

2007年度 2月

碩士學位論文

형광특성을 갖는 수용성

파클리탁셀의 합성 및 특성

朝鮮大學校 大學院

化學工學科

崔 津 碩

형광특성을 갖는 수용성
파클리탁셀의 합성 및 특성

*Syntheses and Characterization of Fluorescent
Water soluble- Paclitaxel(PP7)*

2007 年 2 月 日

朝鮮大學校 大學院

化學工學科

崔 津 碩

형광특성을 갖는 수용성
파클리탁셀의 합성 및 특성

指導教授 曹秉旭

이 論文을 工學碩士學位 申請論文으로 提出함.

2006 年 10 月 日

朝鮮大學校 大學院

化學工學科

崔津碩

崔津碩의 碩士學位 論文을 認准함

委員長 朝鮮大學校 教授 車月石 印

委員 朝鮮大學校 教授 金正圭 印

委員 朝鮮大學校 教授 曹秉旭 印

2006 年 11 月 日

朝鮮大學校 大學院

목 차

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

ABSTRACT

제 1 장 서론

1. Paclitaxel (Taxol)	1
2. Water-soluble paclitaxel (PP7)	6
3. Fluorescent probes	11
4. 본 연구의 내용 및 목적	15

제 2 장 실험

1. 시약 및 기기	16
1. 1. 시약	16
1. 2. 기기	16
2. 2'-Dansylated paclitaxel의 합성	18
3. 2'-Pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel의 합성	22
4. 2'-pyrenbutyric carbonyl-PP7의 합성	27

제 3 장 결과 및 고찰

제 4 장 결 론

.....	32
.....	60

LIST OF TABLES

Table 1. Typical fluorescent probes	13
Table 2. Gradient condition of Prep-HPLC	33
Table 3. The λ_{max} values and absorbance of fluorescent paclitaxel derivative and 1-pyrenbutyric acid/paclitaxel mixture (10/0, 8/2, 5/5, 2/8 and 0/10) at 20 μ M and 40 μ M.	45
Table 4. Gradient condition of Prep-HPLC	47
Table 5. The λ_{max} values and absorbance of fluorescent PP7 derivative and 1-pyrenbutyric acid/PP7 mixture (10/0, 8/2, 5/5, 2/8 and 0/10) at 10 μ M and 20 μ M.	
.....	59

LIST OF FIGURES

Figure.1. Chemical structure of paclitaxel.	1
Figure.2. Structure-Activity Relationships of paclitaxel.	3
Figure.3. Mechanism of action of paclitaxel.	5
Figure.4. Action of paclitaxel in the cell cycle.	5
Figure.5(a). C-2' carbonate derivatives synthesized by the Bristol-Myers Squibb company.	7
Figure.5(b). Phosphate prodrug of Taxol.	7
Figure.6. Taxol 2'-PEG monoester synthesized by Enzon company.	9
Figure.7. Chemical structure of modified Anti-Cancer Drug(PP7).	9
Figure.8. Hydrolysis Mechanism.	10
Figure.9. Jablonski diagram illustrating the processes.	11
Figure.10. Structures of fluorescent probes.	12
Figure.11. Chemical structure of 2'-pyrenbutyric carbonyl-PP7.	15
Figure.12. ^1H -NMR spectrum of paclitaxel (CDCl_3).	20
Figure.13. ^1H -NMR spectrum of 2'-dansylated paclitaxel (CDCl_3).	21
Figure.14 .Thin-layer chromatography of paclitaxel(1), 1-pyrenbutyric acid(2) and fluorescent paclitaxel(3) (Developing Solvent ; EA:H _X = 6:4).	24
Figure.15. ^1H -NMR spectrum of 1-pyrenbutyric acid (CDCl_3).	25
Figure.16. ^1H -NMR spectrum of 2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel (CDCl_3).	26
Figure.17. ^1H -NMR spectrum of water soluble-paclitaxel (PP7) (CDCl_3)..	30
Figure.18. ^1H -NMR spectrum of 2'-pyrenbutyric carbonyl-PP7 (CDCl_3).	31

Figure.19. Preparative HPLC chromatography of crude 2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel.	34
Figure.20. ^1H -NMR spectrum of 2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel (CDCl_3). (after prep-HPLC)	35
Figure.21. Analytical HPLC of paclitaxel	36
Figure.22. Analytical HPLC of 2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel (A; before prep-HPLC, B; after prep-HPLC).	36
Figure.23. UV spectra of paclitaxel, 1-pyrenbutyric acid and 2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel at $20\mu\text{M}$.	38
Figure.24. UV spectra of 2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel at $20\mu\text{M}$, $40\mu\text{M}$.	39
Figure.25. The absorbance of paclitaxel, 1-pyrenbutyric acid and 2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel was measured as a function of concentration at λ_{\max} .	40
Figure.26. Fluorescence spectra of paclitaxel, 1-pyrenbutyric acid and fluorescent paclitaxel derivative at $2\mu\text{M}$ (a ; excitation, b ; emission).	42
Figure.27. Fluorescence spectra of 2'-pyrenbutyric carbonyl- paclitaxel at different concentrations (a ; excitation , b ; emission).	43
Figure.28. The fluorescence emission intensity of paclitaxel, 1-pyrenbutyric acid and fluorescent paclitaxel derivative was measured at different concentrations (Top ; $\lambda = 376\text{nm}$, Bottom ; $\lambda = 396\text{nm}$).	44
Figure.29. UV spectra of paclitaxel, 1-pyrenbutyric acid, fluorescent paclitaxel derivative and 1-pyrenbutyric acid/paclitaxel mixture (2/8, 5/5 and 8/2) at $20\mu\text{M}$.	45
Figure.30. Preparative HPLC chromatography of crude 2'-pyrenbutyric carbonyl-PP7	48
Figure.31. ^1H -NMR spectrum of 2'-pyrenbutyric carbonyl-PP7 (CDCl_3) (after prep-HPLC).	49

Figure.32. Analytical HPLC of PP7	50
Figure.33. Analytical HPLC of 2'-pyrenbutyric carbonyl-PP7 (A; before prep-HPLC, B; after prep-HPLC).	50
Figure.34. UV spectra of water-soluble paclitaxel(PP7), 1-pyrenbutyric acid and fluorescent water-soluble paclitaxel(PP7) derivative at 20 μ M.	52
Figure.35. UV spectra of 2-pyrenbutyric carbonyl-PP7 at different concentrations.	53
Figure.36. The absorbance of water-soluble paclitaxel(PP7), 1-pyrenbutyric acid and fluorescent water-soluble paclitaxel(PP7) derivative was measured as a function of concentration at λ_{max}	54
Figure.37. Fluorescence spectra of paclitaxel, 1-pyrenbutyric acid and fluorescent paclitaxel derivative at 2 μ M (Left ; excitation , Right ;emission).	56
Figure.38. Fluorescence spectra of 2'-pyrenbutyric carbonyl- PP7 at different concentrations (Left ; excitation , Right ;emission)	57
Figure.39. The fluorescence emission intensity of water-soluble paclitaxel(PP7), 1- pyrenbutyric acid and fluorescent water-soluble paclitaxel(PP7) derivative was measured at different concentrations (Top ; $\lambda = 376nm$, Bottom ; $\lambda = 396nm$).	58
Figure.40. UV spectra of water-soluble paclitaxel(PP7), 1-pyrenbutyric acid, fluorescent water - soluble paclitaxel(PP7) derivative and 1-pyrenbutyric acid/PP7 mixture (2/8, 5/5 and 8/2) at 10 μ M.	59

ABSTRACT

Syntheses and Characterization of Fluorescent Water soluble- Paclitaxel(PP7)

By Choi, Jin Seok

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

Department of Chemical Engineering

Graduate School of Chosun University

Paclitaxel(Taxol) is a antineoplastic agent that is derived from the bark of the Pacific yew tree (*Taxus brevifolia*) (Wani et al., 1971). It has been used to ovarian carcinoma, breast carcinoma, leukemia, melanoma, prostate carcinoma and so on, and has become especially important for the management of ovarian and breast carcinoma (Sarosy et al., 1992, Holmes et al., 1991). But, the application of some pharmaceutically active substances such as an anti-cancer drug, paclitaxel, suffer from their low solubility in body fluids and serious side effects. There were several ways to overcome this problem. One possible way is substitution at the reactive sites on the carbon 2' and/or 7 position of the chemical structure of paclitaxel. The conventional such derivatives of paclitaxel with poly(ethylene-glycol) PEG, however, were too stable so that a high percentage of the

polymer drug could be excreted before the drug made bio-available parent drug by esterases with their intended interaction. Jo. et al.^{17~27)} solved this problem by the development of a prodrug, so called PP7 which introduces a hydrophilic PEG, succinic acid mono-ester of poly(ethylene-glycol) monomethylether, with a self-immolating linker(L) at the carbon 7 position. A patented self-immolating link^{17~19)} between PEG and the drug which provides a hydrolytic stability of the drug-polymer link in the body liquid of only a few minutes, just sufficient to transport the major amount of the drug to the site where its activity is required. Fluorescent analogues of drugs, with a high quantum yield, are widely used as important tools in studies of the elucidation of structures and the mechanisms of drug binding to proteins and nucleic acids. The molecular mechanism(s) by which paclitaxel binds to and stabilizes microtubules is currently unclear. To get a better understanding the mechanism of action of paclitaxel and the environment of the paclitaxel-binding site, incorporation of fluorescent 1-pyrenbutyrate onto the carbon 2' of paclitaxel and a paclitaxel prodrug(PP7)^{17~19)} has been successfully carried out. These compounds synthesized were characterized by FT-NMR, high performance liquid chromatography (HPLC), UV and photo luminescence spectrometry.

The paclitaxel analogues synthesized showed high fluorescent susceptibility with concentration dependency in both excitation and emission spectra. It could be used for in-vivo studying the mechanism of the bioactivities and efficacy of paclitaxel.

Keywords : Paclitaxel, water-soluble paclitaxel(PP7), fluorescent probe, 1-pyrenbutyric acid, characterization, microtuble binding mechanism.

제 1 장 서 론

1. Paclitaxel (Taxol)

Paclitaxel (Taxol)은 (Fig. 1.) diterpene계 화합물로 1971년 서부 주목나무¹⁾로부터 처음 추출되었고 난소암, 유방암, 폐암등의 치료효과가 매우 탁월한 현존하는 최고의 항암제이다. Paclitaxel의 화학적명명은 $5\beta, 20\text{-epoxy}-1, 2\alpha, 4, 7\beta, 10\beta, 13\alpha\text{-hexahydroxytax-11-en-9-one-4, 10-diacetate-2-benzoate 13 ester with (2R,3S)-N-benzoyl-3-phenyl isoserine}$ 로서 분자구조식은 $C_{47}H_{51}NO_{14}$ 이고 분자량은 853.92이다.^{2),3)}

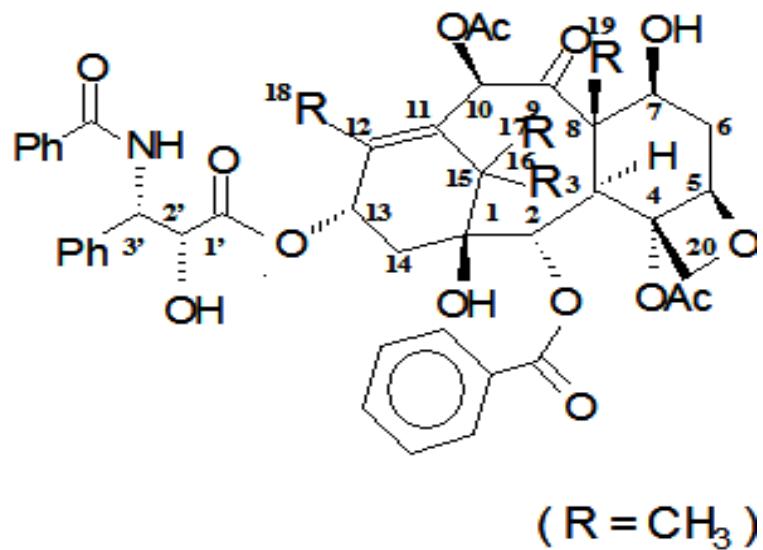
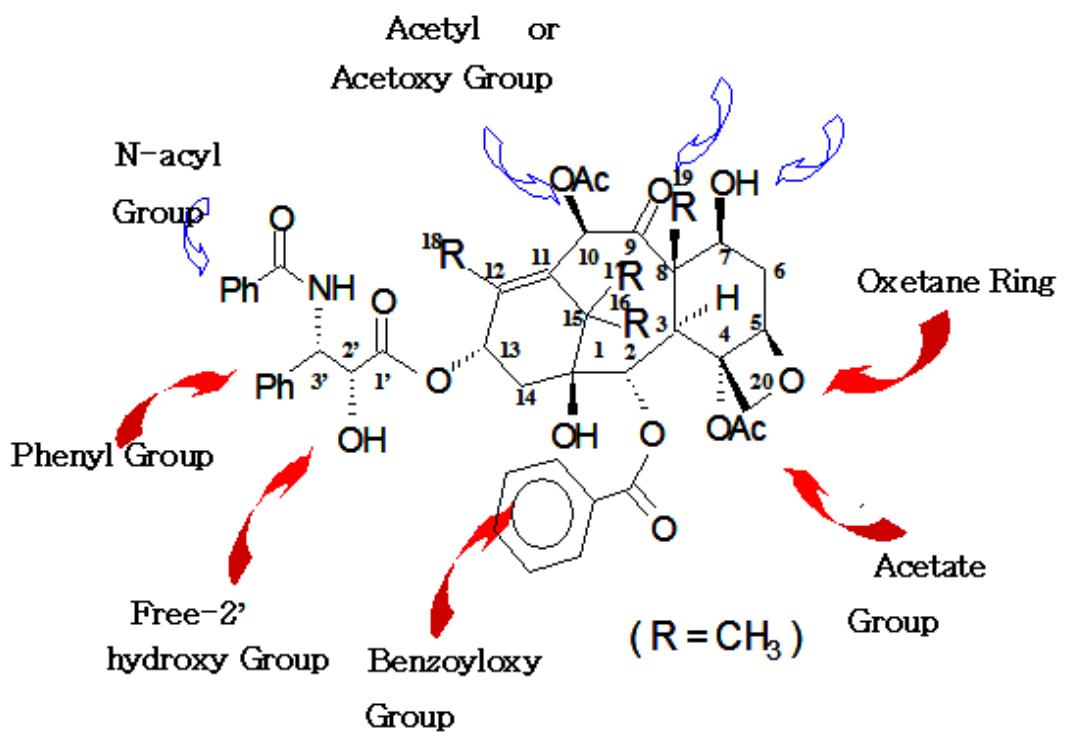


Fig. 1. Chemical structure of paclitaxel.

이처럼 구조가 복잡하여 합성이 용이치 않아서 주로 태평양 주목나무 껍질로부터 추출한다. 그러나, 주목나무 성장속도가 느리며, paclitaxel(Taxol) 함유량도 0.018%로 낮은 문제점을 갖는다. 또한, paclitaxel(Taxol)은 흰색 또는 회색빛이 도는 흰색의 결정성 분말로서, 이것은 매우 친유적(lipophilic)이며 실제로 물에 대한 용해도가 매우 낮은 단점을 가지고 있어 탁월한 효과에도 불구하고 제제화에 많은 어려움이 있다. 물에 대한 용해도가 매우 낮아 특별히 Cremophor EL (Polyethoxy- lated castor oil)이나 Tween 80 (Polyoxyethylene sorbitan monooleate)과 같은 용해 보조제를 필요로 한다.^{4),5)} 현재 정맥혈관 주사용으로 사용되는 제제의 경우 5 mL 용량의 유리병에 paclitaxel 30 mg, Cremophor EL[®] 2.64 g 과 49.7% 에탄올(1:1 v/v)로 구성되어 있다. 이러한 조합의 정맥주사를 통한 쳐방은 Cremophor EL[®]에 의한 과민증과 유기용매인 알코올류에 따른 주사부위의 용혈현상, 근증, 근육통증 등의 여러 가지 부작용들이 유발되는 문제점을 가지고 있어 paclitaxel 의 paclitaxel 의 물에 대한 용해도를 높이기 위해 근본적 구조변화에 대한 요구와 함께 paclitaxel 유사화합물들의 합성에 여러 가지 접근이 시도되어지고 있다. 이러한 paclitaxel 유사화합물의 개발을 위해 structure-activity relationships (Fig. 2.)⁶⁾ 의 중요성이 부각되었다.



possible modification without activity reduction
 strong reduction in bioactivity

Fig. 2. Structure–Activity Relationships of paclitaxel (from Kingston, 1994).

1979년 Horwitz그룹^{7),8)}에 의해 탁솔이 microtubule assembly 을 행한다는 것이 처음으로 밝혀졌다. Paclitaxel은 다른 항암제와는 다른 특별한 작용 메커니즘을 갖는다. Paclitaxel은 대부분 투블린(tubulin)으로 구성되어진 원통형구조를 갖는^{7~9)} 세포내미세관(microtubles)을 형성하기 위한 투블린이합체(tubulin dimer)의 중합반응을 돋는다. 심지어 microtuble assembly를 위해 필요한 구아닌 3인산염(guanine triphosphate, GTP)과 같은 요인들이 없을지라도 중합반응을 돋는다.(Fig. 3.) 그리고 고분자 분해반응을 방해하여 세포내미세관(microtubles)을 안정화 시킨다.^{10),11)} 즉, 분해반응이 일어나야 암세포 분열과 같은 세포분열이 일어나게 되는데 paclitaxel은 이러한 분해반응을 방해하고 안정화시키는 작용 메커니즘을 갖는다. Paclitaxel은 주로 투블린이합체(tubulin dimer)보다는 세포내미세관(microtubles)에 결합한다. Paclitaxel에 대한 결합부위는 세포내미세관(microtubles)에 있는 투블린(tublin)의 β -subunit의 N-terminal 31 amino acid이다.^{12),13)} Paclitaxel의 작용에 의해 형성되어지는 세포내미세관(microtubles)은 매우 안정할 뿐만 아니라 역기능으로 세포파괴(cell death)를 일으키기도 한다.¹⁴⁾ 약물작용의 정확한 메커니즘은 완전히 이해할 수는 없지만 paclitaxel은 세포내미세관(microtubles)계 안에서 동적평형을 분열시키고 세포주기의 G2기와 M기에서 세포들을 방해하고(Fig. 4.) 그 때문에 세포복제(cell replication)를 억제한다고 알려져 있다.

