Journal of Radiation Industry 8(2) : 77~81(2014)

방사성 히알루론산 합성

마 소 영[1] · 이 동 은[1] · 박 상 현[1,2,*]

[1]한국원자력연구원 첨단방사선연구소 생명공학연구부
[2]한국과학기술연합대학원대학교 방사선동위원소 응용 및 생명공학

Synthesis of ^{125}I-Labeled Hyaluronic Acid

So-Young Ma[1], Dong-Eun Lee[1] and Sang Hyun Park[1,2,*]

[1]*Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea*
[2]*Department of Radiation Biotechnology and Applied Radioisotope Science, Korea University of Science and Technology, Daejeon 305-350, Korea*

Abstract - Hyaluronic acid is a disaccharide polymer that consists of glucuronic acid and *N*-acetylglucosamine, and is a glycosaminoglycan. It is widely distributed in animal connective tissue, coexisting with chondroitin sulfate. It forms viscous secretions or gel by bonding to protein in the body, and thus maintains and lubricates tissue structures. In addition, its antibiotic properties are applied to cosmetics and pharmaceuticals. Therefore, it has recently been an object of great interest at cosmetic and pharmaceutical companies. ^{125}I has a longer half-life (59.4 days) than many other radioisotopes, and is therefore useful to long-term studies. In this study, a facile and efficient procedure for the synthesis of ^{125}I-labeled hyaluronic acid has been designed for *in vivo* imaging and pharmacokinetic studies of hyaluronic acid, which are required for the development of new drugs.

Key words : Hyaluronic acid, Radiolabeling, ^{125}I-Labeled hyaluronic acid

서 론

히알루론산 (hyaluronic acid, HA)은 글루쿠론산 (glucuronic acid)과 *N*-아세틸 글루코사민 (*N*-acetylglucosamine)으로 된 다당류인 글리코사미노글리칸 (glycosaminoglycans, GAGs)의 하나이다.

히알루론산은 히알루로난 (hyaluronan)으로 불리기도 하는데, *N*-아세틸글루코사민을 전구체로 하여 합성되며 수분 보유력이 뛰어나 각질층 위에 수분 막을 형성시켜 수 시간 동안 수분을 보존할 수 있는 것으로 잘 알려져 있다 (Nakamura *et al*. 1993; Bert *et al*. 1998).

생체를 구성하는 다당류 성분이기 때문에 생분해성, 생체적합성이 뛰어날 뿐 아니라 면역 거부 반응이 거의 없어 생체 재료로서 우수한 특성을 가지고 있다 (최 등 2009).

일반적으로 생체조직과 장기들은 환자 본인의 세포나 고분자 지지체의 사용으로 대체되거나 재생될 수 있는데 위와 같은 이유들로 히알루론산은 생체조직재생을 위한 세포친화적인 고분자재료로서 각광받고 있다 (Alberts *et*

* Corresponding author: Sang Hyun Park, Tel. +82-63-570-3370, Fax. +82-63-570-3371, E-mail. parksh@kaeri.re.kr

al. 1994; Kim *et al*. 1998; Lee *et al*. 2001; 배 등 2006).

히알루론산은 필러(filler)뿐만 아니라 체내에서 연골과 관절을 부드럽게 하는 완충작용의 기능도 있어 무릎 연골주사에 이용될 수도 있는데 인체 관절액 성분과 유사한 성분이 히알루론산이므로 마모된 연골 부위를 부드럽게 하는 윤활작용과 연골에 영향을 공급하여 관절을 보호하고 통증을 줄일 수 있게 해준다(Balazs *et al*. 1993; Schimizu *et al*. 1998; 노 등 2004).

최근, 생체 내에서 특정 약물의 거동 및 효능을 확인하기 위한 방사성동위원소의 표지기술이 필요 시 되고 있다. 생체 내 분자로서 조직공학 혹은 약물전달 등의 분야에서 널리 사용되고 있는 히알루론산에 다양한 방사성동위원소를 표지하여 체내거동을 평가하는 기술이 주목받고 있다(Cozikova *et al*. 2010).

많은 방사성동위원소 중 ^{125}I는 항원, 항체 등 여러 리간드의 표지에 사용하며, 분자생물학 연구를 포함한 핵의학 분야에서 널리 이용하고 있는 핵종이다. 특히 ^{125}I는 다른 방사성동위원소들 보다 비교적 긴 반감기($t_{1/2}$= 59.4 days)를 가지기 때문에 동일 동물에서 장기간에 걸친 유전자 발현을 연구하기에 유용하다.

