

5-플루오로우라실 프로드럭의 제조, 물리화학적 성질 및 항암효과

지용길* · 이계원

(충남대학교 약학대학)

(Received February 8, 1996)

Synthesis, Physicochemical Properties and Antitumor Activity of 5-Fluorouracil Prodrugs

Ung Kil Jee* and Gye Won Lee

College of Pharmacy, Chungnam University, Taejon 305-764, Korea

Abstract—To assess their stability as a prodrug of 5-fluorouracil (5-FU), four *N*-acyloxycarbonyl derivatives (1-(*N*-tert-butyloxycarbonyl)glycyloxymethyl-5-FU : BGFU, 1-(*N*-tert-butyloxycarbonyl)-leucyloxymethyl-5-FU : BLFU, 1-(*N*-tert-carbobenzoyloxymethyl)glycyloxymethyl-5-FU : CGFU and 1-(*N*-tert-carbobenzoyloxymethyl)leucyloxymethyl-5-FU : CLFU) possessing differently protected amino acids, and two acetic acid derivatives (5-FU-1-acetylhexane : FUAP and 5-FU-1-acetylhexane : FUAH) were synthesized and their physicochemical properties, hydrolysis kinetics, acute toxicity and antitumor activity were evaluated. The lipid-water partition coefficients of six 5-FU prodrugs were higher than that of 5-FU and their aqueous solubilities were in the following rank order: BGFU>FUAP>CGFU>BLFU>CLFU>FUAH. The hydrolysis of *N*-acyloxycarbonyl derivatives, greater at higher pH, was enhanced in presence of liver homogenate or human plasma. Meanwhile, acetic acid ester derivatives, very stable, were hydrolyzed by liver homogenate. Absorption rate constants were 0.181, 0.121, 0.111, 0.168, 0.168, 0.116 and 0.125 hr⁻¹ for 5-FU, BGFU, BLFU, CGFU, CLFU, FUAP and FUAH, respectively. The cytotoxicity of *N*-acyloxycarbonyl derivatives was 4 to 5 times lower than that of 5-FU, but that of acetic acid ester derivatives was negligible. The LD₅₀ values were 204, 325.97 (133.59, amount as 5-FU), 708.16 (262.13), 663.50 (211.77), 382.33 (192.54) and 272.33 (130.09) mg/kg for 5-FU, BGFU, CGFU, CLFU, FUAP and FUAH, respectively. While *N*-acyloxycarbonyl derivatives showed enhanced antitumor activity and therapeutic ratio (3.30, 3.06, 4.19, 3.11 and 1.81 for BGFU, BLFU, CGFU, CLFU and 5-FU, respectively), FUAH and FUAP showed a smaller therapeutic ratio (0.79 and 0.83).

Keywords □ 5-FU, 5-FU prodrugs, pKa, LD₅₀, cytotoxicity, partition coefficient, hydrolysis, antitumor activity, therapeutic ratio, solubility.

5-Fluorouracil(이하 5-FU로 약함)은 uracil 유도체로서 세포내에서 thymidylate synthetase를 억제하여 DNA합성을 저해하거나¹⁾ RNA내에 삽입되어 정상적인 RNA 형성을 억제하여 세포의 증식을 억제하거나 죽이는 것으로 알려져 있다.²⁾

일반적으로 5-FU는 경구투여시 위장관과 간에서 현

저한 초회통과대사를 받아 dihydro-5-FU를 형성하며 유수분배계수가 적어 (octanol/water=0.15) 불완전한 흡수와 다양한 생체이용율을 나타내므로 경구 투여 방법은 부적당한 것으로 보고되고 있다. 임상적으로는 정맥 주사로 연용투여하게 되는데 이 때 암세포에 대한 선택성이 없으므로 골수 억제 작용과 위장관 점막염 등의 심한 독성의 문제점이 발생할 수 있다.³⁾

따라서 이러한 독성과 약물의 전달을 개선하기 위하여 프로드럭화 기법을 이용한 많은 연구가 이루어져

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 042-821-5934 (팩스) 042-821-5903

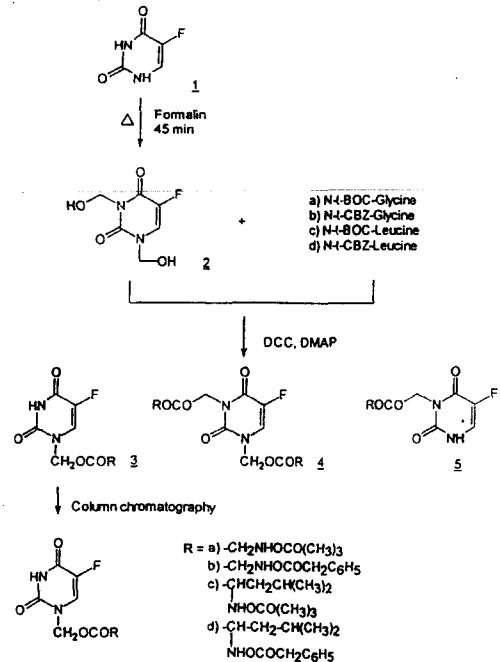
러 가지 유도체들이 합성되어 약리활성 및 독성에 대한 보고가 있다.⁴⁻¹¹⁾ 이들 중 1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil 및 1-hexylcarbonyl-5-fluorouracil은 프로드럭으로 개발되어 결장, 직장, 폐 등의 여러가지 암의 치료제로 사용되고 있지만 여전히 이 약물들은 열민감증이나 빈뇨증 같은 부작용을 나타내고 있으므로¹²⁾ 이들의 이성체 및 대사체들에 대한 연구가 활발히 이루어져 왔다.¹⁰⁻¹²⁾

또한 일반적으로 아미노산은 암세포로의 uptake에 영향을 미쳐 부작용을 감소시키는 경향이 있으므로 이미 daunorubicin과 metronidazole에 아미노산을 펩티드와 에스테르 결합시켜 가능성 있는 결과를 얻은 바 있다.^{13,14)} 또한 5-FU의 아미노산을 결합시킨 프로드럭에 관한 연구로서 N-1에 glycine을 에스테르 결합시켜 유수분배계수와 생체이용률이 향상된 결과를 보고한 바 있으며¹⁵⁾ N-1 위치에 아미노산의 dipeptide로 이루어진 유도체를 합성하여 *Escherichia Coli*와 *Candida Albicans*같은 미생물에 특이적으로 cell uptake된다는 보고가 있었다.¹⁶⁾

이 연구에서는 5-FU의 프로드럭으로서 N-1 위치에 아미노기가 보호된 아미노산이 에스테르 결합으로 이루어진 BGFU, BLFU, CGFU 및 CLFU의 4가지 N-acyloxycarbonyl 유도체와 FUAP와 FUAH의 2가지 acetic acid ester 유도체를 합성하여 확인하였다. 또한 이들 물질의 유수분배계수, pKa, 용해도 및 안정성 실험을 실시하고 급성 독성 실험, 세포 독성 실험, *in situ* 환류장관 흡수 실험 및 Sarcoma 180에 대한 항암력 실험 등을 수행하였다.

