

5-Fluorouracil의 Prodrug에 대한 안정성 및 생체이용율에 관한 연구(I). 1-Glycyloxymethyl-5-fluorouracil HCl의 제조, 물리화학적 성질, 안정성 및 항암효과

지용길[†] · 이계원 · 박목순

충남대학교 약학대학 약학과

(1992년 9월 10일 접수)

Stability and Bioavailability on Prodrug of 5-Fluorouracil (I). Synthesis, Physicochemical Properties, Stabilities and Antitumor Activities of 1-Glycyloxymethyl-5-fluorouracil Hydrochloride

Ung Kil Jee, Gye Won Lee and Mork Soon Park

College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received September 10, 1992)

To assess its suitability as a prodrug of 5-fluorouracil (5-FU), 1-glycyloxymethyl-5-FU HCl (GFU), a 5-fluorouracil derivative having a glycyloxymethyl group at the N-1 position was synthesized. Its physicochemical properties and hydrolysis kinetics, in aqueous solution of pH 1~10 and in the presence of human plasma or rat liver homogenate were studied. Its acute toxicity and antitumor activity against sarcoma 180 were also examined. GFU showed higher lipid/water partition coefficient than 5-FU. The calculated pK_a values of 5-FU and GFU were 8.02 and 7.20, respectively. The decomposition rates of GFU in aqueous solution showed a pH-dependence over the pH range used, which could be ascribed to solvent catalysed hydrolysis reaction at pH lower than 4.16 and to specific hydroxide ion hydrolysis reaction at pH higher than 4.16. The half-life of GFU was 6.9 min in 80% human plasma solution and less than 3 min in rat liver homogenate at 37°C. The LD_{50} value of 5-FU was 240 mg/kg while that of GFU was 440.6 mg/kg (226 mg as 5-FU). Both of 5-FU and GFU showed a strong antitumor activity. Therapeutic ratios of 5-FU and GFU were 3.07 and 3.55, respectively.

Keywords—5-Fluorouracil, 1-Glycyloxymethyl-5-FU HCl, pK_a , LD_{50} , Hydrolysis, Antitumor activity, Therapeutic ratio

5-Fluorouracil (이하 5-FU로 약함), 5-fluoro-2,4(1H, 3H)-pyrimidinedione은 1950년대 후반 Duschnisky 등에 의해 합성되어 항암효과가 발견된 이후^{1,2)} 결장, 직장, 폐, 유방, 위장관 등 여러 장기의 고형암에 중요한 치료제로서 수년간 널리 사용되어 온 항암제이다.³⁾

일반적으로 5-FU는 치료제로서 사용시 정맥주사로 12시간 동안 투여하는데 일주일에 10~15 mg/kg을 투여하기도 하고, 매 4~6주마다 매일 10~15

mg/kg씩 5일간 투여한다.⁴⁾ 이렇게 연용하였을 때 골수억제작용과 위장관 점막염 등의 심한 독성을 일으킨다. 또한 경구투여시 위장관과 간에서의 초회통과효과가 크고 유수분배계수(octanol/water)가 0.15로 매우 낮은 지용성을 나타내므로 생체막 투과가 낮아져 생체이용율이 매우 나쁜 문제점을 가지고 있다.⁵⁾ 이러한 문제점을 개선하기 위하여 5-FU를 화학적으로 modification한 여러 가지 유도체들이 보고되어 있다.⁶⁻¹²⁾ 즉 N-acyloxyaky) (-CH₂

[†] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

OCOR'), N-alkylcarbonyl (-CH₂NHR'), N-alkylcarbonyl (-COR'), N-alkyloxyalkyl (-CH₂OR'), N-alkylthiocarbonyl (-CH₂SCOR') 또는 site specific prodrug으로서 glycosidic products 등의 여러 유도체들이 합성되어 이들의 약리활성 및 독성에 대한 보고가 있으며, 항암제인 daunorubicin에 아미노산을 도입한 peptide로 이루어진 prodrug을 합성하여 이에 대한 여러가지 보고도 있다.¹¹⁾ 이들 중 1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil (FT) 및 1-hexylcarbonyl-5-fluorouracil (HCFU)은 prodrug으로 개발되어 결장, 직장, 폐 등의 여러가지 암에 치료제로 이용되고 있지만 여전히 이 약물들은 hot sensation이나 빈뇨증같은 부작용을 나타내고 있다.¹³⁾

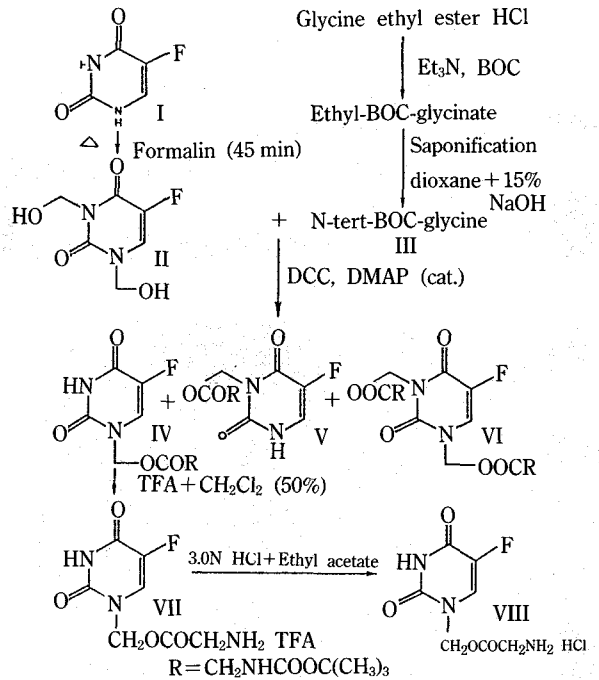
이에 본 저자는 앞의 여러 연구자들의 실험결과를 바탕으로 하여 용해도와 유수분배계수를 개선하고 또한 독성을 저하시켜 앞에서 지적했던 문제점들을 개선하고자 5-FU를 화학적으로 수식하여 에스테르결합, 즉 일종의 acyloxycarbonyl형태인 1-glycyloxymethyl-5-fluorouracil hydrochloride(이하 GFU로 약함)을 얻어 이 물질을 확인하고 이의 pK_a, 유수분배계수, *in vitro*에서 사람의 혈장, 림프의 간 호모지네이트 존재시와 pH의 변화에 따른 가수분해 시험, 급성독성시험, 세포독성시험, *in vivo*에서의 항암력 시험을 행하였다.

실험 방법

시약 및 기기

5-Fluorouracil(Cosmos Co., Germany), glycine ethyl ester HCl, N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, N,N-dimethylaminopyridine, trifluoroacetic acid(Aldrich Chemical Co., Germany), di-*tert*-butyl dicarbonate(Janssen Chemical Co., Belgium), Sephadex LH-20(Pharmacia LKB, Sweden), HPLC용 메탄올, TLC Plate GF₂₅₄(Merk Co., Germany), horse serum, Fisher's media powder (Gibco Co., U.S.A.), 페니실린(10만 Units/l), 스트렙토마이신(0.1 g/l), 중탄산나트륨, 염산(Sigma Chemical Co., U.S.A.), 사람혈장(O type, 을지병원). 기타 시약 및 용매는 일급 또는 특급을 사용하였다.

기기로는 흡광도측정기(Pye Unicam, Model PU 8800), 적외분광광도계(Perkin-Elmer, Model 783),



Scheme 1—Synthesis plan of 1-glycyloxymethyl-5-fluorouracil HCl.