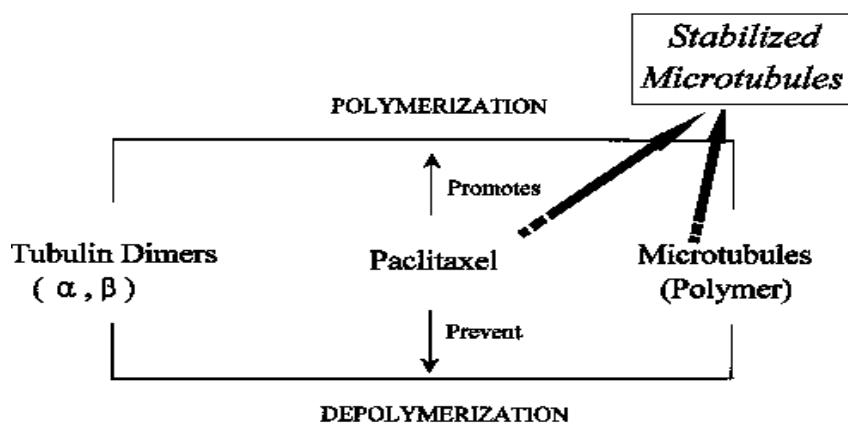


Fig. 3. Mechanism of action of paclitaxel.

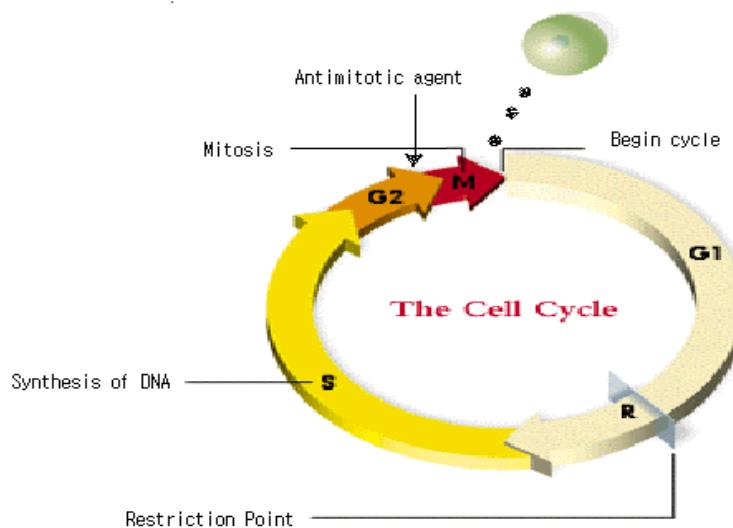


Fig. 4. Action of paclitaxel in the cell cycle.

2. Water-soluble paclitaxel (PP7)

앞서 언급한 바와 같이 복잡한 구조를 갖는 천연물인 paclitaxel(Taxol)은 탁월한 효과에도 불구하고 물에 매우 난용성인 관계로 제제화에 많은 어려움이 있으며 주사제의 경우 여러 종류의 부작용을 갖고 있다. 따라서, 이러한 문제를 해결하고자 수용성 paclitaxel prodrug 개발을 위한 연구가 진행되어왔다.

국외의 경우에는 Bristol-Myers Squibb사와 Enzon사에 의해 주도되고 있다. 1993년에 Bristol-Myers Squibb사에서는 체내에서 효소에 의해 가수분해되어 원래의 약물로 전환될 수 있는 수용성 prodrug를 개발하기 위해 paclitaxel (Taxol)의 C-2' 또는 C-7 위치에 여러 가지 치환체가 결합된 carbonate 화합물을 합성하였으며 (Fig. 5(a).), 또한 이들은 효소(phosphatase)에 의한 분해와 자발적인 분해가 연속적으로 일어날 수 있는 여러 가지 phosphate prodrug를 합성하였다 (Fig. 5(b).). 그러나 이러한 화합물들은 주사용 중류수에서의 불안정성과 한정된 수용성(10 mg/ml 이하)으로 인하여 제제화에 어려움이 있었다.^{15),16)}

1997년 Enzon사에서는 Taxol의 C-2' 위치에 polyethylene glycol (PEG)이 도입된 prodrug를 합성하였다(Fig. 6.). 그러나 이 화합물의 경우 물에 대한 용해도는 >200 mg/ml로 만족한 결과를 얻을 수 있었으나 생체 내에서의 효소에 의한 가수분해가 늦어 이 또한 제제화에 어려움이 있었다.

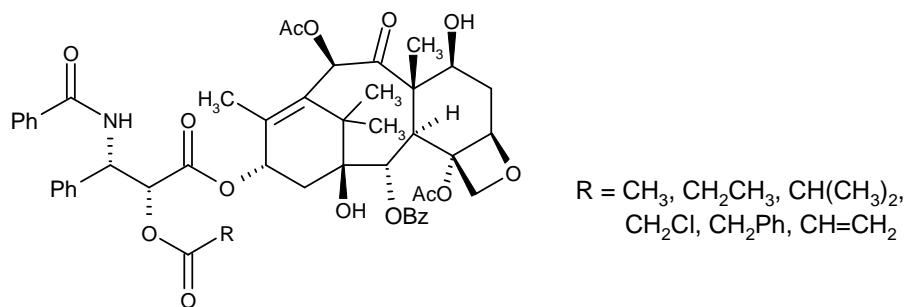
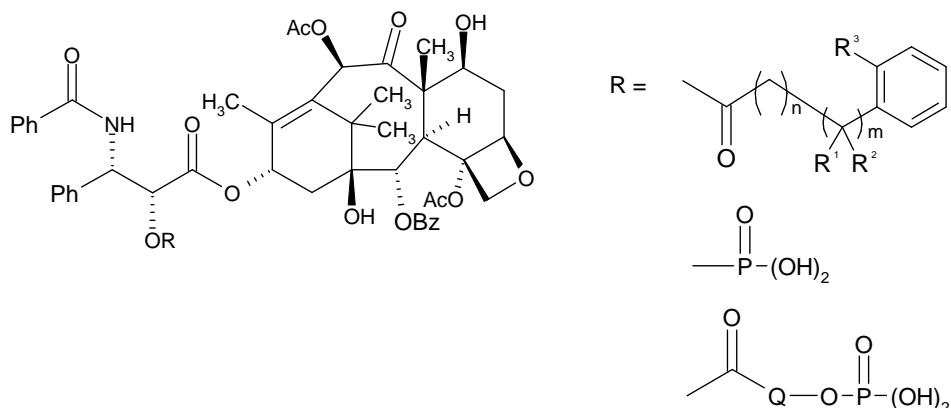


Fig. 5(a). C-2' carbonate derivatives synthesized by the Bristol–Myers Squibb company.



wherein R^3 is $-OC(=O)R$, $-OP=O(OH)_2$ or $CH_2OP=O(OH)_2$; Q is $-(CH_2)^q-$; q is 2 to 6

Fig. 5(b). Phosphate prodrug of taxol.

이러한 문제를 해결하고자 Jo.등은^{17~27)} 수용성 paclitaxel prodrug개발을 위한 연구의 일부로 소수성 약물인 paclitaxel에 친수성 polyethyleneglycol (PEG)을 도입함으로써 water-soluble paclitaxel(PP7) (Fig. 7.)을 성공적으로 합성하였다.(USPAT 6,703,417) PEG는 무독성, 수용성, 생체적합성 고분자로써^{28~37)} 약물과 결합체를 형성하여 약물전달체로 이용할 수 있으며, 수용성이 낮은 약물에 대해서는 용해성을 증대시킬 수 있다. 또한, modified drug는 긴 시간의 안정성이 요구되어진다. 그러나 약물(drug)이 너무 오랫동안 용액에서 유지되면 약물(drug)의 많은 양이 암세포에 작용하기 전에 몸으로부터 방출된다. 따라서 modified drug의 적절한 life time이 요구되어진다. 즉, 물에 대한 용해도는 PEG를 drug에 붙임으로써 해결되었고 이런 약물(drug)의 life time은 polymer 와 active drug사이에 self-immolating linker(L)와 같은 연결그룹을 도입하여 이에 의해 효소 가수분해시간을 조절함으로써 해결하였다. Fig. 8.은 수용성 paclitaxel prodrug(PP7)의 가수분해 메커니즘이다. Neil P. Desai등에 의한 메커니즘의 경우에는 paclitaxel(Taxol)의 구조적인 입체장애가 커서 친핵성 공격이 어려워 긴 가수분해시간($T_{0.5}=>7$ hr)을 필요로 하지만 Jo.등은^{17~27)} 이러한 문제를 해결하고자 그림에서처럼(Fig. 8.) polymer 와 paclitaxel(Taxol)사이에 self-immolating linker(L)와 같은 연결그룹을 도입하여 linear decomposition을 유도하였고 효소 접근시 paclitaxel의 구조적 입체장애를 줄여 빠르게 가수분해가 일어날 수 있도록 하였다. 효과적인 self-immolating linker(L)는 적절한 시간에 분해되고 또한, 암세포에 작용하기 전에 인체로부터 배출(excretion)되는 것을 방해한다. 따라서, 궁극적인 목적인 가수분해 속도 또한 조절할 수 있도록 하였다.

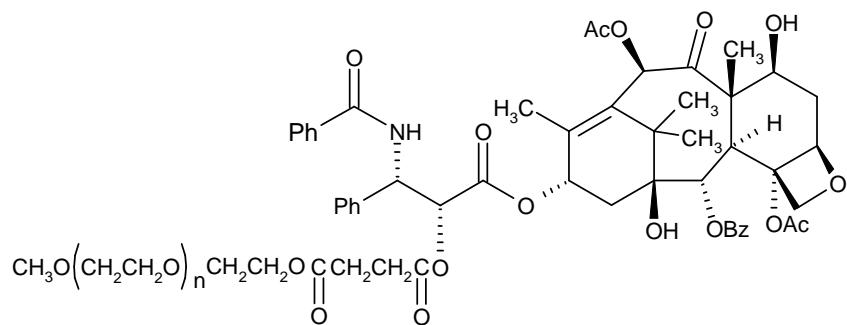


Fig. 6. Taxol 2'-PEG monoester synthesized by Enzon company.

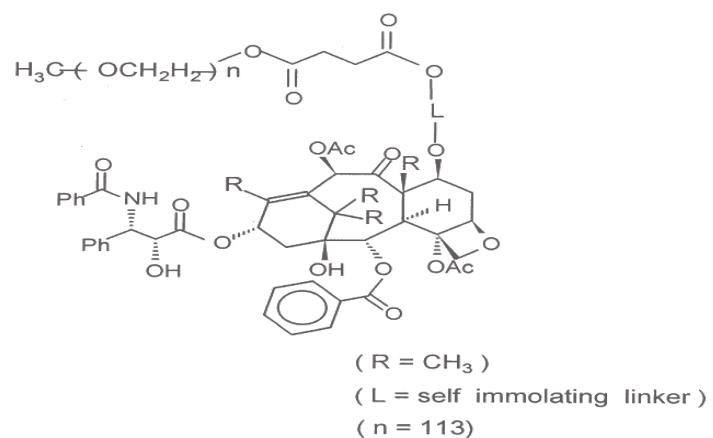
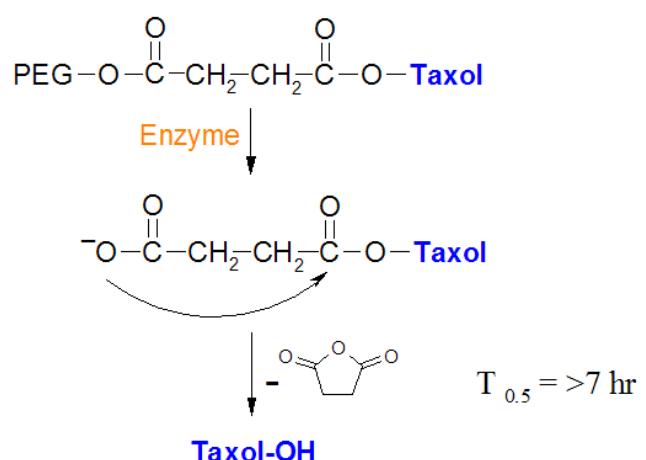
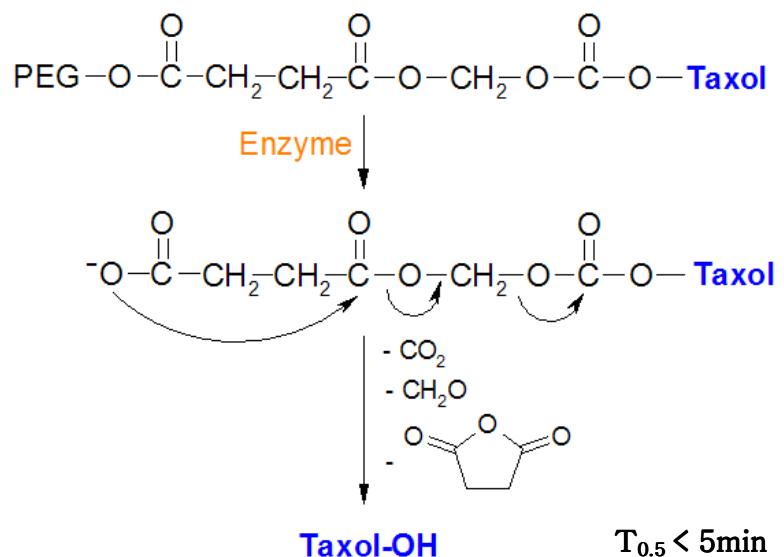


Fig. 7. Chemical structure of modified anti-Cancer Drug (PP7).



U.S. Patent 5,648,506 1997
Neil P. Desai; P.Soon-Shiong; Paul A. Stanford



U.S. Patent 6,703,417 2004
B-W Jo. ; Kolon Inc.

Fig. 8. Hydrolysis Mechanism.

3. Fluorescent probes

Fluorescent probes 는 연구자들로 하여금 민감성과 선택성을 지닌 살아 있는 세포를 포함한 복잡한 생체분자 조직의 각각의 구성요소를 인지할 수 있게 한다. 형광은 “Fluorophores” 또는 “Fluorescent dyes”라고 불리는 분자 (polyaromatic hydrocarbons or heterocycles) 안에서 일어나는 세가지 단계과정의 결과이다. (Fig. 9.)

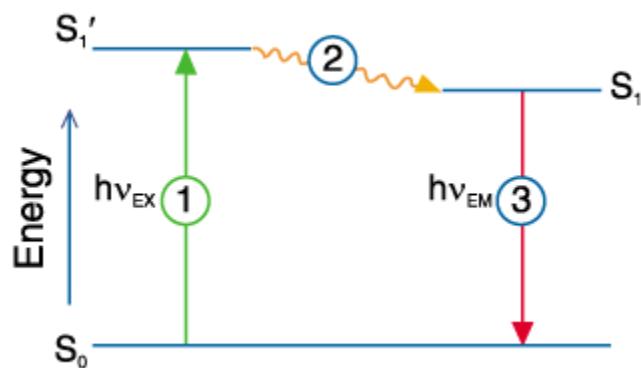


Fig. 9. Jablonski diagram illustrating the processes.

대표적인 fluorescent probe의 성질을³⁸⁾ Table 1.에 나타내었다(Fig. 10.). 실험적 sensitivity ($\epsilon_{\max} \Phi_F$)는 고유의 단백질과 핵산성분들의 값(0.08~11.0)들보다는 훨씬 큰 값을 갖는다. 그리고, fluorescence quantum yield인 Φ_F 는 형광에 의해 decay되는 여기된 singlet 의 fraction으로 단실클로이라이드(dansyl chloride)는 0.1의 값을, 파이렌(pyrene)과 파이렌(pyrene)의 다양한 유도체들은 0.25의 값을 갖는다.

본 실험에서는 대표적인 fluorescent probe(Fig. 10.)들 중 dansyl chloride (5-dimethylamino-1-naphthalene-sulfonyl chloride) 와 1-pyrenbutyric acid를 사용하였다. Dansyl chloride는 분석화학 또는 구조분석에서 적용을 위해 형광물질라벨로 널리 쓰이고 있으며 1,2차 아민, 하이드록시 그룹(-OH), 폐놀, 싸이올(-SH) 등 라벨링의 연구를 위해 사용되었으며, 초기에 dansyl chloride는 극성연구를 위한 프로틴 라벨에도 사용되었다. 또한, 1-pyrenbutyric acid는 독성이 없고 비침습성이며, 카르복실산 그룹이 금속산화물 표면에 바인딩되는 좋은 리간드이며 pyren lumophore의 발광성 때문에 분광학적 프로브(probe)와 강력한 광감작제(photosensitizer)로서 널리 이용되고 있다. 파이렌(pyren)의 경우 최대흡수(absorption)파장은 342nm, 최대방출(emission)파장은 383nm이고, 일반적으로 사용되는 대표적인 fluorescent probe들 중 가장 큰 fluorescence quantum yield(Φ_F)값과 fluorescence decay time (τ_F) 값을 갖는 것으로 알려져 있다.

이렇게 높은 양자수득률(quantum yield)을 갖는 fluorescent probe를 도입한 파클리탁셀유도체는 튜블린에 바인딩되는 파클리탁셀의 메커니즘과 튜블린의 바인딩사이트 주변을 연구하는데 매우 유용하게 사용되어진다.^{39),40)} 즉, 형광특성을 갖는 약물들의 유도체는 단백질과 핵산에 결합하는 약물의 메커니즘과 구조를 설명하는데 중요한 도구로서 널리 이용된다.