실험 방법

시약 및 기기 - 5-Fluorouracil은 Cosmos사, N_α-t-butylloxycarbonylglycine, N_α-t-butylloxycarbonylleucine, N_α-t-carbobenzyloxymethylglycine, N_α-t-carbobenzyloxymethylleucine, NaHCO₃, HCl, Penicillin (10만 units/l) 및 Streptomycin (0.1 g/l)은 Sigma사, N,N-dicyclohexylcarbodiimide와 N,N-dimethylaminopyridine은 Aldrich사 그리고 Horse serum과 Fischer's media powder는 Gibco사에서 구입하여 사용하였다. 또한 TLC plate GF₂₅₄, Silicagel (230~400 mesh)을 Merck사 그리고 기타 시약 및 용매는 일급 또는 특급을 사용하였다.



Scheme 1—Syntheses of N-acyloxycarbonyl derivatives of 5-fluorouracil.

기기는 적외분광광도계 (JASCO Report-100, JASCO, Japan), 핵자기공명측정장치 (JNM-EX 90, JEOL, Japan), 자외/가시부 분광광도계 (UVIKON 860, Kontron, Switzerland), 액체크로마토그래프 (SPD 10A UV-Vis Detector, LC-10AD Liquid Chromatograph, C-R6A Chromatopac, Shimadzu, Japan), 미량원심분리기 (Vision, VS-15000, Korea), 용점 측정기 (Electrothermal 9100, Germany), 냉동 원심분리기 (Mse Scientific Instruments), 감압 농축기 (Rotavapor R 110, Büchi, Germany) 및 micro tubing pump (동경 이화학, Japan) 등을 사용하였다.

5-FU 프로드럭의 제조 및 확인

N-acyloxycarbonyl 유도체의 합성 (Scheme 1)

1-(N-tert-butylloxycarbonyl)glycyloxymethyl-5-fluorouracil (BGFU, 3a)의 제조 - Ozaki 등¹¹⁾의 방법에 따라 5-FU 6.5 g (50 mmol)과 포르말린 8.9 g (110 mmol)을 55~60°C에서 45분간 교반했다. 반응 후, 생성된 미량의 물을 감압농축 제거시켜 점성이 있는 물질인 1,3-bis(hydroxymethyl)-5-FU를 얻었다. 이를 N,N-dimethylformamide (DMF)와 아세

토니트릴의 혼합액 (1 : 1) 150 ml에 용해시키고 여기에 BOC-glycine 10.5 g (60 mmol), DCC 12.35 g (60 mmol) 및 촉매제인 DMAP를 넣고 실온에서 4시간 교반하면서 반응시킨 후, 생성된 dicyclohexylurea (DCU, mp 223~224°C)을 여과하고 염화메틸렌으로 세척했다. 얻어진 염화메틸렌 층을 1N HCl, 5% NaHCO₃ 및 포화 식염수 50 ml로 차례로 세번씩 세척해 주었다. 이를 무수 황산나트륨으로 물을 제거한 다음 염화메틸렌을 증류하여 얻어진 잔사를 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 점조성의 BGFU를 분리하였다. 이 물질을 초산 에칠-석유에틸-에테를 사용하여 결정으로 얻었다 (23.86%). 이때 사용하는 조건은 다음과 같다.

충전물질 : 실리카겔 (particle size 0.04~0.063 mm, 230~400 mesh)

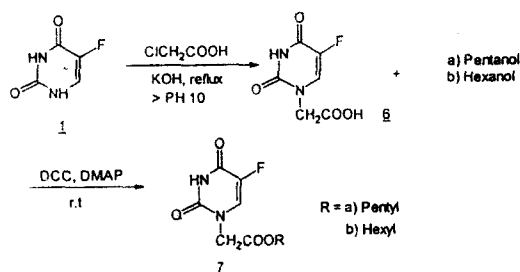
전개용매 : 염화메틸렌 : 메탄올 (20 : 1)

Rf=0.25 (염화메틸렌 : 메탄올=20 : 1, 닌히드린 시약), mp : 139.5~141°C, IR (KBr, cm⁻¹) : 3450, 3025, 1700, 1510, 1259, 780, ¹H-NMR (CDCl₃, ppm) : δ 1.52 (m, 9H, -C(CH₃)₃), 3.96 (d, J=5.9 Hz, 2H, CO-CH₂), 5.69 (s, 2H, N-CH₂), 7.59 (d, J=5.5 Hz, 1H, C₆-H), ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm) : δ 27.82, 69.81, 126.91, 128.43, 134.46, 144.99, 149.05, 155.52, 156.59, 157.76, 170.23

1-(N-tert-carbobenzyloxymethyl)glycyloxymethyl-5-fluorouracil (CGFU, 3b)의 제조 - 1,3-bis(hydroxymethyl)-5-FU를 CBZ-glycine과 BGFU와 같은 조건으로 반응시켜 백색 결정의 CGFU를 얻었다 (29.31%).

Rf=0.33 (염화메틸렌 : 메탄올=20 : 1, 닌히드린 시약), mp : 124~125.5°C, IR (KBr, cm⁻¹) : 3400, 3150, 3025, 1760, 1700, 1510, 780, ¹H-NMR (DMSO-d₆ + CDCl₃, ppm) : δ 3.91 (d, J=6.2 Hz, 2H, OCO-CH₂), 5.03 (s, 2H, C₆H₅CH₂), 5.58 (s, 2H, OCOCH₂), 7.26 (s, 5H, aromatic ring), 7.50 (d, J=5.6 Hz, 1H, C₆-H), ¹³C-NMR (DMSO-d₆, ppm) : δ 47.21, 65.78, 71.01, 128.01, 129.04, 129.11, 130.12, 134.92, 138.26, 145.47, 149.27, 156.72, 157.23, 157.92, 169.12

1-(N-tert-butylxycarbonyl)leucyloxymethyl-5-fluorouracil (BLFU, 3c)의 제조 - 1,3-bis(hydroxymethyl)-5-FU를 BOC-leucine과 BGFU와 같은 조건



Scheme II—Syntheses of acetic acid ester derivatives of 5-fluorouracil.

으로 반응시켜 점조성의 BLFU를 얻었다 (50.21%).

Rf=0.42 (염화메틸렌 : 메탄올=20 : 1, 닌히드린 시약), ¹H-NMR (CDCl₃, ppm) : δ 1.36 (m, 18H, -CH₂CH(CH₃)₂, -COOC(CH₃)₂), 4.26 (brs, 1H, OCO-CH), 5.84 (s, 2H, N-CH₂), 7.72 (d, J=5.6 Hz, 1H, C₆-H), ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm) : δ 21.17, 22.43, 24.34, 27.83, 31.14, 36.18, 40.24, 51.93, 70.01, 127.36, 128.88, 134.58, 145.17, 149.14, 156.60, 157.76, 162.59, 173.27

1-(N-tert-carbobenzyloxymethyl)leucyloxymethyl-5-fluorouracil (CLFU, 3d)의 제조 - 1,3-bis(hydroxymethyl)-5-FU를 CBZ-leucine과 BGFU와 같은 조건으로 반응시켜 백색 결정의 CLFU를 얻었다 (49.10%).

