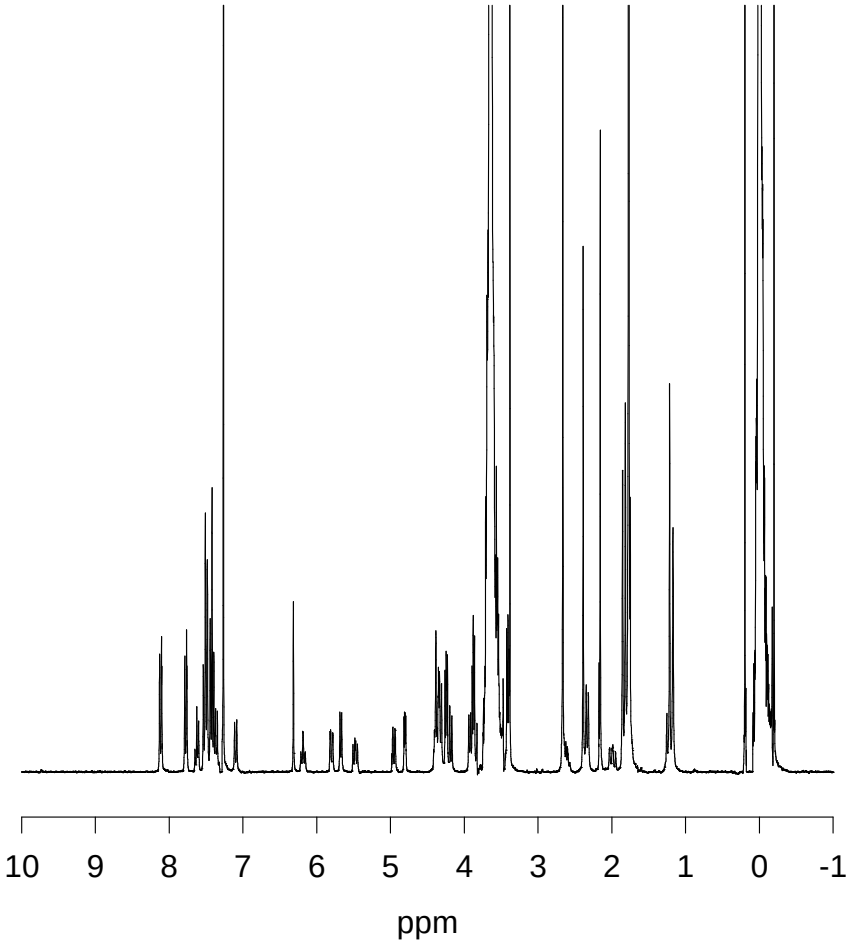
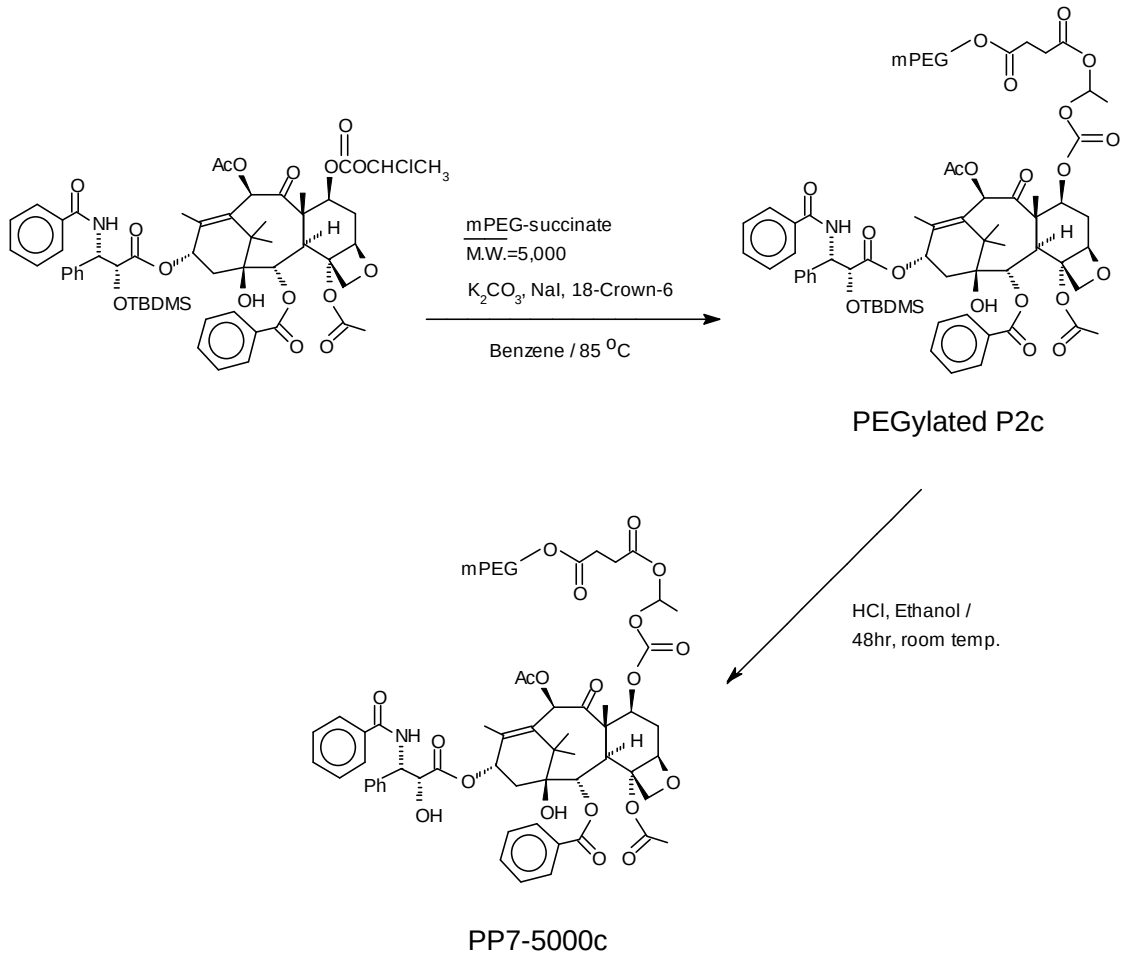


Figure 30. ^{1}H-NMR spectrum of PP7-5000b($CDCl_3$).

2.8 P2c의 PEGylation 및 프로드럭의 합성

파클리탁셀과 $mPEG_{5000}$-succinate사이의 methylene 간격자 구조에 methyl 치환기를 갖는 프로드럭(PP7-5000c)의 합성방법은 scheme 11과 같다.

scheme 11



*2.8.1 PEGylated-P2c*의 합성

P2c(500 mg, 0.4653 mmol)과 $mPEG_{5000}$-succinate(2.85 g, 0.5583 mmol)를 benzene 50 mL에 녹인 용액에 K_2CO_3(116 mg, 0.8375 mmol), NaI(209 mg, 1.3959 mmol)과 18-Crown-6(86 mg, 0.3257 mmol)를 넣고 85 ℃에서 24 시간 동안 환류시켰다. 반응이 끝난 용액을 상온까지 냉각시킨 후 회전증발기를 사용하여 용매를 제거하였다. 이때 생성된 고체혼합물을 dichloromethane으로 용해시킨 후 용해되지 않은 염은 여과를 통해 제거하고 여액을 5 % HCl 수용액으로 수회 세척하였다. 유기층을 회수하여 용매를 회전증발기로 증발시키고, 생성된 고체혼합물을 acetone으로 재결정하여 최종 생성물 3.19 g(수득률 : 93 %)을 얻었다.

^{1}H-NMR, 300 MHz($CDCl_3$, ppm) ; 6.85~6.80(q, 1H, -OCOO-C<u>H</u>CH_3-OOC-), 4.39~3.38(m, mPEG), 1.56~1.50(m, 3H, -OCOO-CHC<u>H_3</u>-OOC-) 0.80(s, 9H, *tert*-butyl), -0.02(s, 3H, -CH_3), -0.26(s, 3H, -CH_3)

*2.8.2 PEGylated-P2c*로부터 프로드럭의 합성

PEGylated-P2c(1.00 g, 0.1629 mmol)를 acetonitrile 27 mL에 녹인 용액에 50 % HF용액(in actonitrile)을 3 mL 첨가하여 전체용액의 HF농도를 5%로 조절한 후 상온에서 6 시간 동안 교반시켰다. HF용액이 아닌 HCl수용액을 사용하는 경우에는 ethanol 용매하에서 전체용액의 HCl농도를 2 %로 조절하였으며 상온에서 48 시간 동안 교반시켰다. 1 시간 간격으로 반응용액을 회수하여 ^{1}H-NMR을 사용해서 반응여부를 확인하였다. 반응이 끝난 혼합용액을 과량의 $NaHCO_3$ 포화수용액으로 중화시킨 후 dichloromethane으로 추출하여 얻은 유기층을 5 % HCl 수용액으로 수회 세척하였다. 회수된 유기층을 magnesium sulfate로 탈수처리하고 용매를 회전증발기로 증발시켜 생성된 고체혼합물을 acetone으로 재결정한 후 Prep-LC를 통해 최종 생성물 707 mg (수득률 : 72 %)을 얻었다.

Prep-LC를 실행함에 있어 이동상 용매로는 acetonitrile과 3차 증류수를 사용하였고 시간에 따라 용매조성에 구배를 주었으며 2 0mL/min의 유속에서 Xterra® RP 7 μm 19×300 mm C_8 Column을 사용하여 분취하였다.

^{1}H-NMR, 300 MHz($CDCl_3$, ppm) ; 6.84~6.79(q, 1H, -OCOO-C<u>H</u>CH_3-OOC-), 4.39~3.38(m, mPEG), 1.56~1.50(m, 3H, -OCOO-CHC<u>H_3</u>-OOC-)

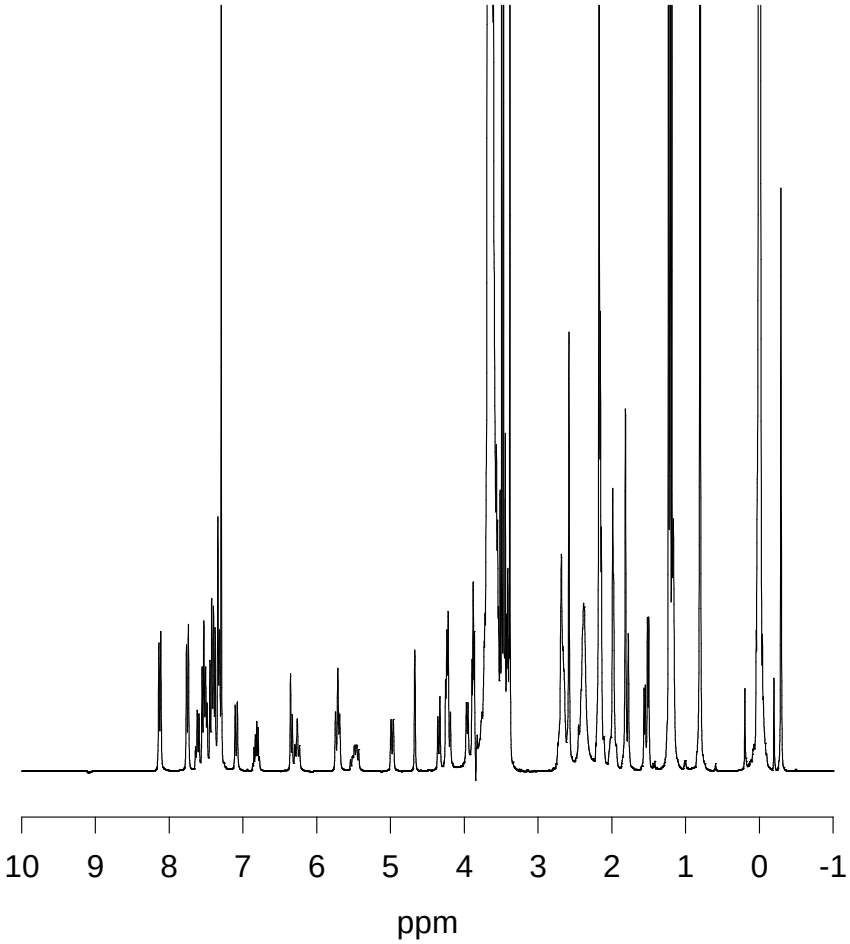


Figure 31. ^{1}H-NMR spectrum of PEGylated P2c($CDCl_3$).

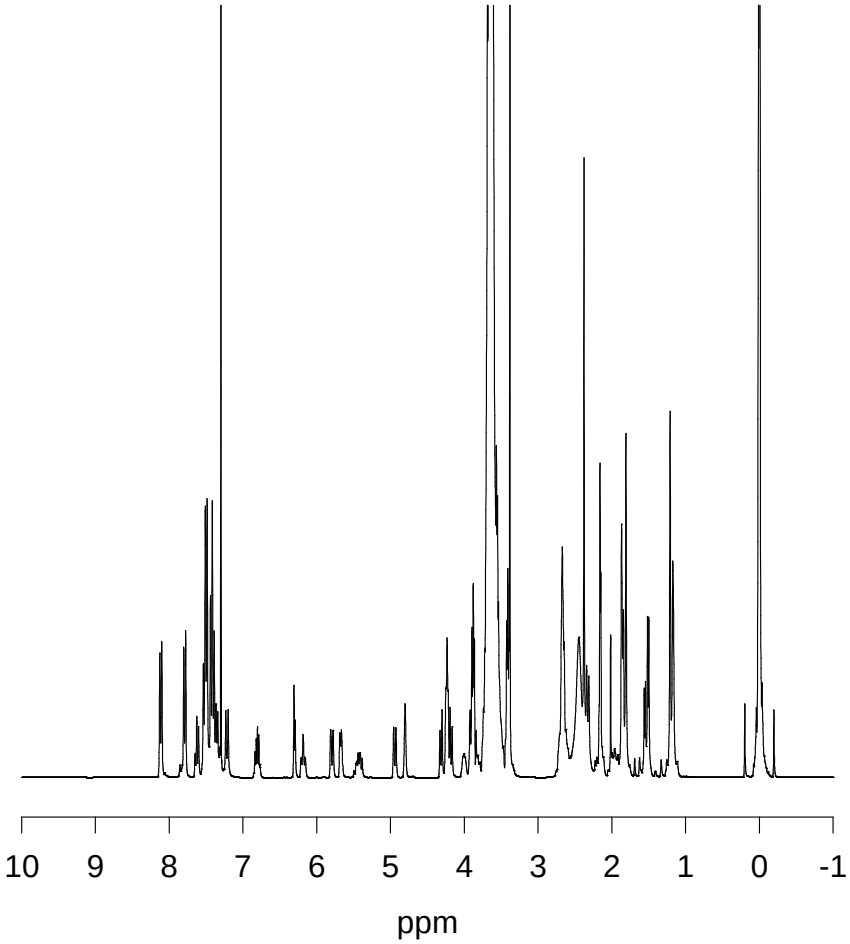


Figure 32. ^{1}H-NMR spectrum of PP7-5000c($CDCl_3$).

2.9 프로드럭들의 용해도 및 가수분해 실험

합성된 프로드럭들의 물에 대한 용해도는 증류수 1 mL에 프로드럭들을 점차적으로 첨가하여 용해시키면서 hazemeter로 측정하였다. 용액이 유동성이 있고 0.5 이하의 haze값을 보일 때 첨가된 화합물의 양을 용해도로 결정하였다.

프로드럭의 가수분해 속도를 측정하기 위해 (주)대한실험동물센터에서 구입한 Sprague-Dawley rat(수컷 종, 270~300 g)의 rat plasma를 사용하였다. 10 mL의 rat plasma를 37 ℃의 수조에서 미리 평형을 맞춘 다음 여기에 프로드럭(포함된 파클리탁셀의 0.5 mg에 해당하는 양)을 넣어 용해하였다. 시간별(0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 10, 15, 20 분)로 상기 용액을 100 μL씩 취하여 acetonitrile 200 μL가 담긴 튜브에 넣어 혼합한 후 11,000 rpm에서 5 분 동안 원심분리하여 상등액 200 μL를 취하였다. 상등액에 포함된 프로드럭과 가수분해로 형성된 파클리탁셀의 농도는 HPLC로 분석하였다. PBS(phosphate buffer solution) 및 증류수에서의 가수분해 실험은 위와 동일한 방법으로 실시하였으며 실험검체는 24 시간 간격으로 채취하여 분석하였다.

2.10 암세포에 대한 동물실험

프로드럭의 항전이능(anti-metastatic potential)을 평가하기 위한 동물실험은 GLP(Good Laboratory Practice)를 인증 받은 Quintiles 사에 의뢰하여 실시하였으며 그 실험내용은 다음과 같다. C57B/6 mice에 3×10^5 개의 B16/F10 흑색종 세포들(melanoma cells)을 정맥주사하고 2 일 후 10 일간 약물을 처방(1 일 1 회)하였다. 세포주입 후 14 일째 되는 날 폐로 전이하여 형성되는 흑색종 군락(melanoma lung colony)의 수와 폐의 무게변화를 조사하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

3.1 $mPEG_{5000}$-succinate의 합성

파클리탁셀의 수용성을 증대시키기 위해 사용되는 $mPEG_{5000}$-succinate는 분자량이 5000인 mPEG과 succinic anhydride를 toluene 용매하에서 환류시키는 방법으로 합성하였다. 생성물인 $mPEG_{5000}$-succinate의 기본적인 물성은 화합물에서 차지하는 부분이 상대적으로 큰 mPEG에 의존하기 때문에 미 반응 mPEG이 존재하게 되면 생성물과의 분리가 매우 어려워 제거가 용이한 succinic anhydride를 과량으로 사용하였다. 미반응 succinic anhydride는 반응이 끝난 후 반응용액이 상온으로 냉각될 경우 재결정에 의해서 대부분 석출되어 단순여과를 통해서 쉽게 제거되었으며, 이때 제거되지 않은 양도 acetone을 이용한 최종 재결정으로 제거가 가능하였다.

생성물의 합성여부는 FT-IR과 ^{1}H-NMR을 이용하여 확인하였다. 그림 33은 $mPEG_{5000}$과 $mPEG_{5000}$-succinate의 FT-IR 스펙트럼을 비교한 것으로 생성물에서 새롭게 형성되는 ester결합에 의한 C=O 작용기의 피이크가 1736 cm^{-1}에서 관찰되었다. 또한 그림 34의 ^{1}H-NMR 스펙트럼에서는 화학반응의 결과로 mPEG의 말단 수산화작용기가 위치한 탄소의 proton들이 ester 작용기의 영향을 받아 그에 해당하는 피이크가 4.26 ppm으로 이동하여 형성되었고, mono-succinate의 ethylene proton들에 해당하는 피이크가 2.68~2.61 ppm에서 새롭게 형성되었다. 이렇게 새롭게 생성되는 피이크들과 적분비를 통해서 $mPEG_{5000}$-succinate의 합성을 확인하였다.