본 연구에서는 히알루론산에 표지를 위한 보결 원자단을 도입하는 합성법과 방사성동위원소 표지법을 소개하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

Hyaluronic acid (HA, weight-average molecular mass approximately 50 Kda±5 Kda)는 Biotopia Co., Ltd.에서 구입하였고, tyramine hydrochloride, sodium acetate, sodium cyanoborohydride, absolute ethanol, chloramine-T, sodium matebisulphite는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. NaI[^{125}I]는 New Korea industrial. (Seoul Korea)로부터 구입하였으며, 고 순도 3차 증류수(deionized water, 18.2MΩ Millipore, USA)를 사용하였다.

Radio-TLC용 plate (Silica gel 60 F254-25 Aluminium sheets 20 cm × 20 cm)는 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

2. HA-Tyramine conjugate의 합성

5% sodium acetate를 조제하여 tyramine hydrochloride 10 mg ml^{-1}이 되도록 준비하였다. Tyramine hydrochloride solution 2 ml에 hyaluronic acid 20 mg를 가하여 24시간 동안 상온에서 세차게 교반 후 80 mg의 sodium cyanoborohydride를 반응용기에 가하여 다시 상온에서 24시간 동안 반응하였다. 그 뒤 ethanol로 정제하여 분리하였다(Lindqvist *et al*. 2002).

3. HA-Tyramine conjugate의 정제

Absolute ethanol 10 ml를 합성이 완료된 반응용기에 주입하고 30분 뒤에 이 혼합물을 시험관으로 옮긴 후 3,500 rpm의 속도로 10분 동안 원심 분리하였다. 상등액 ethanol 을 제거한 후 absolute ethanol 3 ml에 볼텍스믹서로 현탁시켜 다시 3,500 rpm의 속도로 10분 동안 원심분리하였다. 상등액 ethanol을 제거하고 phosphate-buffer saline (PBS, pH 7.4) 2 ml를 사용하여 다시 혼합물을 녹였다. 이 과정을 4번 반복하여 정제하였다(Lindqvist *et al*. 2002). 정제 후 ^{1}H NMR 분석을 하였다.

4. HA-Tyramine의 ^{125}I 표지

원심분리 튜브(2 ml)에 HA-tyramine conjugate solution (in PBS, pH 7.4) 150 μl를 가하고 1.6 μl (0.2 mCi, 7.4 MBq)의 NaI[^{125}I]와 1.2 μl chloramine-T (phosphate buffer saline) 용액을 순차적으로 가하여 5분 동안 상온에서 반응하였다. 5분 뒤 반응을 멈추고 1.2 μl의 sodium metabisulphite (phosphate buffer saline) 용액을 가하여 quenching 하였다.

표지 후 혼합물의 방사능(radioactivity)을 측정하였고, 방사능 측정 후 radio-TLC (Radio-thin layer chromatography) imaging scanner (Bioscan, Washington, D.C. USA)를 이용하여 혼합물의 방사화학적 수율을 측정하였다. Radio-TLC plate에 0.5 μl의 ^{125}I-labeled HA-tyramine conjugate를 점적하고 이동상은 *n*-butanol : 2N NH_4OH : ethanol, 3 : 1 : 1 (v/v/v)를 사용하여 크로마토그래피를 수행하였다. 그 후 radio-TLC에서 검출되는 방사능을 1분간 계수하여 크로마토그램을 얻었다.

5. ^{125}I-Labeled HA-tyramine conjugate의 분리

Absolute ethanol 1 ml을 시험관에 가하여 4000 rpm으로 15분 동안 원심분리 하였다. 상등액을 제거하고 침전물을 1 ml로 다시 씻어내어 합성물질을 얻어냈다.