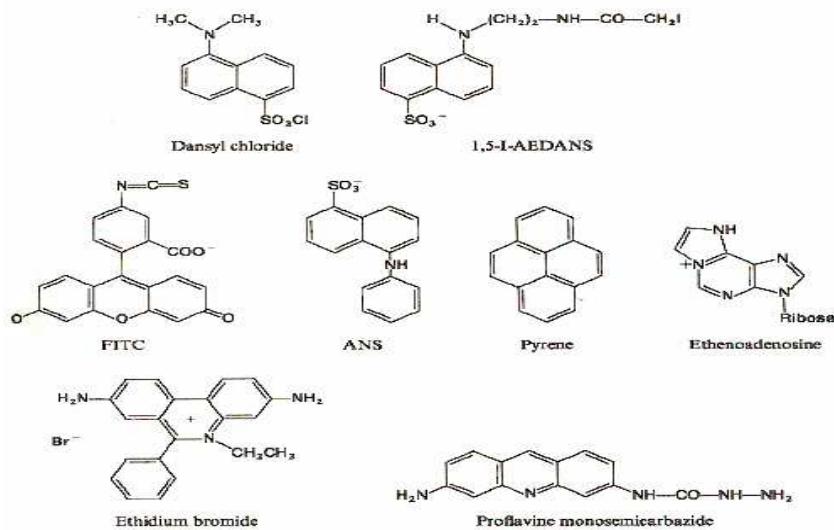


Fig. 10. Structures of fluorescent probes.

Table 1. Typical fluorescent probes.

Probe [#]	Absorption		Emission [§]			Sensitivity
	λ_{\max} (nm)	$\epsilon_{\max} \times 10^{-3}$	λ_{\max} (nm)	ϕ_F	τ_F (nsec)	$\epsilon_{\max}\phi_F \times 10^{-2}$
Dansyl chloride	330	3.4	510	0.1	13	3.4
1,5-I-AEDANS	360	6.8	480	0.5	15	34
Fluorescein isothiocyanate (FITC)	495	42	516	0.3	4	116
8-Anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS)	374	6.8	454	0.98	16	67
Pyrene, and various derivatives	342	40	383	0.25	100	100

Values shown for ϕ_F and τ_F are near the maximum typically observed in biological samples at ambient temperature.
Other (considerably smaller) values often are found

그러나, 파클리탁셀이 세포내미세관(microtubules)에 결합하고 안정화되는 메커니즘^{41~44)}은 현재까지 정확하지 않다. 파클리탁셀-세포내미세관(microtubules) 상호작용은 ligand-receptor association을 이해하기 위해 일반적으로 사용하는 방법으로는 규명하기 어려우며, 이러한 상호작용은 복잡하고 몇 가지 특징을 갖는다. 첫째, 파클리탁셀은 단백질의 발색영역으로부터 뚜렷하게 구분되는 어떠한 발색단도 가지지 않는다. 세포내미세관(microtubules)에 바인딩됨으로서 나타나는 파클리탁셀의 전자적 스펙트럼의 변화는 단백질의 전자적 스펙트럼에 의해서는 분명하게 해석할 수 없다. 둘째, 파클리탁셀은 튜블린(tublin)보다는 세포내미세관(microtubules)에 더 잘 바인딩된다.^{45),46)} 용액상태의 NMR 스펙트럼과 같은 receptor크기에 의한 해석하는 방법은 비효율적이다. 그리고, 셋째로, 분자의 구조적인 복잡성 때문에 새로운 유도체의 합성이 용이하지 않다. 세포내미세관(microtubules)에 바인딩되는 파클리탁셀의 메커니즘을 조사하기 위하여 1995년 Dubois 등^{47),48)}과 Souto 등⁴⁹⁾은 분자에 공유결합으로 형광프로브 (fluorescent probe)를 붙인 파클리탁셀유도체를 보고하였고 Sengupta 등⁵⁰⁾은 3'-N-benzoyl 그룹에 m-(dimethylamino)benzoyl 그룹을 대신한 형광성 파클리탁셀유도체를 연구보고 하였다. 앞서 언급한 바와 같이 이러한 파클리탁셀 유도체들은 메커니즘 연구뿐만 아니라 세포내미세관(microtubules)에 파클리탁셀 바인딩사이트의 성질에 관한 정보를 제공하여 준다.

4. 본 연구의 내용 및 목적

본 연구에서는 물에 대한 용해도를 향상시키고 적절한 가수분해속도를 갖도록 설계되어진 mPEG (methoxy polyethylene glycol)를 갖는 pegylated paclitaxel(PP7)에 1-pyrenbutyric acid등의 강한 형광물질을 probe를 도입하여 형광특성을 갖는 수용성 파클리탁셀을 다음과 같이(Fig. 11.) 합성하고 그들의 특성을 조사하였다. 실제 이러한 연구는 항암제인 파클리탁셀과 수용성 파클리탁셀의 in-vivo transportation과 바인딩 메커니즘을 더 잘 이해하기 위한 기초 및 응용연구에 큰 도움이 될 것이라 사료되어진다.

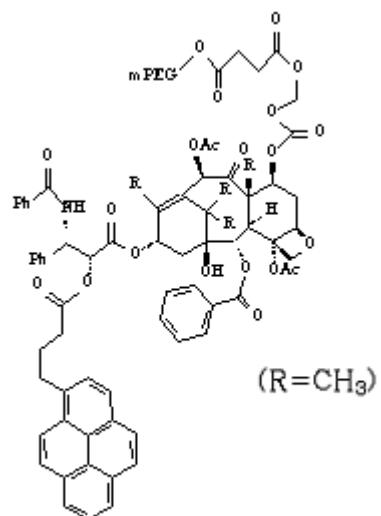


Fig. 11. Chemical structure of 2'-pyrenbutyric carbonyl-PP7.

제 2 절 실 험

1. 시약 및 기기

1.1. 시약

Dansyl chloride (DNS-Cl, 5-dimethylamino-1-naphthalene-sulfonyl chloride), 1-pyrenbutyric acid, 1,3-diisopropyl carbodiimide, triethyl amine 그리고 dimethylaminopyridine(DMAP)은 정제 없이 Aldrich 사의 제품을 그대로 사용하였다. Paclitaxel 은 Brystol-Mayers Squibb 사의 제품을 사용하였으며 합성에 사용되어진 chloroform, pyridine, 그리고 methylene chloride 등은 각각 정제하여 사용하였다.

또한, HPLC 이동상으로 acetonitrile 은 HPLC grade 의 Aldrich 사 제품을, 중류수는 3 차 중류수를 사용하였고, 이러한 이동상 용매는 감압펌프 (Division of Millipore, Waters)와 필터 (FH-0.5 μm , Waters)를 이용하여 감압여과 한 후 사용하였다.

1.2. 기기

본 연구의 실험과 특성조사를 위해서 사용된 기기는 다음과 같다.

FT-NMR Spectrometer : JEOL JNM-LA300

HPLC : Waters 717 Auto sampler

Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector

Waters 1525 Binary HPLC Pump

Xterra RP 85 μm 4.6×250 mm C₁₈ Column

Prep-HPLC : Waters Delta Prep4000

Xterra RP 7 μm 19×300 mm C₈ Column

Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector

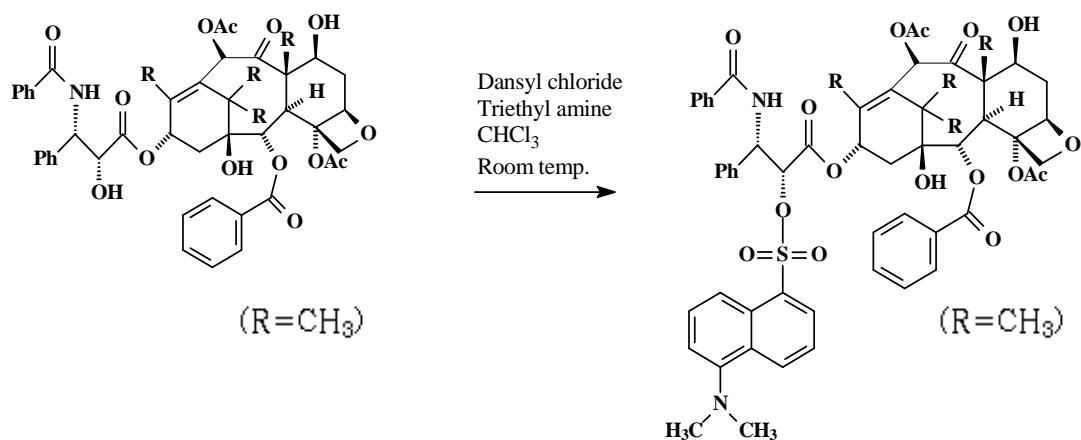
UV spectrophotometer : OPTIZEN 2120

Luminescence spectrometer : SLM Aminco·Bowmam series- 2

2. 2'-Dansylated paclitaxel의 합성

2'-Dansylated paclitaxel은 scheme 1. 과 같은 방법에 의해 합성하였다.

Scheme 1.



2'-Dansylated paclitaxel 합성방법은 다음과 같다. Paclitaxel(100mg, 0.117mmole)을 chloroform 2ml에 녹인 후 triethylamine(5.90mg, 0.059mmole)을 가하고, 여기에 dansyl chloride (15.78mg, 0.059mmole)를 chloroform 1ml에 녹인 용액을 서서히 가한후, 18~20시간 동안 실온에서 교반시킨다. 반응이 끝난 혼합액을 chloroform 10ml로 희석하여 5% HCl수용액, NaHCO₃포화수용액 그리고 중류수로 수회 세척한다. 유기층을 모아 magnesium sulfate로 탈수하고 용매를 감압건조한 후 preparative-HPLC를 이용하여 생성물을 얻었다. 최종 2'-dansylated paclitaxel에 포함된 불순물들은 용매 정제법 만으로는 제거가 어려워 prep-HPLC를 사용하였다. Prep-HPLC의 이동상 용매는 HPLC grade의 acetonitrile과 3차 중류수를 사용하여 gradient 조건으로 이동상을 흘려주었고, 고정상은 Xterra RP 85 μ m 4.6×250mm C₈ column을 사용하였으며, flow는 20mL/min로 하였다. 그러나, prep-HPLC에 의한 정제 후에도 순수한 2'-dansylated paclitaxel을 얻기 어려웠으며 23% 낮은 수득률을 얻었다. NMR 스펙트럼을 보면 다소 적분비는 정확히 일치하지는 않았지만 δ = 3.0ppm과 δ = 7.3ppm, 8~8.3ppm에서 dansyl chloride가 갖는 CH₃와 벤젠고리의 특성피이크들을 각각 확인할 수 있었으며, paclitaxel의 δ = 4.8ppm의 2'-H 피이크는 δ = 5.3ppm으로 shift를 보였고, δ = 3.6 ppm의 2'-OH 피이크 크기가 줄어듬을 확인할 수 있었다. 반응물인 paclitaxel과 화합물의 NMR스펙트럼을 각각 Fig. 12.와 Fig. 13.에 나타내었다. 이처럼, 좋지 못한 반응성을 보이는 것은 paclitaxel과 dansyl chloride의 화학구조적 특성, 때문이라 사료되어지며 따라서, 또 다른 fluorescent probes중 하나인 pyrene유도체를 선택하여 합성을 시도하였다.

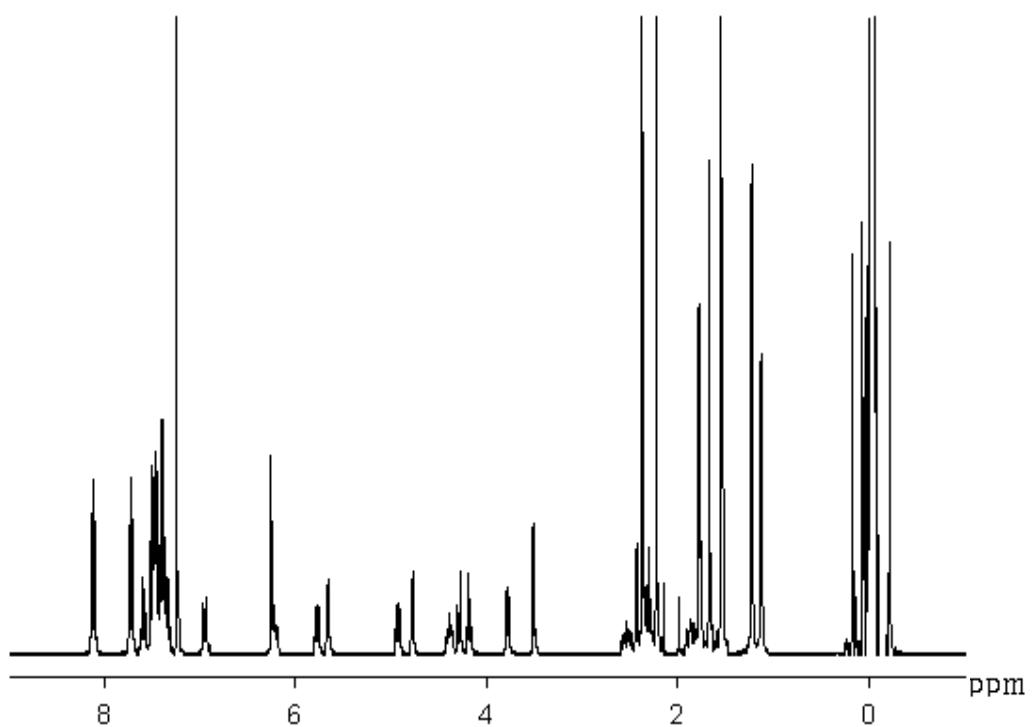


Fig. 12. ^1H -NMR spectrum of paclitaxel(CDCl₃).

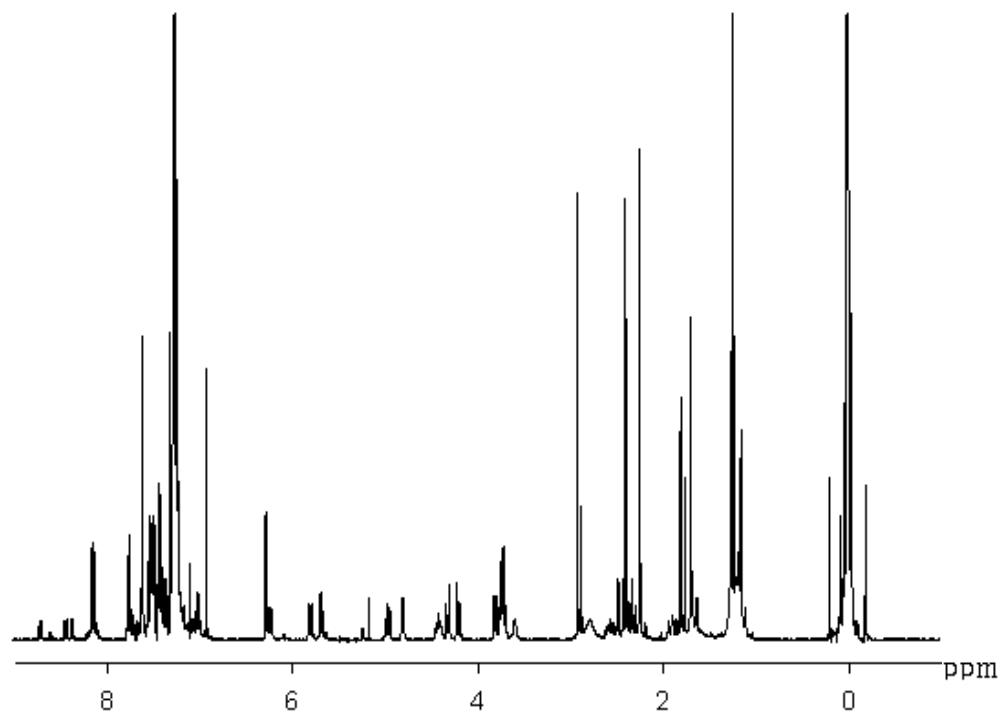
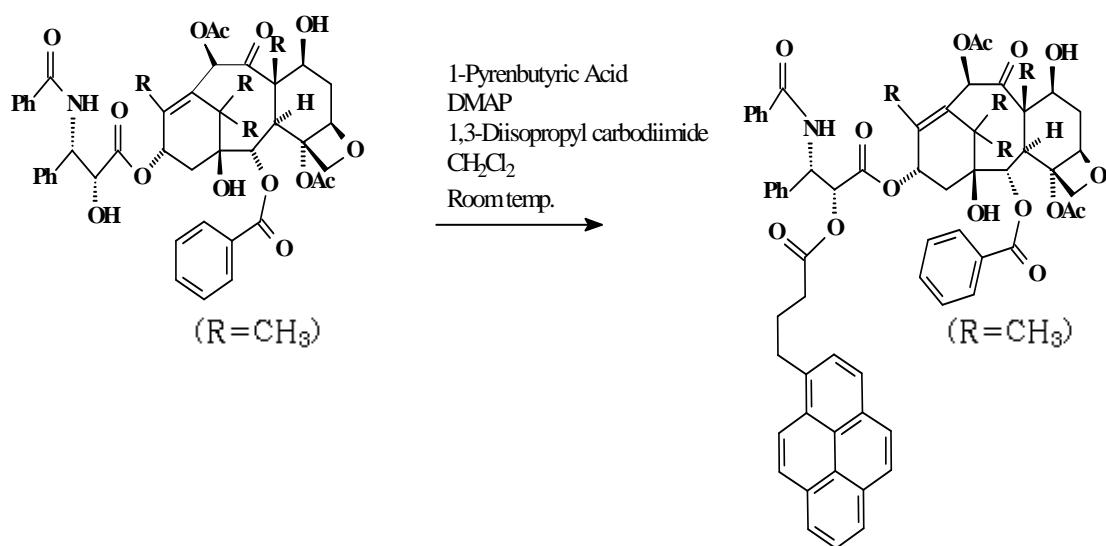


Fig. 13. ¹H-NMR spectrum of 2'-dansylated paclitaxel (CDCl₃).