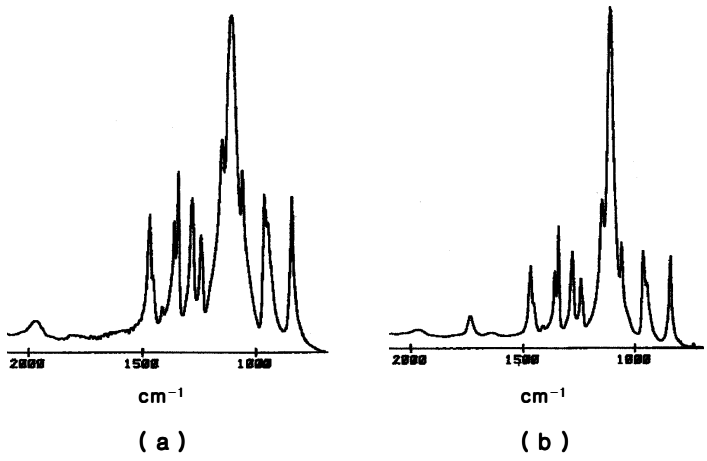


Figure 33. FT-IR spectra of (a)mPEG$_{5000}$ and (b)mPEG$_{5000}$-succinate.

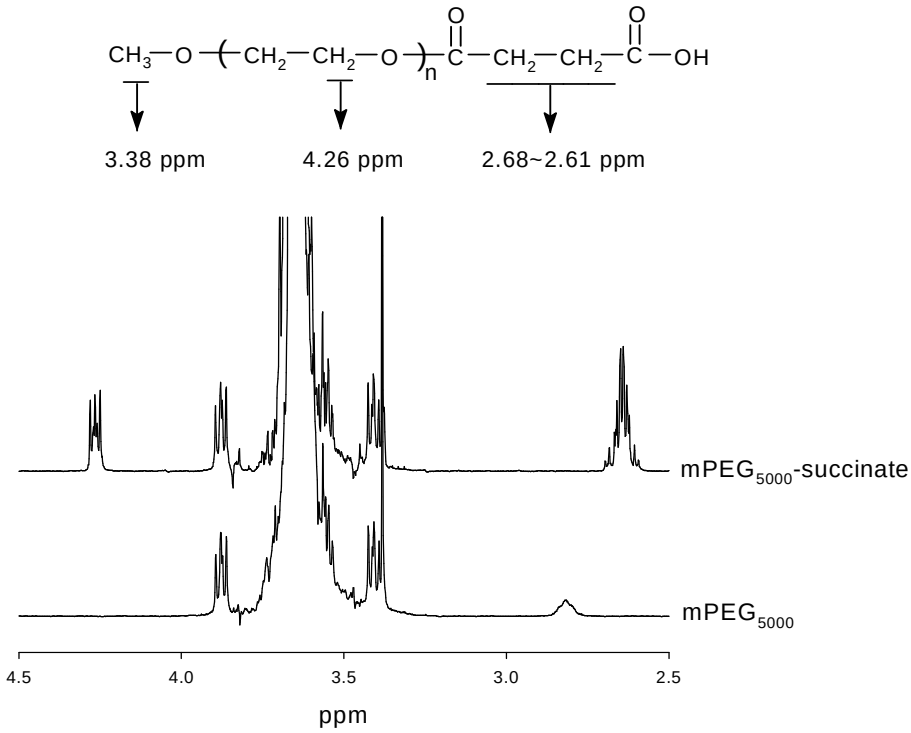


Figure 34. ^{1}H-NMR spectra of mPEG$_{5000}$ and mPEG$_{5000}$-succinate.

3.2 파클리탁셀 유도체 및 프로드럭의 합성

파클리탁셀의 7-OH에 구조적인 변화를 주고자 한다면 7-OH보다 큰 반응성을 갖는 2′-OH에 쉽게 제거 가능한 보호 작용기를 우선적으로 도입시킨 후 원하는 단계에서 그 작용기를 제거하는 방법으로 구조적 변경을 시도해야 한다. 본 실험에서는 silylating agent인 TBDMSCl을 이용하여 2′-OH에 silyl 작용기를 도입시킨 후 도입된 작용기를 제거하는 단계를 달리하여 PP7-5000a를 합성하였다. PP7-5000a의 합성경로에 따른 수득율, 생성물의 순도 및 정제의 용이성을 비교하여 보다 더 효율적인 합성경로로 나머지 프로드럭들을 합성하였다.

3.2.1 합성경로 *1*에 따른 *PP7-5000a*와 *PP7-20000*의 합성

파클리탁셀의 PEGylation에 앞서 수용성 고분자인 PEG와 모약인 파클리탁셀 중간에 위치하여 프로드럭의 가수분해 속도를 변화시키는 methylene carbonate 간격자를 도입시키기 위해 3단계에 거쳐 파클리탁셀 유도체(P3)를 합성하였다. 각 단계별 중간 유도체들(P1과 P2a) 및 최종 유도체인 P3의 합성여부는 TLC와 ^{1}H-NMR을 이용하여 확인하였다.

파클리탁셀의 7-OH에 methylene carbonate 간격자를 도입하기 전, 첫 번째 단계로 보다 더 큰 반응성의 2′-OH를 TBDMSCl과 반응시켜 silyl 작용기로 변화시켰다. 미반응 파클리탁셀을 최대한 줄여주기 위해 TBDMSCl을 10 배 과량으로 사용하였으며 이때 과량으로 사용된 TBDMSCl은 반응 후 5 % HCl 수용액과 $NaHCO_3$ 포화수용액을 이용한 추출과 ethyl acetate와 diethyl ether를 이용한 재결정으로 제거하였다. 그림 35는 출발물질인 파클리탁셀과 합성된 P1 유도체의 ^{1}H-NMR 스펙트럼을 상호 비교한 것이다. 4.80~4.78 ppm에서 3′-H와 2′-OH의 proton과의 짝지음으로 인하여 4중 갈라짐으로 나타나는 파클리탁셀의 2′-H 피이크가 2′-OH에 silyl 작용기가 도입됨으로써 3′-H만의 짝지음으로 인하여 2중 갈라짐 피이크가 되어 4.67~4.66 ppm에서 나타났으며, 3.55~3.53 ppm에서 보이는 2′-OH의 피이크가 P1의 스펙트럼에서는 사라

짐을 보였다. 또한 silyl 작용기에 있는 *tert*-butyl dimethyl의 proton들에 해당하는 피이크들이 0.80 ppm과 -0.29 ppm에서 새롭게 형성되었으며, 적분비는 2′-H의 피이크와 비교하였을 때 1:9:4로 이론치와 일치하여 반응에서 과량으로 사용된 TBDMSCl은 2′-OH에만 반응하며 반응성이 상대적으로 낮은 7-OH와는 본 실험의 조건에서 반응하지 않음을 확인하였다.

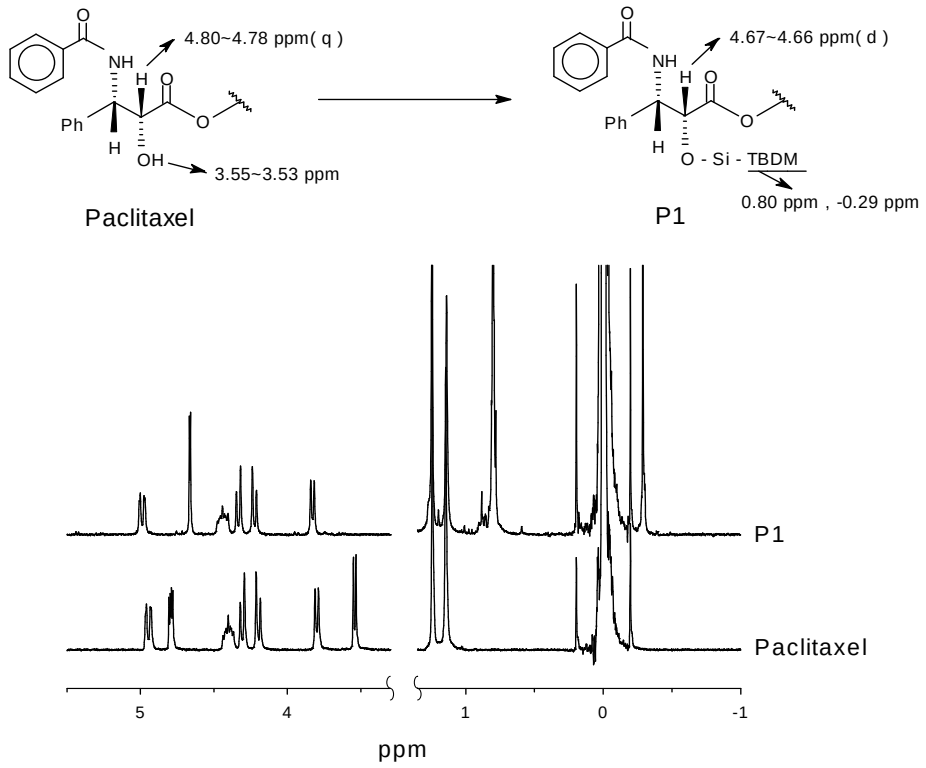


Figure 35. ^{1}H-NMR spectra of paclitaxel and P1.

간격자를 도입시키는 두 번째 단계는 발열반응으로 chloromethyl chloroformate를 첨가할 경우 반응기 내부의 온도가 상승하며, 이러한 온도상승은 여러 부반응을 일으킬 수 있기 때문에 얼음중탕을 이용하여 반응기 내부의 온도가 25℃를 넘지 않도록 천천히 첨가하였다. 이때 반응촉매로는 pyridine을 사용하였으며 사용된 양

은 P1의 5 당량일 경우 가장 좋은 수득율을 보여주었다. P1에서 P2a로의 반응여부는 n-hexane과 ethyl acetate를 1:1(v/v)로 혼합한 전개용매를 사용하여 TLC로 확인하였는데, 반응이 진행됨에 따라 R_f값이 0.58인 P1의 반점(spot)이 점점 사라지고 R_f값이 0.83인 P2a의 반점이 새롭게 생성됨을 보여주었다. P1에서 P2a로의 전환에서 나타나는 이러한 R_f값의 상승은 극성인 7-OH 작용기가 좀 더 비극성인 작용기로의 치환에 의한 전체화합물의 비극성화에 따른 것이다. 그림 36은 반응물인 P1과 chloromethyl chloroformate 그리고 생성물인 P2a의 ^{1}H-NMR 스펙트럼을 비교한 것으로 P1의 7-OH에 간격자 그룹이 도입됨으로써 6-C의 두개의 proton 및 7-OH의 proton과의 짝지음의 영향으로 4.48~4.41 ppm에서 나타나는 P1의 7-H의 다중 피이크가 P2a에서는 carbonate 작용기의 영향을 받아 5.61~5.55 ppm의 4중 피이크로 이동해서 나타남과 동시에 6.01~5.98 ppm(d, J=6.60 Hz)과 5.54~5.51 ppm(d, J=6.60 Hz)에서 chloromethyl carbonate 작용기의 proton에 의한 2 개의 2중 피이크가 새롭게 형성됨을 확인하였다. 반응 전 chloromethyl chloroformate의 스펙트럼에서는 5.76 ppm에서 단일 피이크로 나타나던 methylene 작용기에 존재하는 2 개의 proton이 P2a에서는 2 개의 2중 피이크의 갈라진 형태로 나타나는 것은 거대한 파클리탁셀 분자에 의한 chloromethyl carbonate 작용기의 분자사슬의 회전운동이 제한됨으로써 인접 proton에 대한 스핀상태의 영향이 상쇄되지 않기 때문에 발생하는 스핀-스핀 짝지음 현상에 기인한다.

PEGylation 반응 전, P2a의 2′-C에 있는 silyl 작용기를 산을 이용하여 원래의 작용기인 수산화작용기로 다시 바꿔줌으로써 파클리탁셀의 마지막 단계 유도체(P3)를 합성하였다. 반응에서 전체용액의 HF 농도는 5 %가 되도록 조절하였다. P3로의 반응여부는 TLC로 확인하였으며, 이때 n-hexane과 ethyl acetate를 1:1(v/v)로 혼합한 전개용매를 사용하였다. 0.83의 R_f값을 갖는 P2a의 2′-C에 있는 silyl 작용기가 다시 수산화 작용기로 전환되면서 P3의 극성이 증가하여 R_f가 0.52인 지점에 반점이 새롭게 형성되었다. 산에 의한 반응물의 산화가 비교적 빠르게 일어나기 때문에 TLC를 이용하여 반응여부를 확인한 직후 $NaHCO_3$ 포화수용액으로 반응용액을 중화시켜 반응을 종결시켰다. 재결정을 거친 생성물 P3의 합성여부는 ^{1}H-NMR 스펙트럼으로 확인하였다. 그림 37은 P2a와 P3의 ^{1}H-NMR 스펙트럼을 비교한 것으로 P2a의 silyl 작용기가

제거됨으로써 0.80 ppm과 -0.29 ppm에서 나타나는 *tert*- butyl dimethyl의 proton 피이크들이 사라짐과 동시에 3.56 ppm에서 2′-OH의 proton에 해당하는 피이크가 다시 생성되었다. 또한 4.82~4.79 ppm에서 나타나는 2′-C의 proton 피이크가 3′-C과 2′-OH의 proton과의 짝지음으로 인하여 4중 피이크로 갈라짐을 보였다.

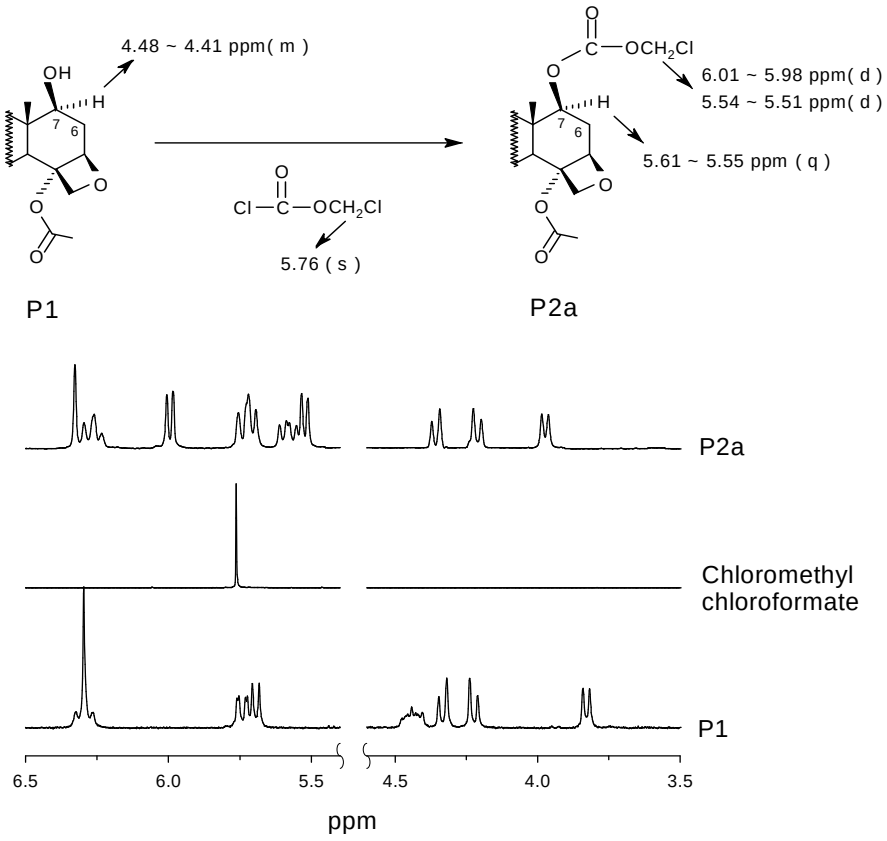


Figure 36. ^{1}H-NMR spectra of P1, chloromethyl chloroformate, and P2a.

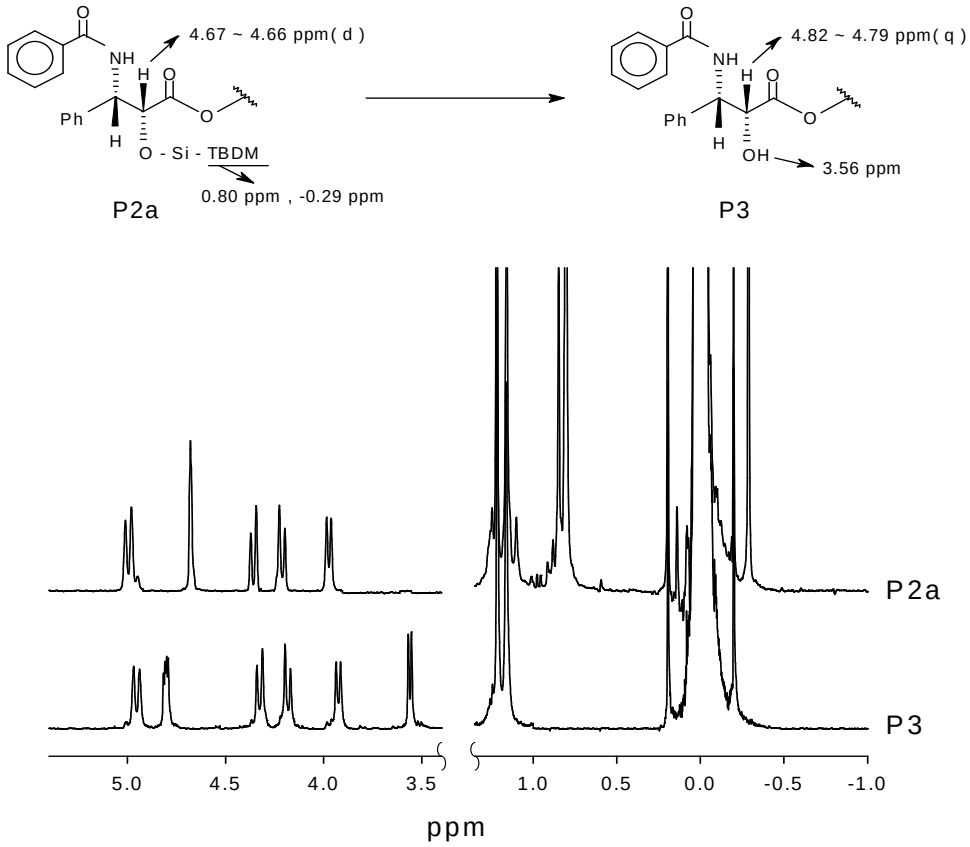


Figure 37. ^{1}H-NMR spectra of P2a and P3.