NMR스펙트럼측정장치(Varian, Model EM-360), HPLC System(Waters Associates, Model 441), Spectronic 3000 array spectrophotometer(Milton Roy), 고속액체크로마토그래프장치(Yamazen, Model 540), 용점측정기, 냉장원심분리기(Mse Scientific Instruments) 등을 사용하였다.

제조 및 확인

Ozaki 등¹⁰⁾의 방법에 따라 5-FU에 포르말린 처리를 하여 hydroxymethylation시킨 1,3-bis(hydroxymethyl)-5-fluorouracil(이하 1,3-bis(hydroxymethyl)-5-FU로 약함)의 N₁위치에 glycine의 아미노기를 선택적으로 보호하는 butoxycarbonyl group을 도입하여 반응성을 높인 N-*tert*-butoxycarbonylglycine(이하 N-*tert*-BOC-glycine으로 약함)을 반응시켜 에스테르결합으로 이루어진 일종의 acyloxycarbonyl형태의 유도체, 즉 GFU를 얻었으며 이의 합성단계를 간단히 도식화하면 Scheme 1과 같다.

1,3-Bis(hydroxymethyl)-5-FU (II)의 제조¹⁰⁾

5-FU 6.5g(50 mmol)과 포르말린 8.9g(110 mmol)을 55~60°C에서 45분간 교반하였다. 반응 후 생성된 미량의 물을 감압농축시켜 제거하고 점성이 있는

물질을 얻었다.

Rf=0.06(클로로포름 : 메탄올=9 : 1, UV 254 nm)

N-tert-BOC-glycine (III)의 제조¹⁴⁻¹⁷⁾

이 물질은 먼저 ethyl-tert-butoxycarbonylglycinate(이하 ethyl-BOC-glycinate로 약함)를 만들어서 이를 검화하여 얻었으며 그 방법은 아래와 같다.

Ethyl-BOC-glycinate의 제조—di-tert-butylidicarbonate(이하 BOC으로 약함) 33.12 ml(144 mmol)를 메탄올 50 ml에 용해시키고, 이를 glycine ethyl ester HCl 16.75g(120 mmol)과 triethylamine 14.75 ml(144 mmol)를 메탄올 75 ml에 용해시킨 용액에 ice bath상에서 조금씩 적가하며 교반하였다. 반응 후, 메탄올을 감압증류하여 제거시킨 다음 잔사를 염화메틸렌에 전용시키고, 이를 물, 포화식염수로 차례로 수세하여 triethylammonium HCl염을 완전히 제거한 다음 무수황산나트륨으로 탈수하였다. 그 다음에 methylene chloride를 증류하여 유상의 ethyl-BOC-glycinate를 얻었다.

Rf=0.49(클로로포름 : 메탄올=9 : 1, 닐히드린 시약), ¹H-NMR(CDCl₃) δ 1.3(t, J=7 Hz, 3H, CH₃), 1.5(s, 9H, C(CH₃)₃), 3.75(d, 2H, N-CH₂), 4.3(q, J=7 Hz, 2H, COOCH₂), 5.0(br., s, 1H, NH)

Ethyl-BOC-glycinate의 검화—앞에서 얻은 유상의 ethyl-BOC-glycinate를 디옥산 30 ml에 용해시켜 15% 수산화나트륨 30 ml를 넣고 2시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응 후 진한 염산으로 산성화하여 에틸로 세번 정도 추출해 이를 무수황산나트륨으로 탈수한 다음, 에틸을 감압 증류 제거시켜 점성이 있는 N-tert-BOC-glycine을 얻었다. 다시 이 물질을 ice bath상에서 석유에틸로 결정화시켜 N-tert-BOC-glycine 15.15g(72%)를 얻었다.

Rf=0.14(클로로포름 : 메탄올=9 : 1, 닐히드린 시약), mp. 80~82°C, IR(KBr, cm⁻¹) 3350, 3000, 1740, 1650, 1400, 1150

¹H-NMR(CDCl₃) δ 1.42(s, 9H, C(CH₃)₃), 3.95(d, 2H, CH₂), 5.15(br., s, 1H, COONH), 9.1(br., s, 1H, COOH)

GFU (VIII)의 제조^{10,18)}

앞에서 얻은 1,3-bis(hydroxymethyl)-5-FU를 아세트니트릴 150 ml에 용해시키고, 여기서 N-tert-BOC-glycine 10.5g(60 mmol), N,N-dicyclocarbadiimide 12.35g(60 mmol), 촉매량의 N,N-dimethylaminopy-

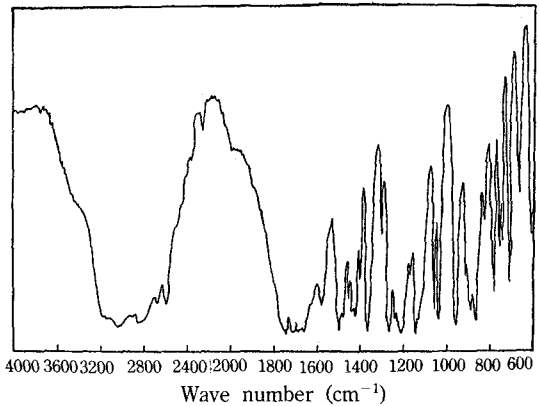


Figure 1—IR spectrum of 1-glycyloxymethyl-5-fluorouracil HCl.

ridine을 넣고 실온에서 4시간 교반하였다. 반응 후 반응혼합물을 여과하고, 침전을 methylene chloride로 세척하여 생성된 dicyclohexylurea(mp. 223~224°C)를 제거했다. 다음에 모액을 증류 제거하여 얻어진 잔사를 칼럼크로마토그래피를 실시하여 목적하는 N-tert-BOC-glycyloxymethyl-5-fluorouracil만을 분리하였다. 이때 사용한 조건은 다음과 같다.

충전물질 : Sephadex LH-20

전개용매 : 아세톤

Rf=0.22(클로로포름 : 메탄올=9 : 1, UV 254 nm, 닐히드린 시약), ¹H-NMR(CDCl₃) δ 1.4(s, 9H, C(CH₃)₃), 3.9(d, 2H, COOCH₂), 5.22(s, 1H, NH), 5.68(s, 2H, NOCH₂CO), 7.6(s, J=5.8 Hz, 1H, C₆-H)

tert-Butoxycarbonyl기를 제거하기 위하여 분리한 반고체 상태의 물질을 염화메틸렌 20 ml에 용해시켜 과량의 trifluoroacetic acid를 ice bath상에서 조금씩 적가하며 30분 정도 교반했다. 반응 후 반응혼합물을 증류하고, 잔사에 초산에칠 20 ml를 가하고 3.0 N 염산을 ice bath상에서 조금씩 적가하며 교반하여 고체물질을 얻었다. 얻은 물질을 아세톤으로 여러번 세척하여 순수한 GFU 3.0g을 얻었다 (수율 23.67%).

Rf=0(클로로포름 : 메탄올=9 : 1, UV 254 nm, 닐히드린 시약), mp. 172~174°C, IR(KBr) 3020, 2850, 1740, 1220, 1590 (Fig. 2).

¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 3.8(s, 2H, COOCH₂), 5.7(s, 2H, NOCH₂CO), 8.18(d, J=7 Hz, 1H, C₆-H), 8.5(br., s, 2H, NH₂), 12.0(br., s, 1H, ring의 NH) (Fig. 2).