3. Fluorescent paclitaxel 의 합성

2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel은 scheme 2.와 같은 방법에 의해 합성하였다.

Scheme 2.



2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel의 합성 방법은 다음과 같다. 1-Pyrenbutyric acid (81.04mg, 0.468mmole)와 dimethylaminopyridine (DMAP) (143.10mg, 1.170mmole)을 dichloromethane 2.5 ml에 녹인다. 여기에 paclitaxel(200mg, 0.234mmole)을 dichloromethane 2ml에 녹인 용액을 가하고 1,3-diisopropylcarbodiimide(29.50mg, 0.234mmole)를 첨가한 후 20~22시간 동안 실온에서 교반시킨다. 반응이 끝난 혼합액을 dichloromethane 25ml로 희석한 후 5% HCl수용액과 중류수로 수회 세척한다. 유기층을 모아 magnesium sulfate로 탈수하고 용매를 감압건조하고 진공건조한 후 생성물을 얻었다. 합성 후 TLC(ethyl acetate : hexane = 6:4)로 합성여부를 확인하였으며(Fig. 14.) 그들의 화합물의 구조는 JEOL JNM-LA300의 FT-NMR spectrometer를 사용하여 확인하였다. NMR스펙트럼을 보면 다소 적분비는 정확히 일치하지는 않았지만 $\delta = 3.4\text{ppm}$ 과 $\delta = 7.8\sim 8.3\text{ppm}$ 에서 1-pyrenbutyric acid가 갖는 CH_2 와 벤젠고리의 특성 피이크(Fig. 15.)들을 각각 확인할 수 있었으며, Paclitaxel의 $\delta = 4.8\text{ppm}$ 의 2'-H피이크는 $\delta = 5.57\text{ppm}$ 으로 shift를 보였고 $\delta = 3.6\text{ppm}$ 의 2'-OH 피이크가 거의 사라짐을 확인하였다. 이들 화합물의 NMR 스펙트럼을 Fig. 16.에 나타내었다.

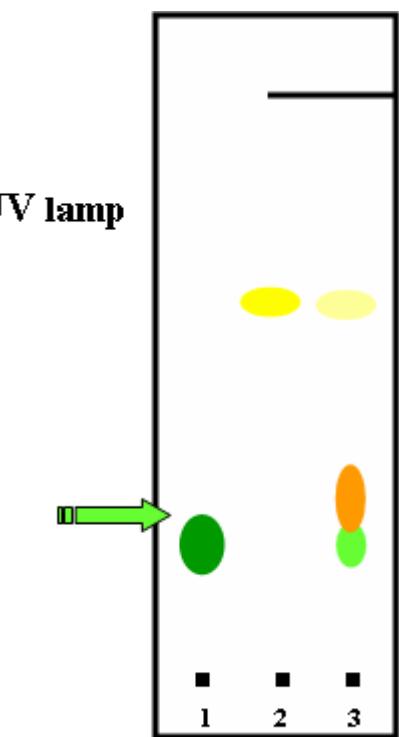


Fig. 14. Thin-layer chromatography of paclitaxel(1), 1-pyrenbutyric acid(2) and fluorescent paclitaxel(3) (Developing Solvent ; EA:H_X= 6:4).

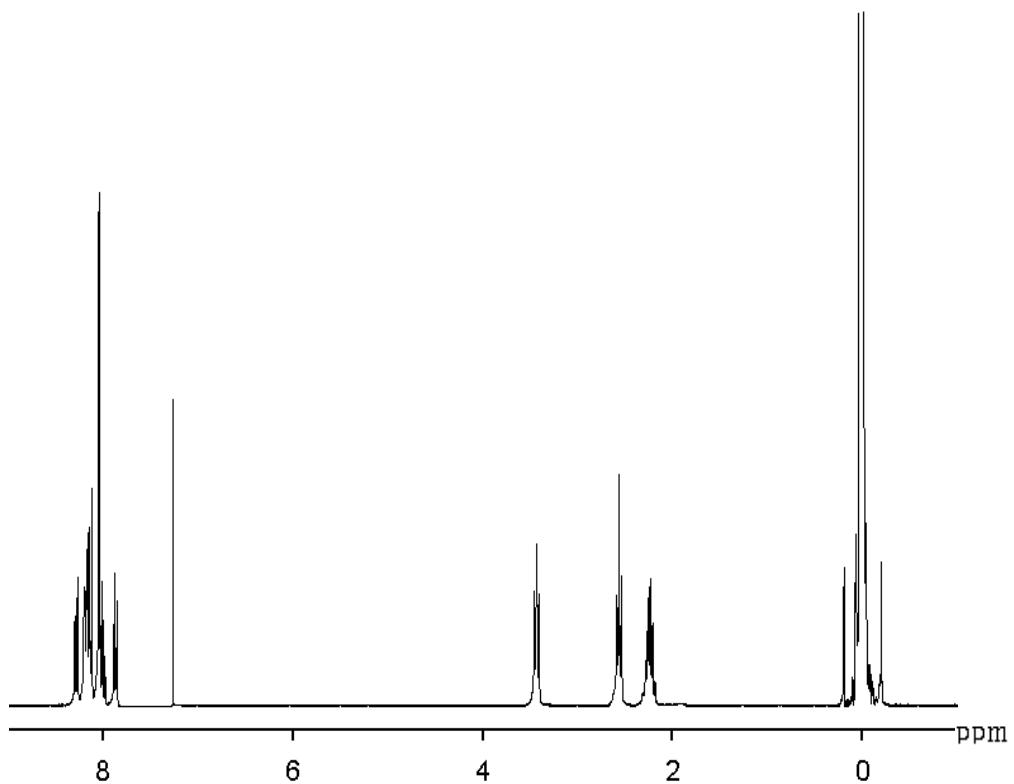


Fig. 15. ¹H-NMR spectrum of 1-pyrenbutyric acid (CDCl_3).

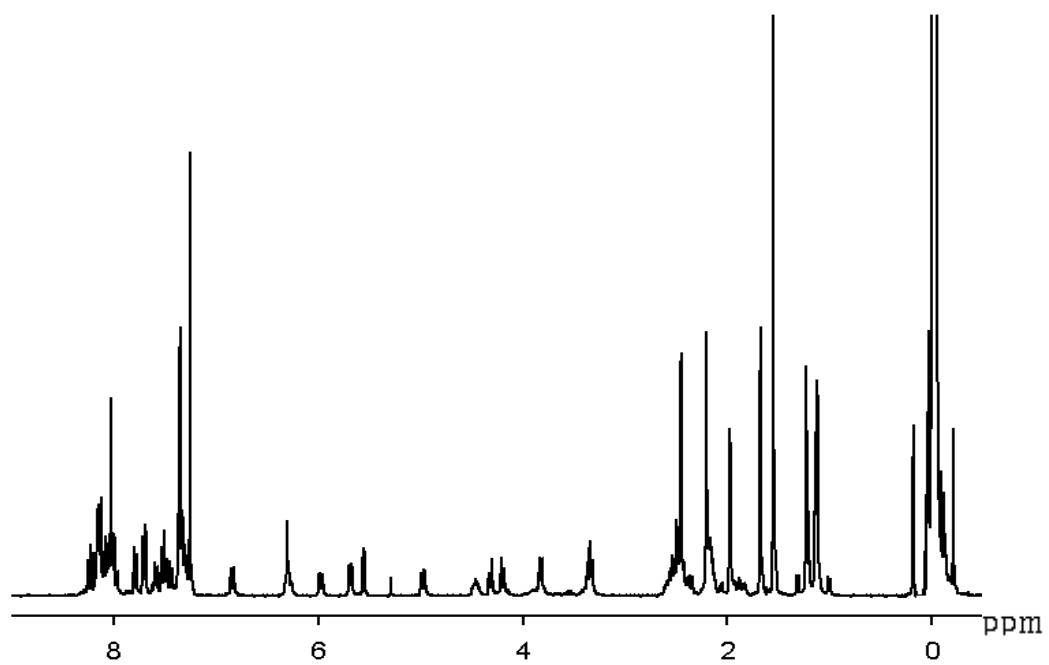
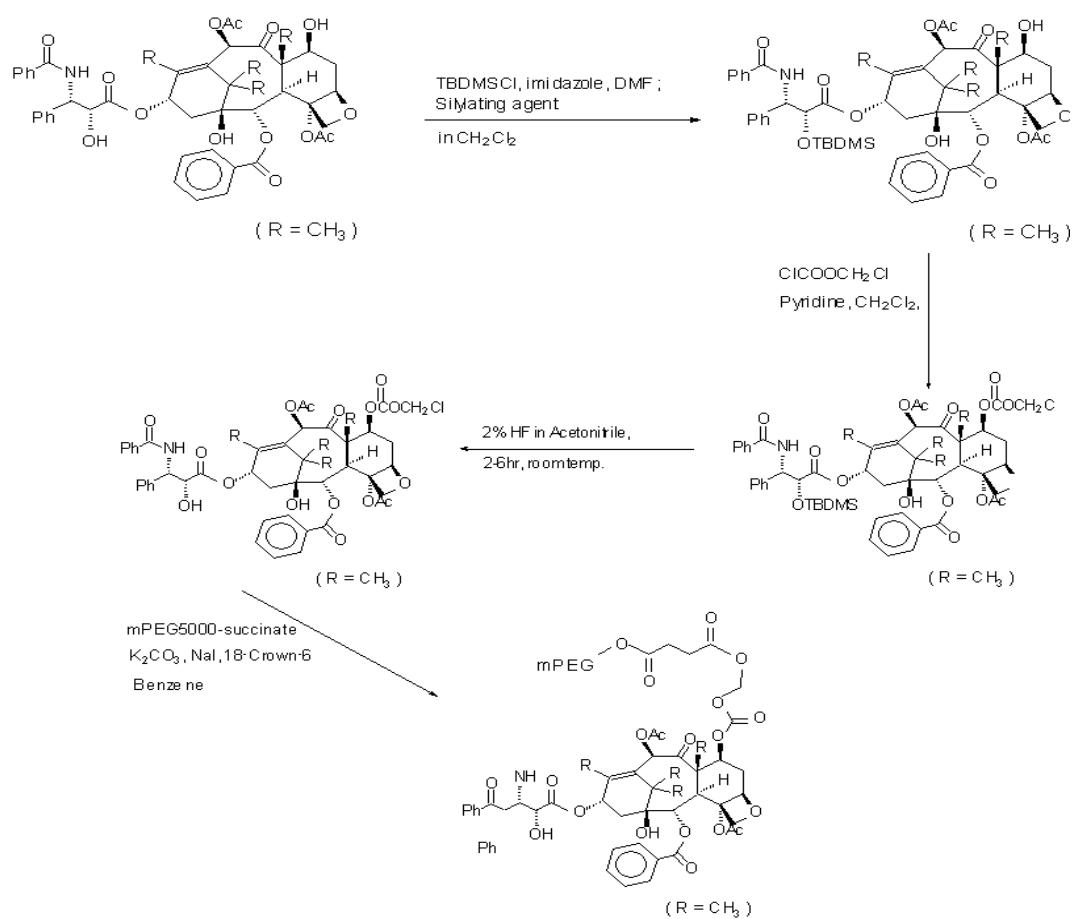


Fig. 16. ¹H-NMR spectrum of 2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel (CDCl_3).

4. Fluorescent water-soluble paclitaxel(PP7) 의 합성

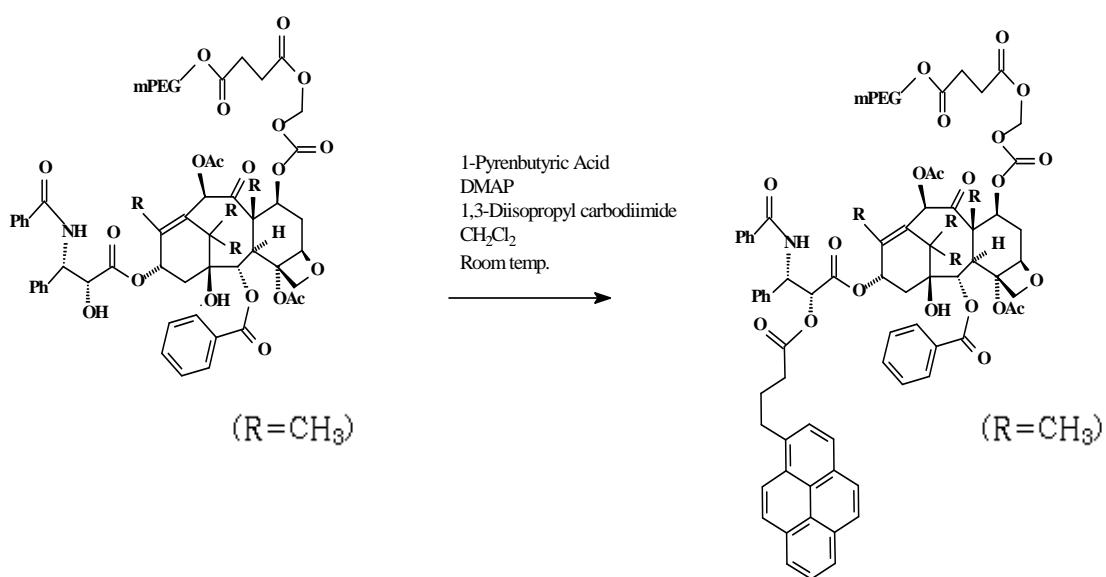
수용성 Paclitaxel (namely, PP7)의 합성은 Jo.^{17)~27)}의 방법에 의하여 합성하였으며 다음의 scheme 3.에 나타내었다.

Scheme 3.



2'-pyrenbutyric carbonyl-PP7은 scheme 4와 같은 방법에 의해 합성하였다.

Scheme 4.



2'-pyrenbutyric carbonyl-PP7의 합성 방법은 다음과 같다. 1-pyrenbutyric acid(11.70mg, 0.041mmole)와 dimethylaminopyridine (DMAP) (20.68mg, 0.169mmole)을 dichloromethane 1.5ml에 녹인다. 여기에 Jo. 등^{17~27)}의 방법에 의해 합성되어진 수용성paclitaxel인 PP7(200mg, 0.034mmole)을 dichloromethane 1ml에 녹인 용액을 가하고 1,3-diisopropyl carbodiimide(4.27mg, 0.034mmole)를 첨가한 후 20~24시간 동안 실온에서 교반시킨다. 반응이 끝난 혼합액을 dichloromethane으로 15ml로 희석한 후 5% HCl수용액과 중류수로 수회 세척한다. 유기층을 모아 magnesium sulfate로 탈수하고 용매를 감압건조하고 진공건조한 후 생성물을 얻었다. 그들의 화합물의 구조는 JEOL JNM-LA300의 FT-NMR spectrometer를 사용하여 확인하였다. NMR스펙트럼을 보면 다소 적분비는 정확히 일치하지는 않았지만 $\delta = 3.4$ ppm과 $\delta = 7.8\sim 8.3$ ppm에서 1-pyrenbutyric acid가 갖는 CH₂와 벤젠고리의 특성 피이크(Fig. 15.)들을 각각 확인할 수 있었으며, 수용성Paclitaxel(PP7)의 $\delta = 4.8$ ppm의 2'-H 피이크는 $\delta = 5.58$ ppm으로 shift를 보임을 확인하였다. 반응물인 수용성Paclitaxel(PP7)과 화합물의 NMR스펙트럼을 각각 Fig. 17.과 Fig. 18.에 나타내었다.

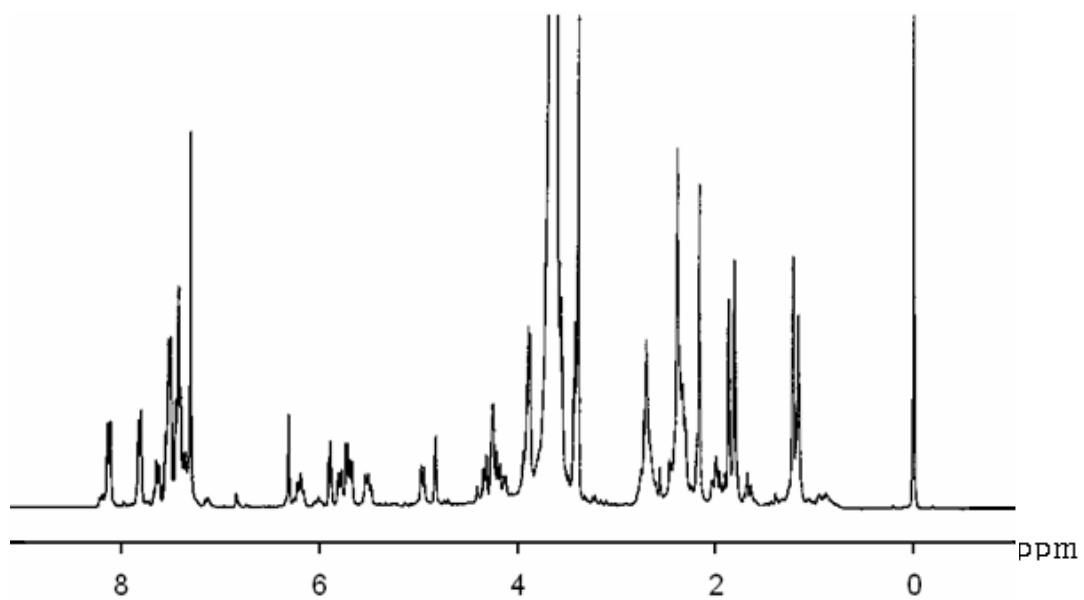


Fig. 17. ${}^1\text{H}$ -NMR spectrum of water soluble-paclitaxel(PP7) (CDCl_3).