Rf=0.50 (염화메틸렌 : 메탄올=20 : 1, 닌히드린 시약), mp : 79.6~81.4°C, IR (KBr, cm⁻¹) : 3350, 3250, 3060, 1710, 1525, 1259, 785, ¹H-NMR (CDCl₃, ppm) : δ 1.28 (m, 9H, -CH₂CH(CH₃)₂), 4.00 (brs, 1H, OCO-CH), 5.10 (s, 2H, CH₂C₆H₅), 5.66 (s, 2H, N-CH₂OCO), 7.34 (s, 5H, aromatic ring), 7.57 (d, J=5.8 Hz, 1H, C₆-H), ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm) : δ 21.52, 23.01, 25.41, 41.05, 52.81, 67.74, 70.82, 128.02, 128.32, 128.41, 129.22, 135.23, 136.54, 145.95, 149.51, 156.25, 156.95, 157.95, 175.35

FUAA 유도체의 합성 (Scheme II)

5-Fluorouracil-1-acetic acid (FUAA, 6)의 제조 - Tada의 방법¹⁷⁾에 따라 5-FU 1.3 g (10 mmol)을 7.5 ml의 물에 수산화칼륨 1.12 g (20 mmol)을 용해시킨 용액에 가하여 용해시킨 다음 여기에 chloroacetic acid 0.95 g (10 mmol)을 물 4 ml에 용해시킨 용액을

실온에서 천천히 적가해 주었다. 그리고 수산화칼륨 용액으로 pH를 10이상으로 유지시키며 하룻밤 동안 환류시킨 다음 냉각하여 진한 염산으로 pH 2로 조절하여 24시간 동안 냉장 방치하여 얻어진 침상의 결정을 여과하고 차가운 물로 세척하여 주었다 (59.41%).

Rf=0 (클로로포름 : 메탄올=9 : 1), mp : 276~277°C, IR (KBr, cm⁻¹) : 3000, 1650, 1400, 1250, ¹H-NMR (DMSO-d₆, ppm) : δ 4.45 (s, 2H, N-CH₂), 8.09 (d, 1H, C₆-H)

5-Fluorouracil-1-acetylpentane (FUAP, 7a)의 제조

FUAA 1.88 g (10 mmol)과 펜탄올 1.06 g (12 mmol)을 DMF 15 ml에 용해시키고 여기에 DCC 2.47 g (12 mmol)과 촉매제인 DMAP를 가해서 냉소에서 2시간 교반하면서 반응액에 초산에칠을 가하여 생성된 DCU를 여과 제거한 다음 여액을 1N-HCl, 5% NaHCO₃ 및 포화 식염수로 각각 세번씩 수세하여 미량의 DMF를 제거하였다. 무수 황산나트륨으로 탈수하여 모액을 증류 제거하고 얻어진 고형 물질을 에틸, 석유에텔로 여러번 세척, 건조하여 백색 분말의 FUAP를 얻었다(75.92%).

Rf=0.48(클로로포름 : 메탄올=9 : 1), mp : 120~122.9°C, IR (KBr, cm⁻¹) : 3160, 3020, 1700, 795, ¹H-NMR (CDCl₃, ppm) : δ 1.37 (m, 9H, -(CH₂)₃CH₃), 4.27 (t, J=13.1 Hz, 2H, -COOCH₂), 4.51 (s, 2H, N-CH₂), 7.32 (d, J=1.8 Hz, 1H, C₆-H), ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm) : δ 13.81, 22.16, 27.83, 30.69, 48.77, 66.49, 127.89, 129.42, 135.20, 145.82, 149.67, 156.68, 157.85, 167.16

5-Fluorouracil-1-acetylhexane (FUAH, 7b)의 제조

FUAA 1.88 g (10 mmol)과 헥산을 1.23 g (12 mmol)을 FUAP와 같은 조건으로 반응시켜 백색 분말의 FUAH를 얻었다(66.13%).

Rf=0.41 (클로로포름 : 메탄올=9 : 1), mp : 99~101.4°C, IR (KBr, cm⁻¹) : 3160, 3020, 1700, 795, ¹H-NMR (CDCl₃, ppm) : δ 1.31 (m, 11H, -(CH₂)₄CH₃), 4.27 (t, J=13.1 Hz, 2H, -COOCH₂), 4.52 (s, 2H, N-CH₂), 7.33 (d, J=1.1 Hz, 1H, C₆-H), ¹³C-NMR (DMSO-d₆, ppm) : δ 13.72, 21.92, 24.85, 30.10, 30.75, 48.62, 65.09, 129.45, 130.97, 134.28, 144.48, 149.62, 156.81, 157.94, 167.79

5-FU 및 5-FU 프로드러의 물리 화학적 성질

유수분배계수 - 유상은 n-옥탄올과 클로로포름을, 수상은 0.02 M의 pH 4.0 초산염 완충 용액과 pH 7.4 인산염 완충 용액을 사용하였다.

Kakemi 등¹⁸⁾의 방법에 따라 약물을 수상에 1×10⁻⁴ M로 용해시킨 수상 10 ml와 유상 10 ml를 넣어 37±0.5°C에서 1시간 동안 200 rpm으로 진탕시킨 후 1시간 동안 방치하였다. 수상을 분취하여 각각의 흡수 극대 파장 (BGFU, BLFU, CGFU 및 CLFU : 273 nm, FUAP, FUAH : 278 nm)에서 흡광도를 측정하여 다음 식에 따라 유수분배계수 (K_{o/w})를 계산하였다.

$$K_{o/w} = \frac{C_o - C_e}{C_e} = \frac{A_o - A_e}{A_e}$$

C_o : Initial drug concentration in the water phase

C_e : Equilibrium drug concentration in the water phase

A_o : Initial absorbance of the water phase

A_e : Absorbance of the water phase at the equilibrium

pKa 측정 - Hasegawa 등¹⁹⁾의 liquid-liquid partition 방법에 따라 약물을 1×10⁻⁴ M로 용해시킨 0.02 M pH 4.0과 7.4 완충 용액 10 ml와 n-옥탄올 10 ml를 넣어 마개달린 시험관에 넣고 37±0.5°C에서 1시간 동안 200 rpm으로 진탕시켜 평형에 도달시킨 후 1시간 동안 방치하였다. 수상을 분취하여 각각의 흡수 극대 파장에서 흡광도를 측정하여 다음 식에 따라 pKa를 계산하였다.

$$pKa = pH + \frac{P_{app}}{P_m - P_{app}}$$

P_{app} : Apparent partition coefficient

P_m : True partition coefficient

위의 식에서 pH 4.0 완충 용액을 수상으로 사용한 것으로부터 P_m값을 얻고 pH 7.4 완충 용액을 수상으로 사용한 것으로부터 P_{app}값을 얻어 식에 적용하여 계산하였다.