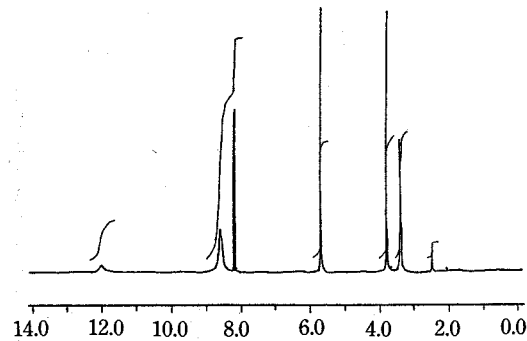


Figure 2—The ¹H-NMR spectrum of 1-glycyloxymethyl-5-fluorouracil HCl in DMSO_{d6}.

물리화학적 성질¹⁹⁻²¹⁾

유수분배계수—Kakemi 등¹⁹⁾의 방법에 따라 5-FU와 GFU를 유상으로 포화시킨 pH 4.0, 7.4 완충 용액(0.02 M)에 1×10⁻⁴ M의 농도로 용해시켜 이를 마개달린 시험관에 10 ml씩 넣어 수상으로 하고 미리 수상으로 포화시킨 클로로포름과 n-옥탄올을 각각 10 ml씩 가하여 유상으로 한 다음 5-FU는 37±0.5°C에서 1시간 진탕시키고, 24시간 방치하여 수상을 취한 것을 263.2 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 계산하였다.

GFU는 불안정하므로 방법을 약간 달리 하여 실험하였다. 즉 37±0.5°C에서 5분간 진탕시킨 다음, 2분 동안 원심분리하여 유상과 수상으로 분리시킨 후, 즉시 수상을 취하여 259.2 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 계산하였다.

유수분배계수(K_{o/w})는 다음 식에 따라 계산하였다.

$$K_{o/w} = \frac{\text{최초의 수층의 약물농도} - \text{평형상태의 수층의 약물농도}}{\text{평형상태의 수층의 약물농도}} = \frac{\text{최초의 수층의 흡광도} - \text{평형상태의 수층의 흡광도}}{\text{평형상태의 수층의 흡광도}} \quad (1)$$

pK_a 측정—Hasegawa 등²⁰⁾의 liquid-liquid partition 방법에 따라 5-FU와 GFU를 1×10⁻⁴ M의 농도로 0.02 M 초산완충액(pH 4.0), 인산완충액(pH 7.4)에 용해시켜 마개달린 시험관에 각각 10 ml씩을 다음 5-FU는 37±0.5°C에서 1시간 진탕시키고 24시간 방치한 후 수상을 취하여 수상의 pH를 즉시 측정

하고 263.2 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 계산하였다. 반면 GFU는 5분 동안 진탕시킨 다음, 2분 동안 원심분리하여 유상과 수상을 분리해 준 다음 수상을 취하여 즉시 pH를 측정하고 259.2 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 계산하였다.

여기에서 Hasegawa 등²⁰⁾의 식을 도입하면, 5-FU, GFU는 모두 약산성이므로 다음의 식을 이용할 수 있다.

$$pK_a = pH + \log \frac{P_{app}}{P_m - P_{app}} \quad (2)$$

따라서 초산완충액(pH 4.0)을 수상으로 사용한 것 으로부터 P_m값을 얻고 인산완충액(pH 7.4)을 수상으로 사용한 것으로부터 P_{app}값을 얻은 다음 식 (2)에 적용시켜 pK_a값을 계산하였다.

가수분해 실험²²⁻²⁵⁾

pH의 변화에 의한 가수분해—Bundgaard의 실험 방법^{22,23)}을 이용하여 모든 완충용액에서의 분해속도 측정은 총 완충용액 농도를 0.05 M로, 이온강도는 KCl을 첨가하여 0.5로 일정하게 유지하였다. 이때 측정은 UV-spectrophotometry법과 HPLC법을 이용하여 37±0.5°C에서 3회씩 실시하였으며 완충용액을 만들기 위하여 초산완충액(pH 4.16), 인산완충액(pH 2.27, 5.61, 7.71), 탄산완충액(pH 9.70)을 사용하였다. 그리고 각각의 겔보기 1차속도정수는 남아 있는 GFU양의 로그값을 취하여 이를 시간에 대하여 플로트하고 그래프의 기울기로부터 구하였다.

pH 9.70에서의 가수분해는 direct UV-spectrophotometry법을 써서 시험하였다. 항은 석영셀에 미리 반응조건의 온도로 맞추어 준 완충용액 2.5 ml를 취한 다음, 소량의 물과 메탄올에 용해시킨 약물의 원액 25 μl를 첨가하여 1×10⁻⁴ M의 농도로 하여 반응시켰다. 온도를 일정하게 유지하면서 259.2 nm에서 감소된 흡광도의 변화를 30초 간격으로 측정하여 이를 남아 있는 약물량으로 환산하였다.

pH 2.27, 4.16, 5.61, 7.71에서의 가수분해시험은 HPLC법으로 행하였다. 미리 반응조건의 온도로 맞추어 준 10 ml의 완충용액을 마개 달린 시험관에 취한 후, 약물의 원액 100 μl를 첨가하여 1×10⁻⁴ M의 농도로서 반응시켰다. 수욕상에서 온도를 일정하게 유지하고 이들 각각의 반응용액을 적절한 시간 간격으로 취하여 직접 HPLC에 주입하였다.

이의 피크높이를 똑같은 조건으로 행한 표준액의 피크높이와 비교하여 가수분해 되지 않고 남아 있는 약물의 양을 구하였다. 이 때 사용된 HPLC 조건은 다음과 같다.

검출기: UV detector: Waters Associates, Model 441, 칼럼: Radial-Pak C₁₈ cartridge column (particle size: 5 μm, Waters Associates), 이동상: 0.01 M 인산완충액(pH 5.5): 메탄올=45:55, 유속: 1.5 ml/min, 칼럼온도: 실온, 시료주입량: 20 μl

사람 혈장에서의 가수분해—모든 실험은 HPLC 법에 의해 37±0.5°C 에서 3회씩 실시하였으며 사람 혈장은 O형의 것을 사용하였다. *In vitro* 상태에서 pH 7.4 인산완충액을 사용하여 사람혈장을 80%로 희석하였으므로 pH 7.4 인산완충액에서의 가수분해를 측정하여 이를 사람혈장 첨가시의 가수분해 속도의 변화와 비교하였다. 그리고 겔보기 1차속도정수는 남아 있는 GFU 양의 로그값을 취하여 이를 시간에 대하여 플로트한 그래프의 기울기로부터 얻었다.

pH 7.4 인산완충액에서 가수분해—미리 반응조건의 온도로 맞추어 준 완충용액 10 ml를 마개 달린 시험관에 취한 후, 약물의 원액 200 μl를 첨가하여 약 2×10⁻⁴ M의 농도 조건에서 반응시켰다. 수욕상에서 온도를 일정하게 유지하고 반응용액을 20분 간격으로 취하여 직접 HPLC에 주입하고, 이의 피크높이를 같은 조건으로 하여 얻은 표준액의 피크높이와 비교하여 가수분해 되지 않고 남아 있는 약물의 양을 구하였다. 이때 HPLC의 조건은 앞에서와 동일한 조건을 사용하였다.