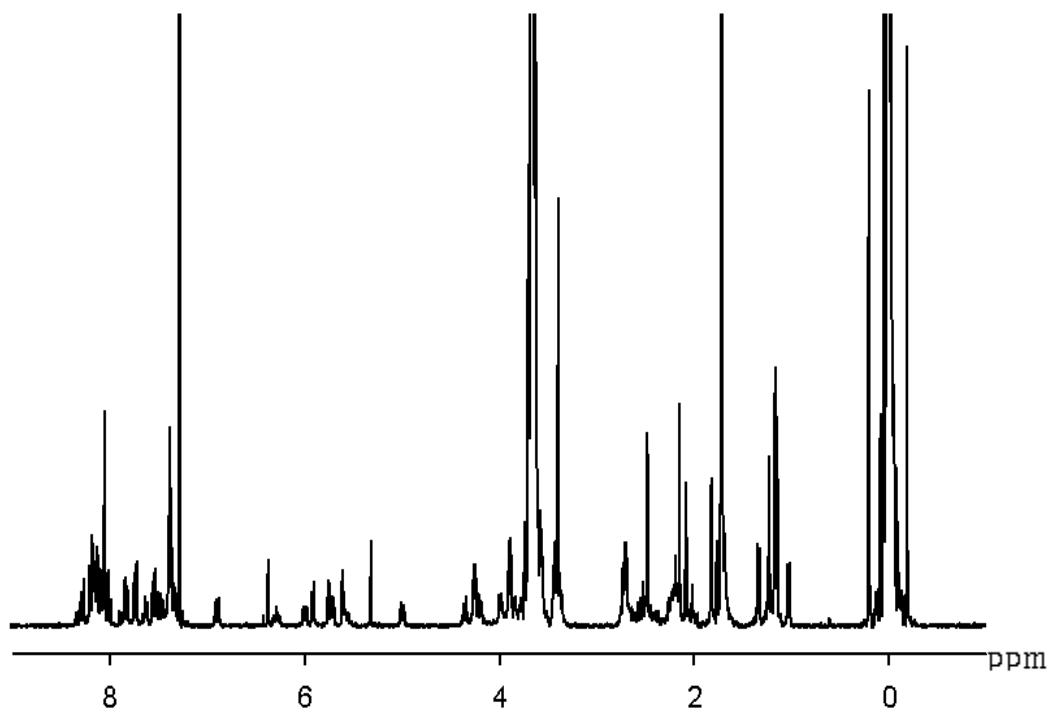


Fig. 18. ¹H-NMR spectrum of 2'-pyrenbutyric carbonyl-PP7 (CDCl₃).

제 3 장 결과 및 고찰

1. Fluorescent paclitaxel의 정제 및 특성

최종 2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel에 포함된 불순물들은 용매정제법만으로는 제거가 어려워 preparative-HPLC를 사용하였다. Prep-HPLC의 이동상 용매는 HPLC grade의 acetonitrile과 3차 중류수를 사용하였고 고정상은 Xterra RP 85 μm 4.6 x 250mm C₈ column을 사용하였으며, 효율적인 분리를 위하여 Table 2.와 같이 20ml의 유속에서 시간에 따른 용매의 조성에 구배를 주었으며, 검출기로는 파장을 228nm로 고정시킨 자외선 검출기를 사용하였다.

Fig. 19.는 2-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel생성물에 대한 prep-HPLC 크로마토그램으로 각각 retention time 15~25min(A)과 41~43min(B)에서 주피이크를 보였다. 각각의 크로마토그램의 주피이크에 대해 분취하였으며 분취를 통해 얻은 시료는 분석용 HPLC와 NMR스펙트럼을 이용하여 최종 화합물을 확인하였다. 그 결과 피이크(A)는 분리하고자 하는 순수한 생성물로서 189mg으로 72%의 수득률을 얻었다. Fig. 20.은 분취한 피이크(A)의 NMR스펙트럼이다. 앞의 분취전의 NMR스펙트럼(Fig. 16.)과는 달리 수소의 수와 종류가 잘 일치함을 확인할 수 있었으며 특히, $\delta = 3.6\text{ppm}$ 의 2'-OH 피이크가 완전히 사라짐을 확인하였다.

또한, Fig. 21.과 Fig. 22.는 분석용 HPLC이다. 이동상 용매로는 HPLC grade의 acetonitrile과 3차 중류수를 사용하여 gradient조건으로 이동상을 흘려주었고 고정상은 Xterra RP 85 μm 4.6 x 250mm C₁₈ column을 사용하였으며, 검출기로는 파장을 228nm로 고정시킨 자외선 검출기를 사용하였다. Fig. 21.은 반응물인 paclitaxel의 분석용 HPLC로 retention time은 8.5min이었다. 그리고 Fig. 22.은 최종생성물의 분취전·후의 분석용 HPLC로

분취결과는 달리 retention time 42.4min에서 하나의 피크를 보여 prep-HPLC를 통하여 99%의 순수한 최종 생성물을 얻을 수 있음을 확인하였다.

Table. 2. Gradient condition of Prep-HPLC

Time (min)	Flow rate (ml/min)	% Acetonitrile ^a	% H ₂ O ^b
Initial	20	40	60
5.00	20	40	60
10.00	20	65	35
40.00	20	90	10
45.00	20	100	0
60.00	20	100	0
65.00	20	40	60

a: 95% Acetonitrile, b: 95% H₂O

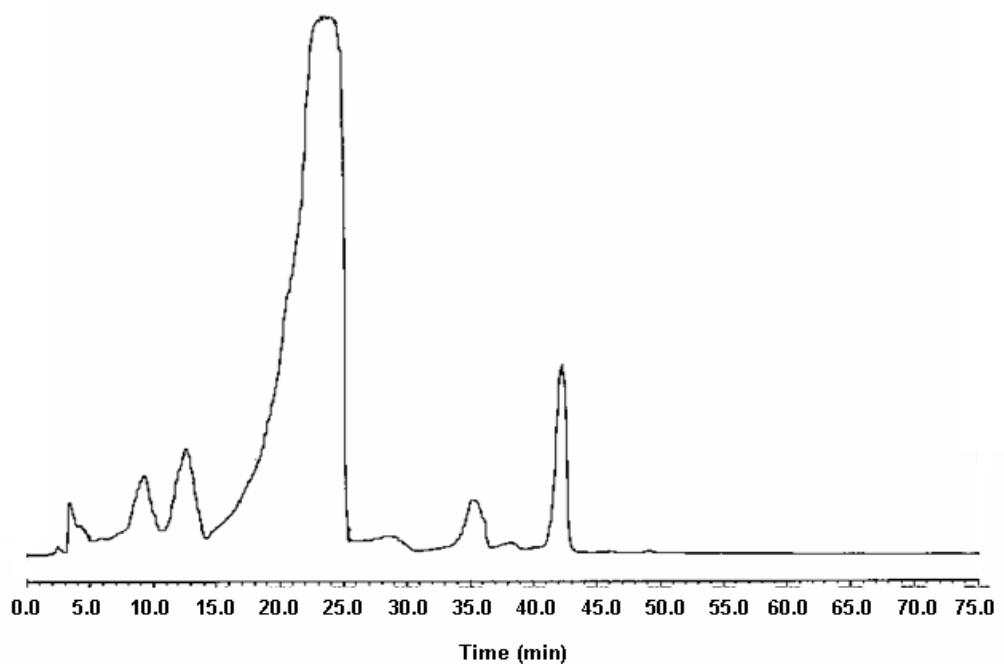


Fig. 19. Preparative HPLC chromatography of crude 2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel.

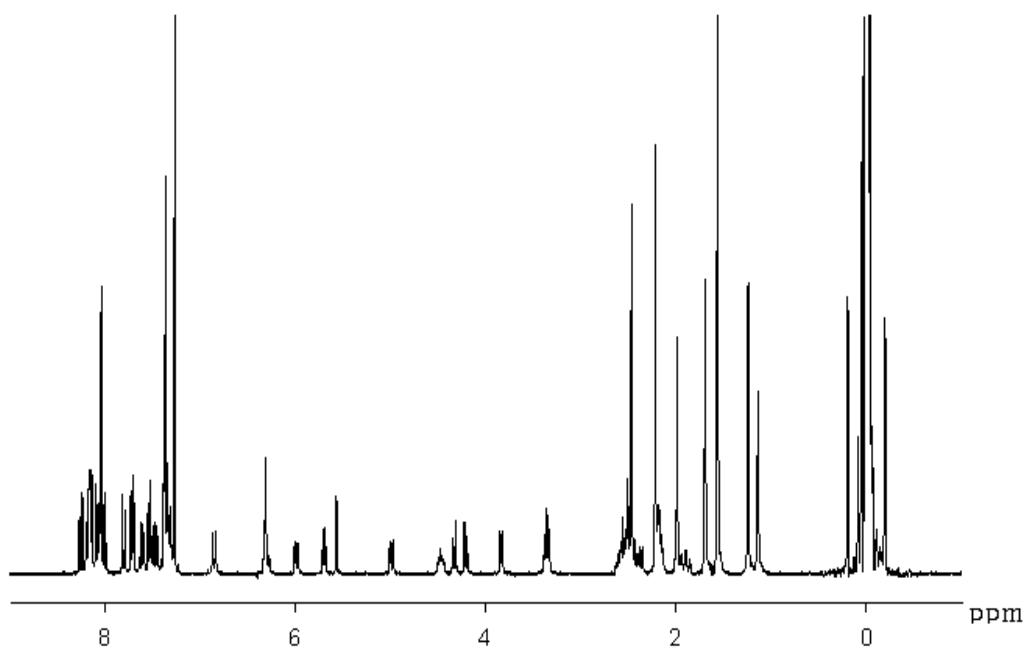


Fig. 20. ¹H-NMR spectrum of 2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel (CDCl₃) (after prep-HPLC).

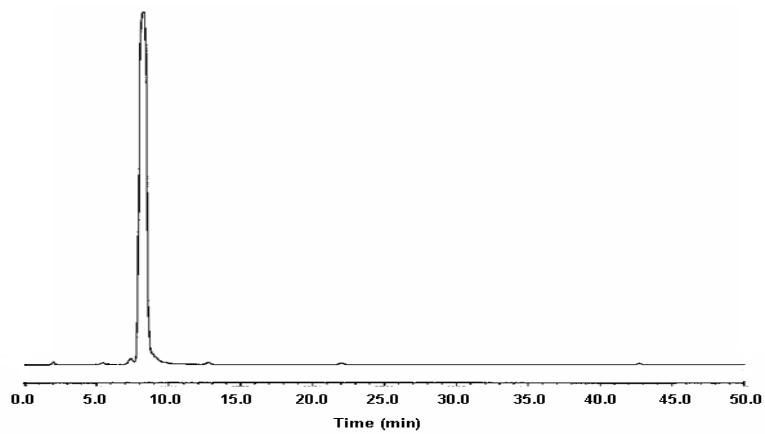


Fig. 21. Analytical HPLC of paclitaxel.

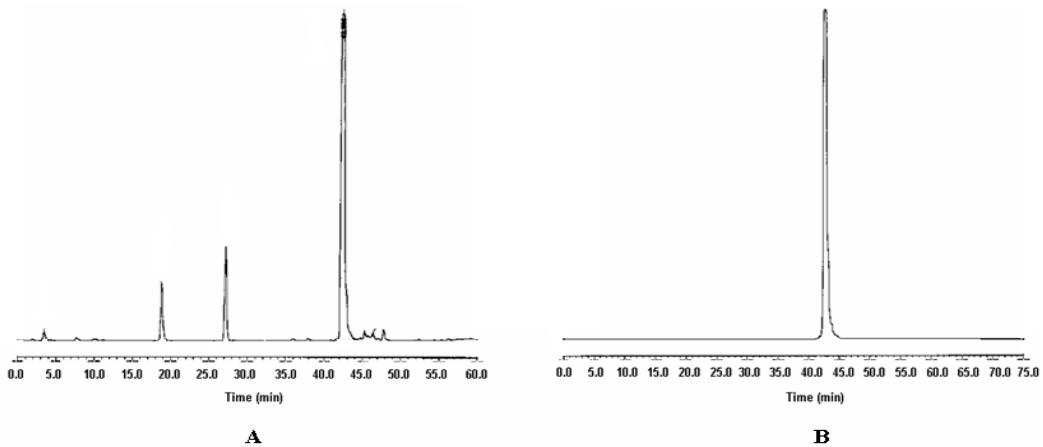


Fig. 22. Analytical HPLC of 2'-pyrenbutyric carbonyl- paclitaxel (A; before prep-HPLC, B; after prep-HPLC).

순수한 paclitaxel 과 1-pyrenbutyric acid 그리고 합성되어진 fluorescent paclitaxel의 $20\mu M$ 농도에서의 UV 스펙트럼들을 Fig. 23.에 나타내었다. 순수한 paclitaxel은 λ_{max} 228nm에서, 1-pyrenbutyric acid는 λ_{max} 239.8nm에서 흡광 도가 가장 큰 값을 보였다. 그리고, 합성되어진 fluorescent paclitaxel(2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel)의 경우, 1-pyrenbutyric acid의 UV스펙트럼과 유사한 패턴을 보였으며, λ_{max} 239.8nm에서 1-pyrenbutyric acid보다 조금 더 큰 최대흡광도를 보였다. 또한, 순수한 paclitaxel과 1-pyrenbutyric acid 그리고 합성되어진 fluorescent paclitaxel의 농도를 달리하면서 UV흡광도를 측정하였다. Fig. 24.에 fluorescent paclitaxel의 농도에 따른 흡광스펙트럼을 나타내었으며, Fig. 25.에 최대흡광도를 보이는 파장에서 각각 3개의 sample에 대하여 농도에 따른 UV흡광도를 비교하였다. 농도가 증가함에 따라 3개의 sample 모두에 대하여 증가되는 흡광도를 보였고, 측정된 각각의 모든 농도에서 fluorescent paclitaxel이 1-pyrenbutyric acid 보다 조금 큰 흡광도를 보임을 확인하였다.

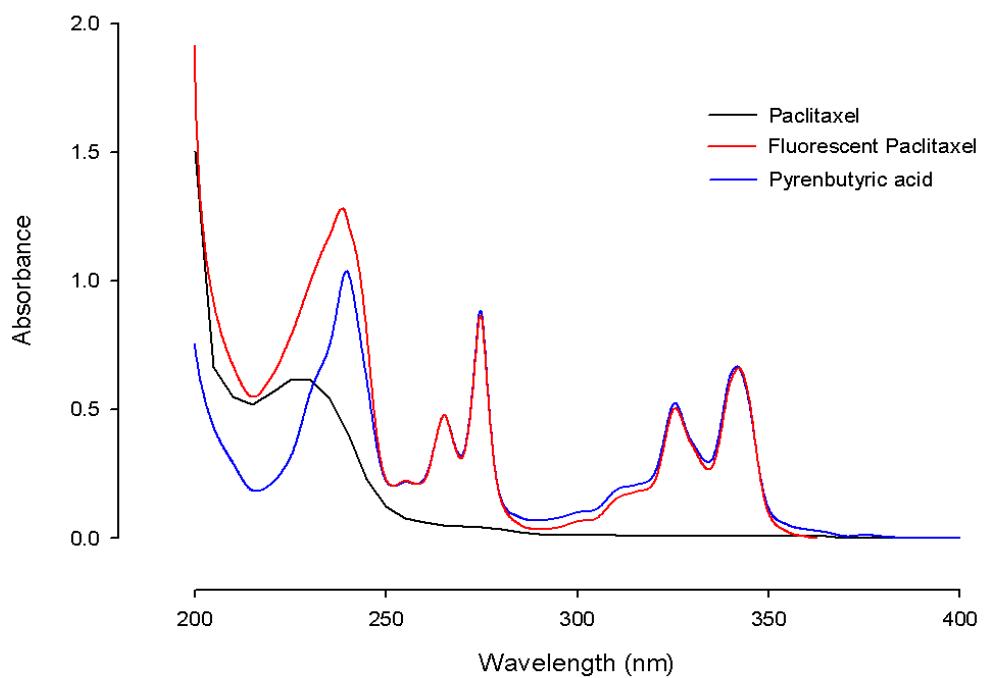


Fig. 23. UV spectra of paclitaxel, 1-pyrenbutyric acid and 2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel at $20 \mu M$.

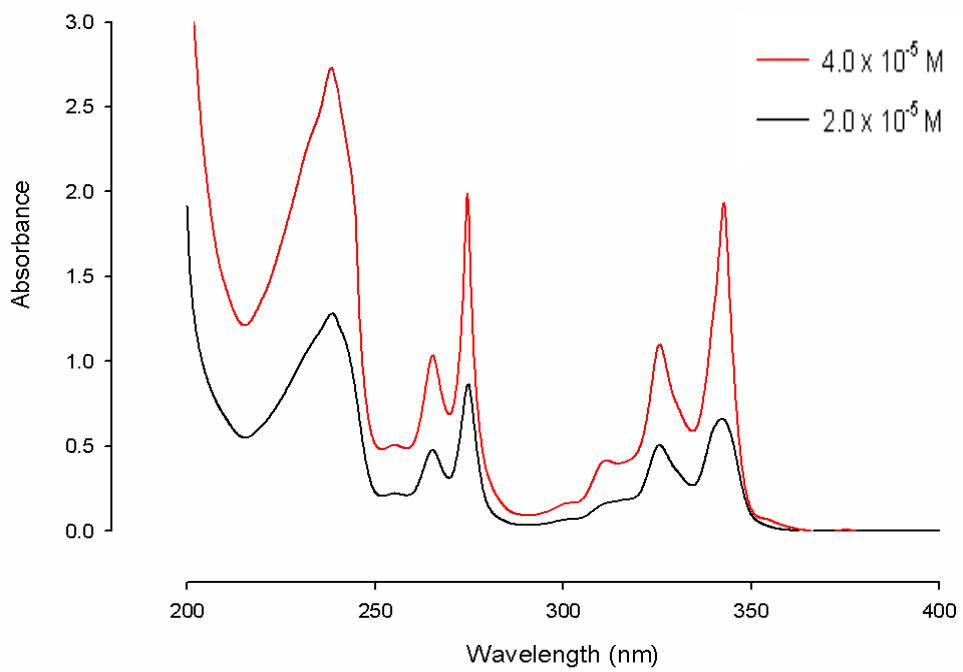


Fig. 24. UV spectra of 2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel at $20 \mu\text{M}$ and $40 \mu\text{M}$.