친유성 계수 (Lipophilic Index, Log k')의 측정²⁰⁾ - 각 약물을 이동상으로 사용한 메탄올 : 물 (50 : 50)에 1×10⁻⁴ M의 농도로 용해하여 HPLC로 분석하여 다음과

같은 식에 의하여 lipophilic index ($\log k'$)를 구했다. 이 때 컬럼은 Novapak C₁₈ 컬럼 (3.9×150 mm, particle size : 4 μm), 유속은 1.0 ml/min, 컬럼 온도는 실온에서, 시료 주입량은 20 μl로 하여 266 nm에서 측정하였다.

$$\log k' = \log \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

t_R : Retention time of a retained peak

t_0 : Retention time of an unretained peak

용해도 - 일정 과량의 5-FU (100 mg)와 각 프로드럭 (20 mg)을 각각 취하여 물 10 ml에 넣고 25±0.1°C의 온도에서 24시간 동안 170 rpm으로 진탕시켜 용액 3 ml를 취하여 0.45 μm 막 여과기로 여과했다. 이 여액 100 μl를 취하여 적당한 농도로 희석하여 흡수 극대 파장에서 흡광도를 측정하여 미리 얻어진 검량선 식 ($r=0.9998\sim0.9999$)에 따라 약물의 용해량을 계산하였다.

가수분해 실험²¹⁻²³⁾

pH의 변화에 의한 가수분해 - Bundgaard 등²¹⁾의 실험 방법에 따라 모든 완충액에서의 가수분해 실험은 전체 완충액의 농도를 0.05 M로, 이온 강도 (ionic strength, μ)는 KCl를 첨가하여 0.5로 일정하게 유지하면서 초산염 (pH 4.0), 인산염 (pH 6.4와 7.8) 및 0.9% NaCl 용액 (생리식염수)에서 3회씩 실시하였다. 이때 각 약물 정량시 컬럼은 Novapak C₁₈ 컬럼 (3.9×150 mm, particle size : 4 μm), 유속은 1.0 ml/min, 컬럼 온도는 실온에서, 측정 파장은 266 nm에서, 그리고 시료 주입량은 20 μl이었으며 이동상 조건은 BGFU, CGFU 및 FUAP는 메탄올 : 물 (45 : 55)을 그리고 BLFU, CLFU 및 FUAH는 메탄올 : 물 (55 : 45)이었으며 pH의 변화에 따라 메탄올의 첨가량을 약간 달리하여 실험하였다. 그리고 각각의 겔보기 1차 속도 정수 (pseudo first-order rate constant)는 분해되지 않고 남아 있는 프로드럭 각각의 양을 시간에 대해 semilog plot한 그래프의 기울기로부터 얻었다.

1×10⁻⁴ M 농도의 각 반응액을 10 ml씩 마개달린 시험관에 취해 37±0.5°C로 일정하게 유지되는 수욕상에서 반응시키면서 정해진 시간 간격으로 시료를 취하여 직접 HPLC로 정량하였다. 이들의 피크 높이 또는 면적을 측정하여 똑같은 조건으로 하여 얻은 표준액의 피

크와 비교하여 가수분해되지 않고 남아 있는 약물의 양을 구했다.

사람 혈장에서의 가수분해 - 모든 실험은 pH의 변화에 의한 가수분해와 동일한 HPLC 법에 의해 3회씩 실시하였으며 사람 혈장은 O형의 것을 사용하여 pH 7.4 인산염 완충 용액에서 가수분해 속도의 변화와 비교하였다. 그리고 겔보기 1차 속도정수는 남아 있는 약물 양을 시간에 대하여 semilog plot한 그래프의 기울기로부터 얻었다.

pH 7.4 인산염 완충액과 80% 사람 혈장 용액을 각각 마개달린 시험관에 10 ml 취한 후, 각 약물의 표준 시료 원액 300 μl를 첨가하여 약 3×10⁻⁴ M의 농도로 하였다. 수욕상에서 온도를 일정하게 유지시키고 용액을 정해진 시간 간격으로 취하여 HPLC로 직접 정량하여 가수분해되지 않고 남아 있는 약물의 양을 구했다. 이때 사람 혈장 용액은 200 μl를 원심분리관에 넣고 1000 μl의 에탄올을 첨가하여 단백질을 제거한 다음, vortex mixer로 서로 혼합해서 15,000rpm으로 2분 동안 원심 분리하고 상정액을 취하여 HPLC로 직접 정량하였다.

원취의 간 호모지네이트에서의 가수분해 - Graham²⁴⁾의 방법에 따라 간 호모지네이트를 제조하였으며 모든 조작은 0~5°C에서 실시하였다. 즉 Sprague-Dawley계 원취의 간을 취하여 차가운 생리 식염수로 세척하고 여지로 탈수시켜 칭량하였다. 칭량한 후 가위로 잘게 썰어 5배 용량의 0.05 M 인산염 완충액 (pH 7.4)으로 희석하여 초음파 조직 연마기로 균질화하였다. 호모지네이트를 6,000 rpm으로 30분 동안 원심 분리하여 상정액을 얻었다. 이 중 10 ml를 취하여 사람혈장에서와 같은 방법으로 실시하여 가수분해 되지 않고 남아 있는 약물의 양을 구했다.

L1210 세포에 대한 세포 독성 실험 - 배양액은 냉장고 (4~6°C)에 보관하면서 일주일 이내에 사용하였으며 L1210 세포는 37°C의 CO₂ 배양기 (CO₂ 5%)로 1주일에 두 번 계대 배양하였다.

실험하기 전에 dimethylsulfoxide (DMSO)로 일정 농도로 제조된 시료용액을 함유하는 실험관과 세포 현탁액의 대조군 (2√n : n = 시료수)을 37°C, CO₂ 배양기에서 48시간 배양하여 haemocytometer를 사용하여 세포수를 계산하였다.

ED₅₀값은 대조군의 50% 수준으로 L1210 세포의 성장을 억제하는 시료의 농도 (μg/ml)로 주어지며 여기

에서는 미국립 암연구소 (NCI, National Cancer Institute, USA) manual의 방법²⁵⁾에 의해 결정하였다. 시험군의 각 농도에 대한 성장율 Y (%)는 다음과 같이 계산하였다.

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

여기에서 T=시험군의 48시간 배양후 평균 세포수 (cells/ml)

C=대조군의 48시간 배양후 평균 세포수 (cells/ml)

C₀=배양 시작시 평균 세포수 (cells/ml)

각각 농도의 Y (%)값과 Log₁₀ dose를 도식화하고 회귀선 Y=A+BX를 얻었으며 회귀선의 기울기와 절편으로부터 ED₅₀값을 계산하였다. 이 때 각각의 농도에 대하여 계산한 Y (%)값이 55%보다 크거나, 45%보다 작으면 재실험을 실시하였다.

NCI manual에 따르면 L1210 세포에 대한 세포 독성 평가는 식물 추출물인 경우 20 µg/ml 이하, 합성물인 경우 4 µg/ml 이하일 경우 항암 작용이 있다고 규정하고 있다.

급성 독성 실험^{26, 27)} - 7군으로 나누어 생쥐를 각군 7마리씩으로 하여 5-FU는 200, 250, 300, 350, 400, 450 및 500 mg/kg, BGFU, CGFU 및 CLFU는 500, 600, 700, 800, 900, 1000 및 1100 mg/kg, FUAP는 300, 350, 400, 450, 500, 550 및 600 mg/kg 그리고 FUAH는 150, 200, 250, 300, 350, 400 및 450 mg/kg을 각각 5% 아라비아고무 용액에 균등히 현탁시키거나 용해시켜 0.1 ml/10 g씩 복강내에 주사했다. 그리고 액상 물질인 BLFU는 200, 300, 400, 500, 600 및 700 mg/kg을 50% 프로필렌글리콜을 사용하여 약간 가운 하면서 초음파 처리하여 용해시켜 바로 투여하였으며 대조군으로 50% 프로필렌글리콜만을 투여하였다. 약물을 투여한 후 2주 동안 관찰하여 죽은 동물수를 가지고 Litchfield & Wilcoxon 방법²⁷⁾에 의하여 LD₅₀값을 산출하였다.