80% 사람 혈장에서의 가수분해—pH 7.4 인산완충액을 이용하여 80% 사람 혈장으로 만든 용액 10 ml를 취하여 미리 반응조건의 온도로 맞추어 준 다음, 약물의 원액 900 μl를 첨가하여 약 9×10⁻⁴ M의 농도로 하였다. 이 용액 200 μl를 원심분리관에 넣고, 단백질을 제거하기 위하여 1000 μl의 메탄올을 첨가한 후, vortex mixer로 서로 혼합해서 1200×g로 2분 동안 원심분리하여 상정액을 취하여 직접 HPLC에 주입하였다. 수욕상에서 온도를 일정하게 유지시키며 이 조작을 10분 간격으로 실시하였으며 이의 피크높이를 같은 조건으로 하여 얻은 표준액의 피크높이와 비교하여 가수분해 되지 않고 남아 있는 약물의 양을 구하였다. 이때 HPLC 조건은 앞에서와

동일한 조건을 사용하였다.

랫트의 간 호모지네이트에서의 가수분해

Graham²⁶⁾의 방법에 따라 간 호모지네이트를 제조하였으며 모든 조작은 0~5°C 에서 실시하였다. 즉 Sprague-Dawley계 랫트를 기절시켜 간을 얻어 차가운 생리식염수로 세척하고 paper towel로 건조시켜 칭량하였다. 칭량한 후 가위로 잘게 썰어 5배 용량의 0.05 M 인산완충액(pH 7.4)으로 희석하여 초음파 tissue homogenizer로 균질화하였다. 호모지네이트를 9000×g로 30분 동안 원심분리하여 상정액을 얻었다. 이 상정액 10 ml를 취하여 사람 혈장에서의 가수분해실험과 같은 방법으로 실시하여 가수분해 되지 않고 남아 있는 약물의 양을 구하였다.

L1210 세포에 대한 세포독성 시험

배양액의 제조—3차 증류수 1l에 Fisher's powder 한봉지, horse serum 100 ml, 중탄산나트륨 1.125g, 페니실린 10만 단위, 스트렙토마이신 100 mg을 가한 후, 0.1 N 염산으로 pH 7.2로 조정된 다음 밀리포아여과지(0.45 μm)로 여과하여 배양액을 조제하였으며 냉장고(4×6°C)에 보관하면서 일주일 이내에 사용하였다.

세포의 배양—L1210 세포는 인삼연구소에서 공급받아 실험에 사용하였으며 세포는 Fischer's medium을 넣은 마개달린 시험관(10 cm×16 mm) 또는 250 ml 마개달린 에를렌마이어 플라스크에서 37°C 의 CO₂ 배양기로 1주일에 두번 계대 배양하였다(CO₂ 5%).

L1210세포 현탁액의 조제—세포독성 실험에 사용되는 logarithmic phase에 도달한 L1210세포를 얻기 위하여 실험 24시간 전에 36~37°C 로 가온한 배양액을 넣은 250 ml 마개 달린 에를렌마이어 플라스크에 L1210세포를 가해 2~3×10⁵ cells/ml의 농도로 조절하여 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

세포독성 실험—시료는 실험하기 직전에 디메틸설폭사이드(DMSO)용액을 이용하여 일정농도로 만든 용액 0.1 ml에 신선한 배지 9.9 ml를 가해 100배 희석하였다(용매농도 0.002% 이하). 마개달린 시험관에 희석액을 각각 100, 50, 25 μl씩 가하고 위에서 제조한 세포 현탁액을 5 ml씩 넣어 실험군으로 하고, 5 ml의 현탁액만 넣어 대조군(2√n: n=시료수)으로 하여 37°C 의 CO₂ 배양기에서 48시간 배양 후 hemacytometer를 사용하여 세포수를 비교하였다.

ED₅₀값의 결정과 세포독성의 판단—ED₅₀값은 대조군의 50% 수준으로 L1210세포의 성장을 억제하는 시료의 농도(μg/ml)로 주어지며, 여기에서는 Thayer 등²⁷⁾의 방법에 따라 계산하였으며 이를 간단히 표현하면 다음과 같다.

시험군의 각 농도에 대한 Y(%)는 다음과 같이 계산하였다.

$$Y(\%) = \frac{T - C_0}{C - C_0} \times 100$$

단, T=시험군의 48시간 배양후 평균 세포수(cells/ml), C=대조군의 48시간 배양후 평균 세포수(cells/ml), C₀=배양 시작시 평균 세포수(cells/ml)

각 농도의 Y(%)값과 log dose를 도식화하여 다음 식에 의하여 회귀선을 구하였다.

$$B = \text{기울기} = \frac{N \cdot \sum(X_i \cdot Y_i) - (\sum X_i) \cdot (\sum Y_i)}{N \cdot \sum(X_i)^2 - (\sum X_i)^2}$$

$$A = \text{절편} = \frac{\sum Y_i}{N} - B \cdot \frac{\sum X_i}{N}$$

단, N=number of point selected

X_i=log dose i

Y_i=growth ratio calculated dose i

여기서 구한 기울기와 절편값을 이용하여 회귀선 Y=A+BX를 얻었으며 이 식의 Y값에 50을 대입하여 ED₅₀값을 계산하였다.

$$50 = A + B(\log_{10} ED_{50})$$

$$\log_{10} ED_{50} = (50 - A) / B$$

$$ED_{50} = 10^{(50 - A) / B} \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

급성독성시험²⁸⁻³¹⁾

체중 20~25g의 ICR계 웅성 마우스를 7군으로 나누어 각군을 7마리씩으로 하고 5-FU 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 mg/kg, GFU 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 mg/kg을 5% 아카시아용액에 각각 균등히 현탁시키거나 용해시켜 0.1 ml/10g씩 복강내에 주사하였다. 약물을 투여한 후 3일, 1주, 2주, 3주 동안 관찰하여 죽은 동물수를 가지고 Lit-chfield & Wilcoxon 방법²⁹⁾에 의하여 LD₅₀치를 산출하였다.

In vivo 항암력 시험^{12,30-35)}

마우스의 복강내에서 1주일 간격으로 계대 배양하여 유지중인 Sarcoma 180세포를 복수와 함께 취하여 차가운 멸균 생리식염수를 가해 800×g로 약 3분 정도 원심분리하여 세포침전물을 분리하였다. 분리한 세포침전물을 다시 차가운 멸균 생리식염수에 부유시켜 원심분리하여 상정액을 제거하였다. 이 조작을 3회 실시하여 혼재된 적혈구를 완전히 제거하였다. 순수한 sarcoma 180세포만 취해 hemacytometer로 세포수를 확인하고 이를 10⁷ cells/ml가 되도록 희석하여 부유액을 만들어 실험용 세포액으로 하였다.

Sarcoma 180세포 부유액을 0.1 ml씩 마우스의 복강내에 이식하였다. 즉 10⁶ cells/mouse의 농도이면 마우스의 복강내에서 충분히 복수암을 유발할 수 있는 치사량에 해당한다. 이식 후 24시간이 지난 다음부터 각 군을 6마리로 하여 1일 1회, 7일간 연속하여 약물을 복강내에 주사하였다. 이때 대조군에는 5% 아카시아용액만을 투여하였으며 5-FU는 30, 15, 7 mg/kg/day, GFU는 200, 100, 70, 50, 30 mg/kg/day의 농도로 각각 5% 아카시아용액에 현탁시키거나 용해시켜 0.1 ml/10g으로 주사하였다.