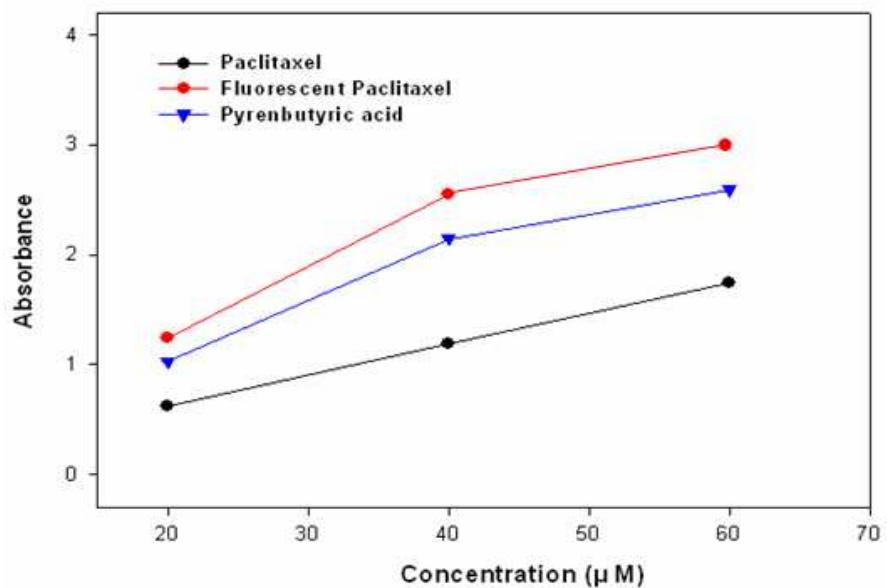
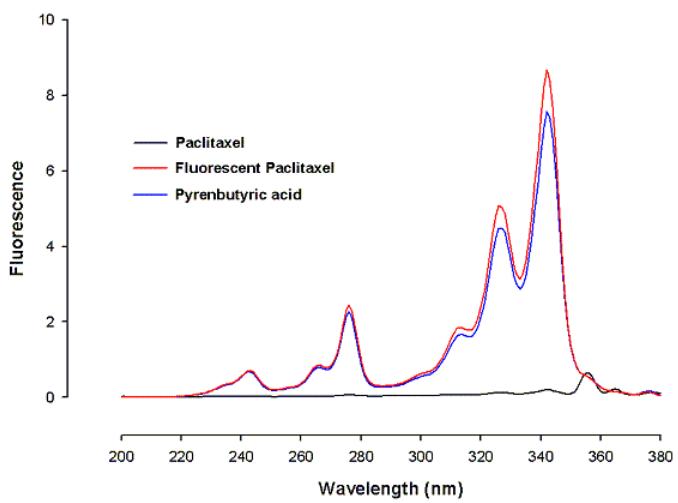


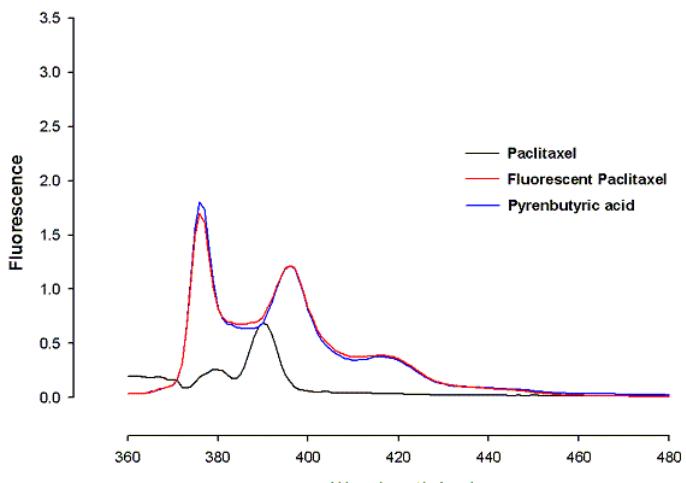
Fig. 25. The absorbance of paclitaxel, 1-pyrenbutyric acid and 2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel was measured as a function of concentration at λ_{\max} .

다음으로 최종생성물의 형광특성을 조사하였다. 순수한 paclitaxel과 1-pyrenbutyric acid 그리고 최종생성물인 fluorescent paclitaxel의 $2\mu M$ 농도에서의 형광스펙트럼들을 Fig. 26.에 비교하였다. Fluorescent paclitaxel의 경우, λ 값 $376nm$ 에서 최대 emission피이크를 보였고 형광특성을 거의 보이지 않는 paclitaxel과는 달리 1-pyrenbutyric acid와 유사한 패턴의 스펙트럼을 확인함으로써 그들의 형광특성을 확인하였다. 또한, 순수한 paclitaxel과 1-pyrenbutyric acid, 그리고 최종생성물인 fluorescent paclitaxel에 대하여 농도를 달리하면서 그들의 형광특성을 조사하였고 그 결과 각각의 농도에서 fluorescent paclitaxel의 형광스펙트럼들을 Fig. 27.에 나타내었다. 그리고, 최대 fluorescent intensity를 보이는 λ 값 $376nm$ 와 두 번째로 큰 intensity를 보이는 λ 값 $396nm$ 에서 각각 3개의 sample에 대하여 농도에 따른 fluorescent intensity를 비교한 결과 측정된 모든 농도에서 paclitaxel은 형광특성을 거의 보이지 않았으며, fluorescent paclitaxel은 1-pyrenbutyric acid와 유사한 결과값을 보였다(Fig. 28.).

Paclitaxel과 1-pyrenbutyric acid 사이의 상호작용을 알아보기 위하여 $20\mu M$ 과 $40\mu M$ 농도에서 1-pyrenbutyric acid/paclitaxel의 물리적인 혼합물에 대하여(10/0, 8/2, 5/5, 2/8 그리고 0/10(w/w)) UV흡광도를 측정하였다. 그 결과 Fig. 29.와 Table 4.와 같이 각각의 농도에서 1-pyrenbutyric acid의 조성이 많아질수록 그들의 최대 흡광도와 λ_{max} 가 순수한 1-pyrenbutyric acid가 보이는 값쪽으로 shift되어짐을 확인함으로써 물리적인 혼합에서도 어느 정도의 상호작용이 존재하리라 사료되어진다.

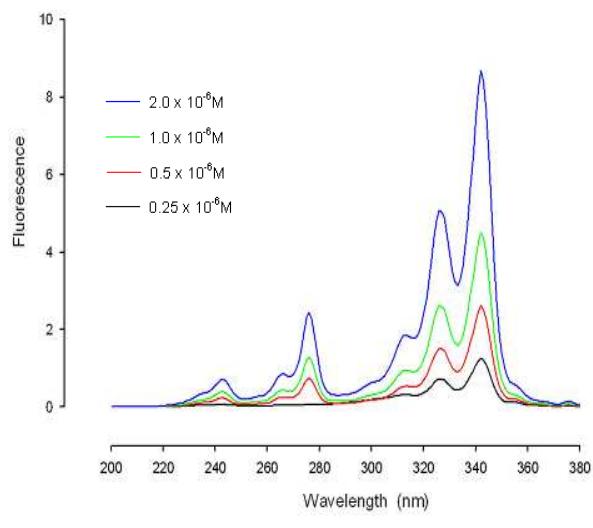


(a)

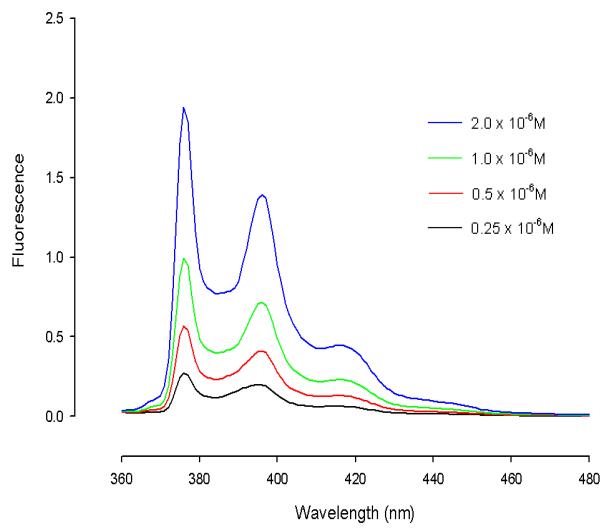


(b)

Fig. 26. Fluorescence spectra of paclitaxel, 1-pyrenbutyric acid and fluorescent paclitaxel derivative at $2\mu M$ (a;excitation, b ; emission).



(a)



(b)

Fig. 27. Fluorescence spectra of 2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel at different concentrations (a ; excitation , b ;emission).

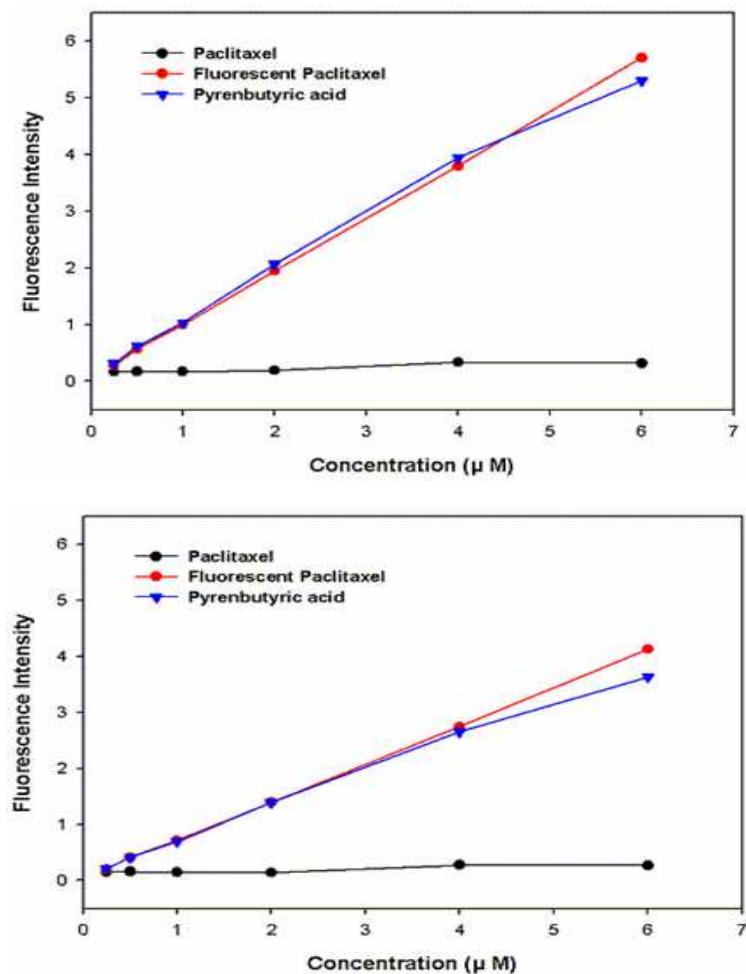


Fig. 28. The fluorescence emission intensity of paclitaxel, 1-pyrenbutyric acid and fluorescent paclitaxel derivative were measured at different concentrations (Top ; $\lambda = 376\text{nm}$, Bottom ; $\lambda = 396\text{nm}$).

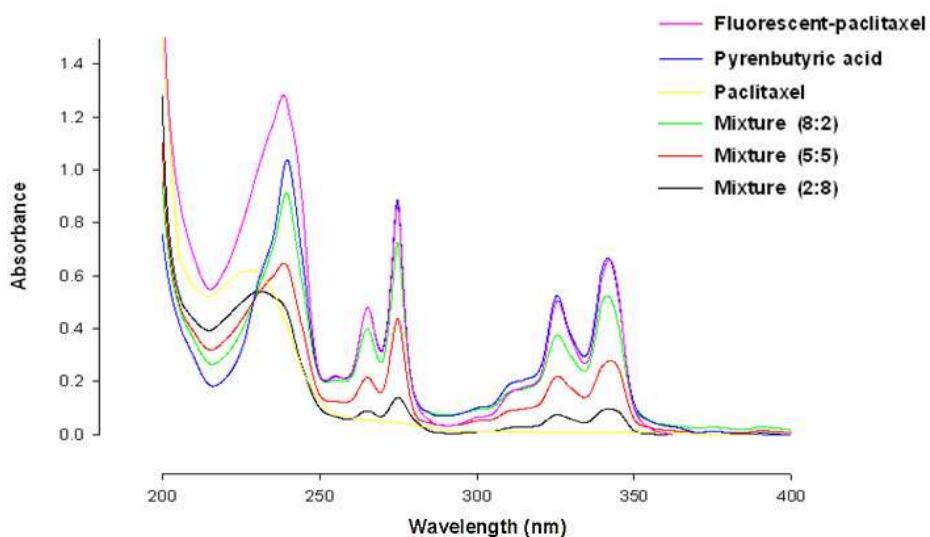


Fig. 29. UV spectra of paclitaxel, 1-pyrenbutyric acid, fluorescent paclitaxel derivative and 1-pyrenbutyric acid/paclitaxel mixture (2/8, 5/5 and 8/2) at $20 \mu\text{M}$.

Table 3. The λ_{max} values and absorbance of fluorescent paclitaxel derivative and 1-pyrenbutyric acid/paclitaxel mixture (10/0, 8/2, 5/5, 2/8 and 0/10) at $20 \mu\text{M}$ and $40 \mu\text{M}$.

Conc. Sample \diagdown	$2 \times 10^{-5} \text{ M}$		$4 \times 10^{-5} \text{ M}$	
	λ_{max}	ABS	λ_{max}	ABS
Pyren-paclitaxel	238.5	1.282	238.5	2.731
Pyren/pacli (10/ 0)	239.7	1.040	239.5	2.144
Pyren/pacli (8/ 2)	239.5	0.914	239.3	1.767
Pyren/pacli (5/ 5)	238.6	0.647	238.5	1.300
Pyren/pacli (2/ 8)	237.0 231.1	0.509 0.541	237.0 231.0	1.070 1.134
Pyren/pacli (0/ 10)	230.0	0.620	230.0	1.190

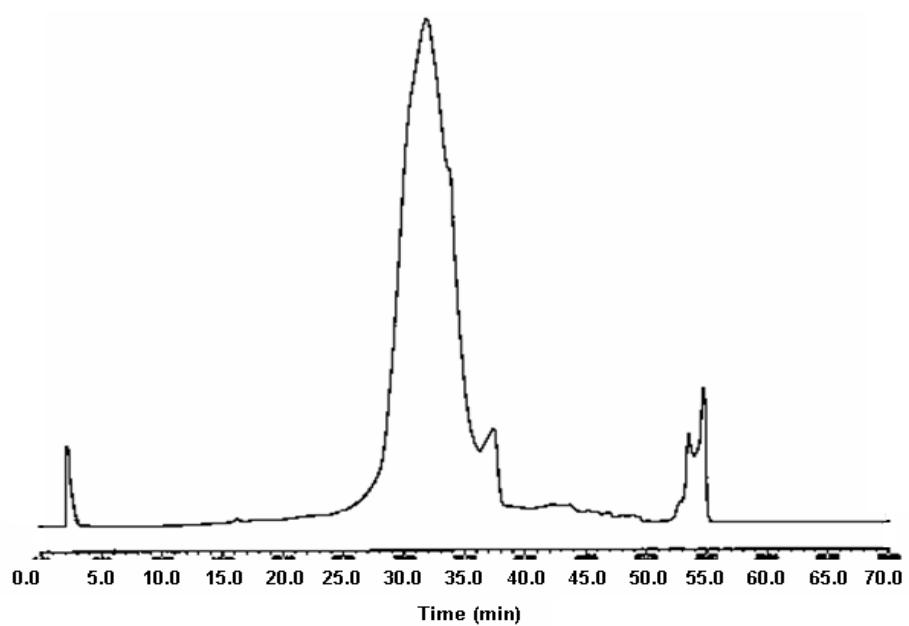
2. Fluorescent water-soluble paclitaxel(PP7)의 정제 및 특성

최종 2'-pyrenbutyric carbonyl-PP7에 포함된 불순물을 역시 용매 정제법만으로는 제거가 어려워 preparative-HPLC를 사용하였다. 앞서 언급한 2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel에 대한 정제와 동일한 이동상과 고정상을 선택하였으며 검출기 역시 파장을 228nm로 고정시킨 자외선 검출기를 사용하였다. 단, 시간에 따른 용매조성의 구배조건은 Table 4.와 같이 하였다 Fig. 30.은 2'-pyrenbutyric carbonyl-PP7 생성물에 대한 prep-HPLC크로마토그램으로 각각 retention time 28~36min(A)과 53~55min(B)에서 주피이크를 보였다. 각각의 크로마토그램의 주피이크에 대해 분취하였으며 분취를 통해 얻은 시료는 분석용 HPLC와 NMR 스펙트럼을 이용하여 최종화합물을 확인하였다. 그 결과 가장 큰 피이크(A) 가 분리하고자 하는 순수한 생성물로서 138mg으로 66%의 수득률을 얻었다. Fig. 31.은 분취한 피이크(A)의 NMR스펙트럼이다. 앞의 분취전의 NMR 스펙트럼 (Fig. 18.)과는 달리 수소의 수와 종류가 잘 일치함을 확인할 수 있었다. 또한, Fig. 32.과 Fig. 33.는 분석용 HPLC로 앞서 언급한 2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel에 대한 분석조건과 동일한 조건으로 하였다. Fig. 32.은 반응 물인 수용성파클리탁셀(PP7)의 분석용 HPLC로 retention time은 29.5min 이었다. 그리고 Fig. 33.는 최종생성물의 분취전후의 분석용 HPLC로 분취전과는 달리 하나의 피이크를 확인하였으며 이는 retention time 39min에서 피이크의 최대점을 보였다. 따라서, prep-HPLC를 통하여 99%의 순도를 갖는 순수한 최종생성물을 얻을 수 있음을 확인하였다.