In Situ 환류 장관 흡수 실험^{28, 29)} - Sprague-Dawley계 흰쥐를 12% 우레탄으로 10 ml/kg 단위로 복강 주사하여 마취시키고 고정대에 배워 고정한 다음 복부의 중앙선을 개복하여 십이지장 상부에 실리콘 튜브를 꽂고 묶었다. 회장 말단에 실리콘 튜브를 삽입하여 37°C의 생리식염수로 20분 동안 5 ml/min의 속도로 환류시켜 소장의 내용물을 완전히 세척해 주고 다시

Schanker 완충액 (pH 7.2)으로 30분 동안 환류시켰다. 15 µg/ml의 페놀 레드 50 ml를 5 ml/min의 속도로 환류시키면서 0, 30 및 60분마다 환류액 2 ml를 취하고 즉시 같은 양의 Schanker 완충액으로 보충해 주었다. 취한 환류액을 0.45 µm 막 여과기로 여과한 다음 여액 1 ml에 1N-NaOH 용액 3 ml를 가하여 알칼리성으로 한 것을 570 nm에서 흡광도를 측정하여 장관내 수분 이동에 의한 희석율을 보정하는 수치로 사용하였다.

다시 Schanker 완충액으로 30분간 환류시킨 다음 1% 메탄올 함유 약물 용액(5-FU로서 50 µg/ml) 50 ml를 37°C에서 5 ml/min의 속도로 환류시키면서 0, 30, 60, 90 및 120분마다 2 ml씩 취하고 즉시 같은 양의 완충액으로 보충하여 주었다. 취한 환류액을 여과하여 여액 1 ml에 Schanker 완충액 2 ml를 가하여 각 약물의 흡수 극대 파장에서 흡광도를 측정하여 다음 식으로 잔존율을 계산하였다.

$$\begin{aligned} \text{잔존율}(\%) &= 100 \times \frac{C_{Dt}}{C_{D0}} \times \frac{C_0}{C_t} \\ &= 100 \times \frac{A_{Dt}}{A_{D0}} \times \frac{A_{t0}}{A_{t1}} \end{aligned}$$

$$\text{흡수율}(\%) = 100 - \text{잔존율}(\%)$$

C_{Dt}, C_{D0}: 측정시간 0과 t에서의 약물 농도

C_{t0}, C_{t1}: 측정시간 0과 t에서의 phenol red 농도

A_{Dt}, A_{D0}: 측정시간 0과 t에서의 약물 흡광도

A_{t0}, A_{t1}: 측정시간 0과 t에서의 phenol red 흡광도

In vivo 항암력 실험^{6, 7, 30)} - Sarcoma 180 세포 부유액을 웅성 ICR계 생쥐 (20~25 g)의 복강내에 0.1 ml (10⁶ cells/mouse)씩 이식하여 복수암을 유발하였다. 이식 후 24시간이 지난 다음부터 각 군을 6마리로 하여 하루에 1회 7일간 연속하여 약물을 복강내에 주사했다. 이때 2군의 대조군에는 5% 아라비아고무 용액과 50% 폴리에틸렌글리콜 400 (PEG 400) 용액을 주사하였으며 각 약물의 농도는 다음과 같이 하여 5% 아라비아고무 용액에 현탁시키거나 50% PEG 400 용액에 용해시켜 0.1 ml/10 g으로 주사하였다. 즉 5-FU는 50, 30 및 15 mg/kg/day, BGFU, CGFU, BLFU 및 CLFU는 200, 100, 70, 50 및 30 mg/kg/day 그리고 FUAP와 FUAH는 100, 70, 50, 30 및 15 mg/kg/day의 농도로

Table I—Lipid-water partition partition coefficients, pKa values and melting point of 5-fluorouracil and synthesized 5-fluorouracil derivatives (Mean±S.D., n=5)

Compound	n-Octanol		Chloroform		pKa	Melting point (°C)
	pH 4.0	pH 7.4	pH 4.0	pH 7.4		
5-FU	0.13±0.05	0.10±0.12	0.03±0.05	0.01±0.45	8.02±0.88	282~284
BGFU	1.07±0.05	0.74±0.04	1.42±0.07	0.67±0.02	7.74±0.07	139.5~141
BLFU	17.15±2.64	6.89±1.12	15.12±3.66	6.77±1.30	7.24±0.16	- ^a
CGFU	2.65±0.08	2.09±0.10	3.09±0.19	1.74±0.10	7.90±0.19	124~125.5
CLFU	15.61±1.70	9.68±2.00	21.47±4.43	7.66±0.96	7.90±0.10	79.6~81.4
FUAP	13.20±2.30	10.34±2.50	28.76±1.45	31.99±5.85	7.95±0.18	120~122.9
FUAH	31.70±4.86	15.94±5.06	7.77±3.17	14.60±3.26	7.41±0.28	99~101.4

a: Can not be measured because it is viscous compound

주사하였다.

생쥐를 60일까지 관찰하여 다음과 같은 식을 사용하여 생존비 (T/C %)와 % 생명연장기간 (increase life span, ILS %)을 계산하였다.

$$\text{생존비}(\%) = \frac{T}{C} \times 100$$

$$\text{ILS}(\%) = \frac{T}{C}(\%) - 100$$

여기에서 T = 처치군의 평균 생존일수

C = 대조군의 평균 생존일수

또한 치료 계수(therapeutic ratio)는 다음식으로 계산하였다.

$$\text{Therapeutic Ratio} = \frac{\text{ILS}_{\max}}{\text{ILS}_{30\%}}$$

여기에서 ILS_{\max} = 최대의 % 생명연장기간을 나타내는 용량

$\text{ILS}_{30\%}$ = 30%의 생명연장기간을 나타내는 용량

$\text{ILS}_{30\%}$ 는 각 용량과 % 생명연장기간을 이용하여 구하였다.

결과 및 고찰

5-FU 프로드럭의 제조 - 5-FU의 N-1 위치에 acyl 또는 alkoxy group이 직접 도입되면 이미 보고되었던 바와 같이 상대적으로 불안정하여 쉽게 모약물로 전환되기 때문에 N-1 위치에 -OH 또는 -COOH 기를 도입시켜 아미노산이나 알코올과 반응하여 에스테르 결합을 형성하기 위하여 두가지 경로로 합성하였다.

즉 첫번째 경로는 5-FU에 포르말린 처리를 하여 N의 1과 3 위치에 hydroxymethyl기가 모두 도입된 1,3-bis(hydroxymethyl)-5-FU를 얻었다. 이 때 60°C 이상에서는 물질이 증발되거나 다시 5-FU로 분해되는 경향이 있으므로 주의해야 한다.

