

1-β-D-Arabinofuranosylcytosine의 Prodrug 연구

AraC-5'-Alkylthioacetates 합성 및 그들의 물리·화학적 성질과 항암작용 시험

이 회 주·김 태 련

덕성여자대학교

(Received 1988)

Study on Prodrugs of 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine

Preparation of araC-5'-Alkylthioacetates and Evaluation of their Physical-chemical Properties and Antitumor Activities.

Heejoo Lee and Tae-Ryun Kim

Duksung Women's University

Abstract—AraC-5'-methylthioacetate (araC-MTA, 1) and araC-5'-butylthioacetate (araC-BTA, 2) were prepared and their physical and chemical properties and *in vivo* antitumor activities were examined. Both compounds were found to have higher partition coefficients (n-hexanol/water) than their parent araC and to be hydrolyzed to araC within an hour in mouse plasma and ascitic fluid solutions. In *in vivo* antitumor activity test they showed similar potency to araC, which were assumed due to too quick hydrolyses of them to parent in the body fluid.

항암제로 쓰이고 있는 1-β-D-arabinofuranosylcytosine (araC, cytarabine)은 지용성이 낮으므로 (분배계수 $\log P$ octanol/water = -2.1) 경구투여시 흡수율이 낮고(20% 이하), 또 한편 체내 존재하는 효소 deaminase에 의해 쉽게 대사되어 생체내 반감기가 매우 짧다(혈중 $\beta-t_{1/2}$ = 약 2시간)¹⁾. 그리하여 생체내 급속한 대사에 보호되며 지용성 증가로 체내 흡수 분포율이 증가한 araC 유도체를 얻어보고자 하는 연구가 오랜동안 여러기관에서 진행되어 왔다^{2,3)}

본 저자도 기존 항암 및 항 virus성 nucleoside 들의 약물로서 효율을 증가시키기 위한 prodrug 연구를 계속해 오고 있다. 특히 물에 난용성인 cycloaradine에 5'-methoxyacetate기를 도입한 유도체는 herpes simplex virus type 1(encephalitis) 및 type 2(genital infection)에 모약 cycloaradine 보다 약효가 높게 나타냄을 보고 하였다.⁴⁻⁶⁾ 이 methoxyacetyl ester기는 본래 모약의 용해도에 변화를 가져와 투여에 용이성이나 흡수 분포에

증가를 가져오고, 한편 체내 분포 후에는 쉽게 가수분해 되어 모약을 적절히 유리시켜 활성형으로 전향되게 하리라 예견되었다. 그후 araC의 5'-OH에 유사 ester기를 도입한 유도체들 합성을 보고한 바 있다.^{7,8)}

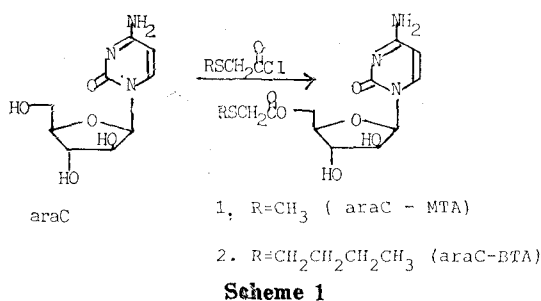
이번 지용성이 낮고 체내 대사가 빠른 araC의 5'-OH기에 종래 methoxyacetyl기 보다 지용성이 크리라 예상되는 alkylthioacetyl기를 도입해 얻은 유도체들 (1 및 2)의 *in vivo* 항암작용 및 물리, 화학적 성질에 관한 실험결과 얻은 소견을 보고하고자 한다.

실험 방법

약자—araC-MTA, 1-β-D-arabinofuranosylcytosine-5'-methylthioacetate; araC-BTA, araC-5'-butylthioacetate; DCC, N,N'-dicyclohexylcarbodiimide; DCU, N,N'-dicyclohexylurea; %ILS, percentage increase in life span.