Table 4. Gradient condition of Prep-HPLC

Time (min)	Flow rate (ml/min)	% Acetonitrile ^a	% H ₂ O ^b
Initial	20	20	80
5.00	20	20	80
10.00	20	40	60
30.00	20	60	40
50.00	20	90	10
55.00	20	100	0
65.00	20	100	0
70.00	20	20	80

a: 95% Acetonitrile, b: 95% H₂O



**Fig. 30. Preparative HPLC chromatography of
crude 2'-pyrenbutyric carbonyl-PP7.**

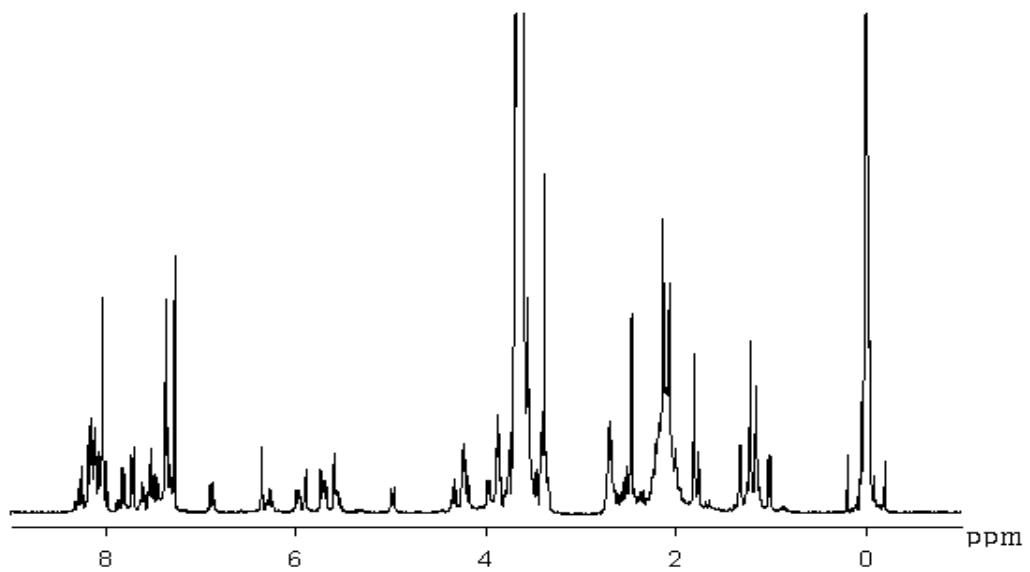


Fig. 31. ¹H-NMR spectrum of 2'-pyrenbutyric carbonyl-PP7 (CDCl₃)
(after prep-HPLC).

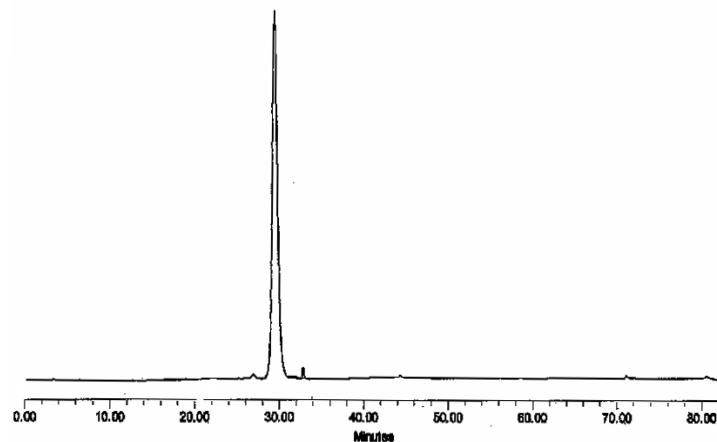


Fig. 32. Analytical HPLC of PP7.

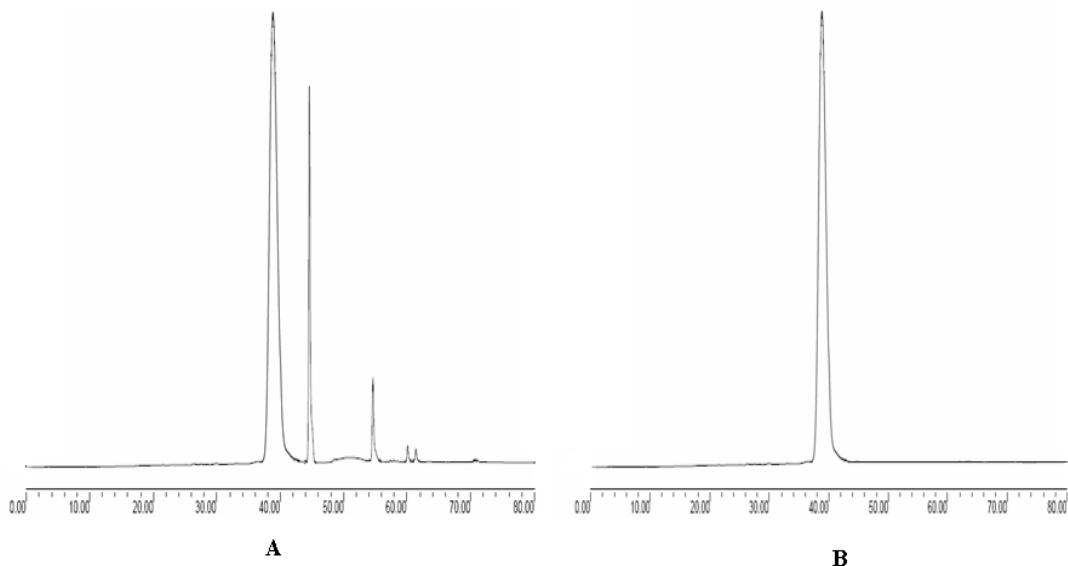


Fig. 33. Analytical HPLC of 2'-pyrenbutyric carbonyl- PP7
(A; before prep-HPLC, B; after prep-HPLC).

순수한 water-soluble paclitaxel (PP7)과 1-pyrenbutyric acid 그리고 합성되어진 fluorescent water-soluble paclitaxel (PP7)의 $20\ \mu M$ 농도에서의 UV 스펙트럼들을 Fig. 34.에 나타내었다. 순수한 PP7은 λ_{abs} 228nm 에서, 1-pyrenbutyric acid는 λ_{abs} 239.8nm 최대흡광도를 보였다. 그리고 합성되어진 fluorescent PP7(2'-pyrenbutyric carbonyl-PP7)의 경우 측정된 농도범위에서 1-pyrenbutyric acid의 UV스펙트럼과 유사한 패턴을 보였으며, 1-pyrenbutyric acid보다 조금 더 큰 λ_{abs} 값을 갖는 흡광도를 보였다. 또한, 순수한 PP7과 1-pyrenbutyric acid 그리고 합성되어진 fluorescent PP7의 농도를 달리하면서 UV 흡광도를 측정하였다. Fig. 35.에 fluorescent PP7의 농도에 따른 흡광스펙트럼을 나타내었으며, Fig. 36.에 최대흡광도를 보이는 파장에서 각각 3개의 sample에 대한 농도에 따른 UV흡광도를 비교하였다. 역시 농도가 증가함에 따라 3개의 sample 모두에 대하여 증가되는 흡광도를 보였고, 측정된 각각의 모든 농도에서 fluorescent PP7이 1-pyrenbutyric acid보다 조금 더 큰 흡광도를 보임을 확인하였다.

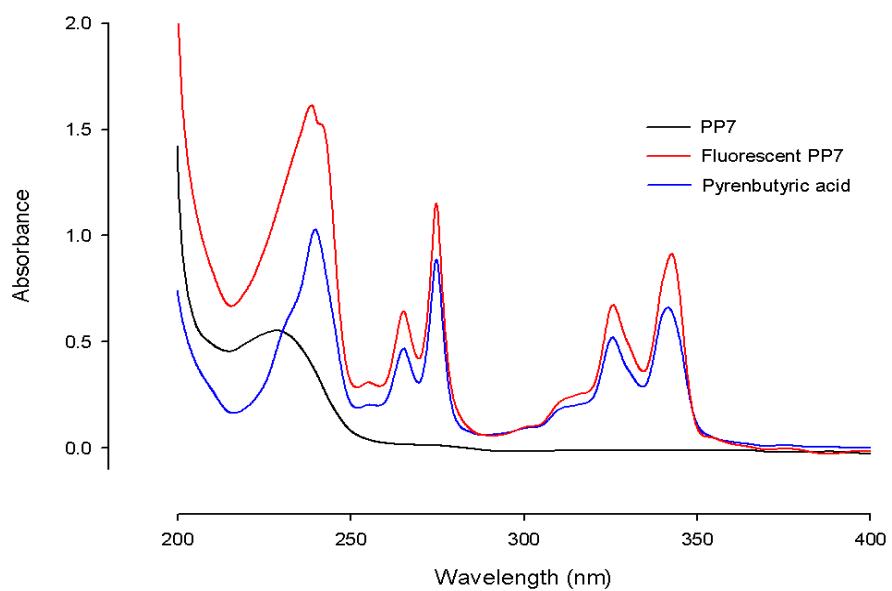


Fig. 34. UV spectra of water-soluble paclitaxel(PP7), 1-pyrenbutyric acid and fluorescent water-soluble paclitaxel(PP7) derivative at $20 \mu\text{M}$.

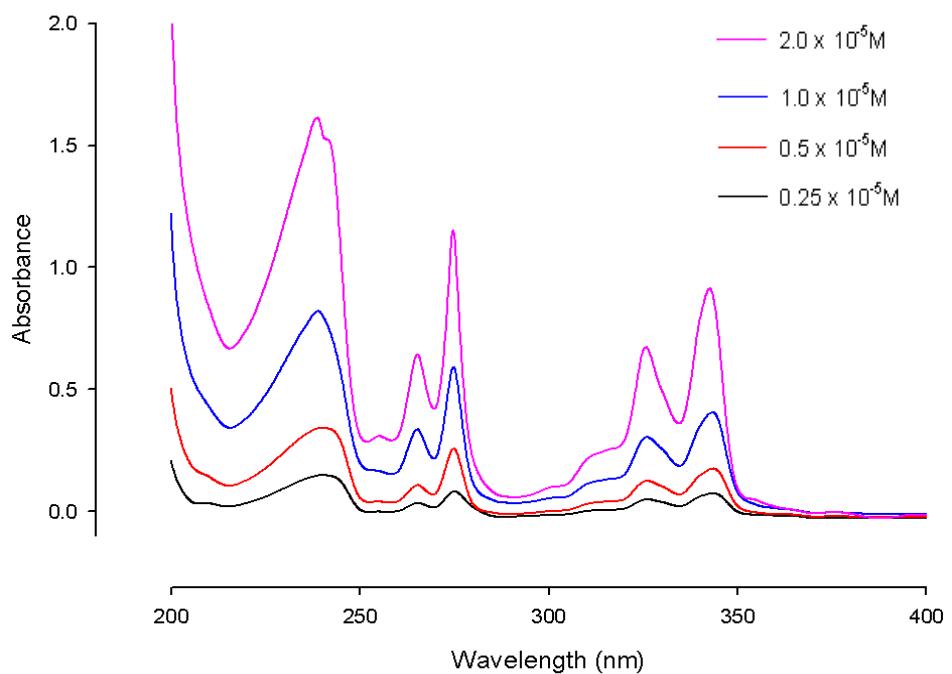


Fig. 35. UV spectra of 2–pyrenbutyric carbonyl–PP7 at different concentrations.

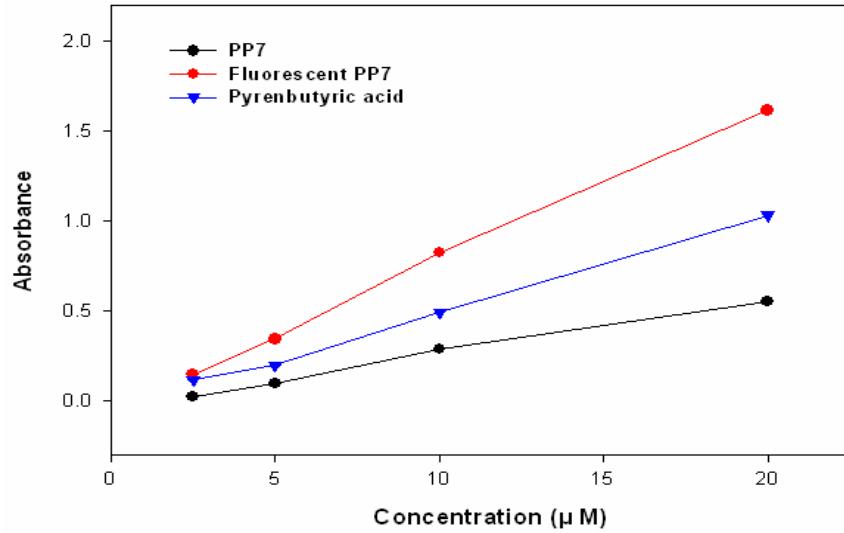


Fig. 36. The absorbance of water-soluble paclitaxel(PP7), 1-pyrenbutyric acid and fluorescent water-soluble paclitaxel(PP7) derivative was measured as a function of concentration at λ_{max} .

다음으로 최종생성물의 형광특성을 조사하였다. 순수한 paclitaxel과 1-pyrenbutyric acid 그리고 최종생성물인 fluorescent PP7의 $2\mu M$ 농도에서의 형광스펙트럼들을 Fig. 37.에 비교하였다. Fluorescent PP7의 경우, λ 값 $376nm$ 에서 최대 emission피이크를 보였고 형광특성을 거의 보이지 않는 PP7과는 달리 1-pyrenbutyric acid와 유사한 패턴의 스펙트럼을 확인함으로써 그들의 형광특성을 확인하였다. 또한, 순수한 PP7과 1-pyrenbutyric acid, 그리고 최종생성물인 fluorescent PP7에 대하여 농도를 달리하면서 그들의 형광특성을 조사하였고 그 결과 각각의 농도에서 fluorescent PP7의 형광스펙트럼들을 Fig. 38.에 나타내었다. 그리고, 최대 fluorescent intensity를 보이는 λ 값 $376nm$ 와 두번째로 큰 intensity를 보이는 λ 값 $396nm$ 에서 각각 3개의 sample에 대하여 농도에 따른 fluorescent intensity를 비교한 결과 측정된 모든 농도에서 PP7은 형광특성을 거의 보이지 않았으며, fluorescent PP7은 1-pyrenbutyric acid와 유사한 결과값을 보였다(Fig. 39.).

PP7과 1-pyrenbutyric acid 사이의 상호작용을 알아보기 위하여 $10\mu M$ 과 $20\mu M$ 농도에서 1-pyrenbutyric acid/PP7의 물리적인 혼합물에 대하여(10/0, 8/2, 5/5, 2/8 그리고 0/10(w/w)) UV흡광도를 측정하였다. 그 결과 Fig. 40.과 Table 5.와 같이 각각의 농도에서 1-pyrenbutyric acid의 조성이 많아질수록 그들의 최대 흡광도와 λ_{max} 가 순수한 1-pyrenbutyric acid가 보이는 값쪽으로 shift되어짐을 확인함으로써 물리적인 혼합에서도 어느 정도의 상호작용이 존재하리라 사료되어진다.

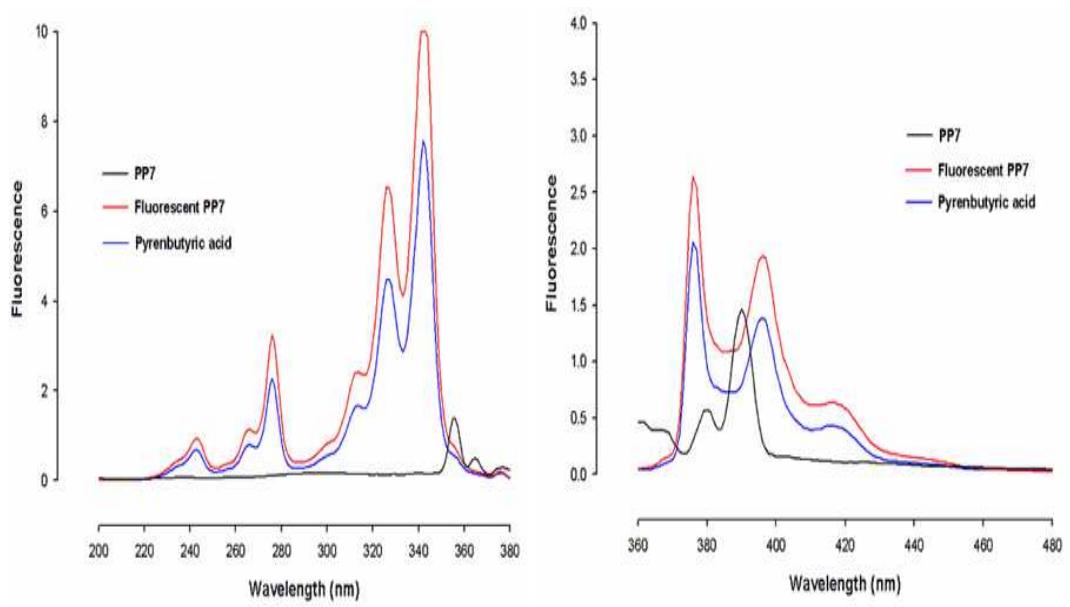


Fig. 37. Fluorescence spectra of paclitaxel, 1–pyrenbutyric acid and fluorescent paclitaxel derivative at $2 \mu\text{M}$ (Left ; excitation, Right ; emission).