마우스를 60일까지 관찰한 후 다음과 같은 식을 사용하여 수명연장율(% increase in life span, % ILS)을 계산하였다.

$$ILS(\%) = (T - C) / C \times 100$$

단, T=처치군의 평균 생존일수

C=대조군의 평균 생존일수

결과 및 고찰

GFU의 합성

5-FU의 N-1위치에 직접 acyl 또는 alkoxy group이 도입되면 상대적으로 불안정하기 때문에 직접 alkyl기를 도입하였다. 즉 55~60℃의 온도를 45분 정도 유지하여 포르말린과 반응시키면 1,3-bis(hydroxymethyl)-5-FU를 얻게 되는데 이때 60℃ 이상에서는 물질이 중합되거나 다시 5-FU로 분해되는 경향이 있었다.

또한 아미노산은 zwitterion 형태를 이루고 있으며 대부분의 유기용매에 대해 그 용해도가 낮기 때문에 아미노산 자체로는 반응을 하기가 어려우므로 아미노산

Table I—Lipid/Water Partition Coefficients, pK_a and Melting Points of 5-Fluorouracil and 1-Glycyloxymethyl-5-fluorouracil Hydrochloride

Parameter	Compound		
	5-FU	1-Glycyloxymethyl-5-FU HCl	
PC* chloroform	pH 4.0	**0.03±0.05**	
	pH 7.4	0.01±0.45	
	octanol	pH 4.0	0.13±0.05
		pH 7.4	0.10±0.12
pK_a	8.02±0.56	7.20±0.48	
melting point	282~284°C	172~174°C	

*P.C: partition coefficient

**Values are Mean±S.D. of five experiments

노산의 $-NH_2$ 또는 $-COOH$ 기를 보호하여 반응성을 높여 주는 기존의 방법을 이용하였다.¹²⁾ 즉 아미노산의 $-NH_2$ 기만을 선택적으로 보호하는 butoxycarbonyl기를 아미노산에 도입하여 $-COOH$ 기만이 반응할 수 있는 형태인 *N-tert*-BOC-glycine을 합성하여 다음 반응에 사용하였다.

위에서 합성된 두 가지 물질을 가지고 Ozaki 등⁹⁾의 방법에 따라 *N,N*-dicyclocarbodiimide, *N,N*-dimethylaminopyridine의 존재하에 실온에서 반응시켜 1,3-bis(hydroxymethyl)-5-FU의 *N*-1위치의 $-OH$ 기와 보호된 아미노산의 $-COOH$ 기가 서로 에스테르 결합으로 이루어진 물질을 쉽게 얻을 수 있었다. 제조의 각 단계에서 생성되는 물질을 TLC, IR, NMR로 확인하였다.

GFU의 IR spectrum과 NMR spectrum은 Fig. 1과 2에 나타내었다. IR spectrum에서 1740, 1220 cm^{-1} 에 에스테르 결합이 3020 cm^{-1} 에 ring의 아민기가 나타났으며 2850 cm^{-1} 에 메틸렌기가, 1590 cm^{-1} 에 아미노기가 나타나는 것을 확인하였다.

NMR spectrum에서 1.4 ppm에 나타났던 butoxycarbonyl기의 메틸기가 나타나지 않았으며 7.6 ppm에 나타났던 C_6-H 는 8.18 ppm으로 약간 shift되었고, 또한 메틸렌기에 인접한 아미노기도 8.5 ppm으로 shift됨을 볼 수 있었다. 그러므로 목적하는 최종물질이 합성되었음을 알 수 있었다.

GFU의 물성

유수분배계수, pK_a , 용점을 측정하여 Table I에 나타내었다. Table I과 같이 클로로포름과 옥탄올을

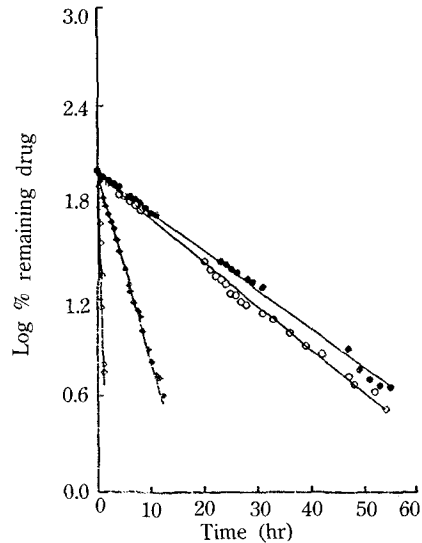


Figure 3—First-order plots for the hydrolysis of 1-glycyloxymethyl-5-fluorouracil HCl in 0.05 M acetate buffer (pH 4.16), and 0.05 M phosphate buffer (pH 2.27, 5.61, 7.71) at 37°C.

- : in 0.05 M phosphate buffer (pH 2.27)
- : in 0.05 M acetate buffer (pH 4.16)
- ◆—◆: in 0.05 M phosphate buffer (pH 5.61)
- ◇—◇: in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.71)

유상으로 사용한 두 경우 모두 새로이 합성된 유도체 약물이 5-FU보다 유수분배계수가 증가함을 볼 수 있었으므로 더 지용성임을 알 수 있었다. 또한 유도체의 구조에서 보는 바와 같이 *N*-3 proton이 해리되어 pH가 낮아질 것으로 예상되었는데 이를 실제 옥탄올을 유상으로 하여 pK_a 값을 계산한 결과 7.2로서 잘 일치함을 볼 수 있었다.

두 약물의 용점을 비교해 보면 5-FU는 282~284°C인 반면 유도체는 172~174°C로서 더 낮음을 볼 수 있다. 즉 Bundgaard 등²³⁾의 실험결과에서와 같이 uracil 자체는 한 분자의 NH-protons과 다른 분자의 carbonyl기 사이에 분자간 수소결합의 형성으로 인하여 높은 결정격자 에너지를 가지게 되어 결국 용점이 높아지게 되지만 유도체와 같이 acyloxymethyl group으로 uracil의 *N*-1 proton을 치환시켜 주면 수소결합을 감소시키거나 파괴시키므로 상대적으로 용점이 낮아지게 되는 것이다.

가수분해 특성

가수분해실험은 여러가지 pH의 완충액에서 37±

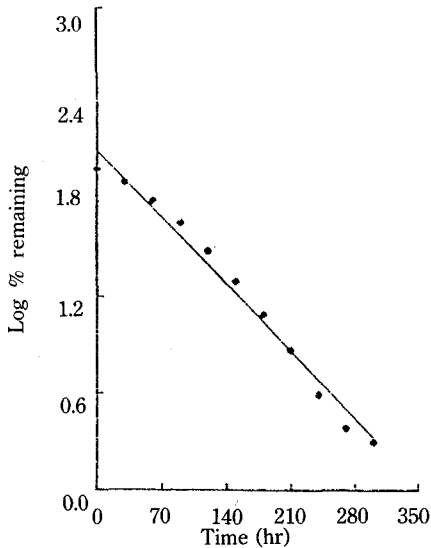


Figure 4—First-order plots for the hydrolysis of 1-glycyloxymethyl-5-fluorouracil HCl in 0.05 M carbonate buffer (pH 9.70) at 37°C.