또한 아미노산은 zwitter ion 형태를 이루고 있으며 대부분의 유기 용매에 대한 용해도가 낮기 때문에 아미노산 자체로는 반응을 하기가 어렵고 에스테르나 아미드 결합으로 5-FU의 N-1 위치에 치환시킨다 하더라도 목적에 맞는 물질을 얻기가 힘들었다. 따라서 아미노산의 아미노기를 기존에 보고된 방법에 따라 butyloxycarbonyl(BOC)과 carbobenzyloxymethyl(CBZ)로 보호하여 반응성을 높여준 형태^{31, 32)}인 BOC-glycine, BOC-leucine, CBZ-glycine, CBZ-leucine을 사용하였다.

두번째 경로는 한쪽 끝에 carboxyl기를 가지는 alky기로 5-FU에 연결된 FUAH를 이용하는 방법으로 이 때 이 물질은 더 이상 정제하지 않고 바로 다음 반응에 사용하였다. 이 경로에 있어서도 처음에는 아미노산을 아미드 결합으로 도입하였으나 기대했던 바와 같이 지용성이 개선되지 않았으므로 다른 일반 알코올류를 선택하여 도입하였다.

이러한 두가지 경로를 통하여 합성된 중간 물질을 가지고 DCC와 DMAP의 존재하에 반응시켜 에스테르 결합으로 이루어진 6 가지의 유도체를 합성할 수 있었다. 즉 DCC와 DMAP를 이용하는 방법은 Ozaki 등¹¹⁾에 의하여 carboxyl기와 알코올성 hydroxyl기가 반응하는 에스테르화 반응으로 비교적 완화된 조건에서도 높은 수율을 얻을 수 있는 간단한 방법으로 소개된 바 있었다.

제조 의 각 단계에서 생성되는 물질은 TLC, IR 및 NMR로 확인하였다.

Table II—Solubilities and lipophilic indexes ($\log k'$) of 5-fluorouracil and synthesized 5-fluorouracil derivatives (Mean \pm S.D., n=5)

Compound	Solubility (mg/ml)	Lipophilic index ($\log k'$) ^a
5-FU	7.26 \pm 1.01	- ^b
BGFU	0.89 \pm 0.02	0.31
BLFU	0.31 \pm 0.05	1.08
CGFU	0.57 \pm 0.02	0.34
CLFU	0.25 \pm 0.03	1.26
FUAP	0.76 \pm 0.05	0.64
FUAH	0.26 \pm 0.01	0.92

a: Mobile phase used methanol: water 50:50 v/v%

b: Not determined because drug peak appears before solvent peak

유수분배계수 및 pKa - Table I은 유수분배계수, pKa 및 용점을 측정된 결과이다. 프로드럭의 유수분배계수를 살펴보면 BLFU와 CLFU는 두가지 유상에서 각각 17.15과 15.12 및 15.61과 21.47로서 약 150배, FUAP은 클로포름에서 28.76으로 약 220배, 그리고 FUAH은 n-옥탄올에서 31.7로서 약 240배 증가되었다.

일반적으로 Henderson-Hasselbach 식에 의하면 5-FU와 같은 약산성 약물들은 pH 4.0 초산염 완충액의 약산성에서 비이온화 형태로 존재하는 비율이 크므로 생체막과 유사한 유상으로의 이행이 많이 일어나 높은 유수분배계수를 가진다. pKa 값은 n-옥탄올을 유상으로 사용하여 계산한 수치이며 프로드럭의 구조에서 N-3 proton이 해리되어 pH가 낮아진 것을 볼 수 있었다.

또한 프로드럭들의 용점은 모약물의 용점 282~284°C보다 상당히 낮아져 CLFU와 FUAH는 각각 79.6~81.4°C과 99~101.4°C이었다. 이와 같은 감소 현상은 Bundgaard²³⁾의 실험 결과에서와 같이 uracil 자체는 한 분자의 NH-proton과 다른 분자의 carbonyl group 사이에 분자간 수소결합의 형성으로 인하여 높은 결정 격자 에너지를 가지게 되어 결과적으로 높은 용점을 가지지만 프로드럭과 같이 여러 가지 치환체를 사용하여 N-1 proton를 치환시키면 수소결합을 감소시키거나 파괴시키므로 낮은 용점을 나타내는 것으로 생각된다.

용해도 및 친유성 계수 - 물에서의 용해도와 50% 메탄올을 이동상으로 하였을 때의 친유성 계수를 측정하여 Table II에 나타내었다. 즉 BLFU와 CLFU는 각각 0.31와 0.25 mg/ml로서 아주 낮은 용해도를 보여 주었

Table III—Pseudo-first order rate constants for the hydrolysis of synthesized 5-fluorouracil derivatives in various buffer solution at 37°C (Mean \pm S.E., n=3)

Compound	Buffer solution	K _{obs} (min ⁻¹ ×10 ⁻⁴)	t _{1/2} (hr)
BGFU	4.0	0.96 \pm 0.09	120.3
	6.4	4.40 \pm 0.09	26.3
	7.8	10.00 \pm 0.22	11.6
BLFU	4.0	0.31 \pm 0.08	372.6
	6.4	1.80 \pm 0.06	84.2
	7.8	3.90 \pm 0.12	29.6
CGFU	4.0	1.00 \pm 0.07	115.5
	6.4	6.60 \pm 0.14	17.5
	7.8	14.30 \pm 0.31	8.1
CLFU	4.0	0.35 \pm 0.17	330.0
	6.4	2.60 \pm 0.03	44.4
	7.8	7.60 \pm 2.04	15.2
FUAP	- ^a	-	-
FUAH	-	-	-

a: Not calculated because it was not hydrolyzed

으며 또한 FUAH (0.26 mg/ml)가 FUAP (0.76 mg/ml)보다는 더 낮은 용해도를 보여 주었다.

친유성 계수를 측정하여 유수분배계수와 용해도의 상관성을 비교하였을 때 acyloxycarbonyl 유도체 중 BLFU와 CLFU는 각각 1.08과 1.26으로서 큰 수치를 나타내었는데 이것은 특히 이 두가지 물질이 비극성의 성질이 강해져 높은 유수분배계수와 낮은 용해도 수치를 나타내는 것으로 보인다. 또한 acetic acid ester 유도체의 경우 약간 낮은 친유성 계수를 가지므로 acyloxycarbonyl 유도체의 두가지 물질보다 낮은 비극성 정도를 가지는 것으로 보인다.

따라서 유수분배계수, 용해도 및 친유성 계수는 서로 상관관계가 있는 것으로 생각된다.

pH의 변화에 의한 가수분해 - 가수분해되지 않은 잔존량을 시간에 따라 측정하여 그 로그값을 각 pH별로 도시해 본 결과 각 약물들은 모두 0.9% 생리식염수 용액에서는 유의성 있는 변화가 없이 일정했고 acetic acid ester 유도체는 약산성과 알칼리성의 완충액에서 매우 안정함을 알 수 있었다. 그러나 acyloxycarbonyl 유도체는 pH 4.0, 6.4 및 7.8 완충액에서 서로 다른 반감기를 가지는 1차 분해 거동을 보여 주었으며 pH가 증가함에 따라 또한 치환된 기의 분자량이 커질수록 가수분해율이 증가하였다.