$mPEG_{5000}$-succinate와 $mPEG_{20000}$-succinate의 P3에 대한 PEGylation은 파클리탁셀에 도입된 chloromethyl carbonate의 염소와 mPEG-succinate의 한 쪽 말단에 위치한 carboxylic acid 작용기의 친핵성 치환반응으로 염소보다 요오드일 경우 acid 작용기의 친핵성 공격이 용이하기 때문에 할로겐 교환반응을 목적으로 NaI를 사용하였고, phase transfer agent로 18-crown-6를 첨가하였다. 반응이 진행되는 동안 반응기 내부의 온도는 파클리탁셀의 구조적 변형이 발생하지 않도록 90 ℃를 넘지 않게 조절하였으며, 분자량이 큰 $mPEG_{20000}$-succinate의 경우 분자량에 따른 입체장애 효과에 기인한 수득율의 감소 때문에 반응시간을 길게 하였다. 생성물의 합성여부는

^{1}H-NMR로 확인하였다. 제거되지 않은 미반응 mPEG-succinate의 존재여부는 8.13 ppm에서 나타나는 파클리탁셀의 이중 피이크(2H, *o*-Ph2)와 3.90~3.38 ppm에서 나타나는 mPEG의 반복단위 ethylene proton에 의한 다중 피이크의 적분비를 비교함으로써 확인하였다. 미 반응 mPEG-succinate가 존재하지 않는다고 가정할 때, 즉 파클리탁셀과 mPEG-succinate가 1:1로 반응하였다면 앞에서 언급한 proton의 적분비가 이론적으로 mPEG의 분자량이 5000인 PP7-5000a의 경우 1:225가 되어야 하며 20000인 PP7-20000의 경우 1:906이 되어야 하지만 간단한 추출과 재결정만으로 얻은 생성물의 적분비를 비교한 결과 PP7-5000a는 1:370, PP7-20000은 1:1820으로 미반응 mPEG이 상당량 존재함을 알 수 있었다. 이러한 미반응 mPEG-succinate의 존재는 약물의 정량적인 약효 측정에 영향을 주기 때문에 미반응 mPEG-succinate를 제거해야 한다. 하지만 mPEG이 프로드럭에서 차지하는 부분이 파클리탁셀에 비하여 상당히 크기 때문에 프로드럭과 mPEG-succinate의 물성이 유사하여 추출이나 재결정과 같은 간단한 방법으로는 서로 분리하기가 매우 어려워 Prep-HPLC를 이용한 분리 및 분취를 시도하였다. 반응 생성물에 대한 Prep-HPLC는 Xterra® RP 7 μm 19×300 mm C_8 Column을 이용하였고, 효율적인 분리를 위해 표 4와 같이 20 mL/min의 유속에서 시간에 따른 용매(acetonitrile과 3차 증류수)의 조성에 구배를 주었으며 검출기로는 파장을 228nm

Table 4. Gradient condition of Prep-HPLC.

Time(min)	Flow rate (mL/min)	% Acetonitrile	% H_2O
Initial	20	20	80
5	20	20	80
10	20	30	70
35	20	70	30
40	20	100	0
45	20	100	0
50	20	20	80

로 고정시킨 자외선 검출기를 사용하였다. 이때 시료는 3차 증류수에 10 w% 농도로 녹인 후 3 mL씩 주입하였다. 그림 38과 39는 P3에 $mPEG_{5000}$-succinate와 $mPEG_{20000}$-succinate를 반응시켜 얻은 생성물에 대한 Prep-HPLC 크로마토그램으로 각각 18분과 15.5분에 주피이크를 보였다. 자외선 검출기를 사용하였기 때문에 발색단을 갖지 않는 미반응 mPEG-succinate에 해당하는 피이크는 보이지 않아 프로드럭과 미반응 mPEG-succinate의 분리여부는 직접 확인할 수 없지만 동일한 조건에서 자외선 검출기가 아닌 증기화광산란 검출기(ELSD)를 사용하였을 때 15~16 분에 $mPEG_{5000}$-succinate의 검출 피이크를 보였고 mPEG부분의 분자량 증가에 따른 친수성의 증가로 인하여 $mPEG_{20000}$-succinate는 머루름 시간이 짧아져 13~14 분에 피이크를 보임으로써 그림 38과 39에서 보이는 주피이크는 얻고자 하는 프로드럭의 검출에 의한 피이크임을 예상하였다. 각각의 크로마토그램의 주피이크에 대해서 분취하였으며 분취를 통해 얻은 시료는 ^{1}H-NMR, UV, MALDI-TOF와 분석용 HPLC를 이용하여 미반응 mPEG-succinate가 제거된 최종 화합물임을 확인하였다.

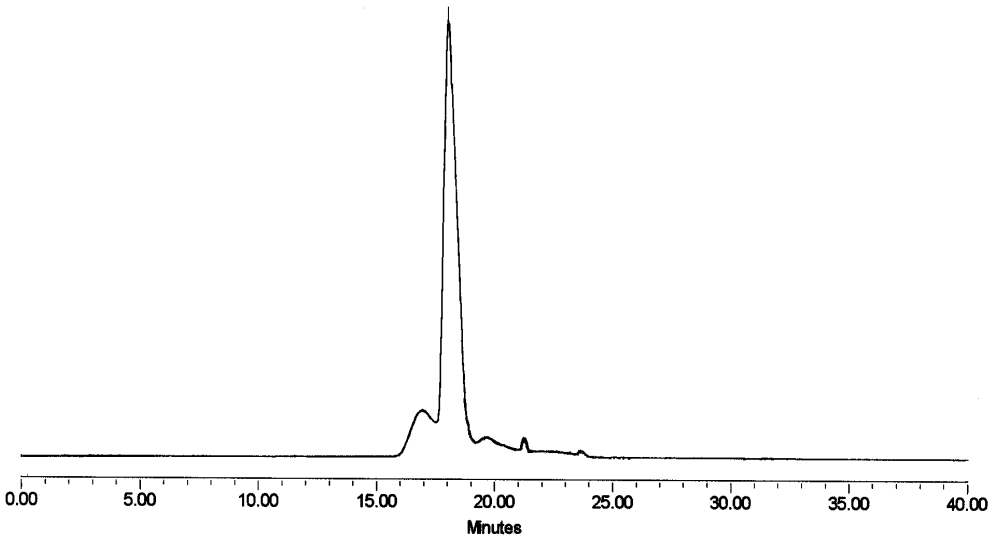


Figure 38. Prep-HPLC chromatogram of crude PP7-5000a.

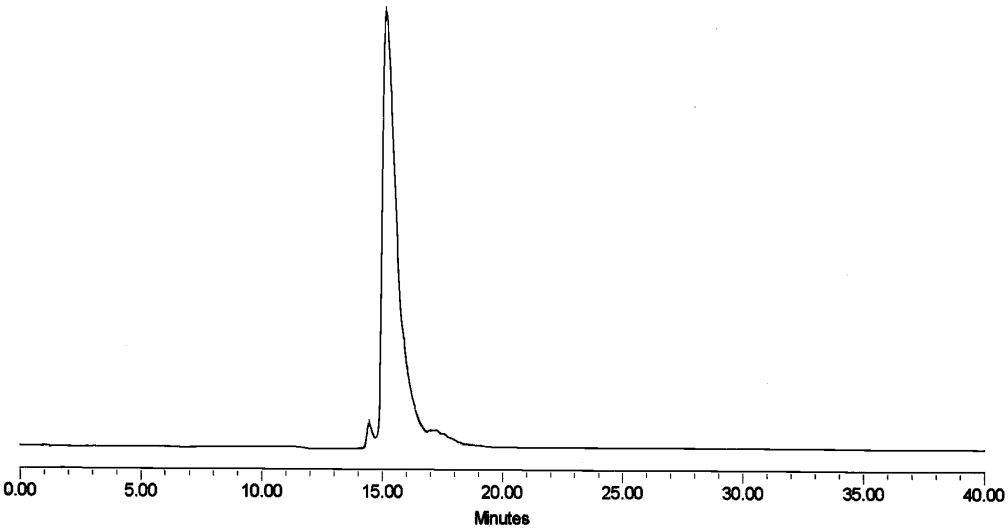


Figure 39. Prep-HPLC chromatogram of crude PP7-20000.

Prep-HPLC를 통해 분취해서 얻은 시료들에 대한 ^{1}H-NMR 스펙트럼은 그림 40과 같다. P3에 mPEG-succinate가 PEGylation됨에 따라 3.90~3.38 ppm에서 mPEG의 ethylene proton에 해당하는 다중 피이크가 보였다. 앞서 언급했던 8.13 ppm에서 나타나는 파클리탁셀의 기준 피이크와 mPEG의 ethylene proton 피이크의 적분비가 Prep-HPLC전의 화합물과 비교하였을 때 PP7-5000a의 경우 1:370에서 1:235로 감소하였으며 PP7-20000의 경우도 1:1820에서 1:980으로 크게 감소하여 미반응 mPEG-succinate가 효과적으로 제거되었음을 확인하였다. 그러나 ^{1}H-NMR 스펙트럼을 이용한 적분비의 비교는 이론값과는 약간의 차이를 보임으로써 정확한 정량적 분석에 문제점을 갖는다. 이와 같은 이론값과의 차이는 기준 피이크에 해당하는 proton수에 비하여 mPEG의 ethylene proton수가 상대적으로 너무 크기 때문에 mPEG의 etylene proton에 해당하는 피이크가 곁 피이크를 동반할 뿐만 아니라 3.90~3.38 ppm에서 파클리탁셀의 다른 피이크들과 중첩을 일으킴으로써 나타난다. ^{1}H-NMR 스펙트럼을 이용한 정량적 해석의 문제점을 해결하기 위해서 파클리탁셀과 최종 프로드럭의 농도에 따

른 UV 흡광도를 이용하여 프로드럭내에 포함된 파클리탁셀의 농도를 계산함으로써 미반응 mPEG-succinate의 존재여부를 확인하였다.

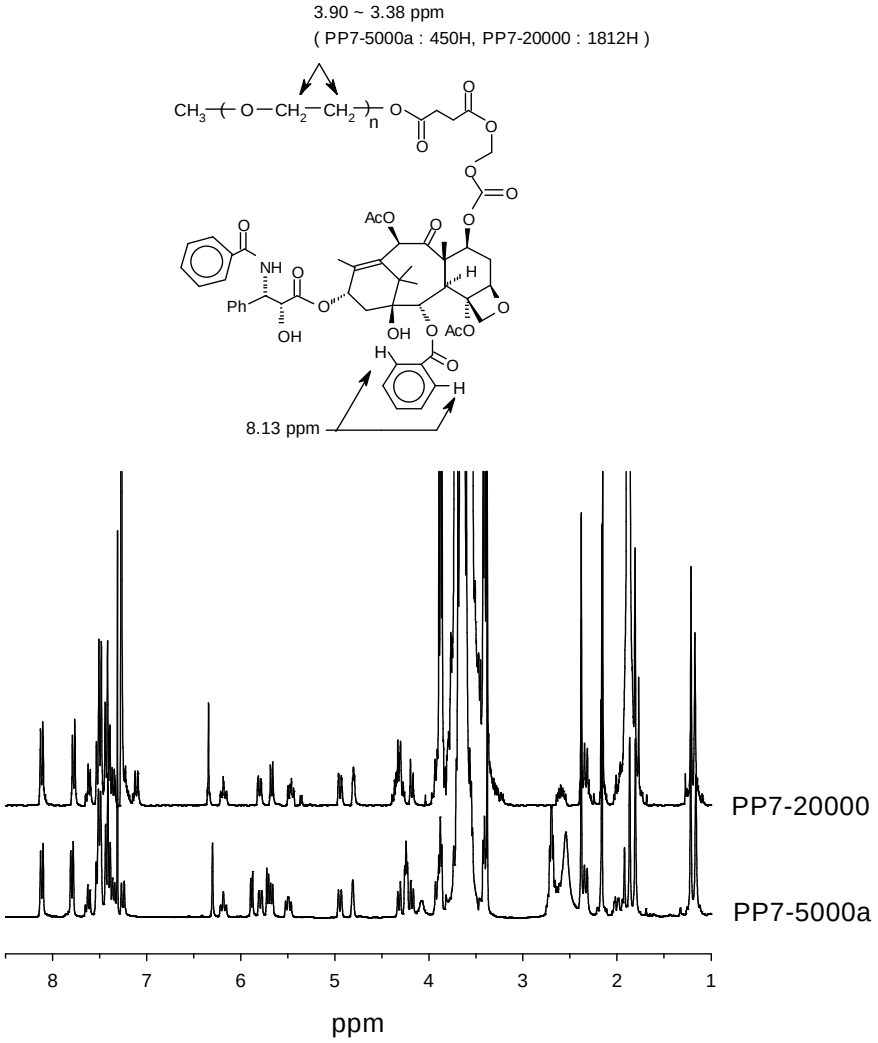


Figure 40. ^{1}H-NMR spectra of PP7-5000a and PP7-20000 after Prep-HPLC.

그림 41은 파클리탁셀의 농도를 1.95×10^{-5}M에서 9.76×10^{-5} M까지 변화시키며 얻은 UV 스펙트럼으로 모든 농도에 대하여 228 nm에서 가장 큰 흡광도를 보이며

파클리탁셀의 농도가 증가함에 따라 228 nm에 해당하는 흡광도가 그림 42와 같이 선형적으로 증가하였다. 이와 같이 농도에 따른 흡광도의 선형적인 증가는 해당 농도에서 Beer-Lambert 식을 만족함을 의미하여 그림 42를 검정곡선으로 이용하여 특정 농도에서 프로드럭의 흡광도를 알면 프로드럭내에 존재하는 파클리탁셀의 농도를 계산할 수 있다. 그림 43은 최종 프로드럭인 PP7-5000a와 PP7-20000의 UV 스펙트럼으로 파클리탁셀과 동일하게 228 nm의 파장에서 가장 큰 흡광도를 보이며 228 nm에서 PP7-5000a(9.32×10^{-6} M)와 PP7-20000(1.70×10^{-6} M)은 각각 0.273과 0.044의 흡광도를 보였다. 이 흡광도 값을 그림 42의 검정곡선을 대입하여 얻은 프러드럭내의 파클리탁셀의 함유농도는 PP7-5000a의 경우 100 %로 Prep-HPLC를 통해 미반응 mPEG-succinte가 완전히 제거되었음을 확인하였고, PP7-20000은 92 %로 미반응 mPEG-succinte에 대한 효과적인 제거는 이루어졌지만 소량 존재함을 확인할 수 있다. 분자량이 상대적으로 큰 PP7-20000에 대한 Prep-HPLC의 분리효율의 저하는 분자내에서 차지하는 mPEG의 비율이 PP7-5000a의 경우 보다 더 증가되어 프로드럭과 미반응 mPEG-succinte와의 극성차이에 기여하는 소수성 부분의 영향이 감소하기 때문이다.

최종적으로 미 반응 mPEG-succinate의 제거여부와 순도를 확인하기 위해 Prep-HPLC 후의 PP7-5000a와 mPEG-succinate에 대하여 MALDI-TOF와 분석용 HPLC를 실시하였다. 그림 44는 PP7-5000a와 mPEG-succinate에 대한 MALDI-TOF 스펙트럼으로 프로드럭과 mPEG-succinate의 분자량차이는 파클리탁셀의 분자량에 해당함을 확인하였다. 그림 45는 분석용 HPLC 크로마토그램으로 Prep-HPLC를 통해 얻은 PP7-5000a는 99% 이상의 순도를 보였다.

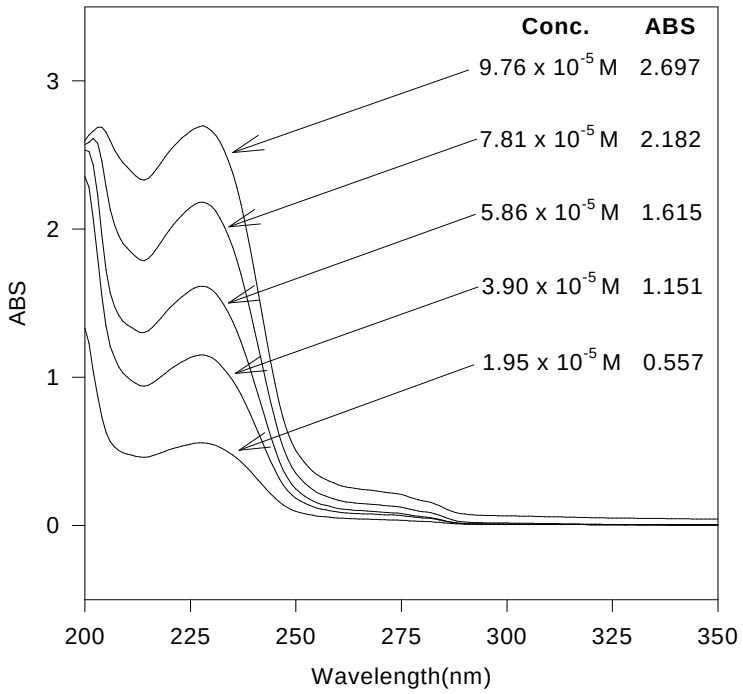


Figure 41. UV-spectra of paclitaxel at different concentrations.

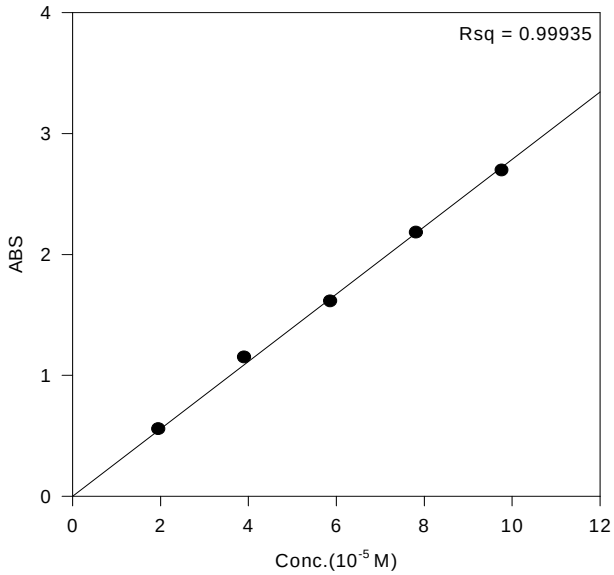


Figure 42. Calibration curve for absorptivity as a function of concentration of the Paclitaxel.

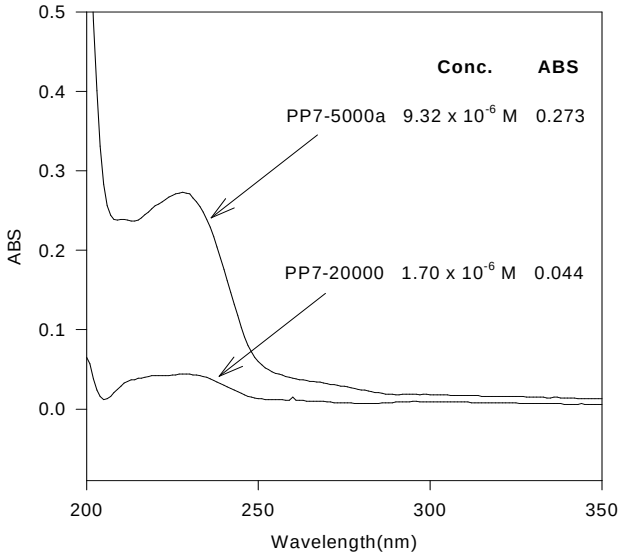


Figure 43. UV-spectra of prodrugs at a specific concentration.