0.5°C 로 direct UV-spectrophotometry법과 HPLC법에 의해 실시하였으며 Fig. 3, 4와 같이 시간에 따라 남아 있는 약물의 양에 로그값을 취하여 각 pH별로 플롯해 본 결과 이 약물은 각 pH에서 서로 다른 반감기를 가지는 1차분해거동을 보여 주었다. 여기서 구해진 각각의 1차분해속도정수를 Table II에 나타내었으며, 약물의 가수분해의 결과 생성되는 물질은 parent drug인 5-FU임을 HPLC분석에 의해 확인하였다.

가수분해에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위하여 Table II에 나타낸 각 pH에서의 겉보기 1차분해속도정수에 로그값을 취하여 이를 pH에 대하여 plot하여 Fig. 5에 나타내었다. 즉 이 그래프에서 보면 pH 4.16 이하의 산성용액에서의 속도정수 pH와 무관하게 거의 일정하지만 pH 4.16 이상의 중성 및 알칼리성 용액에서의 pH-rate profile은 거의 일정한 기울기를 갖는 직선인 것을 볼 수 있다. 이는 hydroxide ion이 가수분해의 반응에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

그러므로 Bundgaard 등²²⁾의 실험결과를 바탕으로 하여 비교해 볼 때 이와 비슷한 결과를 얻었으므로 이 약물의 전반적인 가수분해 반응은 pH 4.16 이하에서는 수용액 중에서 pH와 무관하게 용매의 영향을 받아 일어나며(solvent catalysed hydrolysis reac-

Table II—Apparent First-order Rate Constants for the Hydrolysis of 1-Glycyloxymethyl-5-fluorouracil Hydrochloride in Various Buffer Solutions at 37°C

Buffer	K_{obs}^* ($\text{min}^{-1}, \times 10^{-2}$)	$t_{1/2}$ (min)
phosphate buffer (pH 7.27)	0.041 ± 0.02	1690.2
acetate buffer (pH 4.16)	0.045 ± 0.03	1540.0
phosphate buffer (pH 5.61)	0.18 ± 0.02	378.7
phosphate buffer (pH 7.71)	2.02 ± 0.09	34.3
carbonate buffer (pH 9.70)	37.88 ± 0.08	1.8

*Mean \pm S.E. of three experiments

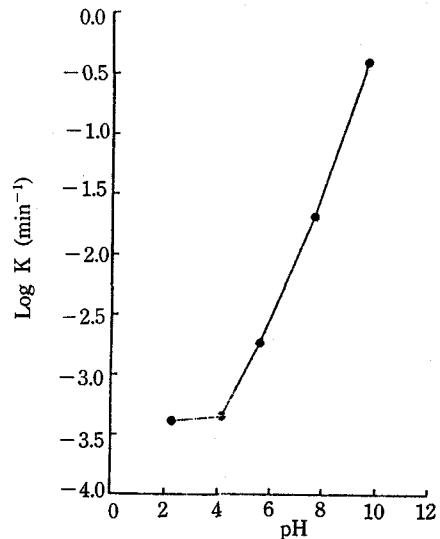


Figure 5—The pH-rate profile for the hydrolysis of 1-glycyloxymethyl-5-fluorouracil HCl in aqueous solution ($\mu=0.5$) at 37°C.

tion), pH 4.16 이상에서는 pH에 의존해서 hydroxide ion에 의해 영향을 받아 일어나는 것이라고 생각된다(specific hydroxide ion catalysed hydrolysis reaction).

Prodrug의 개발에 있어서 여러가지 효소에 의해 parent drug으로의 전환이 가속화되는지의 여부를 확인하는 것은 매우 중요하다. 그러므로 37°C, *in vitro* 상태에서 pH 7.4 완충액, 80% 사람 혈장, 랫트의 간 호모지네이트에서 유도체 약물의 가수분해를 HPLC로 정량하여 각각 얻어진 결과를 Table III에 나타내었으며 역시 이들의 경우에도 얻어진 결과들을 가지고 검토하여 시간에 따라 가수분해되지 않고 남아 있는 약물의 양에 로그값을 취하여 plot하여

Table III—Rate Constants for the Hydrolysis of 1-Glycyloxymethyl-5-fluorouracil Hydrochloride in 0.05 M Phosphate Buffer (pH 7.4) and in 80% Human Plasma at 37°C

Medium	K_{obs} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
buffer (pH 7.4)	1.9×10^{-2}	36.5
80% human plasma	1.01×10^{-1}	6.9
$K_{obs}(\text{plasma})/K_{obs}(\text{buffer})$	5.2	

Fig. 6에 나타내었을 때 pH의 변화에 따른 가수분해에서와 같은 경향의 1차분해거동을 나타내는 것을 볼 수 있었다. 또한 가수분해의 결과 parent drug인 5-FU가 정량적으로 생성되는 것을 확인하였다.

Table III에서 보면 다른 에스텔 결합으로 이루어진 약물들의 경우에서와 같이 순수한 완충액에 대하여 혈장의 존재는 가수분해를 가속화시켜 줄 것으로서 half-life가 36.5분에서 6.9분으로 감소되었으며 또한 랫트의 간 호모지네이트의 존재도 역시 가수분해를 가속화시켜 주는데 이때는 더욱 빠른 가수분해의 결과로서 3분 이내에 모두 5-FU를 생성하기 때문에 실험방법에서와 같은 전처리를 하여 속도정수를 구하는 것은 어려웠다.

결론적으로 새로이 합성된 약물은 *in vivo* 상태에서는 여러가지 효소들에 의하여 에스텔 결합이 분해되어 5-FU로의 전환이 매우 빠르게 일어날 수 있다는 것을 예상할 수 있다.

세포독성

L1210세포에 대한 positive control시험은 미국립암연구소(NCI)의 manual에 따라 Me-CCNU를 사용하였다. L1210세포에 대한 Me-CCNU의 ED_{50} 값은 1.7~7.7일 때 정상적인 세포독성 감도를 가진다고 보고되어 있는데 실험실에서 사용한 세포의 ED_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 값은 2.553이므로 정상적이라 할 수 있다.

5-FU의 세포독성 시험은 이 물질이 현재 항암제로 사용되고 있으므로 별 의미가 없으나 새로 합성된 유도체 약물과 이를 비교해 세포독성의 정도를 살펴보기 위해 이 실험을 실시하였다.

5-FU의 ED_{50} 값은 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하이었고 GFU는 0.031 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로서 parent drug에 비해 약간 감소된 세포독성 정도를 보여 주었다. 즉 두 물질 모두 비교 물질인 Me-CCNU에 비해서 매우 높은 세포독성을 보여 주었다. 이는 새로이 합성된 약물 자체로는

Table IV—Acute Toxicities (LD_{50}) of 1-Glycyloxymethyl-5-fluorouracil Hydrochloride and 5-Fluorouracil after Intraperitoneal Injection in the Mice

Compounds	LD_{50} (mg/kg)
5-FU	240 (172.3~308.2)*
1-glycyloxymethyl-5-FU HCl	440.6 (328.1~586.6)**

* (F.L. Probability 95%)

** Amount as 5-fluorouracil is 226 mg/kg (168.3~300.8 mg/kg)

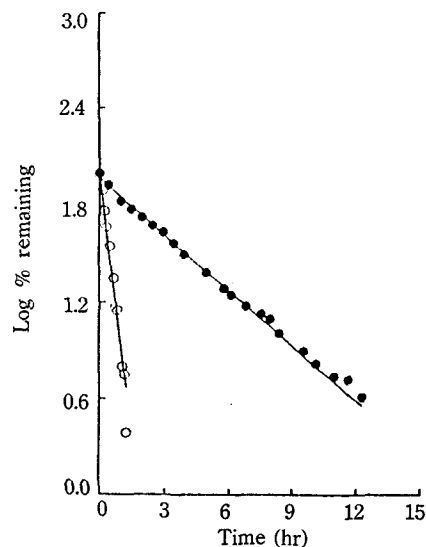


Figure 6—First-order plots for the hydrolysis of 1-glycyloxymethyl-5-fluorouracil HCl in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4) and in 80% human plasma solution at 37°C.