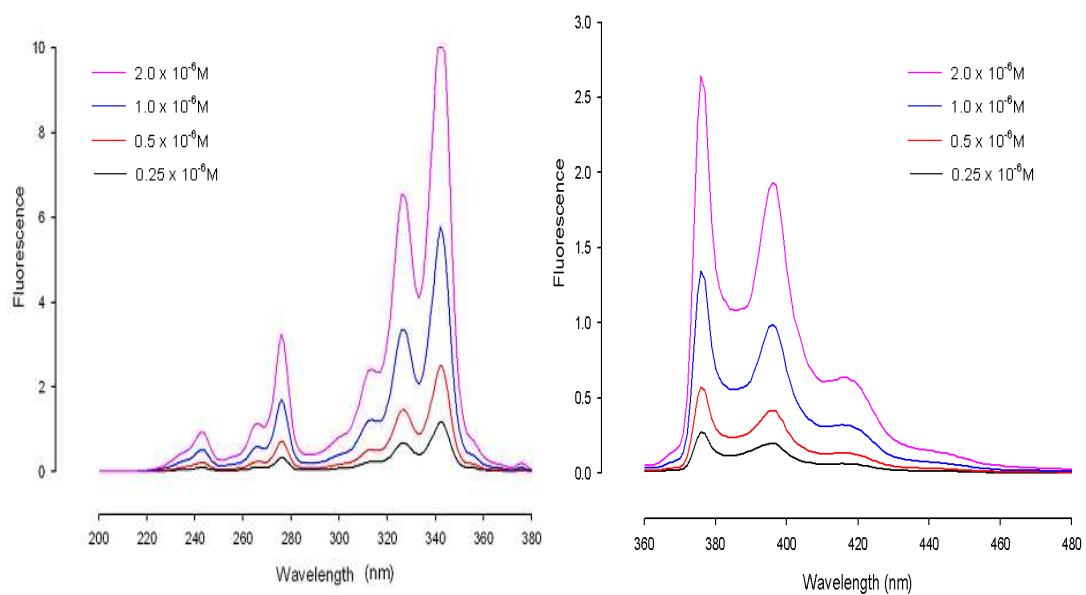


Fig. 38. Fluorescence spectra of 2'-pyrenbutyric carbonyl-PP7 at different concentrations (Left ; excitation, Right ; emission).

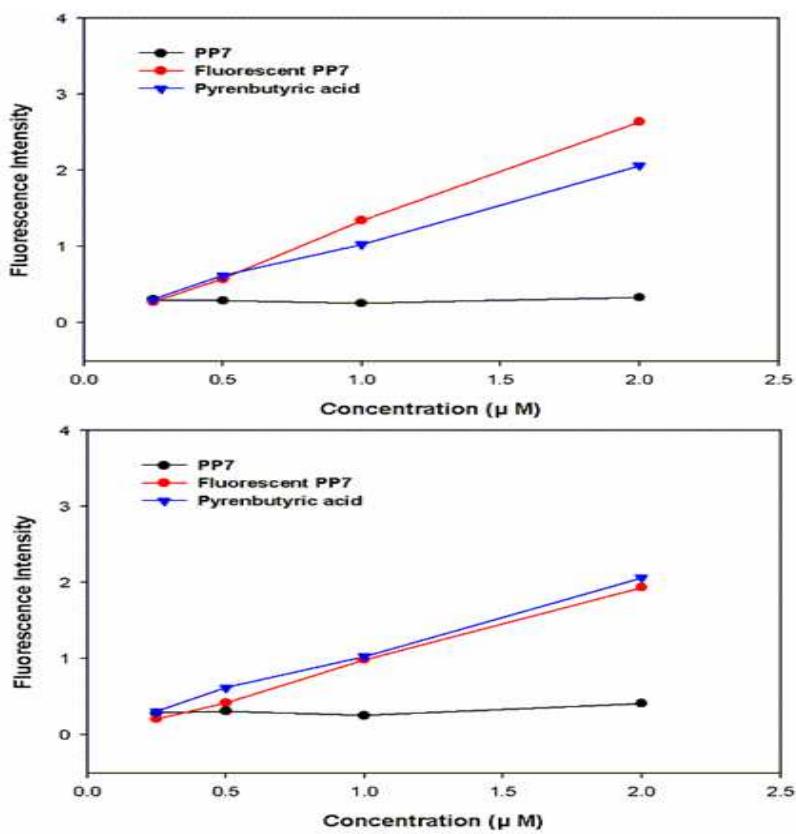


Fig. 39. The fluorescence emission intensity of water-soluble paclitaxel(PP7), 1-pyrenbutyric acid and fluorescent water-soluble paclitaxel(PP7) derivative was measured at different concentrations (Top ; $\lambda = 376\text{nm}$, Bottom ; $\lambda = 396\text{nm}$).

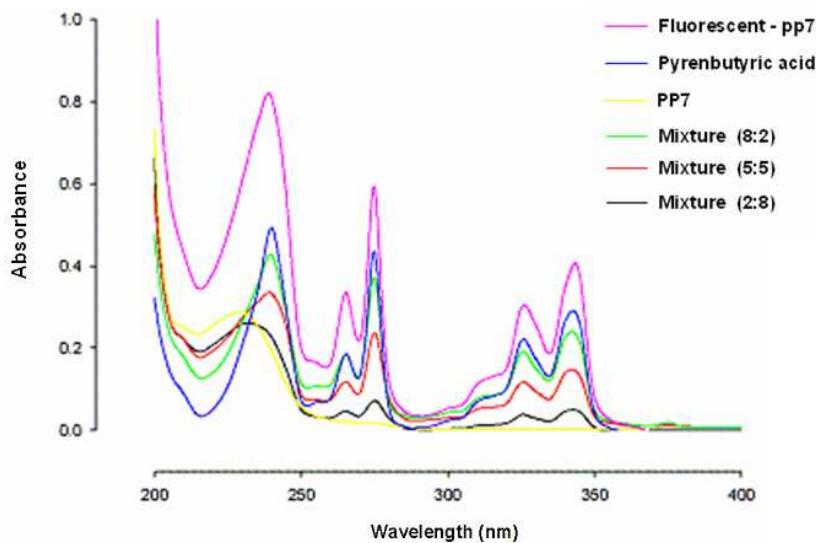


Fig. 40. UV spectra of water-soluble paclitaxel(PP7), 1-pyrenbutyric acid, fluorescent water soluble paclitaxel(PP7) derivative and 1-pyrenbutyric acid/PP7 mixture (2/8, 5/5 and 8/2) at $10 \mu\text{M}$.

Table 5. The λ_{\max} values and absorbance of fluorescent PP7 derivative and 1-pyrenbutyric acid/PP7 mixture (10/0, 8/2, 5/5, 2/8 and 0/10) at $10 \mu\text{M}$ and $20 \mu\text{M}$.

Conc. Sample \ Conc.	1 $\times 10^{-5}$ M		2 $\times 10^{-5}$ M	
	λ_{\max}	ABS	λ_{\max}	ABS
Pyren-PP7	238.8	0.820	238.8	1.614
Pyren/PP7 (10/ 0)	240.0	0.493	239.8	1.031
Pyren/PP7 (8/ 2)	239.5	0.428	239.5	0.843
Pyren/PP7 (5/ 5)	238.9	0.336	238.7	0.613
Pyren/PP7 (2/ 8)	237.0 231.8	0.248 0.261	237.1 231.6	0.539 0.562
Pyren/PP7 (0/ 10)	228.8	0.287	228.5	0.553

제 4 장 결 론

형광특성을 갖는 파클리탁셀 및 수용성 파클리탁셀을 합성하여 그들의 기본적인 특성을 조사한 결론은 다음과 같다.

1. 항암제인 paclitaxel과 수용성 paclitaxel(PP7)에 형광물질인 1-pyrenbutyric acid를 probe로 도입하여 형광특성을 갖는 화합물들을 성공적으로 합성하였다.

2. 최종 2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel과 2'-pyrenbutyric carbonyl-PP7에 포함된 불순물들은 용매 정제법만으로는 제거가 어려워 preparative-HPLC를 사용하였다. Prep-HPLC의 이동상 용매는 HPLC grade의 acetonitrile과 3차 중류수를 사용하여 gradient 조건으로 이동상을 흘려주었고, 고정상은 Xterra RP 85 μm 4.6 \times 250mm C₈ column을 사용하였으며, flow는 20ml/min로 하였다. 그 결과 순수한 생성물을 얻을 수 있었으며 이는 다시 analytical-HPLC를 통하여 99%의 순도를 갖는 최종 생성물임을 확인 할 수 있었다.

3. 합성되어진 fluorescent paclitaxel(2'-pyrenbutyric carbonyl-paclitaxel)의 형광특성을 조사한 결과, λ_{ex} 376nm에서 최대 fluorescent intensity를 갖는 emission 피크를 보였고, 형광특성을 거의 보이지 않는 paclitaxel과는 달리 측정된 모든 농도에서 1-pyrenbutyric acid와 유사한 패턴의 스펙트럼을 확인함으로써 그들의 형광특성을 확인하였다.

4. 합성되어진 fluorescent PP7(2'-pyrenbutyric carbonyl-PP7)의 형광특성을 조사한 결과, λ_{ex} 376nm에서 최대 fluorescent intensity를 갖는 emission

피이크를 보였고, 형광특성을 거의 보이지 않는 paclitaxel과는 달리 측정된 모든 농도에서 1-pyrenbutyric acid와 유사한 패턴의 스펙트럼을 확인함으로써 그들의 형광특성을 확인하였다.

5. 이러한 연구는 항암제인 paclitaxel과 수용성 paclitaxel(PP7)의 in-vivo transportation과 바인딩 메커니즘을 더 잘 이해하기 위한 기초 및 응용연구에 큰 도움이 될 것으로 사료되어진다.

참고문헌

- 1) Wani, M., Taylore, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., McPhail, A.T., The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus Brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 93, 2325–2337, 1971.
- 2) Kingston, D.G.I., The chemistry of Taxol. *Pharmacol. Ther.* 52, 1–34, 1991.
- 3) Gregory, R., DeLisa, A.F., Paclitaxel: a new antineoplastic agent for refractory ovarian cancer. *Clin. Pharm.*, 1993.
- 4) Sharma, A., Sharma, U.S., Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Int. J. Pharm.*, 154 123–140, 1997.
- 5) Sharma, A., Straubinger, R.M., Ojima, I., Bernacki, R. J., Antitumor efficacy of taxane liposomes on a human ovarian tumor xenograft in nude athymic mice. *J. Pharm. Sci.*, 84, 1400–1404, 1995.
- 6) Kingston, D.G.I., Taxol: the chemistry and structure activity relationships of a novel anticancer agent. *TIBTECH* 12, 222–227, 1994.
- 7) Rowinsky, E., Cazenava, L.A., Donehower, R.C., Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. *J. Natl. cancer Inst.*, 82, 1247–1259, 1990.
- 8) Horwitz, S., Mechanism of action of taxol. *Transs pharmacol. Sci.*, 13, 134–136, 1992.
- 9) Kuhn, J., Pharmacology and pharmacokinetics of paclitaxel. *Ann. Pharmacother.*, 28, s15–s17, 1994.
- 10) Schiff, P., Horwitz, S.B., Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, UAS 77, 1561–1565, 1980.

- 11) Schiff, P., Fant, J., Horwitz, S.B. Promotion of microtuble assembly in vitro by taxol . *Nature* 277, 665–667, 1979.
- 12) Parness , J., Horwitz. S.B., Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. *J. Cell Biol.*, 91, 479–487, 1981.
- 13) Rao, S., Krauss, N.E., Heerding, J.M., 3'-(p-Azido benzamido) taxol photolabels the terminal 31-amino acids of beta-tubulin. *J. Biol. Chem.*, 269, 3132–3134, 1994.
- 14) Rowinsky, E., Donehower, R.C., Paclitaxel (Taxol). New Engl. *J. Med.*, 332, 1004–1014, 1995.
- 15) 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.
- 16) Y. Ueda, H. Wong, J. D. Matiskella, V. Farina, C. Fairchild, W. C. Rose, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **4**, 1861, 1994.
- 17) Jo. B-W 2000 Korean Patent 2000-0019873;
- 18) Jo. B-W, Kolon Inc. US Patent 6,703,417 B2, 2004
- 19) M. Hess, J.-S. Sohn, S.-K. Choi, B.-W. Jo, *Macromol. Symp.*, 2003, 201, 163
- 20) M.Hess, M. Zahres, B.-W. Jo, *Macromol. Symp.*, 2004, 214,351–359
- 21) J.-S. Sohn, S.-K. Choi, B.-W. Jo, M. Hess, *Mater. Res. Innovat.*, 2005, 9(1), 85
- 22) J.-S. Sohn, B.-W. Jo and M. Hess, K. Schwark, S. Dehne and M. Zahres *Macromol. Symp.*, 2005, 225, 31
- 23) J.-S. Sohn, S. K. Choi, B.-W. Jo, K. Schwark and M. Hess, *e-Polymers.*, 2005, 007, 1
- 24) M. Hess_, B.-W. Jo, B. Wermeckes, S. Dehne, J.-S. Sohn, S. Wunderlich, M. Zahres *Macromol. Symp.*, 2006, 321, 28
- 25) B.-W. Jo, M. Hess, M. Zahres, *Mater. Res. Innovat.*, 2003, 7, 178
- 26) J.-S. Sohn, S.-K. Choi, B.-W. Jo, M. Hess, *Mater. Res. Innovat.*,

- 2005, 9(1), 85–94
- 27) Hess, M.; Zähres, M.; Jo, B.-W., J.-S. Sohn, *Mater. Res. Innovat.*, 2006, 10(2), 364–375
- 28) Bailey, Jr., F. E.; Koleske, J. V., Alkylene oxides and their polymers; Marcel Dekker: New York, 1991.
- 29) Poly(ethylene Glycol) Chemistry: *Biotechnical and Biomedical Appli.*, Harris, J. M., Ed.; Plenum Press: New York, 1992.
- 30) Pollak, A.; Witesides, G. M., *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 289–291. 1976.
- 31) King, T. P.; Kochoumian, L.; Lichtenstein, L. M. *Arch. Biochem. Biophys.*, 178, 442–450, 1977.
- 32) Tsukada, Y.; Okkawa, K.; Hibi, N. *Cancer Res.*, 47, 4293, 1987.
- 33) R. B. Greenwald *J. Control. Release.*, 74, 159, 2001.
- 34) B. J. Ha, O. S. Lee, and Y. S. Lee *J. of Korean Ind & Eng. Chemistry*, 7, 59, 1996.
- 35) J. Bailey and J. v. Koleske End., poly(ethylene oxide), Academic press, New York, 1976.
- 36) G.M. Powell, Polyethylene glycol, In Handbook of water soluble Dums and Resins (R.L. Davidson, Ed), McGraw-Hill, New York, 1831, 1980.
- 37) S. Dreborg and E.B. Akwerblom Immunotherapy with mono-methoxy polyethylene glycol modified allergen, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 6, 315–356, 1990.
- 38) *Biophysical chemistry, part II*: Techniques for the study of biological structure and function, cantor and schimmel
- 39) Rao, S., Krauss, N. E., Heerding, J. M., Swindell, C. **S.**, Ringel, I.,
- 40) Orr, G. A., & Horwitz, S. B. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 3132–3134.
- 41) Guy, R.K., Scott, Z.A., Sloboda, R.D., and Nicolaou, K.C. (1996): Fluorescent taxoids. *Chem. Biol.*, 3:1021–1031.
- 42) Nicolaou, K.C., and Guy, R.K. (1995): The conquest of taxol. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 34:2079–2090.
- 43) Kingston, D.G. (1994): Taxol: The chemistry and structure–activity

- relationships of a novel anticancer agent. *Trends Biotech.*, 12:117125.
- 44) Wulf, F.A., Debonen, F.A., Bautz, Faulstich, H., and Wieland, Th. (1979): Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, U.S.A. 76:4498–4502
- 45) Parness, J., & Horwitz, S. B. (1981) *J. Cell Biol.* 91, 479–487.
- 46) Ringel, I., & Horwitz., S. B. (1991) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259, 855–860.
- 47) Dubois, J., Gue ‘nard, D., Gue ‘ritte-Voegelein, F., Guedira, N., Potier,P., Gillet, B., & Beloeil., J.-C. (1993) *Tetrahedron* 49, 6533–6544.
- 48) Dubois, J., Le Goff, M.-T., Gueritte-Voegelein, F., Guenard, D., Tollon, Y., & Wright, M. (1995) *Bioorg. Med. Chem.* 3, 1357–1368.
- 49) Souto, A. A., Acuna, A. U., Andrea, J. M., Barasoain, I., Abal, M., & Amat-Guerri, F. (1995) *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 34, 2710–2712.
- 50) Sengupta, S., Boge, T. C., Georg, G. I., & Himes, R. H. (1995) *Biochemistry* 34, 11889–11894.

감사의 글

본 연구의 지도는 물론 저의 대학원 전 과정 동안 끊임없는 애정으로 매사에
격려와 큰 가르침을 주신 조병욱 교수님께 먼저 깊은 감사를 드립니다. 그리고
저의 부족한 논문을 심사해주시고 조언해 주신 조선대학교 차월석 교수님, 김정규
교수님께 감사 드립니다. 또한, 대학원 생활 동안 많은 시간을 함께 하면서
실험에 대해 많은 도움을 주신 대학원 선배님들에게 아울러 감사 드립니다.
끝으로 제가 지금에 이르기까지 항상 지켜보아 주시고 돌보아주신 사랑하는
아버지, 어머니께 논문을 드립니다.