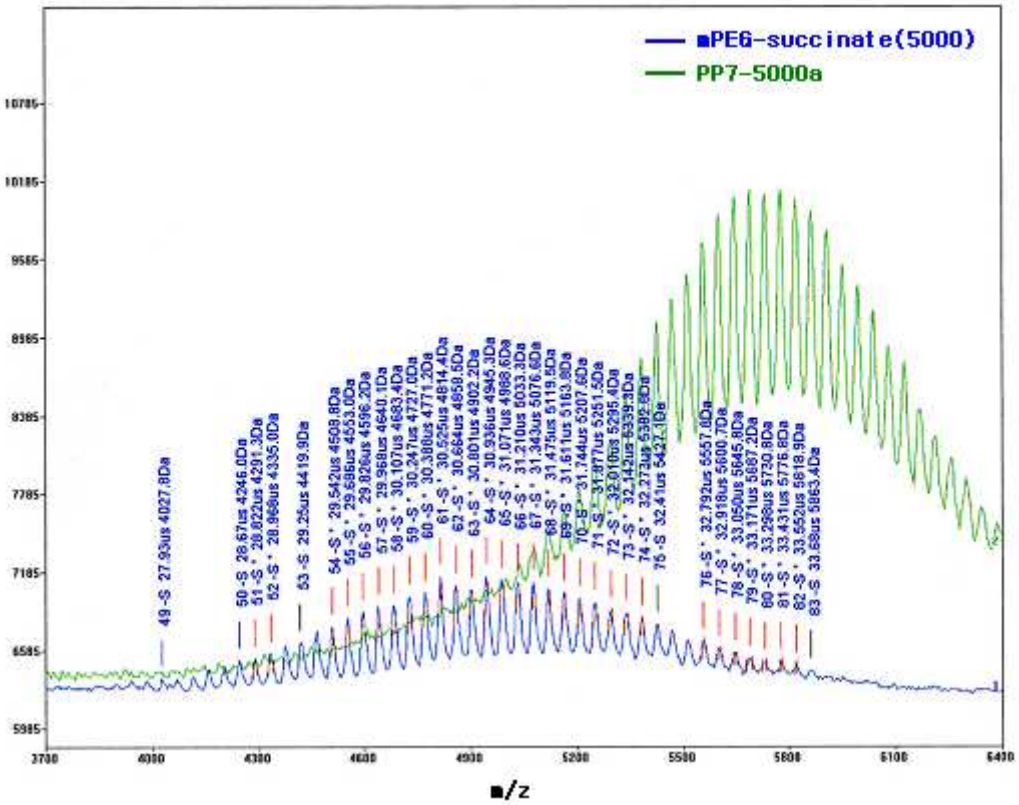


Figure 44. MALDI-TOF spectra of $mPEG_{5000}$-succinate and PP7-5000a.

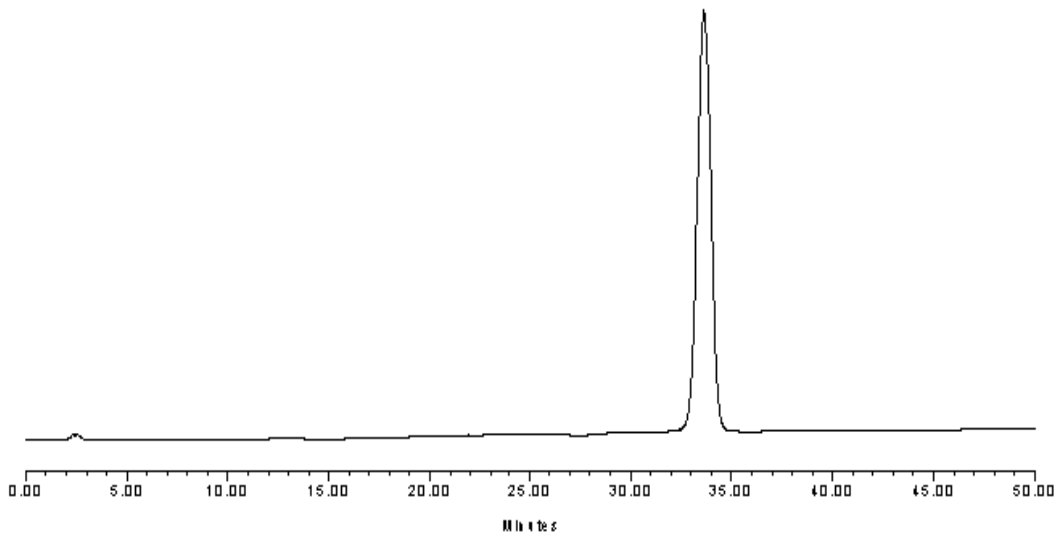


Figure 45. Analytical HPLC chromatogram of PP7-5000a after Prep-HPLC.

3.2.2 합성경로 *2*에 따른 *PP7-5000a*의 합성

합성경로 1에 의한 프로드럭의 합성의 경우 파클리탁셀의 2′-OH에 간격자 작용기가 반응하지 못하도록 도입시킨 보호 작용기를 제거하는 유도체합성의 마지막 단계에서 강산의 사용에 따른 파클리탁셀의 구조변형으로 인하여 높은 순도와 수득율을 기대하기 어렵다. 이러한 문제점은 최종 PEGylation 후 높은 순도의 프로드럭을 얻는데 있어 큰 장애물로 작용하며 값비싼 모약의 손실이라는 점에서 바람직하지 못하다. 유도체의 합성에서 나타나는 문제점뿐만 아니라 최종단계인 PEGylation과정은 mPEG-succinate 말단에 위치한 $-COO^-$의 alkyl halide에 대한 친핵성 반응으로 2′-OH를 갖는 P3에 대한 PEGylation일 경우 $2'-O^-$의 친핵성 공격성향에 의한 주반응의 반응효율의 저하를 배제할 수 없어 수득율의 저하를 예상할 수 있다. 실제로 Prep-HPLC 후 얻은 PP7-5000a와 PP7-20000의 수득율은 각각 60%와 48%로 낮은 수득율을 보였다. 이와 같은 문제점을 극복하기 위하여 2′-OH가 silyl 작용기에 의해서 보호된 파클리탁셀의 유도체(P2a)에 먼저 PEGylation을 한 후 보호 작용기를 제거하는 합성경로 2로 PP7-5000a를 합성하여 합성과정의 용이성 및 수득율을 비교하였다.

PEGylated-P2a의 합성은 P3에 대한 PEGylation과 동일한 방법으로 실시하였으며 합성여부는 ^{1}H-NMR로 확인하였다. PEGylated-P2a와 P2a의 ^{1}H-NMR 스펙트럼은 그림 46과 같다. P2a의 PEGylation으로 인하여 4.39~3.38 ppm에서 mPEG의 proton들에 해당하는 다중 피이크가 나타남으로써 생성물의 합성여부를 확인하였다. 또한 Prep-HPLC를 이용한 정제과정을 거치지 않은 상태에서 파클리탁셀의 8.13 ppm 기준 피이크와 mPEG의 다중 피이크와의 적분비가 1:245로 P3에 대한 PEGylation에서 보여줬던 1:370과 비교하였을 때 상당히 작은 값을 보였으며, Prep-HPLC 후의 순도 높은 PP7-5000a가 1:232인 점을 감안하면 P2a에 대한 PEGylation은 상당히 높은 반응정도를 보였다. 이러한 결과는 앞서 언급한 $2'-O^-$의 친핵성에 의한 반응성의 저해효과가 P2a의 경우에는 배제되기 때문에 나타나는 것으로 P2a에 대한 PEGylation이 2′-OH 작용기를 가지고 있는 P3에 대한 PEGylation보다 효율적인 반응임을 예측할 수 있다.

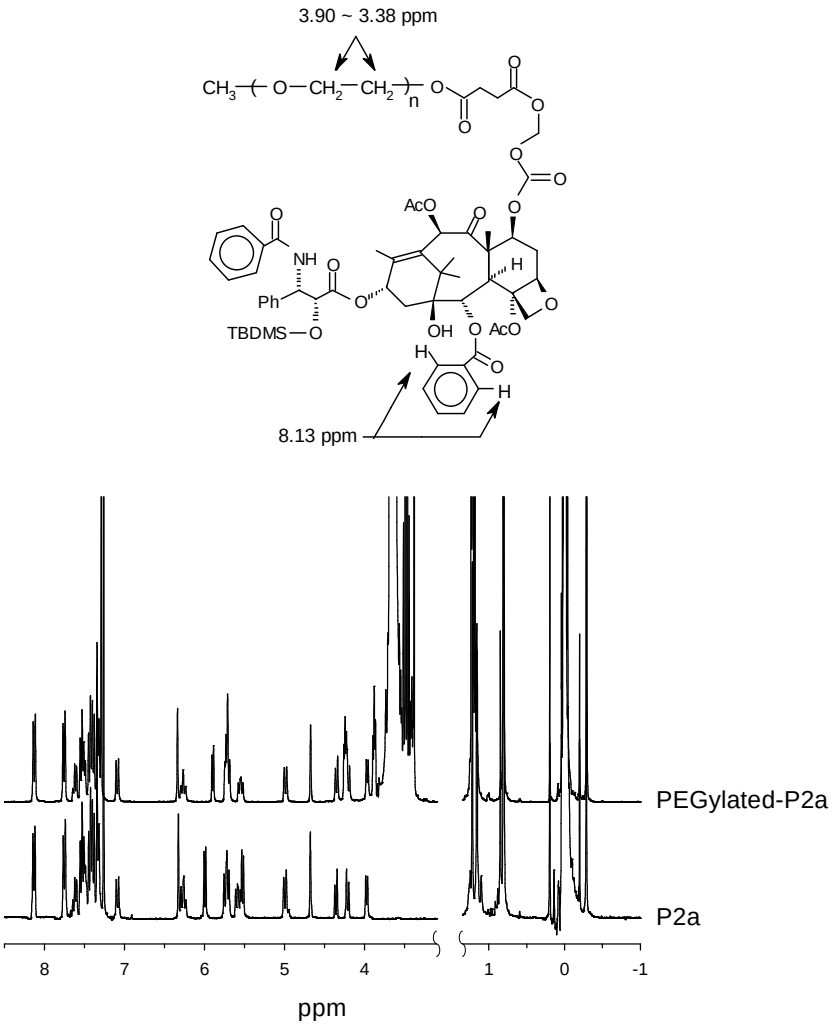


Figure 46. ^{1}H-NMR spectra of P2a and PEGylated-P2a.

합성경로 2의 최종반응인 silyl 작용기의 제거반응은 합성경로 1에서의 방법과 동일하게 실시하였다. 반응이 진행되는 동안 시간에 따라 채취한 시료의 ^{1}H-NMR 스펙트럼에서 0.80 ppm과 -0.29 ppm의 silyl 작용기에 의한 피이크가 사라짐으로써 silyl 작용기의 제거여부를 확인할 수 있었지만 8.13 ppm의 피이크와 3.90~3.38 ppm 피이크의 적분비가 반응 전 1:245에서 반응 완결 후 1:280으로 증가함으로써 미반응 mPEG의 함유량이 오히려 증가함을 보였다. 반응 후 생성물에서의 mPEG의 증가는 산에 의한

silyl 작용기의 제거반응은 물론 파클리탁셀과 간격자 사이에 위치한 carbonate 작용기의 가수분해 반응도 동시에 발생함을 의미하며 이러한 가수분해 반응은 프로드럭의 수득율을 저하시키는 원인이 된다.

반응 생성물내에 존재하는 mPEG-succinate를 제거하기 위해서 앞서 언급한 방법과 동일한 조건으로 Prep-HPLC를 실시하였으며 그에 대한 크로마토그램은 그림 47과 같다. 합성경로 1에 의한 방법으로 얻은 프로드럭의 크로마토그램과 큰 차이점을 보이지 않았으며 주 피이크에 해당하는 부분을 분취하여 최종 프로드럭을 얻을 수 있었다. 그림 48은 분취를 통해 얻은 최종 프로드럭과 silyl 작용기의 제거반응 전 PEGylated-P2a의 ^{1}H-NMR 스펙트럼으로 0.80 ppm과 -0.29 ppm의 silyl 작용기의 피이크는 사라졌으며 8.13 ppm과 3.90~3.38 ppm 피이크와의 적분비 또한 1:234로 mPEG-succinate가 완전히 제거된 PP7-5000a임을 확인하였다. 합성경로 2의 최종반응에서 발생하는 가수분해 반응으로 인하여 프로드럭의 높은 수득율은 기대하기 어려웠지만 합성경로 1의 60 %에 비하면 높은 78 %의 수득율을 보여 silyl 작용기를 제거하는 반응의 순서를 달리함으로써 모약인 파클리탁셀의 손실을 줄일 수 있었다.

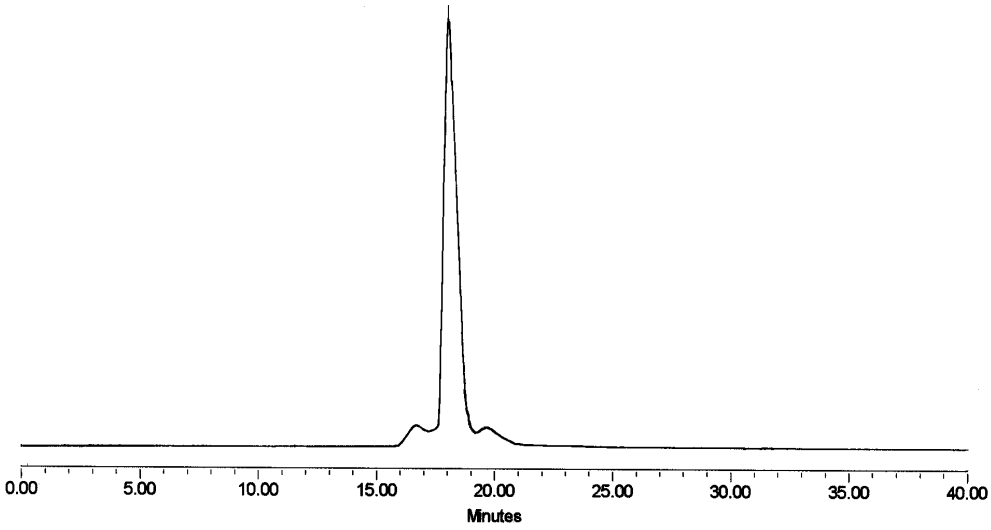


Figure 47. Prep-HPLC chromatogram of crude PP7-5000a.

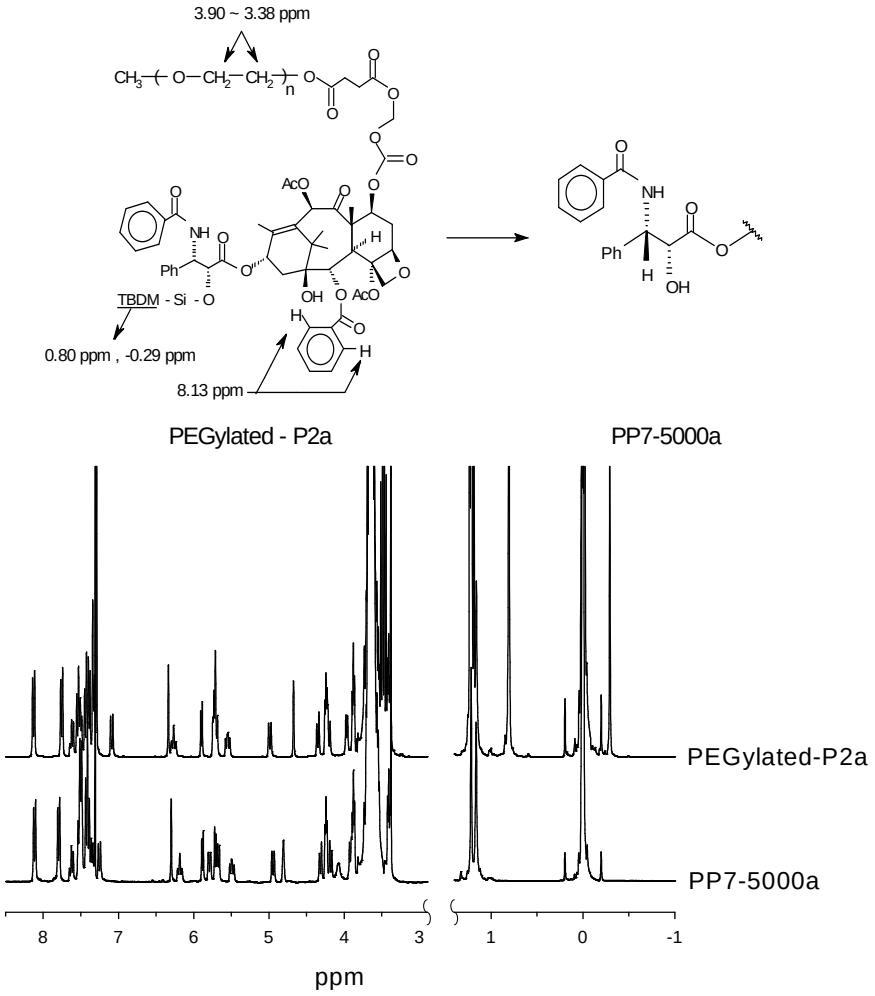


Figure 48. ^{1}H-NMR spectra of PEGylated-P2a and PP7-5000a.

3.2.3 합성경로 *2*에 따른 *PP7-5000b*와 *PP7-5000c*의 합성

간격자를 달리하기 위해 파클리탁셀의 2′-OH가 silyl 작용기에 의해 치환된 유도체(P1)에 각각 2-bromoethyl chloroformate와 1-chloroethyl chloroformate를 P2a의 합성과 동일한 방법으로 반응시켰다. 반응여부는 TLC를 이용하여 확인하였으며

^{1}H-NMR로 생성물들에 대한 구조를 확인하였다. 반응물들과 P2b의 ^{1}H-NMR 스펙트럼은 그림 47과 같다. P1의 7-OH에 간격자 그룹이 도입됨으로써 6-C의 두개의 proton 및 7-OH의 proton과의 짝지음으로 인하여 4.48~4.41 ppm에서 나타나는 P1의 7-H에 대한 다중 피이크가 P2b에서는 carbonate 작용기의 영향을 받아 5.53~5.50 ppm의 4중 피이크로 이동해서 나타남과 동시에 4.62~4.58 ppm에서 나타나는 반응물의 3중 피이크가 P2b에서는 4.54~4.41 ppm으로 이동하면서 다중 피이크로 나타남을 확인하였다. 이와 같은 현상은 P2a에서와 동일하게 파클리탁셀에 의한 간격자 작용기의 분자사슬의 회전운동이 제한되어지기 때문에 나타나는 스핀-스핀 짝지음에 의한 피이크 갈라짐에 기인한다.