○—○; in 80% human plasma
●—●; in phosphate buffer (pH 7.4)

효과가 떨어지고 완전한 작용을 하기 위해서는 일단 parent drug인 5-FU로 전환해야 하기 때문에 5-FU에 비해 전환으로 인한 약간의 시간이 더 요구되므로 세포독성 정도가 떨어진 것으로 생각된다.

급성독성

Table IV는 급성독성시험의 결과로서 각각의 LD_{50} 값은 5-FU가 240 mg/kg, 새로 합성된 약물은 440.6 mg/kg(5-FU로서 226 mg)이었다. 즉 이 두 가지 약물은 서로 비슷한 정도의 독성을 나타내었다고 할 수 있다. 이는 *in vitro* 상태에서의 가수분해 실험의 결과에서 예상할 수 있었던 것처럼 실제 마우스에 투여했을 때 몸안의 여러가지 효소에 의해 단시간 내에 가수분해되어 5-FU로 전환되어 작용을 나타

Table V—Antitumor Activities of 1-Glycyloxymethyl-5-fluorouracil Hydrochloride and 5-Fluorouracil Against Sarcoma 180 after Intraperitoneal Injection

Compounds	Dose* (mg/kg/day)	Mean survival days**	ILS*** (%)	Antitumor activity****
1-glycyloxymethyl- 5-FU HCl	200 (102.6)	8.60±0.55	-67.95	Toxic
	100 (51.3)	16.33±9.89	-39.14	Toxic
	70 (35.9)	55.40±7.67	106.49	+++
	50 (25.6)	46.00±12.13	1.45	+++
	30 (15.4)	42.20±10.31	57.29	+++
5-FU	30	51.50±8.71	91.95	+++
	15	40.67±15.21	51.58	+++
	7	41.33±11.91	54.04	+++

*ICR mice were intraperitoneally implanted with 1×10^6 cells of sarcoma 180 and were administered intraperitoneally once daily for 7 days, starting 24 hr after transplantation. () are the dose as 5-FU

**The mice were observed until 60 days after the tumor implantation. Values are mean±S.D.

***increase in life span over controls

****Antitumor activity was graded as -: 0~9, +: 10~19, ++: 20~29, +++: 30 or more of ILS %.

내기 때문이라고 생각된다.

항암효과

*In vivo*에서 Sarcoma 180세포를 이용하여 마우스에 복수암을 유발시켜, 각각 5-FU와 GFU를 치료약물로 투여했을 때의 항암력 실험의 결과를 Table V에 나타내었으며 이때 생존일이 60일 이상인 것은 일괄적으로 60일로서 간주하여 ILS를 계산하였다.

즉 GFU는 200, 100 mg/kg의 용량에서 심한 독성이 나타났으며 70 mg/kg의 용량에서 ILS가 106.49%로 가장 크게 나타났다. 또한 이 용량에서 일반적으로 항암제의 부작용 중의 하나로 나타나는 체중감소의 현상도(data는 생략) 나타나지 않고 비교적 양호한 상태를 유지하였다. 그리고 5-FU는 30 mg/kg의 용량에서 약간의 체중감소 현상을 동반하면서 91.95%로 ILS가 가장 크게 나타난 반면, 15 mg/kg의 용량에서는 51.58%로 ILS가 감소하는 동시에 체중감소의 현상도 적었으며 두 가지 용량 모두 비교적 양호한 상태를 유지하였다.

이들의 ILS_{30%}를 계산해 보면 GFU는 19.38 mg/kg, 5-FU는 8.36 mg/kg이었고, 치료비(therapeutic ratio, ILS_{max}/ILS_{30%})는 각각 3.07 및 3.54로서 복수암에 대해 새로 합성된 약물이 약간 더 높은 치료효과를 나타낸다고 생각된다.

항암력 실험의 결과를 바탕으로 하여 이들 두 약물을 실제 치료에 적용한다고 가정할 때 적당한

용량은 5-FU의 경우 15~30 mg/kg이고, GFU는 약간 증가된 70 mg/kg(FU로서 35.9 mg)이라고 사료된다.

일반적으로 아미노산을 결합시킨 prodrug들이 독성감소와 생체이용율의 향상을 나타낸다는 보고되어 있다. 이상의 실험에서 GFU가 처음 기대했던 바와 같이 용해도와 유수분배계수가 개선되었으나 독성은 거의 감소되지 않고 비슷하게 나타났다. 따라서 이 약물은 제재개발에 의한 생체이용율의 개선에는 상당한 기대효과가 있을 것으로 사료된다.

결론

GFU를 제조, 확인하고 5-FU를 대조약물로 하여 이 약물의 *in vitro*에서의 약제학적 실험과 *in vivo*에서의 급성독성시험과 항암력 시험을 행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 유수분배계수는 GFU가 5-FU보다 높은 값을 나타내었으며 5-FU 및 GFU의 pK_a값은 각각 8.02 및 7.20이었다.

2. GFU의 가수분해반응은 pH 4.16 이하에서는 solvent catalysed reaction에 의해 일어난 반면, pH 4.16 이상에서는 specific hydroxide ion catalysed reaction에 의해 일어나고, 결과로서 parent drug인 5-FU가 정량적으로 생성되었다. 또 GFU는 랫트의 간 호모지네이트의 존재시 3분 이내에 모두 가수분해되었으며 80% 사람 혈장 존재시에는 반감기가

6.9분이었다.

3. 급성독성시험의 결과 5-FU의 LD₅₀은 240 mg/kg, GFU는 440.6 mg/kg (5-FU로서 226 mg/kg)이었다.

4. Sarcoma 180 cell을 이식한 마우스에서 항암력 실험결과 두 약물은 모두 비슷한 항암효과를 나타내었고 5-FU 및 GFU의 치료비는 각각 3.07 및 3.55이었다.

감사의 말씀

이 논문은 1991년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모 (지방대학육성)과제 학술연구조성비에 의해 연구되었다. 이에 감사드린다.