결과 및 논의

1. HA-Tyramine conjugate의 ^{1}H NMR 분석

히알루론산은 ^{125}I, ^{131}I 같은 방사성동위원소 표지(radiolabeling)을 위한 유용한 원자단을 포함하고 있지 않기

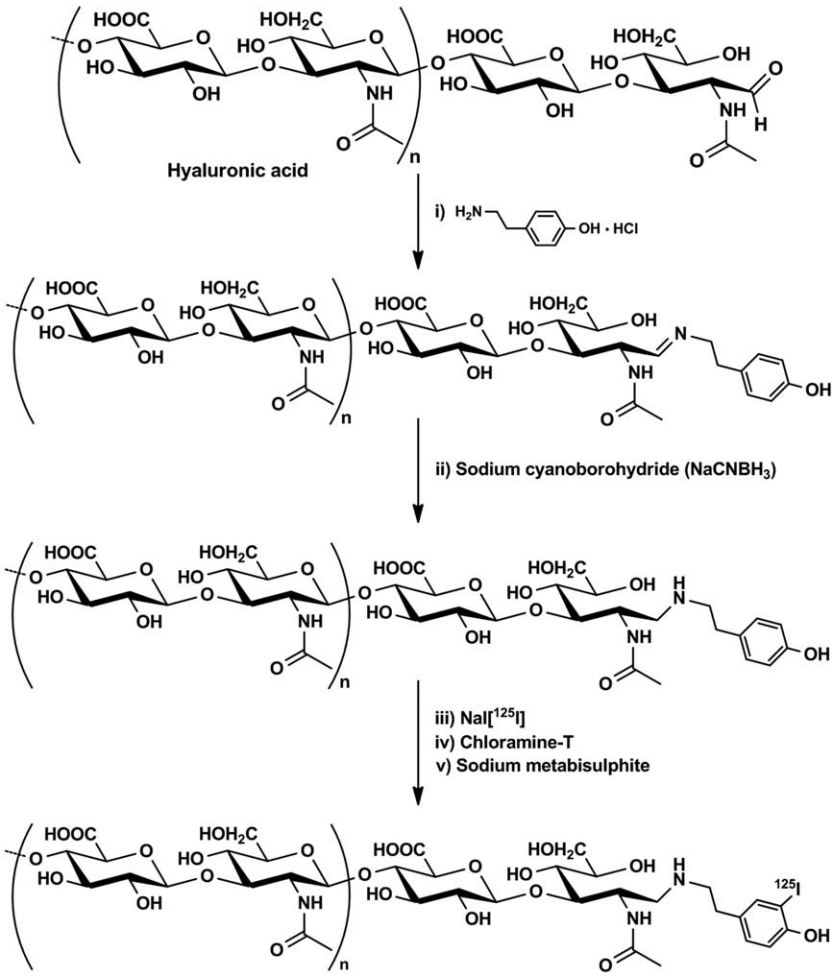

Fig. 1. Synthetic scheme for ^{125}I-labeled hyaluronic acid-tyramine conjugate.

때문에, tyramine이나 tyrosine 같은 보결(prosthetic)원자단을 도입 후 환원 아민화반응(reductive amination)하여 히알루론산의 환원말단에 연결하였다. 도입된 보결원자단의 방향족 고리(aromatic ring)는 하이드록실기(hydroxyl group, -OH)를 포함하기 때문에 친전자성 방향족 치환반응(electrophilic aromatic substitution)에 의한 요오드화반응(iodination)이 가능해진다(Fig. 1).

HA-tyramine conjugate의 ^{1}H NMR 스펙트럼을 얻기 위하여 NMR Disposable sample tube (Economy Standard, ES-500)에 HA-tyramine conjugate powder 10 mg를 deuterium oxide (99.9 atom % D, Sigma-Aldrich)을 가하여 시료를 제조하였다.

^{1}H NMR은 500 MHz FT-NMR JEOL ECA-500 Spectrometer를 이용하여 TMS (tetramethyl silane)을 기준(0 ppm)으로 하여 얻었다.

HA-tyramine conjugate는 분자량이 큰 고분자화합물이다. 히알루론산은 ^{1}H NMR 스펙트럼에서 특징적인 화학적 이동(chemical shift)을 확인하기는 힘들다. 하지만 tyramine의 특징적인 화학적 이동은 관찰할 수 있다. para-이치환 벤젠고리를 포함하고 있는 tyramine은 대칭면

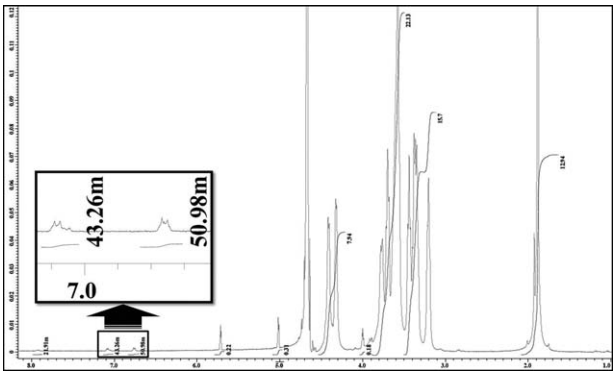

Fig. 2. ^{1}H NMR spectrum of HA-tyramine conjugate (500 MHz). The inset shows expansion of *para*-disubstituted benzene ring (tyramine) in the rage of the 6.5 ~ 7.2 ppm in D_2O.