시약 및 기구—AraC는 중의제약회사로부터 기증되었으며 기타 합성에 필요한 화합물들은 Aldrich Co. 또는 Sigma Co.에서 구입하여 사용하고, 용매는 특급 또는 일급 시약을 사용하였다. TLC는 Merck Co.의 Kieselgel 60 F254를, column용 silical gel은 같은 회사 Kieselgel 60 (0.063~0.200mm)를 사용하였다.

합성 화합물들의 용점측정은 melting apparatus Bock-Monoscop M Werk-NR 7999, Germany를 사용하고 보정하지 않았다. UV 흡수는 Pye Unicam의 UV Spectrophotomete SP8-100, IR spectra는 Perkin-Elmer 1310, 그리고 NMR spectra는 Varian FT-80A를 이용하여 얻었다.



1-β-D-Arabinofuranosylcytosine-5'-methylthioacetate (1, araC-MTA)의 합성—이미 보고된 방법에 따라 methylthioacetyl chloride와 araC를 DMF 용매에서 반응하여 araC-MTA(1)를 얻었다.⁷⁾ Rf 0.36, 20% MeOH-CHCl₃-2% AcOH; mp 188~190°C; UV (H₂O) λ_{max} 271 nm (ε7500).

n-Butylthioacetyl chloride의 합성—보고된 methylthioacetyl chloride 합성 과정을 응용하여 합성하였다.⁷⁾ 즉 DCC 103g(0.5mole)과 n-butanol 37g(0.5mole)을 함께 교반하며 CuCl 800mg을 첨가 반응시키고, 반응 6시간 후 반응액이 굳어져 CH₂Cl₂ 300ml를 가해주고 2일간 계속 반응시켰다. 반응액에 hexane 200ml를 가하고 침전은 여과 제거하고(CuCl) 여액의 용매를 증류 제거한 후 잔류물(isourea, IR 1660cm⁻¹ 흡수로 확인)을 benzene 200ml에 녹인 후, mercaptoacetic acid 23g(0.25mole)을 benzene 50ml에 희석하여 서서히 첨가하여 주었다(소량의

mercaptoacetic acid와 잔류 Cu ion과 결합한 타르성 물질이 형성되어 제거하였음). 반응액을 7시간 동안 환류 가열 후 냉각하고 침전을 여과 제거하였다(DCU, mp 232~233°C). 여액의 용매를 증류 제거한 후 잔류물을 ethyl acetate에 녹이고 10% Na₂CO₃ 수용액으로 씻고 용매를 완전 증류 제거하여 액상의 butyl butylthioacetate를 얻었고, 수율은 거의 당량이었다: Rf 0.78 (Hexane : EtOAc : MeOH=5 : 15 : 1); IR (neat) 1720cm⁻¹(ester); NMR(CDCl₃) δ 0.9~1.9(m, 14H, 2CH₂CH₂CH₂), 2.66(t, J=7Hz, 2H, SCH₂), 3.2(s, 2H, SCH₂CO), 4.14(t, J=6Hz, 2H, OCH₂). Butyl butylthioacetate 20.4g(0.1 mole)을 4N NaOH 50ml과 ethanol 100ml 혼합액에서 3시간 환류 가열하여 가수 분해하였다. Ethanol을 증류 제거하고 물을 가하고 ether로 세척하고 수용액을 HCl로 pH 2 정도로 산성으로 하고 EtOAc로 2회 추출하였다. 용매 제거 후 잔류물을 silica gel column과 용매 5% MeOH-1% AcOH-CHCl₃를 써서 분리하여 Rf 0.34(같은 용매) 분획을 모아 용매 제거 후, butylthioacetic acid 11.3g(수율 69.4%)를 얻었다.

얻은 butylthioacetic acid 8.8g(0.06mole)을 냉조에서 교반하며 SOCl₂ 20ml(과량)과 혼합하고 3시간 동안 환류 가열하였다. 과량의 SOCl₂를 완전 감압증류 제거하고 액상의 butylthioacetyl chloride를 얻었고 IR(neat) 1780cm⁻¹ 흡수로 COCl기 형성을 확인하였다. 감압증류 정제가 되지않아 그대로 다음 반응에 이용하였다.