문헌

- 1) R. Duschinsky, E. Plevin and C. Heidelberger, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4559 (1957).
- 2) C. Heidelberger, N.K. Chauduri, P. Danneberg, D. Mooren, L. Griesbach, R. Duschinsky, R.J. Schnitzer, E. Plevin and J. Schliner, *Nature*, **179**, 663 (1957).
- 3) A.G. Gilman, L.S. Goodman, T.W. Rall and F. Murad, Goodman and Gilman's; The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th Ed. Macmillan Publishing Co., New York, 1268 (1985).
- 4) C.E. Meyers, R. Diasio, H.M. Eliot and B.A. Chabner, Pharmacokinetics of the fluoropyrimidines; Implications of their clinical use, *Cancer Ther. Rev.*, **3**, 175 (1976).
- 5) T.A. Philips, A. Howell, R.J. Grieve and P.G. Welling, Pharmacokinetics of oral and intravenous fluorouracil in humans, *J. Pharm. Sci.*, **69**, 1428 (1980).
- 6) S. Ozaki, Y. Watanabe, T. Hoshiko, H. Mizuno, K. Ishikawa and H. Mori, 5-Fluorouracil Derivatives. IV. Synthesis of antitumor-active acyloxyalkyl-5-fluorouracils, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 733 (1984).
- 7) T. Hoshiko, S. Ozaki, Y. Watanabe, T. Ogasawara, S. Yamauchi, K. Fujiwara, A. Hoshi and M. Iigo, 5-Fluorouracil derivatives. V. Synthesis and antitumor activities of (alkylthio)carbonyl-5-fluorouracils, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 2832 (1985).
- 8) S. Ozaki, Y. Watanabe, T. Hoshiko, T. Nagase, T. Ogasawara, H. Furukawa, A. Uemura, K. Ishikawa, H. Mori, A. Hoshi, M. Iigo and R. Tokuzen, 5-Fluorouracil derivatives. X. Synthesis and antitumor activities of α -alkoxyalkyl-5-fluorouracils, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 150 (1986).
- 9) S. Ozaki, Y. Ike, H. Mizuno, K. Ishikawa and H. Mori, 5-Fluorouracil derivatives. I. The synthesis of 1-carbamoyl-5-fluorouracils, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **50**, 2406 (1977).
- 10) S. Anmad, S. Ozaki, T. Nagase, M. Iigo, R. Tokuzen and A. Hoshi, A facile method for synthesis of N-acyloxymethyl-5-fluorouracils as a class of antitumor agents, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 4137 (1987).
- 11) H. Bundgaard, Design of Prodrugs, Elsevier Science Publishers B.V., 216 (1985).
- 12) A. Hoshi, M. Iigo, A. Nakamura, M. Inomata and K. Kuretani, Antitumor activity of 1-alkyl-carbamoyl derivatives of 5-fluorouracil against L1210 leukemia, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 161 (1978).
- 13) M. Nakanishi, I. Okuno, S. Fujisawa and M. Tanada, *Yakuri To Chiryō*, **8**, 1211 (1980).
- 14) G.W. Andeson and A.C. Macgregor, t-Butoxycarbonyl amino acid and their use in peptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 6180 (1957).
- 15) F.C. McKay and N.F. Albertson, New amine-masking groups for peptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4086 (1957).
- 16) P.K. Chakravarty, P.L. Carl, M.J. Weber and J.A. Katzenellenbogen, Plasmin-activated prodrugs for cancer chemotherapy. 1. Synthesis and biological activity of peptidylavicin and peptidylphenylenediamine mustard, *J. Med. Chem.*, **26**, 633 (1983).
- 17) P.K. Chakravarty, P.L. Carl, M.J. Weber and J.A. Katzenellenbogen, Plasmin-activated prodrugs for cancer chemotherapy. 2. Synthesis and biological activity of peptidyl derivatives of doxorubicin, *J. Med. Chem.*, **26**, 638 (1983).
- 18) H. Bundgaard, C. Larsen and P. Thorbek, Prodrugs as drug delivery system XXVI. preparation and enzymatic hydrolysis of various water-soluble amino acid esters of metronidazole, *Int. J. Pharma.*, **18**, 67 (1984).

- 19) K. Kakemi, T. Arita, R. Hori and R. Konishi, Absorption and excretion of drugs. XXX. Absorption of barbituric acid derivatives from rat stomach, *Chem. Pharm. Bull.*, **15**, 1534 (1967).
- 20) J. Hasegawa, T. Fujita, Y. Hayashi, K. Iwamoto and J. Watanabe, pK_a determination of verapamil by lipid-lipid partition, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 442 (1984).
- 21) H. Sasaki, T. Takahashi, J. Nakamura, R. Konishi and J. Shibasaki, Intestinal absorption of 5-fluorouracil and its alkylcarbamoyl derivatives in the rat small intestine, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 676 (1986).
- 22) A. Buur and H. Bundgaard, Prodrugs of 5-fluorouracil. I. Hydrolysis kinetics and physicochemical properties of various N-acyl derivatives of 5-fluorouracil, *Int. J. Pharm.*, **21**, 349 (1984).
- 23) A. Buur and H. Bundgaard, Prodrugs of 5-fluorouracil II. Hydrolysis kinetics, bioactivation, solubility and lipophilicity of N-alkoxycarbonyl derivatives of 5-fluorouracil, *Arch. Pharm. Chem. Sci. Ed.*, **12**, 37 (1984).
- 24) A. Buur and H. Bundgaard, Prodrugs of 5-fluorouracil. III. Hydrolysis kinetics in aqueous solution and biological media, lipophilicity and solubility of various 1-carbamoyl derivatives of 5-fluorouracil, *Int. J. Pharm.*, **23**, 209 (1985).
- 25) A. Buur and H. Bundgaard, Prodrugs of 5-fluorouracil. V. 1-Alkoxycarbonyl derivatives as potential prodrug forms for improved rectal or oral delivery of 5-fluorouracil, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 522 (1986).
- 26) J. Graham, Isolation of subcellular organelles and membranes, In: Rickwood D. (EDS.), *Centrifugation; A Practical Approach*, IRL Press Ltd., Eynsham, 165 (1984).
- 27) P.S. Thayer, P. Himmerfarb and G.L. Watta, Cytotoxicity assays with L1210 cells *in vitro*. comparison with L1210 *in vivo* and KB cells *in vitro*, *Cancer Chemother. Rep. Part 2*, **1** (1971).
- 28) W.H. Lee, J.B. Kim, U.K. Jee and B.T. Rhyu: Pharmaceutical study on ketoprofen lysinate, *J. Korean Pharm. Sci.*, **12**, 37 (1982).
- 29) J.T. Litchfield and F. Wilcoxon, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, **96**, 99 (1949).
- 30) J. Yamashita, I. Yamawaki, S. Ueda, M. Yasumoto, etc., Studies on antitumor agents V. Synthesis and antitumor activities of 5-fluorouracil derivatives, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 4258 (1982).
- 31) M. Yasumoto, I. Yamawaki, T. Marunaka and S. Hashimoto, Studies on antitumor agents. 2. Syntheses and antitumor activities of 1-(tetrahydro-2-furanyl)-5-fluorouracil and 1,3-bis(tetrahydro-2-furanyl)-5-fluorouracil, *J. Med. Chem.*, **21**, 738 (1978).
- 32) M. Kurono, Y. Sakai, H. Yokohama, T. Chiba and S. Fujii, *Ono Pharm. Inc. Japan Patent Open*, 53-31674 (1978).
- 33) S. Ueda, S. Takeda, I. Yamawaki, J. Yamashita, M. Yasumoto and S. Hashimoto, Studies on antitumor activities of compound related to 1-(tetrahydro-2-furanyl)-5-fluorouracil metabolites, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 125 (1982).
- 34) A. Hoshi, M. Nakamura and K. Kuretani, Antitumor activity of benzoyl and benzenesulfonyl derivatives of 5-fluorouracil, *Gann*, **65**, 463 (1974).
- 35) A. Hoshi, M. Nakamura and K. Kuretani, Antitumor activity of carbamoyl derivatives of 5-fluorouracil by oral administration, *Gann*, **66**, 673 (1975).