각 프로드럭들의 가수분해에 대한 1차 속도상수 및 반감기를 계산하여 Table III에 나타내었고 약물들의

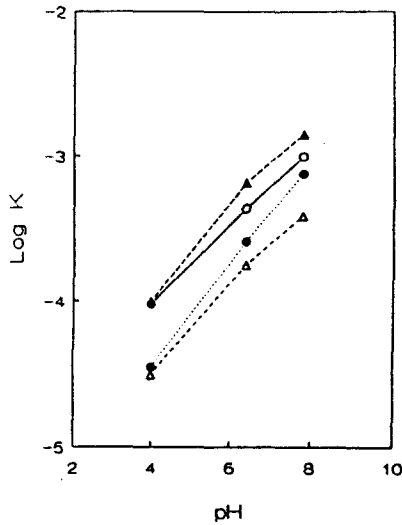


Fig. 1—The pH rate profiles for the hydrolysis of synthesized 5-fluorouracil derivatives in aqueous solution ($\mu=0.5$) at 37°C.
Key: —●—: BLFU, —○—: BGFU, —▲—: CGFU, —△—: BLFU

가수분해 결과 모약물인 5-FU가 정량적으로 생성됨을 HPLC에 의하여 확인하였다.

Table III에 나타낸 각 pH의 분해속도 상수 K에 로그값을 취하여 이를 pH에 대하여 도시해 본 결과 pH 4.0의 약산성에서는 거의 가수분해되지 않고 안정한 경향을 나타내었지만 그 이상의 증성 및 약알칼리성 용액에서는 pH가 증가함에 따라 가수분해 속도가 빨라져 불안정한 양상을 보여 주고 있다(Fig. 1).

또한 0.9% NaCl 용액에서는 시간에 따라 유의성 있는 분해가 일어나지 않았으므로 제제 설계시 수상으로 사용하기에 적당한 용액으로 사료된다.

사람 혈장 및 랫트의 간 호모지네이트에서의 가수분해—*In vitro* 상태에서 pH 7.4 완충용액, 80% 사람 혈장 및 흰쥐의 간 호모지네이트에서의 가수분해 결과를 Table IV에 나타내었다. 이 경우에도 1차 분해 거동을 보여주며 분자량이 거대해질 수록 더 불안정하여 BOC group 치환체보다는 CBZ기의 치환체가 더 빠른 가수분해가 일어났다. 즉 혈장과 흰쥐의 간 호모지네이트의 존재에 의해 가수분해가 가속화되어 반감기가 각각 BGFU는 6.31과 0.045 hr, BLFU는 3.62와 0.052 hr, CGFU는 1.02와 0.035 hr 그리고 CLFU는 1.32 hr이며 특히 호모지네이트에서는 3분 이내에 모두 분해되어 측정할 수 없었다.

Table IV—Pseudo-first order rate constants for the hydrolysis of synthesized 5-fluorouracil derivatives in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4), 80% human plasma and rat liver homogenate at 37°C (Mean±S.E., n=3)

Compound	Buffer solution	K_{obs} ($\text{min}^{-1} \times 10^{-4}$)	$t_{1/2}$ (hr)
BGFU	PBS ^a	6.7±0.08	17.2
	HP ^b	18.3±0.34	6.3
	RLH ^c	2530.9±94.55	0.05
BLFU	PBS	1.9±0.01	60.8
	HP	31.9±0.10	3.6
	RLH	2266.7±88.46	0.05
CGFU	PBS	9.8±0.18	11.8
	FP	112.8±2.88	1.0
	RLH	3284.4±104.14	0.04
CLFU	PBS	3.1±0.09	37.3
	HP	85.5±1.02	1.4
	RLH	d	d
FUAP	PBS	e	e
	HP	e	e
	RLH	355.0±11.07	0.3
FUAH	PBS	e	e
	HP	e	e
	RLH	80.5±18.76	0.2

a: pH 7.4 phosphate buffer solution

b: HP is 80% human plasma

c: RLH is rat liver homogenate

d: Not be calculated because it was hydrolyzed rapidly

e: Not be calculated because it was not hydrolyzed

Table V—Cytotoxic effects of 5-fluorouracil and synthesized 5-fluorouracil derivatives against L1210 cells (Mean±S.D., n=3)

Compound	ED ₅₀ ($\mu\text{g/ml} \times 10^{-2}$)
5-FU	1.45±0.35 (1.31×10^{-7} M)
BGFU	6.80±0.14 (2.11×10^{-7} M)
BLFU	7.65±0.91 (1.79×10^{-7} M)
CGFU	7.40±0.14 (1.96×10^{-7} M)
CLFU	6.65±0.64 (1.52×10^{-7} M)
FUAP	3333±130.11 (1.26×10^{-4} M)
FUAH	6991±173.95 (2.61×10^{-4} M)

acetic acid ester 유도체의 두가지 프로드럭은 문헌에 보고된 바와 같이 구조적으로 더 안정한 N-CH₂결합을 가지고 있어서 80% 사람 혈장에서는 시간에 따라 유의성 있게 가수분해되지 않았지만 랫트의 간 호모지네이트에서는 정량적으로 분해하여 FUAP와 FUAH의 반감기가 각각 0.33과 0.24 hr이었다.

세포 독성 실험—5-FU와 프로드럭들의 세포독성 정도를 비교하여 Table V에 나타내었는데 이는 가수분해 실험 결과와 거의 일치했다. 즉 완충 용액에서 가수분해가 잘 이루어지지 않아 항암 작용이 있는 모약물로의 전

환이 거의 일어나지 않는 FUAP와 FUAH는 기준 물질인 5-FU에 비해 세포 독성이 거의 없었다. 또한 4가지의 acyloxycarbonyl 유도체는 가수분해의 정도에 따라 약간의 차이는 있었지만 거의 비슷한 정도의 세포 독성을 보여 주었고 모약물로의 전환에 시간이 필요하기 때문에 기준 물질에 비해서는 모두 떨어지는 독성을 보여 주었다.

따라서 이러한 결과에서 프로드럭 자체는 항암 효과를 가지고 있지 않으며 효과를 나타내기 위해서는 5-FU로 전환되어야 한다고 할 수 있다.

In situ 환류 장관 흡수 실험 - 유수분내계수와 흡수율의 상관성을 관찰하기 위하여 실시하였으며 구 결과를 Table VI에 나타내었다. 5-FU에 비하여 프로드럭들의 흡수율은 전반적으로 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 즉 BGFU는 60과 90분, CGFU는 90과 120분에서 그리고 FUAP와 FUAH는 120분에서 흡수율이 떨어진 것을 볼 수 있었다. 또 한 시간에 따라 잔존된 약물 양을 대수로 한 그래프에서 흡수 속도 상수 K값을 구하여 Table VII에 나타내었는데 BLFU와 CLFU의 흡수 속도 상수는 0.168 hr⁻¹로서 5-FU의 0.181 hr⁻¹과 비슷하였지만 그 이외의 CGFU, BGFU, FUAP 및 FUAH는 각각 0.111, 0.121, 0.116 및 0.125 hr⁻¹로서 모두 모약물에 비해서 훨씬 떨어지는 흡수율을 가짐을 볼 수 있었다.