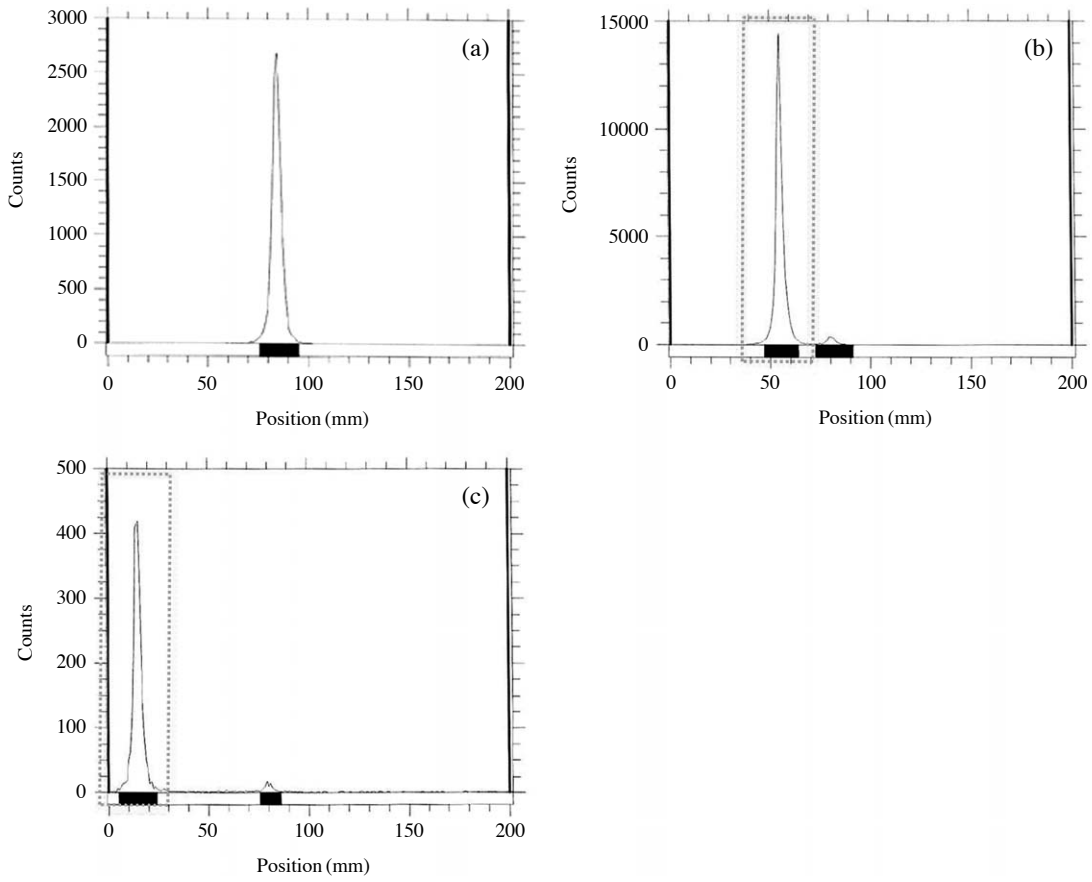

Fig. 3. Radio-thin layer chromatogram of (a) Free ^{125}I, (b) Tyramine-^{125}I and (c) ^{125}I-labeled HA-tyramine conjugate.

(plane of symmetry)을 기준으로 위치한 수소들은 서로 같은 특징을 지니고 있으므로 4개의 수소들이 각 2개씩 6～7.5 ppm 부근에서 doublet of doublets peak 양상으로 관찰된다(Fig. 2).

2. HA-Tyramine의 ^{125}I 표지 및 Radio-TLC 분석

HA-tyramine conjugate의 방사성동위원소 표지 효율을 측정하기 위하여 실리카겔이 코팅된 유리섬유 TLC plate에 free ^{125}I, ^{125}I-labeled tyramine 그리고 ^{125}I-labeled HA-tyramine conjugate 용액을 각각 1 μl씩 점적하여 이동상은 *n*-Butanol : 2N NH_4OH : ethanol, 3 : 1 : 1, (v/v/v)를 사용하여 크로마토그래피를 수행한 다음 radio-TLC를 이용하여 분석하였다.