1-β-D-Arabinofuranosylcytosine-5'-butylthioacetate (2, araC-BTA)의 합성—AraC 3g(0.012mole)을 DMF 20ml에 녹이고 냉조에서 교반하며 butylthioacetyl chloride 3.07g(0.018 mole)을 DMF 5ml에 희석해서 서서히 가해주었다. 반응은 하루동안 계속하고 NaHCO₃ 2g으로 중화하고, 감압증류하여 용매를 제거하였다. 잔유물을 물에 녹이고 EtOAc로 3회 추출하여 합해하고 무수 Na₂SO₄로 건조하고 용매를 감압증류 제거하였다. 잔유물을 silica gel column과 10% MeOH-CHCl₃ 혼합용매를 써서 분리하여 Rf 0.37(20% MeOH -1% AcOH-CHCl₃)에 해당

하는 부분을 모았다. 용매를 증류 제거하고 잔유물을 MeOH-EtOAc 용매를 써서 재결정하여 백색결정 araC-BTA(2) 2.5g을 얻었다 : 수율 약 55%; mp 78~80°C; UV(H₂O) λ_{max} 271nm (ε 8100); IR(KBr) 3300(br), 1720(ester), 1600, 1100cm⁻¹; NMR(DMSO -δ₆ -D₂O)δ 0.5~1.3 (m, 7H, CH₃CH₂CH₂), 2.3(t, J=7Hz, 2H, CCH₂S), 3.05(s, 2H, SCH₂CO), 3.5~4.1 (m, 기타 protons), 5.4(d, J=7Hz, 1H, C₅H), 5.80(d, J=4Hz, 1H, 1'-CH), 7.20(d, J=7Hz, 1H, C₆H).

분배계수 측정—각화합물을 10⁻²M 수용액(원액)을 만들고, 이 원액 0.9ml과 n-hexanol 0.9 ml을 혼합하고 24시간 상온에서 교반후 각층을 분취하였다. 분취된 수층([S]_{H₂O})과 원액([S] 원액)의 UV 흡수도를 271nm에서 각각 측정하고, 아래와 같이 계산하여 분배계수 P를 얻었다 (Table 1).

$$P = \frac{[S]_{\text{hexanol}}}{[S]_{\text{H}_2\text{O}}} = \frac{[S]_{\text{원액}} - [S]_{\text{H}_2\text{O}}}{[S]_{\text{H}_2\text{O}}}$$

Table I—UV absorptions and partition coefficients of araC and its derivatives.

	UV (H ₂ O) λ _{max}	P ($\frac{[S]_{\text{hexanol}}}{[S]_{\text{H}_2\text{O}}}$)
araC	271 (ε 9,250)	0.0
araC-MTA	271 (ε 7,500)	0.125
araC-BTA	271 (ε 8,100)	0.838

Table II—Relative hydrolysis rates of araC derivatives in the various conditions.

	pH 7.5 ^{a)}	pH 1.2 ^{b)}	plasma ^{c)}	mouse복수 ^{d)}
araC-MTA	half at 24hr	small at 24hr	all at 1hr	all at 1hr
araC-BTA	"	"	"	"
araC	—	—	—	—

주 : a) 0.05M phosphate buffer (pH 7.5) 1ml.

b) NaCl 2.0g과 묽은 염산 24.0ml 및 물을 넣어 1L로 한 pH 1.2 1ml (위액과 같은 pH임).

c) 0.05M phosphate buffer (pH 7.5) 0.5ml과 rat의 현장 0.5ml을 혼합한 액.

d) Sarcoma 180 tumor cell을 복강내 증식시킨 ICR mouse의 복수를 tumor cell과 함께 수집하여 이것 0.5ml과 0.05M phosphate buffer 0.5ml를 혼합한 액.

위와 같이 하여 얻은 각 1ml에 10⁻²M용액이 되게 각 화합물을 녹이고 37°C항온을 유지하며 시간에 따라 용액을 일부 취해내어 a)는 그대로 b)는 pH7.5로 조절후 c)와 d)는 끓는 물에 2분간 담가 단백질을 응고시키고 ethanol을 가하고 원심 분리한 후 TLC를 하였다. AraC를 대조물로 하고 UV-lamp로 변화정도를 보았다. AraC 자체에 deamination은 감지하지 못했다.