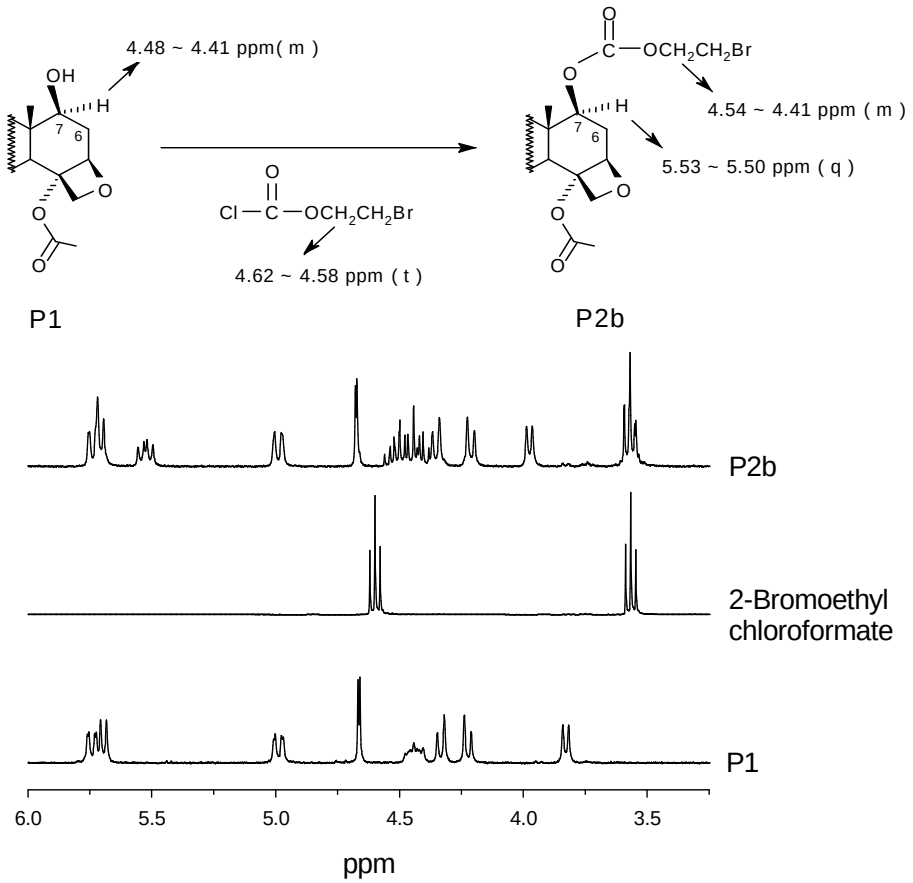


Figure 49. ^{1}H-NMR spectra of P1, 2-bromoethyl chloroformate, and P2b.

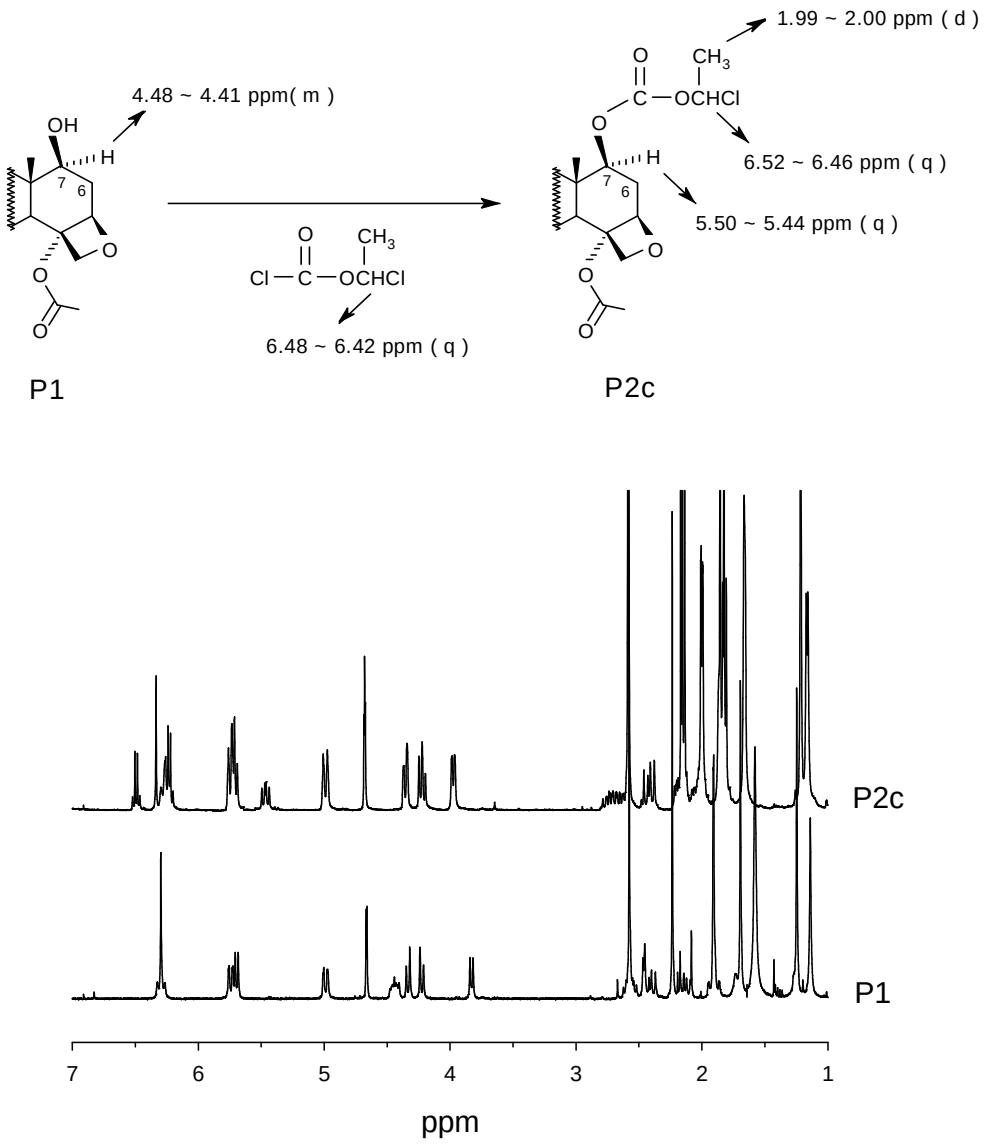


Figure 50. ^{1}H-NMR spectra of P1 and P2c.

P1에 1-chloroethyl chloroformate을 반응시켜 얻은 화합물의 ^{1}H-NMR 스펙트럼은 그림 50과 같다. P1의 4.48~4.41 ppm에서 나타나는 7-H 피이크가 화학반응의 결과로 P2c의 스펙트럼에서는 5.50~5.44 ppm으로 이동하여 나타나며 6.52~6.46 ppm과 1.89~1.87 ppm에서 간격자의 proton에 의해 각각 4중 피이크와 2중 피이크가 새롭게 형성됨으로써 합성여부를 확인하였다.

서로 다른 치환기를 7-C에 갖는 두 파클리탁셀 유도체들의 PEGylation은 PEGylated-P2a의 합성과 동일한 방법을 사용하였다. P2b의 경우 다른 유도체들(P2a와 P2c)과는 달리 7-C에 도입된 치환기의 말단에 위치한 할로겐이 염소가 아닌 브롬으로 보다 우수한 이탈성을 갖기 때문에 할로겐 교환반응을 위한 NaI를 사용하지는 않았다. 그림 51은 반응이 완결된 후 재결정으로 미반응 파클리탁셀의 유도체들을 제거한 후 얻은 생성물들의 ^{1}H-NMR 스펙트럼으로 두 화합물 모두 4.39~3.38 ppm에서 mPEG-succinate의 피이크들이 새롭게 생성됨으로써 파클리탁셀 유도체들에 대한 PEGylation여부를 확인하였다. 반응정도를 가늠할 수 있는 8.13 ppm 피이크와 3.90~3.38 ppm 피이크의 적분비는 PEGylated-P2b의 경우에 1:243이었으며, PEGylated-P2c에서는 상대적으로 높은 1:256이었다. PEGylated-P2c에서 나타나는 적분비의 상대적 증가는 P2c에 대한 mPEG-succinate의 반응성이 다른 유도체들에 비하여 낮다는 것을 의미하여 이러한 반응성의 감소는 $-COO^{-}$의 친핵성 공격을 받는 탄소가 P2c의 경우 2차 탄소로 1차 탄소인 P2a와 P2b에 비하여 큰 입체장애를 갖기 때문에 나타나는 것으로 생각된다.

최종 프로드럭들을 얻기 위한 과정은 PP7-5000a와 동일하였으며, PP7-5000b와 PP7-5000c의 경우에도 silyl 작용기의 제거반응에서 프로드럭의 가수분해를 동반하였다. 그림 52와 53은 PEGylation에서의 미반응 mPEG-succinate와 silyl 작용기 제거반응에서 가수분해로 생성되는 mPEG-succinate를 제거하기 위해 실시한 반응 생성물들에 대한 Prep-HPLC 크로마토그램으로, 주피이크에 대한 분취를 통해 각각 60 %와 57 %의 수득율에 해당하는 양을 얻었다.

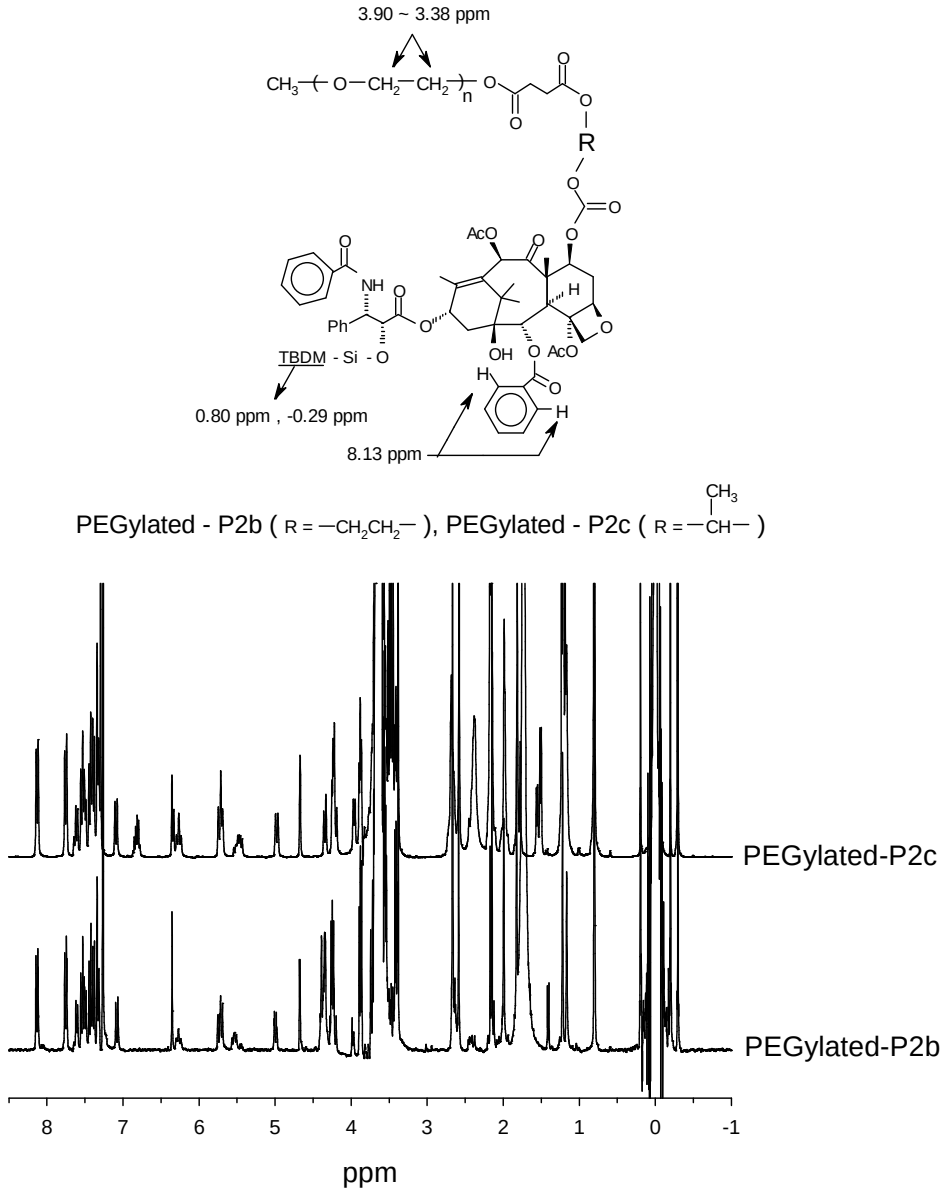


Figure 51. ^{1}H-NMR spectra of PEGylated-P2b and PEGylated-P2c.

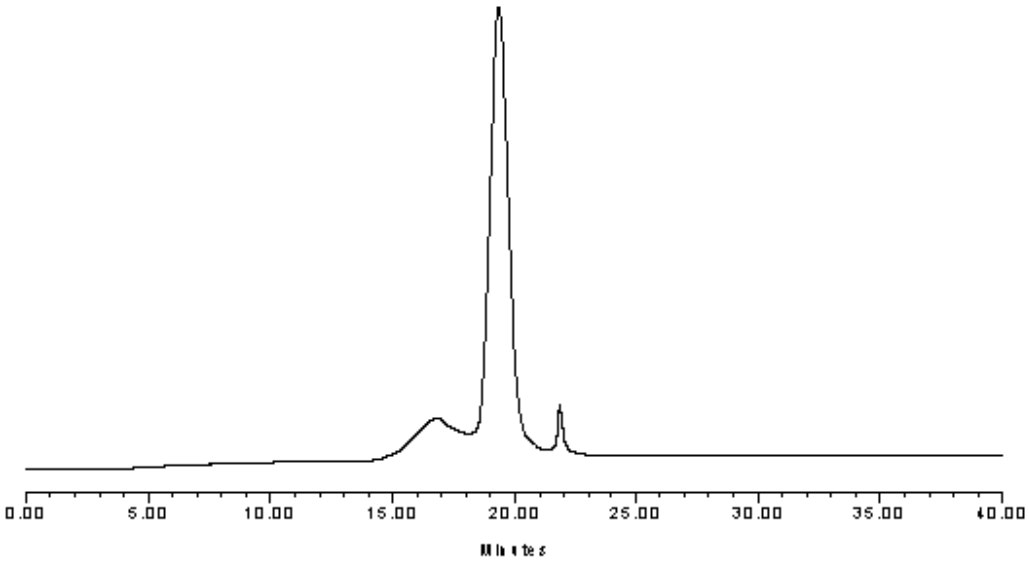


Figure 52. Prep-HPLC chromatogram of crude PP7-5000b.

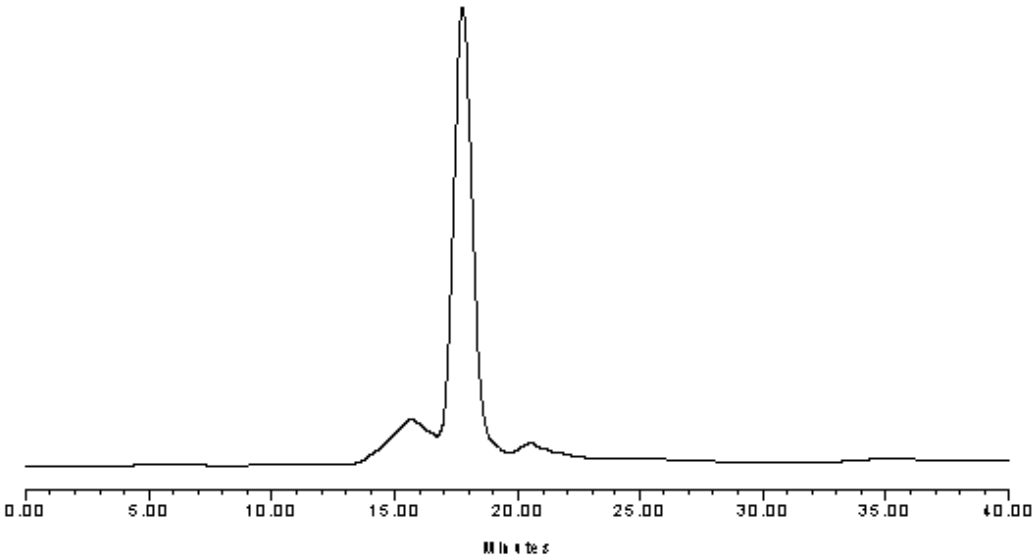


Figure 53. Prep-HPLC chromatogram of crude PP7-5000c.

그림 54와 55는 Prep-LC로 분취를 하여 얻은 시료들의 ^{1}H-NMR 스펙트럼이다. 0.80 ppm과 -0.29 ppm에서 보이는 silyl 작용기의 TBDM과 관련된 피이크들이 완전히 사라짐과 동시에 제거반응의 가수분해로 인하여 증가했던 8.13 ppm과 3.90~3.38 ppm 피이크의 적분비가 Prep-HPLC를 통해 1:236과 1:234로 감소함으로써 두 프로드럭 반응물에서 mPEG-succinate의 제거가 효과적으로 이뤄졌음을 확인하였다.

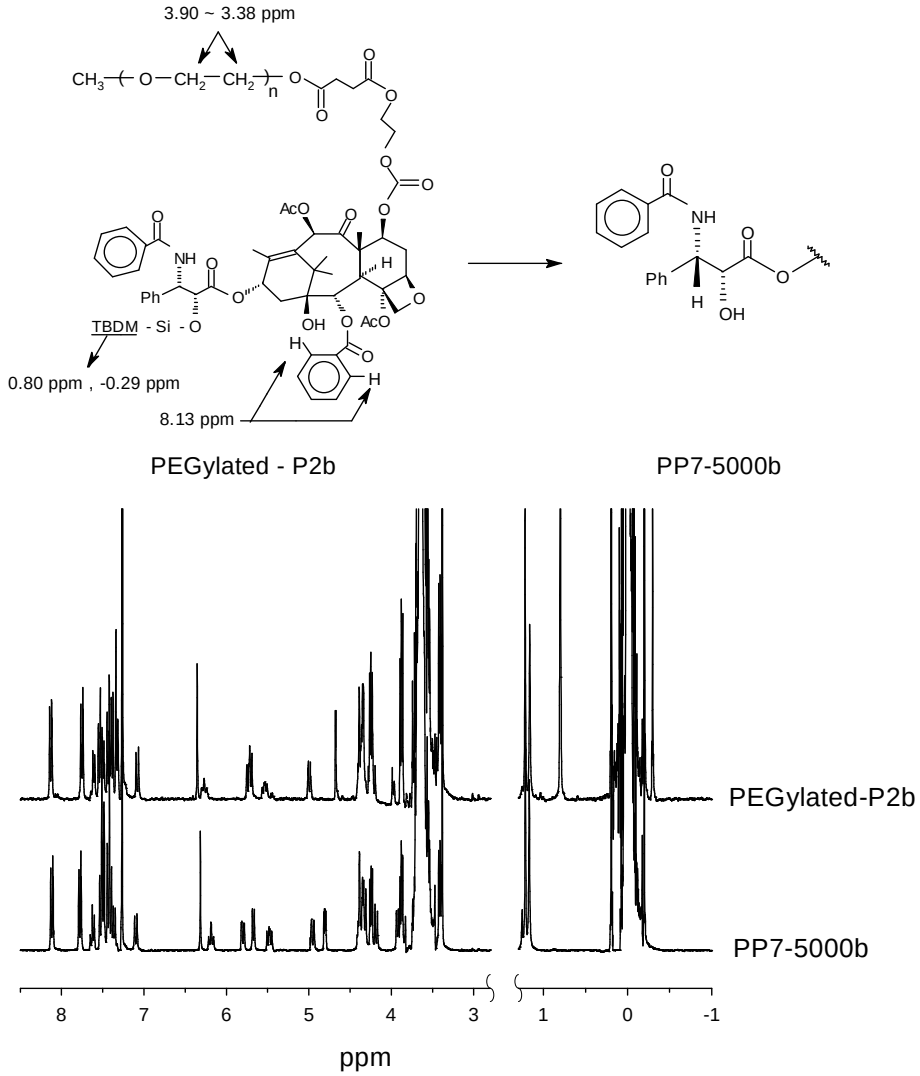


Figure 54. ^{1}H-NMR spectra of PEGylated-P2b and PP7-5000b.