HA-tyramine conjugate는 ^{125}I 용액과 약 5분 반응시켰을 때 radio-TLC 분석결과 ^{125}I는 R_f=1, tyramine-^{125}I은 R_f=0.54, ^{125}I-labeled HA-tyramine conjugate는 R_f=0에 있음을 각각 알 수 있었다. ^{125}I-labeled HA-tyramine conjugate의 방사화학적 순도는 96% 이상으로 나타났다. 방사성동위원소 표지효율 시험 결과를 통해 실험에 사용한 ^{125}I가 HA-tyramine conjugate에 잘 표지됨을 알 수 있었다(Fig. 3).

결 론

본 연구에서는 히알루론산과 tyramine을 이용하여 HA-tyramine conjugate를 합성하였고, ^{1}H NMR로 구조를 확인하였다. Modified chloramine-T method를 이용하여 방사성동위원소 ^{125}I로 표지된 물질을 합성하였고 96% 이상의 방사화학적 순도를 얻었다.

방사성 히알루론산은 생체 내 약물의 거동평가에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

또한 본 연구는 이당체(disaccharide)의 손쉽고 빠른 방사성 요오드 표지에 응용될 수 있으며 표지된 이당체들은 생체 내(*in vivo*) 영상과 약물동태(pharmacokinetics) 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

사 사

이 연구는 2014년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(방사선융합기술개발, 2012M2A2A6011335; 원자력선진기술연구센터, 2012M2B2B1055245).

참 고 문 헌

노성숙, 이재준, 황성미, 임소영, 정일영, 최영룡. 2004. 퇴행성 슬관절염에 대한 히알루론산 나트륨의 치료효과. 대한통증학회지. **17**(2):170-174.

배민수, 박홍현, 이동욱, 이근용. 2006. 생체조직공학용 수화젤. 고분자과학과 기술. **17**(3):321-329.

최진희, 김순희, 홍희경, 김수진, 이선경, 김온유, 박종학, 이종문, 강길선. 2009. 히알루론산을 함유한 PLGA 지지체와 섬유륜세포를 이용한 디스크 재생. *TERM*. **6**(1):83-88.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD. 1994. Molecular Biology of the Cell. 3re ed. New York. Garland Science. 971pp.

Balazs EA and Dehlinger JL. 1993. Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis. *J. Rheumatol Suppl*. **39**:3-9.

Bert J and Reed RK. 1998. Hyaluronan, hydration and flow conductivity of rat dermis. *Biorhelolgy* **35**(3):211-219.

Cozikova D, Laznickova A, Hermannova M, Svanovsky E, Palek L, Buffa R, Sedova P, Koppova R, Petric M, Smejkalova D, Laznicek M, Velebny V. 2010. Preparation and the kinetic stability of hyaluronan radiolabeled with ^{111}In, ^{125}I and ^{14}C. *J. Pharm. Biomed. Anal*. **52**(4):517-524.

Kim BS and Mooney DJ. 1998. Development of biocempatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *TIBTECH* **16**(5):224-230.

Lee KY and Mooney DJ. 2001. Hydrogels for tissue engineering. *Chem. Rev*. **101**(7):1869-1879.

Lindqvist U, Tolmachev V, Kairemo K, Astrom G, Jonsson E and Lundqvist H. 2002. Elimination of Stabilised Hyaluronan from the Knee Joint in Healthy Men. *Clin. Pharmacokinet*. **41**(8):603-613.

Nakamura M, Hikida M, Nakano T, Ito S, Hamano T and Kinoshita S. 1993. Characterization of water retentive properties of hyaluronan. *Cornea* **12**(5):433-436.

Schimizu C, Kubo T, Hirasawa Y, Coutts RD and Amiel D. 1998. Histomorphometric and biochemical effect of various hyaluronans on early osteoarthritis. *J. Rheumatol. Suppl*. **25**(9):1813-1819.

Scott JE. 1995. Extracellular matric, supramolecular organisation and shape. *J. Anat*. **187**(2):259-269.

Kakabakos SE, Livaniou E, Evangelatos SA, Evangelatos GP and Ithakissios DS. 1991. Ithakissios, Isolation of mono- and di-iodine 125 tyramines for conjugation labelling, *Eur. J. Nucl. Med*. **18**:952-954.

Manuscript Received: July 17, 2014
Revised: September 5, 2014
Revision Accepted: September 8, 2014