가수분해 시험—AraC-MTA와 araC-BTA 그리고 대조물로 araC를 Table 2에 각 조건하에서 10⁻²M농도가 되도록 용액을 만든 후 37°C 항온을 유지하며 시간에 따라 분해되어 araC로 전환하는 정도를 TLC(전개용매 20% MeOH -1% AcOH-CHCl₃, araC-MTA Rf 0.32, araC-BTA Rf 0.42, araC Rf 0.05) 전개후에 UV 흡수변화(UV-lamp 사용)를 비교하였다.

in vivo항암실험—이미 발표된 방법으로 실시하였다.⁶⁾ 즉 ICR mice(체중 14~16) 복강에 1×10⁶의 sarcoma 180 암세포를 이식한 후 각 실험군 및 대조군을 10마리씩 하였다. 이식 다음 날부터 5일간 araC, araC-MTA 및 araC-BTA 각각 2가지 농도로 복강 주사하였다. 대조군은 saline 용액을 주사하였다. 항암작용은 survival rate를 비교 검토하여 Table 3에 나타내었다.

$$\% \text{ ILS} = \frac{\text{Treated}}{\text{Control}} \times 100$$

결과 및 고찰

화합물 합성—화합물 araC-MTA(1)는 보고된 방법에 준해 합성되었다.⁷⁾ AraC-BTA(2) 합성을 위해 필요한 butylthioacetyl chloride는 보고된 methylthioacetyl chloride 합성과정과 유사한 과정으로 얻어졌다.⁷⁾ 즉 n-butanol과 DCC를 반응하여 O-butyl-N,N'-dicyclohexylisourea를 만든 후(IR 1660cm⁻¹ 흡수로 isourea 형성확인),

Table III—Effects of the araC derivatives on survival times and weight changes of mice with ip implanted sarcoma 180 tumor cells.

	Dose ^{a)} mg/kg/day × 5 (μmol)	Survival time		Wt. change g/mouse on day 9
		range days (median)	% ILS	
control	saline	11~25(18.9)	100	+7.1
araC	19(80)	24~33(27.6)	146	+3.8
	9.5(40)	17~31(25.3)	134	+4.6
araC-MTA	26(80)	20~50(28.5)	151	+5.0
	13(40)	23~31(27.6)	146	+3.5
araC-BTA	30(80)	17~32(24.8)	131	+2.7
	15(40)	20~31(24.2)	128	+4.1

주: a) 각각의 필요량을 saline 용액에 녹여 냉장고에 보관하며 1회 0.3ml씩을 복강 주사하였다.

mercaptoacetic acid와 2:1의 비로 반응하여 n-butyl n-butylthioacetate를 분리 정제하였다. 이는 IR 1720cm^{-1} 흡수로 ester기를 확인하고, NMR spectrum에서 각 proton peak를 확인하였고 특히 $-\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2-$ 의 세개의 methylene proton들의 peak인 triplet(δ 2.66, $J=7\text{Hz}$), singlet(δ 3.2) 및 triplet(δ 4.14, $J=6\text{Hz}$)로 확인되었다. 얻은 ester를 NaOH 가수분해하여 유리산으로 한 후 thionylchloride와 반응하여 butylthioacetyl chloride를 얻었다.

AraC-BTA는 araC-MTA와 유사하게(Scheme 1) araC와 butylthioacetyl chloride를 DMF용매에서 반응시킨 후 column chromatography로 분리하였고, NMR spectrum를 이용하여 구조를 확인하였다(실험방법 참조). 특히 n-butylthioacetyl기가 araC의 NH_2 기에 결합하지 않고 5'-OH기에 ester 결합하였음은 UV의 λ_{max} 가 araC와 마찬가지로 271nm인 것으로 확인하였다(araC의 NH_2 에 amide 결합을 하면 λ_{max} 가 244 및 300nm 입).