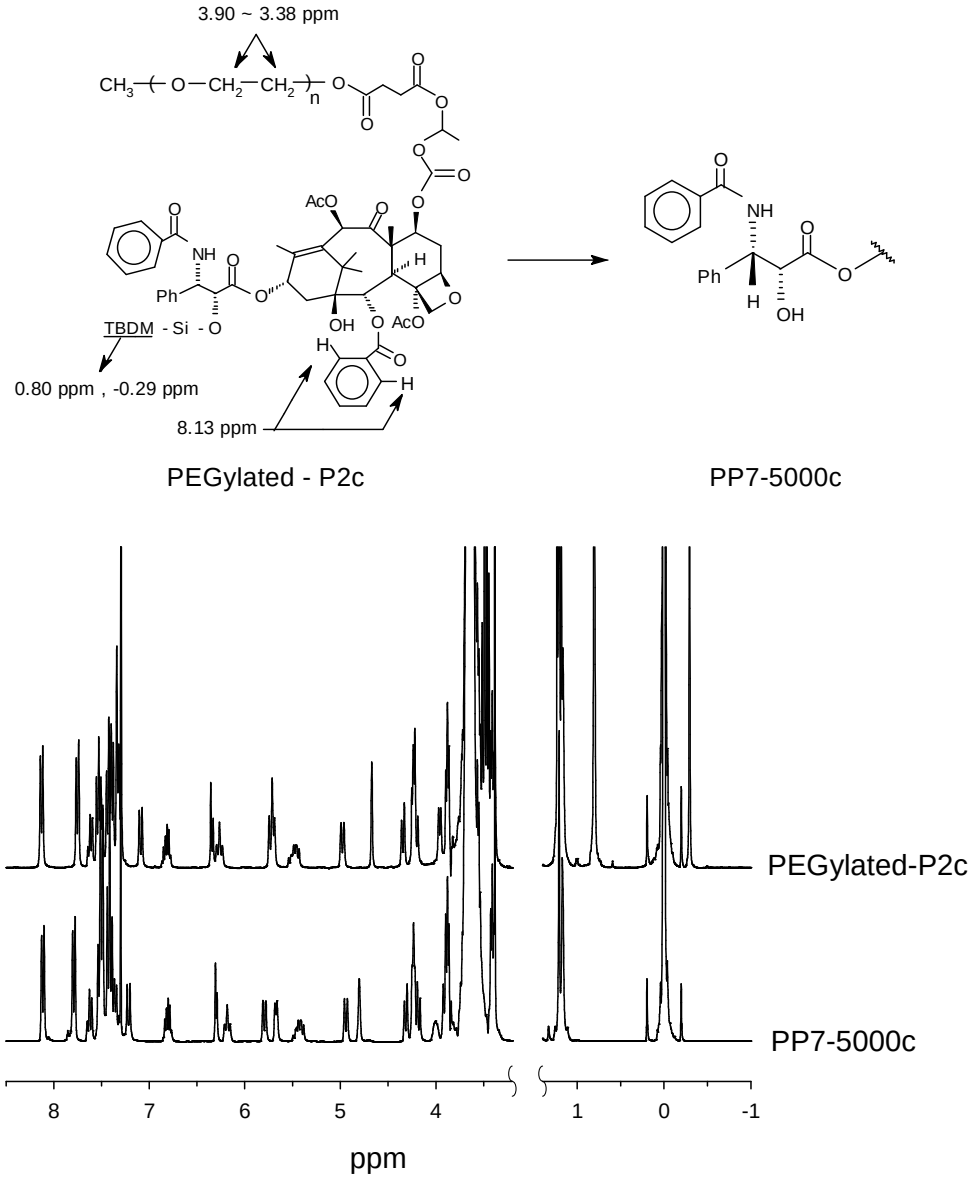


Figure 55. ^{1}H-NMR spectra of PEGylated-P2c and PP7-5000c.

^{1}H-NMR 스펙트럼의 결과를 입증하기 위한 또 다른 실험으로 분취 후 얻은 시료들에 대하여 특정농도에서 UV 흡광도를 측정하였고 측정된 흡광도 값을 농도에 따른 파클리탁셀의 흡광도 값으로 만들어진 검정곡선(그림 42)에 대입하여 프로드럭내에 포함된 모약의 농도를 계산하였다. 그림 56은 6.56×10^{-6} M 농도의 PP7-5000b와 8.23×10^{-6} M 농도의 PP7-5000c에 대한 UV 흡광 스펙트럼으로 검정곡선을 이용하여 계산한 결과 각각 프로드럭의 순도가 97 %와 98 %로 ^{1}H-NMR 스펙트럼의 결과와 일치하였다. 또한 그림 57과 58의 분석용 HPLC 크로마토그램을 통하여 두 프로드럭들에 대한 정제가 효율적임을 확인하였다.

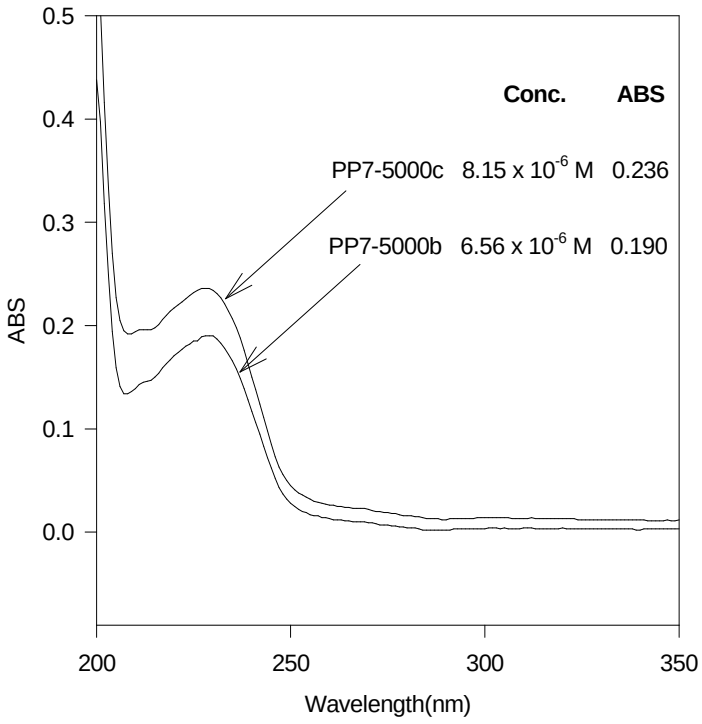


Figure 56. UV-spectra of prodrugs at a specific concentration.

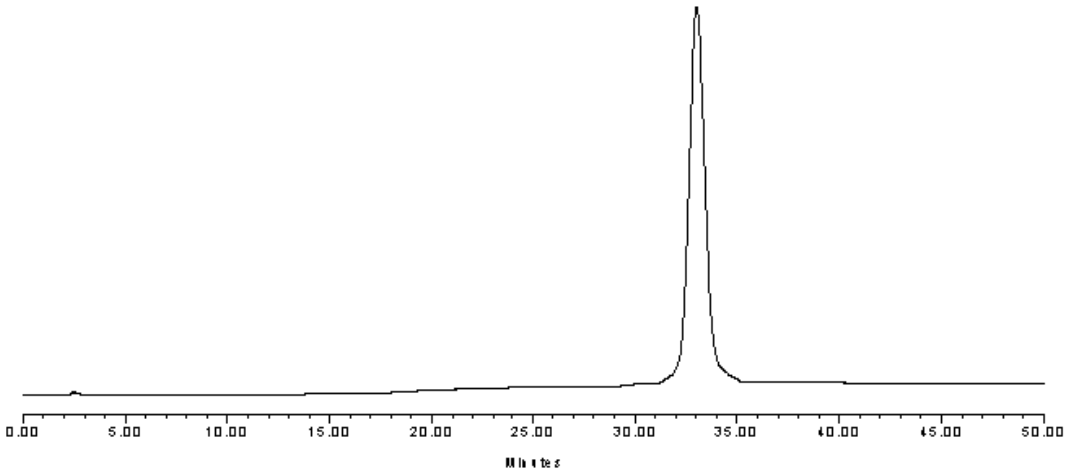


Figure 57. Analytical HPLC chromatogram of PP7-5000b after Prep-HPLC.

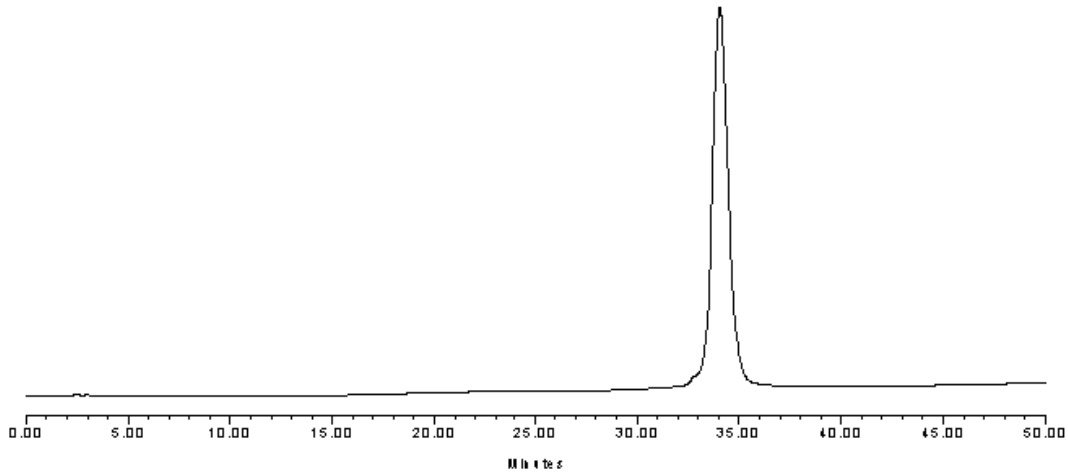


Figure 58. Analytical HPLC chromatogram of PP7-5000c after Prep-HPLC.

3.3 프로드럭의 용해도 및 가수분해

프로드럭들의 물에 대한 용해도 실험결과는 표 5와 같다. 파클리탁셀의 물에 대한 용해도(< 0.01 mg/mL)는 매우 낮지만 합성된 모든 프로드럭들은 400 mg/mL이상의 용해도를 보여 물에 대한 용해도가 크게 향상되었다. 이러한 용해도의 큰 증가는 파클리탁셀에 도입된 수용성 고분자인 PEG의 영향에 기인한 것으로, PP7-5000a의 경우 포함된 파클리탁셀의 함유량으로 환산하면 57 mg/mL 이상에 해당하는 양을 다른 용제 없이 물에만 용해시킬 수 있음을 의미한다. 일반적으로 환자에게 투여하는 파클리탁셀의 양이 200~500 mg인 것을 감안하면 현재 정맥주사용으로 사용되는 제제의 경우 많은 양의 Cremophor EL®을 포함하게 되어 과민증을 유발시키기 때문에 과민증을 줄이기 위한 방법으로 환자에게 미리 항히스타민제(antihistamines)와 스테로이드제(corticosteroids)를 처방하면서 장시간에 걸쳐 서서히 투여하고 있다. 용해도 측면에서 합성된 프로로드럭들이 현재 사용되는 조합형 제제를 대신한다면 Cremophor EL®로 인하여 발생되는 문제점을 원천적으로 제거 할 수 있다.

Table 5. Water-solubility of paclitaxel and prodrugs.

Compound	Amount of dissolving(mg/mL)
Paclitaxel	< 0.01
PP7-5000a	> 400
PP7-20000	> 400
PP7-5000b	> 400
PP7-5000c	> 400

그림 59는 rat plasma에서 프로드럭의 가수분해로 인한 프로드럭과 파클리탁셀의 농도변화를 시간에 따라 도표화한 것으로, PP7-5000a와 PP7-5000c의 경우 빠르게 프로드럭에서 파클리탁셀로 전환되어짐을 알 수 있다. 프로드럭의 농도에 로그값을 취해 시간에 따른 변화에 대해서 도시하면 그림 60과 같은 직선의 그래프를 얻을 수 있으며, 이 직선의 기울기로부터 반감기를 구하여 표 6에 나타내었다.

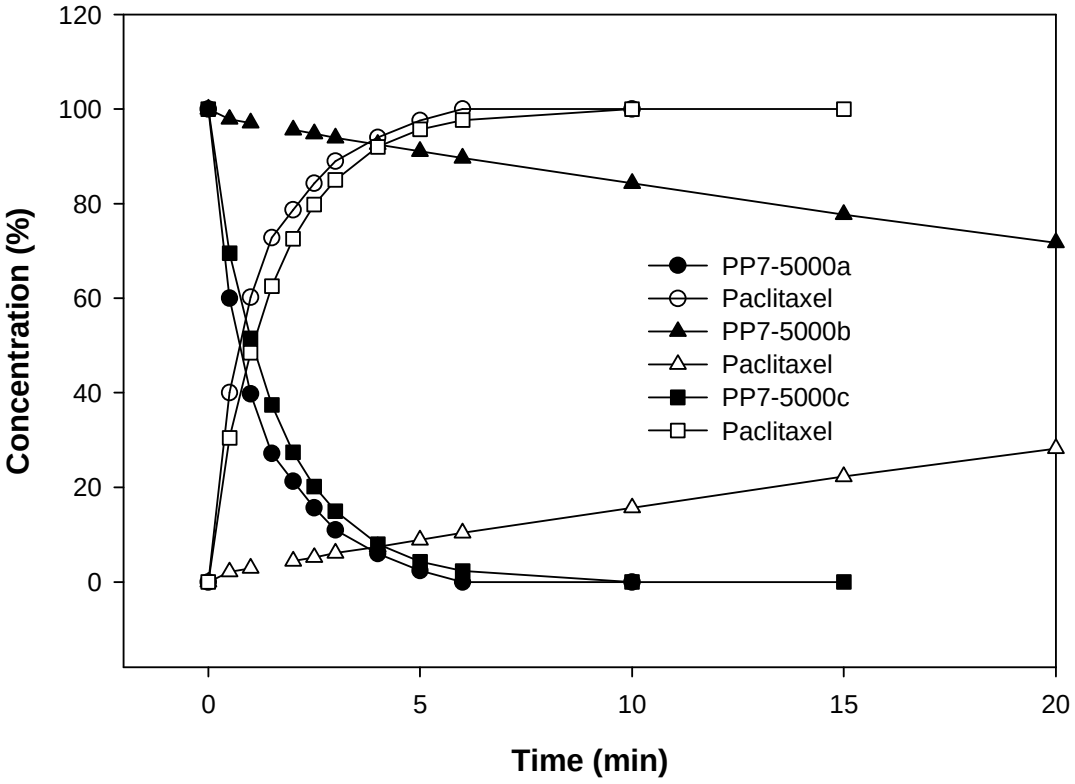


Figure 59. Hydrolysis of prodrugs in rat plasma(%Conc. vs. Time).

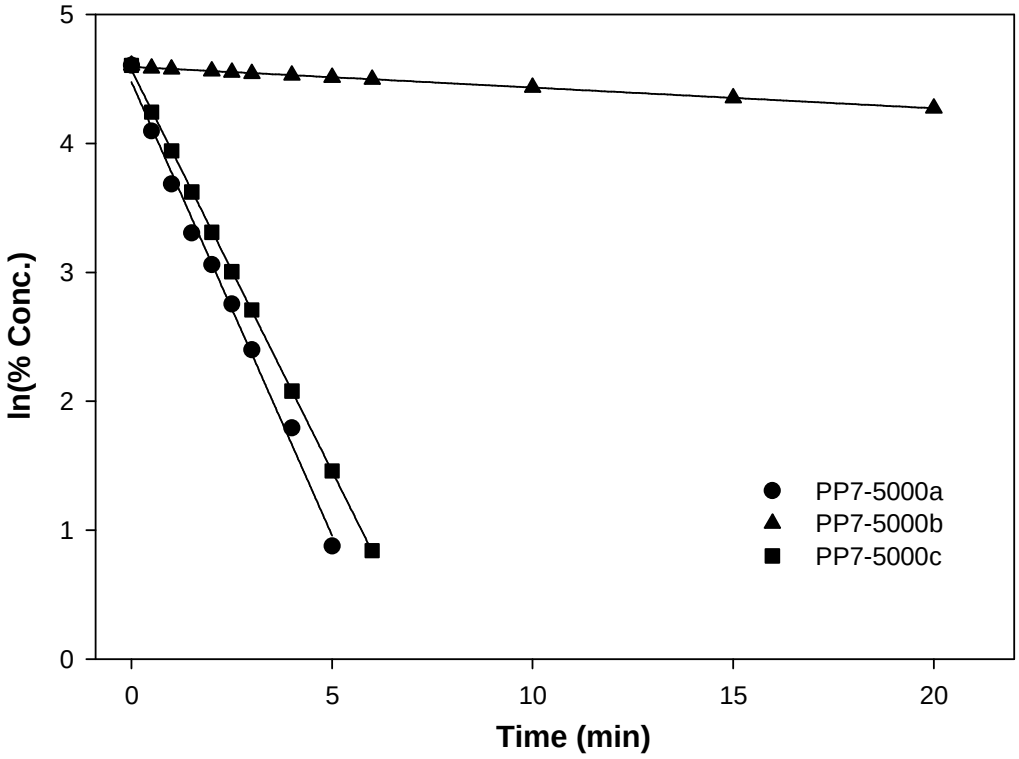


Figure 60. Hydrolysis of prodrugs in rat plasma(ln[%Conc.] vs. Time).

Table 6. Enzymatic hydrolysis rate of paclitaxel prodrugs in rat plasma.

Prodrug	$T_{1/2}$ Hydrolysis in rat plsma (pH 7.3)
Taxol 2′-PEG diester[a)]	1.6 hr
Taxol 2′-PEG monoester[a)]	> 7 hr
PP7-5000a	0.94 min
PP7-5000b	42.7 min
PP7-5000c	1.12 min

[a)]US patent 5,648,506.