합성 화합물들의 물리·화학적 성질—유기용매와 물에 대한 용해도를 비교하기 위하여 n-hexanol과 물에 대한 분배계수를 실험방법에 준하여 얻어 표 1에 표시하였다. 이 실험 결과로 보면 수용성이 큰 모약 araC는 물로부터 유기용매 n-hexanol로 전혀 이전하지 않고, 유도체 araC-MTA는 약간, 그리고 araC-BTA는 약 1/2 정도가 이전하였다(araC-BTA는 n-hexanol과

물에 대한 분배비가 1:1.2). 이는 원래 예상 하였던 대로 이들 alkylthioacetyl기들이 araC의 지용성 성질을 alkyl기 크기에 따라 증가시킬 것임을 보여주고 있다.

한편 이들 alkylthioacetyl ester 유도체들을 pH 7.5(체액 pH), pH 1.2(위액), mouse혈장 및 복수액에서 37°C 를 유지하며 배양할 때 가수분해 되어 모약 araC를 유리시키는 정도를 시간에 따라 관찰하여 표 2에 나타내었다. 표 2에서 보는 바와 같이 두 ester 유도체들은 위 산성인 pH 1.2 용액에서 24시간 내에 소량만이 가수분해 되었고, 체액성 pH 7.5 용액에서는 24시간에 약 절반정도가 가수분해 되어 araC를 유리하였다. 그러나 마우스 혈장이나 복수액에서는 1hr내에 모두가 가수분해 되었고, 이는 이들 체액속에 가수분해 효소 esterases의 작용으로 해서 분해가 빠른 것으로 보아진다.

한편 이들 체액속에서 araC나 합성 화합물들이 탈 amino화된 물질들을 발견하지 못하였는데, 이것은 cytidine deaminase 효소는 간에서는 크게 작용을 발휘하고 혈장에는 거의 존재하지 않는다는 보고와 일치하며,¹⁾ 그리해 이들 유도체들이 deaminase에 의해 어떻게 영향을 받는지를 볼 수 없었다.

in vivo 항암실험—AraC를 positive 대조군으로 하고 araC-MTA 및 araC-BTA의 in vivo 항암효과 실험을 sarcoma 180 암세포를 복강내에 이식한 ICR mice를 써서 하였다. 약물은 표

3에 나타난 계획대로 투여하고 항암효과는 각 집단 mice들의 생존일과 체중 변화를 control집단과 비교하였다. 표3에 보는 바와 같이 기존 항암제인 araC 투여 집단은 약물을 투여하지 않은 control집단보다 수명이 46% 증가하였다.

합성 araC-MTA 및 araC-BTA 투여군도 control군보다는 수명이 연장되었고, 특히 araC-MTA는 모약보다 약간 높은 51%의 수명증가를 보였다. 이 araC-MTA는 *in vitro* DNA 합성억제 실험에서는 짧은 시간에 있어서는 araC보다 작용성이 낮았는데⁷⁾ 이번 *in vivo* 항암성 실험에서는 araC보다는 약간이나마 높은 작용성을 보이고 있다. 그러나 이들 alkylthioacetyl ester 유도체들은 전반적으로 즉 수명 연장 또는 체중 변화면에서 araC와 큰 차이가 없는 것으로 보인다.

이상의 실험 결과를 집약해 보면 표1에서 보는 바와 같이 합성 alkylthioacetyl 유도체들이 지용성이 증가하여 흡수에 상승을 가져올 것이 예상되는 데, 모 araC의 항암효과를 크게 능가하지 못하는 것은 표 2에 나타난 대로 이들 ester 유도체들이 체액 즉 혈장 또는 복수에서 쉽게 가수분해 되어 한꺼번에 모 araC를 유리시킴으로 모 araC 그 자체의 약효와 큰 차이를 보이지 못하는 것으로 사료된다. 이와 같은 결과는 Hong 등이 araC-phospho-corticoid 유도체들 합성 연구에서 가수분해 속도가 빠른 것이 약효가 적다고 보고한⁸⁾ 것과 같이 한다.