단순 ester결합으로 이루어진 PEG-파클리탁셀 프로드럭의 경우 가수분해 반감기가 7 시간 이상으로 매우 느리게 가수분해가 일어나는 반면 self-immolationg 간격자를 갖는 프로드럭들은 반감기가 0.94~42.7 분으로 rat plasma에서 빠르게 가수분해 되었으며, 간격자내에 methylene 구조를 갖는 PP7-5000a와 PP7-5000c가 ethylene 구조를 갖는 PP7-5000b 보다 상대적으로 빠른 가수분해 반감기를 보였다. 그림 15와 그림 61의 가수분해 기전을 통해 알 수 있듯이 단순 ester결합의 프로드럭에서는 말단에 형성된 $-COO^-$의 친핵성 공격이 파클리탁셀의 구조적인 입체장애를 받지만, self-immolating 간격자를 포함하는 프로드럭들에서는 간격자의 carbonate 작용기의 탄소로 보다 용이한 친핵성 공격이 가능하여 입체장애를 받지 않기 때문에 빠르게 가수분해 되어진다. 이와 같은 빠른 가수분해는 환자에게 투여 시 프로드럭에서 항암활성이 큰 모약으로의 전환이 빠르게 이루어짐을 의미하는 것으로 느린 가수분해 때문에 신장을 통해 프로드럭 상태로 제거됨으로써 나타나는 약효감소를 최소화할 수 있어 보다 좋은 약효를 기대할 수 있다.

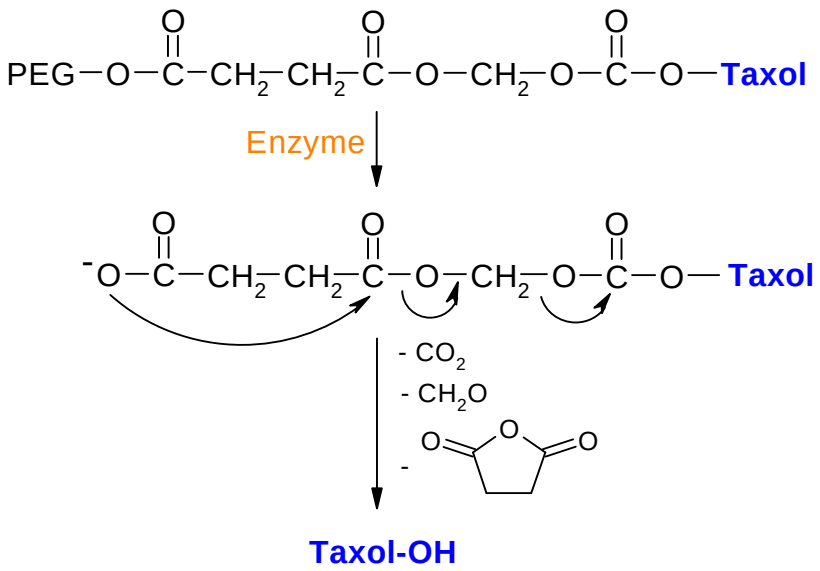


Figure 61. Hydrolysis mechanism of PP7-5000a.

정맥주사를 통한 약물의 처방에 있어 약물의 주사용수에서의 안정성 역시 중요한 사항으로 증류수와 PBS에서 PP7-5000a의 비효소적 가수분해 속도와 수용액에서의 pH의존 관계를 조사하여 표 7과 그림 62에 나타내었다. Rat plasma에서 매우 빠른 효소적 가수분해를 보였던 PP7-5000a이지만 PBS와 증류수에서는 가수분해 반감기가 각각 26.7 시간과 201.5 시간으로 비효소적 가수분해는 느리게 일어나며 pH가 4.5인 약산성에서 가장 안정함을 보였다. 느린 비효소적 가수분해에 따른 주사용수에서의 프로드럭의 안정성은 정맥주사를 통한 약물의 처방 시 가수분해로 인한 주사용수에서의 파클리탁셀의 침전을 막을 수 있어 PP7-5000a의 경우 주사용수에서 약물의 불안정에 따른 문제점은 발생하지 않음을 확인하였다.

Table 7. Non-enzymatic hydrolysis rate of prodrugs.

Prodrug	$T_{1/2}$ Hydrolysis(hr)	
	PBS(pH 7.3)	Distilled Water(pH 6.8)
Taxol 2′-PEG monoester[a)]	> 96	> 96
PP7-5000a	26.7	201.5

[a)]US patent 5,648,506.

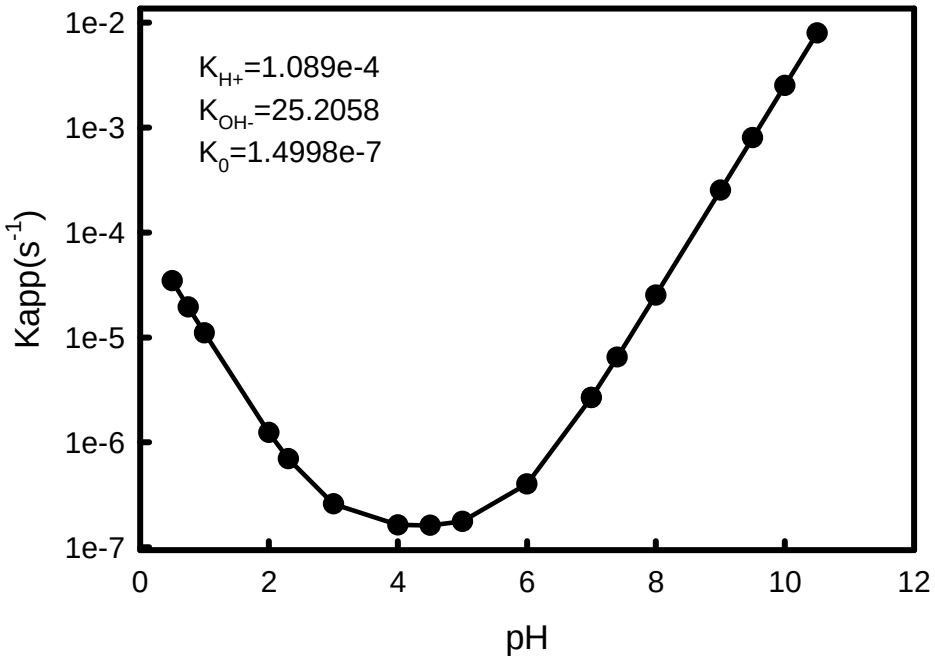


Figure 62. Stability of PP7-5000a(pH profile).

3.4 PP7-5000a의 B16/F10 흑색종 세포에 대한 항전이능

프로드럭의 항전이능 평가실험은 합성된 프로드럭들 중 가장 빠른 가수분해 특성을 보이는 PP7-5000a를 선정하여 표 8과 같이 비교군과 실험군으로 분류하여 실시하였다.

Table 8. Study design of the anti-metastatic potential test of PP7-5000a.

Group	Treatment[a)]	Dose
1	Vehicle control(0.9 % w/v saline)	10 mL/kg
2	PP7-5000a	5 mg/kg[b)]
3	PP7-5000a	10 mg/kg[b)]
4	Paclitaxel	5 mg/kg
5	Untreated control(no melanoma cell injection; no test treatment)	-

[a)]administered intravenously, once daily for 10 days starting on Day-2.(Mice received 3×10^5 B16/F10 cells intravenously on Day-0.)

[b)]formulated in 0.9% w/v saline on each day of dosing.

그림 63은 C57B/6 mice에 3×10^5개의 B16/F10 흑색종 세포들(melanoma cells)을 정맥주사한 후 2일째 되는 날부터 10 일간 약물을 처방(1 일 1 회)하고 세포주입 14일째 되는 날 종양세포들이 폐로 전이하여 형성되는 흑색종 군락(melanoma lung colony)의 수를 도표화한 것으로 그 결과는 표 9와 같다. 항암제를 투입하지 않은 vehicle의 경우 폐로 전이하여 형성된 군락의 수가 141.4±14.16 개이지만 5 mg/kg에 해당하는 프로드럭을 처방하게 되면 관찰된 흑색종 군락의 수가 106.7±12.38개로 vehicle만을 주입한 경우와 비교할 때 24.5 %의 감소율을 보임으로써 전이하는 B16/F10 흑색종 세포에 대한 프로드럭의 항암효과를 확인 할 수 있었다. 또한 프로드럭의 투여량을 2배로 증가시킬 경우 흑색종 군락의 수가 84.83±10.28 개로 40.0 %의

감소율을 보여 정맥주사한 프로드럭의 양이 증가할수록 전이하는 B16/F10 흑색종 세포에 대한 항암효과가 증가함을 확인하였다. 파클리탁셀을 5 mg/kg 투여한 실험군의 46.9 %의 감소율과 비교할 때 프로드럭을 처방한 두 실험군 모두 파클리탁셀 실험군보다 감소율이 낮지만 실제 프로드럭내에 포함된 파클리탁셀의 양이 프로드럭 실험군들의 경우 각각 0.71 mg/kg과 1.42 mg/kg인 것을 고려하면 약효가 감소하였다고 볼 수 없다. 파클리탁셀의 양을 기준으로 투여한다면 오히려 모약인 파클리탁셀보다 더 우수한 항암효과를 기대할 수 있다. 폐의 무게를 조사하여 도표화한 그림 64와 그 결과를 나타낸 표 10에서도 동일한 결과를 보였다.

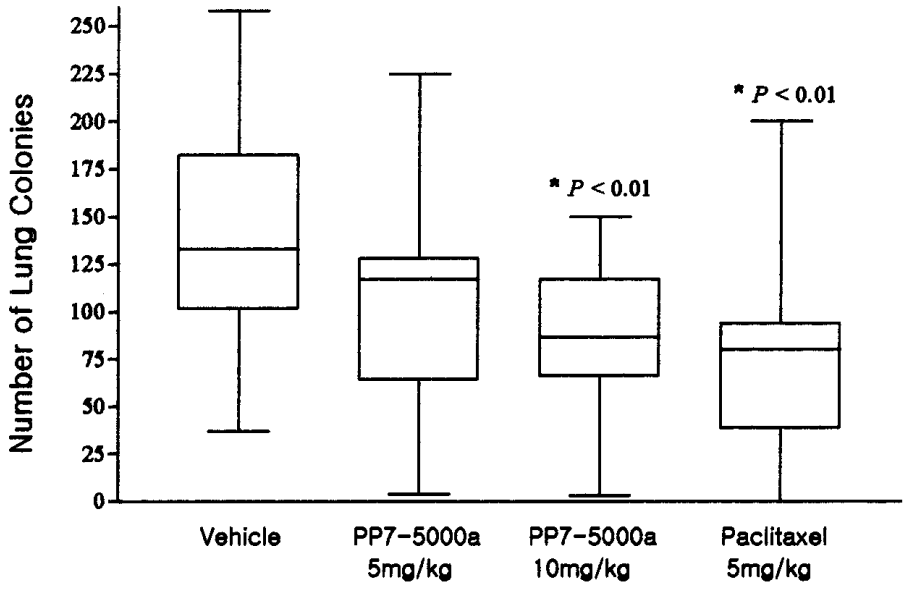


Figure 63. The effect of PP7-5000a and paclitaxel on the development of B16/F10 melanoma lung colonies in C57BL/6 mice.

Table 9. The effect of PP7-5000a and paclitaxel on the development of B16/F10 melanoma lung colonies in C57BL/6 mice.

Group	Treatment	Intravenous Dose	Colony Count	% Reduction
1	Vehicle (0.9% w/v saline)	10 mL/kg	141.4 ± 14.16	-
2	PP7-5000a	5 mg/kg	106.7 ± 12.38	24.5
3	PP7-5000a	10 mg/kg	84.83 ± 10.28[a)]	40.0
4	Paclitaxel	5 mg/kg	75.12 ± 12.05[a)]	46.9

Data are expressed as mean ± s.e. mean.

[a)] $P < 0.01$, compared to vehicle(ANOVA and Dunnett's test).

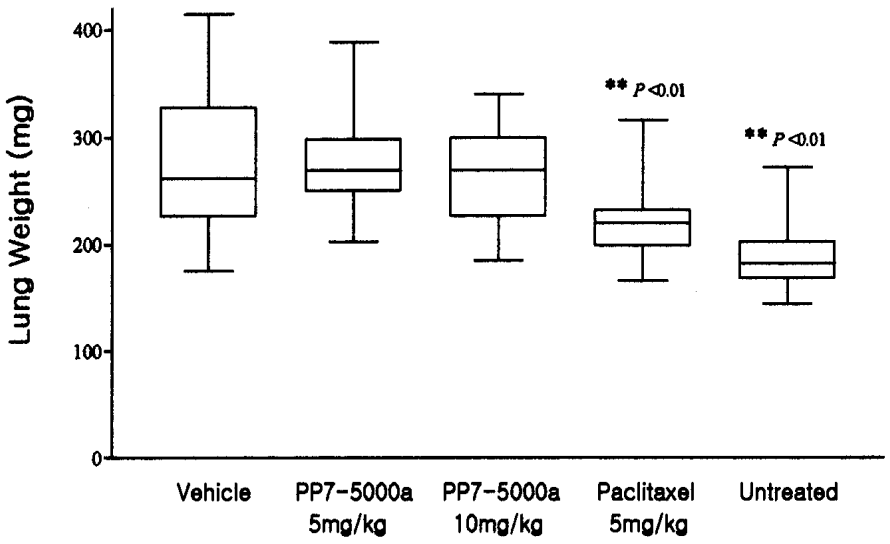


Figure 64. The effect of PP7-5000a and paclitaxel on the lung weight of C57BL/6 mice following i.v. administration of B16/F10 melanoma cells.

Table 10. The effect of PP7-5000a and paclitaxel on the lung weight of C57BL/6 mice following i.v. administration of B16/F10 melanoma cells.

Group	Treatment	Intravenous Dose	Lung Weight (mg)	% Reduction
1	Vehicle (0.9% w/v saline)	10 mL/kg	282.5 ± 16.53	-
2	PP7-5000a	5 mg/kg	277.9 ± 11.42	1.6
3	PP7-5000a	10 mg/kg	263.8 ± 11.06	6.6
4	Paclitaxel	5 mg/kg	228.0 ± 10.19[a)]	19.3
5	Untreated Control	n/a	191.2 ± 9.95[a)]	32.3

Data are expressed as mean ± s.e. mean.

[a)] $P < 0.01$, compared to vehicle(ANOVA and Dunnett's test).

PP7-5000a의 증가된 항암활성은 파클리탁셀과 컨쥬게이트를 형성하는 PEG에 의한 파클리탁셀의 순환수명(circulating lifetime)의 증가와 프로드럭의 암세포와의 특정 상호작용에 기인하는 것으로 예상된다. 파클리탁셀의 순환수명에 가장 큰 영향을 주는 요인은 대사작용과 신장등을 통한 제거이다. 투여된 전체 파클리탁셀의 약 50 %에 해당하는 양은 간의 cytochrome P450 효소들(CYP3A와 CYP2C)에 의한 대사과정을 통해 제거되며 5~10 %에 해당하는 양은 대사작용을 거치지 않고 신장을 통해 소변으로 제거된다고 알려져 있다.[129~132)] 이러한 순환수명과 관련된 파클리탁셀의 약효감소 이외에도 세포내에 존재하고 있는 다중약물 전달제(multidrug transpoter)인 P-gp (P-glycoprotein)에 의해 발생되는 세포의 내성과 연관된 약효감소도 예상할 수 있다. P-gp는 파클리탁셀과 같이 소수성인 약물이 세포내에 축적되는 것을 막기 위해 세포 밖으로 약을 방출시키는 역할의 수행하는데, 약물의 농도가 증가할 수 록 세포의 P-gp의 이러한 제거능력은 증가하게 되며 결국 P-gp의 능력이 증가된 세포는 약물에 내성을 갖는 세포를 복제하게 되어 약물의 약효는 감소하게 된다.[133~135)] 하지만 프로드

력인 PP7-5000a의 경우, 고분자인 PEG에 의한 구조적 구름(conformational cloud)형성으로 cytochrome P450 효소들의 대사작용에 따른 파클리탁셀의 약효감소를 최소화할 수 있으며, 또한 친수성인 PEG에 의한 영향으로 파클리탁셀의 소수성때문에 나타나는 P-gp에 의한 파클리탁셀의 방출현상을 감소시켜 모약인 파클리탁셀보다 우수한 항암효과를 보이는 것으로 생각된다.

PEG에 의한 파클리탁셀의 순환수명의 증가와 약물에 대한 세포의 내성감소 및 암세포와의 친화력에 관련된 프로드럭의 약효증가의 정확한 원인을 밝히기 위해서는 체계적인 약동력학적(pharmacokinetic) 연구가 필요로 되지만 본 연구의 결과에 의하면 self-immolating 간격자를 포함하는 파클리탁셀 프로드럭은 물에 대한 용해도와 약효 측면에서 현재 사용되는 파클리탁셀 제제를 충분히 대체 가능하리라 기대된다.

제 4 장 결 론

우수한 항암효과에도 불구하고 물에 대한 낮은 용해도로 인하여 환자에 대한 처방법에 제한이 있을 뿐만 아니라 여러 부작용을 동반하는 파클리탁셀의 문제점을 해결하기 위해 본 연구에서 실시한 새로운 수용성 파클리탁셀 프로드럭의 합성과 그 프로드럭의 가수분해에 따른 모약의 방출 및 암세포에 대한 항전이능 특성에 대한 결과는 다음과 같다.

1. 파클리탁셀의 물에 대한 용해도를 증가시키기 위해 수용성 고분자인 mPEG을 이용하였으며, 프로드럭로써의 효율인 모약의 방출속도를 빠르게 하기 위해 mPEG과 모약인 파클리탁셀 사이에 여러 종류의 self-immolating 간격자를 도입하여 새로운 수용성 파클리탁셀 프로드럭들을 합성하였다.

2. 합성의 용이성과 수득율의 증가를 위해 파클리탁셀 유도체의 PEGylation과 파클리탁셀의 2′-OH에 도입된 silyl 보호 작용기의 제거 순서를 변화시키면서 합성경로 1과 2로 구분하여 프로드럭을 합성하였다. 2′-OH가 silyl 작용기에 의해 보호된 유도체들에 대한 PEGylation(합성경로 2)은 60 %이하의 수득율을 보이는 보호되지 않은 상태의 유도체에 대한 PEGylation(합성경로 1)보다 높은 95 %의 수득율을 보였다. 이는 2′-OH 작용기의 존재유무에 따른 결과로 합성경로 1의 경우 mPEG-succinate의 친핵성 치환반응이 2′-O^-로 인하여 영향을 받기 때문이다. 마지막 단계인 silyl 작용기의 제거반응에서 가수분해에 따른 프로드럭의 손실을 감안하더라도 높은 수득율의 PEGylation으로 인하여 합성경로 2의 경우 최종 프로드럭의 수득율이 78 %로 향상됨을 확인 할 수 있었다.

3. 프로드럭 분자내에서 mPEG이 상대적으로 많은 비율을 차지하기 때문에 프로드럭의 물성이 mPEG과 유사하여 추출이나 재결정등과 같은 간단한 조작으로 프로드럭을 정제하기에는 어려움이 있어 Prep-HPLC를 사용하여 정제하였다. 시간에 따라 용매의 조성에 변화를 주어 실시한 Prep-HPLC로 높은 순도(99%)의 프로드럭을 얻을 수 있었다.