한편 전에 발표되고 있는 nucleoside들의 5'-OH기에 ester유도체들 즉 cyclaradine-5'-alkoxyalkylate^{6,10)} 또는 araA-5'-valerate¹¹⁾ 등이 체내 전신투여 보다는 표피 흡수쪽으로 개발 연구 보고 되고 있는 것을 고려할 때 본 araC의 alkylthioacetyl 유도체들도 약물실험 방법에 따라 다른 결과를 나타내리라 예상된다.

결 론

기존 항암제 araC의 5'-OH에 alkylthioacetyl 기를 도입한 araC-MTA 및 araC-BTA를 합성하여 이들의 물리·화학적 성질과 *in vivo* 항암

성 작용을 실험한 결과 이들 유도체들이 생체조건에서 1시간내에 모두 가수분해 되어 모 araC로 전환되고, 그리해 모 araC와 유사한 약효를 나타낸 것으로 사료된다.

본 실험결과 nucleoside prodrug 연구는 체내 대사에 대해 보다 내성인 유도체 합성연구가 필요하게 되었고, 한편 약물투여 방법을 달리하는 항암작용실험 방법을 고려하게 되었다.

감사의 말씀

본 연구는 1986년도 문교부 연구비 지원에 의하여 이루어졌습니다. 이에 감사드립니다.

한편 이 연구가 진행되게 편의를 제공해 준 서울대학교 약학대학 미생물실과 서울대학교 생약연구소에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Ho, D.H.W. and Frei III, E.: Clinical pharmacology of 1- β -arabinofuranosylcytosine. *Clinical Pharmac. & Therap.*, 12, 944(1971).
- 2) Hong, C.I., Kirisits, A.J., Nechaev, A., Buchheit, D.J., and West, C.R.: Nucleoside conjugates. 6. Synthesis and comparison of antitumor activity of 1- β -arabinofuranosylcytosine conjugates of corticosteroids and selected lipophilic alcohols, *J. Med. Chem.* 28, 171(1985).
- 3) Wechter, W.J., Johnson, M.A., Hall, C.M., Warner, D.T., Berger, A.E., Wenzel, A.H., Gish, D.T. and Neil, G.L.: Aracytidine acylates. Use of drug design predictors in structure-activity relationship correlation. *J. Med. Chem.* 18, 339(1975).
- 4) Vince R., Daluge, S., Lee Heejoo, Shannon, W.M., et. al: Carbocyclic arabinofuranosyladenine (cyclaradine): Efficacy against genital herpes in guinea pigs. *Science*, Sept. 30 P1405 (1983).
- 5) Shannon, W.M. Westbrook, L., Arnett, G., Daluge, S. Lee Heejoo, and Vince, R: Comparison of the efficacy of vidarabine, its carbo-

- cyclic analog (cyclaradine) and cyclaradine-5'-methoxyacetate in the treatment of herpes simplex virus type 1 encephalitis in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **24**, 538 (1983).
- 6) Vince, R.: Alkoxyalkanoate esters of cyclaradine. US. Patent 4,362, 729(1982).
- 7) 이희주 및 송민경 : 1-β-Arabinofuranosylcytosine-5'-methylthioacetate 합성 및 이의 DNA 합성에 대한 억제작용 평가, *약학회지*, **30**, 238(1986).
- 8) 이희주 · 차영애 · 안정옥 · 장일무, 9-β-D-Arabinofuranosyladenine-5'-methoxyacetate 및 1-β-D-arabinofuranosyladenine-5'-methoxyacetate의 합성 및 sarcoma 180 암에 대한 항암작용. *한국생화학회지*, **17**, 332(1984).
- 9) 대한약전 해설 제 5개정, 문성사, p.1212(1987).
- 10) Vince, R.: (3-Ethoxypropionate) esters of Cyclaradine. US Patent 4,594, 350(1986).
- 11) Higuchi, W.I., Kusai A., Fox, J.L. Gordon, N.A., and Ho, N.F.H.: Controlled release of drugs: Prodrug performance in target tissues in controlled release delivery systems. Ed by Roseman, T.J. and Mansdorf, S.Z., Marcel Dekker, Inc., p.43 (1983).