4. 합성된 모든 프로드럭들의 물에 대한 용해도는 400 mg/mL이상 이였다. 프

로드럭내에 포함된 파클리탁셀의 해당량을 계산하면 PP7-5000a의 경우 57 mg/mL로 파클리탁셀의 0.01 mg/mL이하에 비해 물에 대한 용해도가 크게 향상되었다.

5. 프로드럭의 효율과 관련된 rat plasma에서의 효소적 가수분해는 self-immolating 간격자가 도입됨으로 인하여 가수분해 반감기가 PP7-5000a의 경우 0.94 분으로 단순 ester결합의 7 시간에 비하여 매우 짧아졌으며 간격자의 종류에 따라 간격자내의 구조적 영향으로 가수분해속도가 변화하였다. 이로써 간격자의 구조적 변화를 통해 프로드럭의 가수분해속도를 조절할 수 있음을 확인하였다. 또한 느린 비효소적 가수분해와 주사용수에 대한 안정성으로 인하여 제제로서의 활용이 가능함을 알 수 있었다.

6. B16/F10 흑색종 세포를 주입한 C57BL/6 mice에서의 PP7-5000a와 파클리탁셀의 항전이능 평가를 위한 동물 실험에서 PP7-5000a를 10 일 동안 5 mg/kg(1 일 1 회)씩 처방한 실험군은 vehicle(0.9 % w/v saline)만을 주입한 경우와 비교하였을 때 폐로 전이하여 형성된 흑색종 군락의 수가 24.5 % 감소하였으며, 투여한 양을 10 mg/kg으로 증가시키면 감소율도 40.0 %로 증가함을 보여 PP7-5000a의 항전이능을 확인할 수 있었다. 또한 파클리탁셀을 5 mg/kg 투여한 실험군의 46.9 %의 감소율과 비교할 때 실제 프로드럭내에 포함된 파클리탁셀의 양이 프로드럭 실험군들의 경우 각각 0.71 mg/kg과 1.42 mg/kg인 것을 고려하면 모약인 파클리탁셀 보다 약효가 증가함을 예상할 수 있으며, 이러한 약효의 증가는 PEG에 의한 파클리탁셀의 순환수명의 증가와 약물에 대한 세포의 내성감소 및 암세포와의 친화력에 기인하는 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. J. N. Baxter, B. Lythgoe, B. Scales, R. M. Scrowston, S. Trippett, *Chem. Soc.,* 2964, 1962.
2. D. J. Cram, M. R. V. Sahyun, G. R. Knox, *J. Am. Chem. Soc.,* ***84***, 1734, 1962.
3. E. Graf, A. Kirfel, G. F. Wolff, E. Breitmaier, *Liebigs Ann. Chem.,* 376, 1982
4. L. Barboni, P. Gariboldi, E. Torregiani, G. Appendino, B. Gabetta, G. Zini, E. Bombardelli, *Phytochemistry,* ***33***, 445, 1993.
5. G. Appendino, M. Varese, P. Gariboldi, B. Gabetta, *Tetrahedron Lett.,* ***35***, 2217, 1994.
6. J. Gu, R. Zheng, Z. Zhang, Z. Jia, *Planta Med.*, ***71***, 495, 1991.
7. G. Appendino, *Fitoterapia*, ***64***, 5, 1993.
8. T. Bryan, Q. Brown, *J. Pharm. Pharmacol.*, ***5***, 205, 1933.
9. E. K. Rowinsky, W. P. McGuire, T. Guarnieri, J. S. Fisherman, M. C. Christian, R. C. Donehower, *J. Clin. Oncol.*, ***9***, 1704, 1991.
10. M. J. Burke, D. Siegel, B. Davidew, *N. Y. St. J. Med.* 1576, 1979.
11. R. Baureis, W. Steiert, *Arzneim. Forsch.*, ***9***, 77, 1959.
12. S. B. Vohora, L. Kumar, *Planta Med.*, ***2***, 100, 1971.
13. M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, A. T. McPhail, *J. Am. Chem. Soc.,* ***93***, 2325, 1971.
14. R. C. Donehower, E. K. Rowinsky, *Cancer Treat. Rev.,* ***19***, 63, 1993
15. K. Diergarten. A. Dreps, *Onkalogie,* ***16***, 329, 1993
16. E. K. Rowinsky, *Ann. Pharmacother.,* ***28***, S18, 1994
17. K. Gerzon, *Anticancer Agents Based on Natural Products Models,* New York: Academic Press, 1980, p. 271.
18. E. Hamel, *Pharmacol. Ther.,* ***55***, 31. 1992.
19. T. W. Doyle, D. M. Vyas, *Kirk-othmer Encyclopedia of chemical Technology,* 4th Ed: John Wiley & Sons, Inc., Vol. 5, 1993, p. 870.
20. P. B. Schiff, J. Fant, S. B. Horwitz, *Nature,* ***13***, 134, 1979.
21. P. Dustin, *Microtules,* 2nd Ed., Berlin: Springer-Verlag, 1984.

22. E. C. Raff, *J. Cell. Biol.* ***99***, 1, 1984.
23. E. Hamel, *Microtuble Proteins,* Boca Raton: CRC Press, 1990, p. 89
24. L. Wilson, M. A. Jordan, *Microtubles,* J. S. Hyams, C. W. Lloyd Eds., New York: Wiley-Liss, 1994, p. 59.
25. J. J. Correia, R. C. Williams, *Ann. Rev. Biophs. Bioeng.,* ***12***, 211, 1983.
26. V. I. Gelfand, A. D. Bershadsky, *Ann. Rev. Cell Biol.,* ***7***, 93, 1991.
27. K. W. Farrell, M. A. Jordan, H. P. Miller, L. Wilson, *J. Cell Science,* ***184***, 1035, 1987.
28. M. A. Jordan, L. Wilson, *Biochemistry,* ***29***, 2730, 1990.
29. M. A. Jordan, D. Thrower, L. Wilson, *Cancer Res.,* ***51***. 2212, 1991.
30. M. A. Jordan, D. Thrower, L. Wilson, *J. Cell Science,* ***102***, 401, 1992.
31. K. L. Wendell, L. Wilson, M. A. Jordan, *J. Cell Science,* ***104***, 261. 1993.
32. M. A. Jordan, R. J. Toso, D. Thrower, L. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* ***90***, 9552, 1993.
33. E. K. Rowinsky, L. A. Cazenave, R. C. Donehower, *J. Natl. Cancer Inst.,* ***82,*** 1247, 1990
34. R. T. Dorr, *Ann. Pharmacother.* ***28***, S11, 1984.
35. J. D. Adams, K. P. Flora, B. R. Goldspiel, J. W. Wilson, S. G. Finley, *J. Natl. Cancer Inst. Monographs,* ***15***, 141, 1993.
36. F. A. Holmes, A. P. Kudelka, J. J. Kavanagh, M. H. Huber, J. A. Ajani, V. Valero, *Taxane Anticancer Agents,* Washington: ACS Symposium Series ***583***, 1994, p. 31.
37. W. J. Slichenmyer, D. D. Van Hoff, *J. Clin. Pharmacol.,* ***30***, 770, 1990.
38. W. Lorenz, H. J. Riemann, A. Schmal, *Agents & Actions,* ***7***, 63, 1977.
39. J. Kant, S. Huang, H. Wong, C. Fairchild, D. M. Vyas, V. Farina, *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* ***3***, 2471, 1993.
40. A. E. Mathew, M. R. Mejillano, J. P. Nath, R. H. Himes, V. J. Stella, *J. Med. Chem.,* ***35***, 145, 1992.
41. D. G. I. Kingston, *Taxol; the chemistry and structure activity relationships of a novel anticancer agent*: TIBTECH 12, 1974, p. 222~227.
42. D. M. Vyas, H. Wong, A. R. Crosswell, A. M. Casazza, J. O. Knipe, S. W. Mamber, T. W. Doyle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* ***3***, 1357, 1993.
43. Y. Ueda, H. Wong, J. D. Matiskella, V. Farina, C. Fairchild, W. C. Rose, *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* ***4***, 1861, 1994.

44. A. V. Kabanov, V. Y. Alakhov, *J. Controlled Release,* ***28***, 15, 1994.
45. A. A. Epenetos, *Cancer Res.,* ***46***, 3138, 1986.
46. J. N. Lowder, *Blood,* ***69***, 199, 1987.
47. H. Sands, *Antibody Immunoconjugates Immunoradiopharm.,* ***1***, 213, 1988.
48. H. F. Dvorak, J. A. Nagy, A. M. Dvorak, *Cancer Cells,* ***3***, 77, 1991.
49. L. T. Baxter, R. K. Jain, *Microvasc. Res.,* ***41***, 5, 1991.
50. F. J. Burrows, Y. Watanado, P. E. Thorpe, *Cancer Res.,* ***52***, 5954, 1992.
51. M. Juweid, *Cancer Res.,* ***52***, 5144, 1992.
52. R. K. Jain, *Sci. Am.,* ***271***, 58, 1994.
53. J. Denekamp, *Prog. Appl. Microcirc.,* ***4***, 28, 1984.
54. A. Gougos, M. Letarte, *J. Immunol.,* ***141***, 1925, 1988.
55. B. Carnemolla, *J. Cell Biol.,* ***108***, 1139, 1989.
56. H. J. Buhring, *Leukemia,* ***5***, 841, 1991.
57. P. J. O'Connell, *Clin. Exp. Immunol.,* ***90***, 154, 1992.
58. J. M. Wang, *Int. J. Cancer,* ***54***, 363, 1993.
59. P. E. Thorpe, E. J. Derbychire, *J. Controlled Release,* ***48***, 277, 1997.
60. R. H. Jain, *Cancer Res.,* ***47***, 3039, 1987.
61. A. Gabizin, D. Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* ***85***, 6949, 1988.
62. H. F. Dvorak, J. A. Nagy, J. T. Dvorak, A. M. Dvorak, *Am. J. Pathol.* ***133***, 95, 1988.
63. H. Maeda, Y. Matsumura, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.,* ***6***, 193, 1989.
64. C. Sung, R. J. Youle, R. L. Dedrick, *Cancer Res.,* ***50***, 7382, 1990.
65. L. W. Seymour, *Crit. Rev. Ther.Drug Carrier Syst.,* ***9***, 135, 1992.
66. D. Liu, A. Mori, L. Huang, *Biochem. Biophys. Acta,* ***1104***, 95, 1992.
67. R. K. Jain, *Cancer Res.,* ***48***, 2641, 1988.
68. E. M. Sevick, R. K. Jain, *Cancer Res.,* ***51***, 2727, 1991.
69. J. R. Less, T. C. Skalak, E. M. Sevick, R. K. Jain, *Cancer Res.,* ***51***, 265, 1991.
70. L. T. Baxter, R. K. Jain, *Microvasc. Res.,* ***40***, 246, 1990.
71. P. A. Netti, *Microvasc. Res.,* ***52***, 27, 1996.
72. K. A. Ward, R. K. Jain, *J. Hyperthermia,* ***4***, 233, 1988.
73. C. J. Eskey, A. P. Koretsky, M. M. Domach, R. K. Jain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* ***90***, 2646, 1993.
74. M. Nozue, J. Surg, *Oncol.,* ***63***, 109, 1996.
75. R. K. Jain, *Cancer Metastasis Rev.,* ***6***, 559, 1987.

76. R. K. Jain, L. T. Baxter, *Cancer Res.,* ***48***, 7022, 1988.
77. E. M. Sevik, R. K. Jain, *Cancer Res.,* ***51***, 1352, 1991.
78. S. D. Nathanson, L. Nelson, *Ann. Surg. Oncol.,* ***1***, 333, 1994.
79. Y. Boucher, I. Lee, R. K. Jain, *Microvasc. Res.,* ***50***, 175, 1995.
80. C. A. Znata, *Cancer Res.,* ***56***, 964, 1996.
81. W. G. Roberts, G. Palade, *Cancer Res.,* ***57***, 1207, 1997.
82. V. P. Torchilin, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.,* ***2***, 65, 1985.
83. G. Gregoriadis, *Liposome Technology,* vols. 1~3: CRC Press. 1993.
84. J. Kopecek, *Biomaterials,* ***5***, 19, 1984.
85. C. R. Gardner, *Biomaterials,* ***6***, 153, 1985.
86. J. Drobnik, *J. Adv. Drug Delivery Rev.,* ***3***, 229, 1989.
87. H. Maeda, *Med. Res. Rev.,* ***6***, 181, 1991.
88. R. A. Srivastava, *Enzyme Microb. Technol.,* ***13***, 164, 1991.
89. J. Suh, Y. Cho, G. Kwang, *Bioorg. Chem.,* ***20***, 236, 1992.
90. R. Duncan, *Anticancer Drugs,* ***3***, 175, 1992.
91. S. E. Mathews, C. W. Pouten. M. D. Threadgill, *Adv. Drug Delivery Rev.,* ***18***, 219, 1996.
92. K. Iwai, H. Maeda, T. Konno, *Cancer Res.,* ***44***, 2115, 1984.
93. H. Maeda, M. Ueda, t. Morinage, T. Matsumoto, *J. Med. Chem.,* ***2***8, 455, 1985.
94. H. Maeda, L. W. Seymour, Y. Miyamato, *Bioconjugate Chem.,* ***3***, 351, 1992.
95. E. Hurwitz, M. Wilchek, J. Pitha, *J. Appl. Biochem.,* ***2***, 25, 1980.
96. R. Duncan, *J. Makromol., Chem.* ***184***, 197, 1984.
97. P. A. Vasey, *Clin. Cancer Res.,* ***5***, 83, 1999.
98. G. Hooftman, S. Herman, E. Schacht, *J. Bioact. Compat. Polymers,* ***11***, 135, 1996.
99. J. M. Harris, *Poly(ethylene glycol) Chemistry,* New York: Plenum Press, 1992.
100. K. D. Vandegriff, M. McCarthy, R. J. Rohlfs, R. M. Winslow, *Biophys. Chem.,* ***69***, 23, 1997.
101. H. K. Roy, J. K. DiBaise, J. Black, W. J. Karolski, A. Ratashak, S. Ansari, *FEBS Lett.,* ***496***, 143, 2001.
102. V. P. Torchillin, *J. Liposome Res.,* ***6***, 99, 1996.
103. J. Senior, *Biochem. Biophys. Acta,* ***1062***, 77, 1991.
104. V. P. Torchillin, M. I. Papisov, *J. Liposome Res.,* ***4***, 725, 1994.
105. M. L. Nucci, R. Shorr, A. Abuchowski, *Adv. Drug Delivery Rev.,* ***6***, 133, 1991.

106. A. Abuchowki, T. J. R. McCoy, N. C. Palczuk, F. F. Davis, *J. Biol. Chem.,* ***252***, 3582, 1997.
107. P. P. K. Ho, E. B. Milkin, J. L. Bobbitt, E. L. Grinnan, P. J. Burck. *J. Biol. Chem.,* ***245***, 3706, 1970.
108. M. S. Hershfield, *Semin. Hematol.,* ***35***, 291, 1998.
109. Y. Wang, S. Youngster, J. Bausch, R. Zhang, C. McNemar, *Biochemistry,* ***39***, 10634, 2000.
110. D. C. Wylie, M. Voloch, S. Lee, Y. H. Liu, S. Cannon-Carlson, C. Cutler, B. Pramanik, *Pharm. Res.,* ***18***, 1354, 2001.
111. S. Zalipsky, C. Gilon, A. Zikha, *Eur. Polym. J.,* ***19***, 1177, 1983.
112. Y. Murakami, Y. Tabata, Y. Ikada, *Drug Delivery,* ***4***, 23, 1997.
113. Enzon Inc. Unpublished results.
114. V. J. Stella, W. N. A. Charman, V. H. Naringrekar, *Drugs,* ***29***, 455, 1985.
115. H. Bundgaad, *Drugs of the Future,* ***16***, 443, 1991.
116. A. K. Sinhababu, D. R. Thakker, *Adv. Drug Delivery Rev.,* ***19***, 241, 1996.
117. R. B. Greenwald, A. Pendri, D. Bolikal, C. W. Gilbert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* ***4***, 2465, 1994.
118. M. Potmesil, *Cancer Res.,* ***54***, 1431, 1994.
119. A. Bedeschi, I. Candiani, C. Geroni, L. Capolongo, *Drugs Future,* ***22***, 1259, 1997.
120. B. R. Vishnuvajjala, A. Garzon-Aburbeh, *U.S. Patent 4,943,579,* 1990.
121. R. B. Greenwald, A. Pendri, C. Conover, C. Gilbert, R. Yang, J. Xia, *J. Med. Chem.,* ***36***, 2689, 1993.
122. C. D. Conover, A. Pendri, C. Lee, C. W. Gilbert, K. L. Shum, R. B. Greenwald, *Anticancer Res.,* ***17***, 3361, 1997.
123. R. B. Greenwald, C. D. Conover, A. Pendri, Y. H. Choe, A. Martinez, D. Wu, S. Guan, Z. Yao, K. L. Shum, *J. Controlled Release,* ***61***, 281, 1999.
124. S. A. Bernhard, A. Berger, J. H. Carter, E. Katchalski, M. Sela, Y. Shalitin, *J. Am. Chem. Soc.,* ***84***, 2421, 1962.
125. R. B. Greenwald, A. Pendri, C. D. Conover, C. Lee, Y. H. Choe, C. Gilbert, A. Martinez, J. Xia, D. Wu, M. Hsue, *Bioorg. Med. Chem.,* ***6***, 551, 1998.
126. C. D. Conover, R. B. Greenwald, A. Pendri, C. W. Gilbert, K. L. Shum, *Cancer Chemother. Pharmacol.,* ***42***, 407, 1998.
127. L. Ochoa, A.W. Tolcher, J. Rizzo, G. H. Schwartz, E. K. Rowinsky, *J. Clin.*

Oncol., ***19***, 198a, 2000.
128. Z. Zhao, D. G. I. Kingston, A. R. Crosswell, *J. Nat. Prod.,* ***54***, 1607, 1991.
129. P. Wiernik, E. Schwartz, J. Strauman, J. P. Dutcher, R. B. Lipton, E. Paietta, *Cancer Res.,* ***47***, 2486, 1987.
130. F. Hiroshi, O. Masaaki, T. Ayuko, M. Hideshi, K. Hiroyuki, *Jpn. J. Cancer Chemother.,* ***21***, 659, 1994.
131. G. N. Kumar, U. K. Walle, T. Walle, *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* ***268***, 1160, 1994.
132. T. Brown, K. Havlin, G. Weiss, J. Cagnola, J. Koeller, J. Kuhn, J. Rizzo, J. Craig, J. Phillips, D. Von Hoff, *J. Clin. Oncol.,* ***9***, 1261, 1991.
133. M. M. Gottesman, I. Pastan, *Ann. Rev. Biochem.,* ***62***, 385, 1993.
134. P. Borst, A. H. Schinkel, J. J. M. Smit, E. Wagenaar, L. Van Deemter, A. J. Smith, E. W. H. M. Eijdems, F. Baas, G. J. R. Zaman, *Pharmacol. Ther.,* ***60***, 289, 1992.
135. S. N. Roy, S. B. Horwitz, *Cancer Res.,* ***45***, 3856, 1985.