일반적으로 지용성이 높아지면 생체막 투과가 증가되어 흡수율이 증가될 것이 기대되지만 지용성이 높은 프로드럭은 유의성 있는 흡수율의 증가를 보여주지 않았다. 이는 대부분의 프로드럭들은 가수분해가 서서히 일어나 일부는 모약물로 전환되지만 일부는 가수분해되지 않은 형태로 존재할 수 있으므로 이 두가지 형태의 약물들이 장관을 환류하면서 흡수될 뿐만 아니라 물에

서 매우 낮은 용해도를 가지기 때문인 것으로 생각된다.

급성 독성 실험 - Table VIII은 급성 독성 실험의 결과로서 모약물과 이의 프로드럭들은 서로 비슷한 정도의 독성을 나타내었으며 BGFU와 FUAH의 LD₅₀ 값은 325.97와 272.36 mg/kg으로 5-FU보다 약간 높은 정도의 독성을 보여 주는 것을 알 수 있다. 이는 FUAH의 경우에는 다른 프로드럭들에 비하여 모약물로 전환되는 속도가 더 느리기 때문일 것으로 생각된다.

BLFU는 점조성이 강하여 결정화하기 어려운 물질로서 고용량을 용해하기가 어려워 이를 50% 프로필렌글리콜에 녹여 투여하였으며 대조군으로 50% 프로필렌글리콜을 사용하였는데 다른 프로드럭과 마찬가지로 비슷한 정도의 독성을 나타내었다.

In vivo 항암력 실험 - In vivo에서 Sarcoma 180 세포를 이용하여 마우스에 복수암을 유발시켜 5-FU와 이의 프로드럭들을 치료약물로 투여했을 때의 항암력 실험 결과와 4, 7 및 10일 후의 체중의 변화를 Table IX에 나타내었다.

즉 5-FU의 경우 30 mg/kg의 용량에서는 체중 감소를 동반하면서 높은 항암력을 보여주지만 용량을 더 증가시키면 독성이 나타나는 것을 볼 수 있다. 프로드럭에

Table VII—Absorption rate constants of 5-fluorouracil and synthesized 5-fluorouracil derivatives *in situ* (Mean±S.E., n=5)

Compound	K (hr ⁻¹)	t _{1/2} (hr)
5-FU	0.181±0.02	3.83
BGFU	0.121±0.02	5.73
BLFU	0.168±0.02	4.13
CGFU	0.111±0.01	6.24
CLFU	0.168±0.01	4.13
FUAP	0.116±0.03	5.97

Table VI—Absorption rate constants of 5-fluorouracil and synthesized 5-fluorouracil derivatives after intraperitoneal injection in the mice

Compound	% Absorbed			
	30	60	90	120 min
5-FU	9.31±1.26	27.88±2.78	44.86±5.14	54.78±4.76
BGFU	7.45±1.65	15.15±2.23	29.73±2.48	42.85±3.56
BLFU	13.69±1.34	32.56±2.35	46.53±3.66	51.69±2.77
CHFU	14.68±2.64	18.60±2.68	29.48±1.29	42.09±1.47
CLFU	15.86±2.17	28.00±1.00	44.26±1.33	53.31±1.49
FUAP	12.41±1.17	25.28±1.16	33.16±1.22	41.42±2.41
FUAH	8.97±1.70	27.56±2.68	35.86±3.74	42.07±1.46

* P<0.05 calculated by means of Student's t-test

Table VIII—Acute toxicity (LD₅₀) of 5-fluorouracil and synthesized 5-fluorouracil derivatives after intraperitoneal injection in the mice

Compound	LD ₅₀ (mg/kg)	F. L. Prbability 95% (mg/kg)
5-FU	204.20	144.20~289.14
BGFU	325.99 (133.59 ^a)	123.12~863.01 (50.46~353.69)
BLFU	- _b	-
CGFU	708.16 (262.13)	604.49~829.60 (223.76~319.45)
CLFU	663.50 (211.77)	516.75~851.93 (164.93~271.91)
FUAP	382.33 (192.54)	297.00~491.02 (149.92~247.27)
FUAH	272.36 (130.09)	226.24~327.88 (108.06~156.60)

a: Amount as 5-fluorouracil

b: Can not be calculated because of viscous compound

서 가장 높은 T/C를 보여주는 용량은 BGFU, BLFU, CGFU 및 CLFU의 경우 각각 70, 50, 100 및 50 mg/kg이었다. 또한 치료 계수는 BGFU, BLFU, CGFU, CLFU, FUAP 및 FUAH에서 각각 3.30, 3.06, 4.19, 3.11, 0.83 및 0.79이었으며 이때 5-FU는 1.81이었다. 따라서 두가지의 acetic acid ester 유도체는 모약물인 5-FU에 비해서 효과가 없음을 알 수 있었으며 4가지의 acyloxycarbonyl 유도체는 모약물에 비하여 모두 높은 치료 계수를 나타내며 우수한 항암효과를 나타내었다. 특히 CGFU는 200 mg/kg의 용량에서도 독성이 나타나지 않고 약간의 효과를 나타내었을 뿐만 아니라 치료 계수도 4.19로서 가장 크게 나타났다.

이상의 실험 결과에서 모든 프로드러들은 처음 기대했던 바와 같이 유수분배계수는 아주 향상되었으나 독성은 거의 감소되지 않고 비슷하거나 약간 감소된 결과를 나타내었다. 또한 항암력에 있어서는 acetic acid ester 유도체는 5-FU에 비하여 효과가 떨어졌지만 a-acyloxycarbonyl 유도체는 높은 치료 계수를 나타내며 우수한 항암 효과를 나타내었다. 따라서 두가지 에스테르 결합 형태중 4가지의 acyloxycarbonyl 유도체를 선택하여 제제개발에 적용하면 생체이용률의 개선 및 부작용 경감 등 약물 전달체계의 약물로서 활용도가 높을 것으로 사료된다.

결 론

일반적으로 상용되고 있는 항암제인 5-FU의 a-acyloxycarbonyl 유도체인 BGFU, BLFU, CGFU 및 CLFU와 acetic acid ester 유도체인 FUAP와 FUAH를 제조, 확인하고 5-FU를 대조 약물로 하여 *in vitro*에서 물리화학적 실험과 *in vitro*에서의 급성 독성 실험과 항암력 실험을 행하여 다음과 같은 결론을 얻

었다.

1. 유수분배계수는 모든 프로드러이 5-FU의 0.13보다 높아져 지용성이 증가하였으며 특히 BLFU와 CLFU는 6.89와 9.85로서 높은 값을 나타냈다. 또한 물에 대한 용해도는 BGFU>FUAP>CGFU>BLFU>CLFU≈FUAH이었다.

2. N-acyloxycarbonyl 유도체는 pH가 높아짐에 따라 그리고 효소의 존재하에 가수분해가 빨라졌으며 그 결과로서 모약물인 5-FU가 정량적으로 생성되었다. 그러나 acetic acid 유도체는 안정하였으며 편위의 간 호모지네이트가 존재할 때 가수분해가 촉진되었다.

3. 세포 독성 실험 결과 N-acyloxycarbonyl 유도체는 4~5배 감소되었으며 acetic acid ester 유도체의 경우 효과가 거의 없었다.

4. 5-FU, BGFU, CGFU, BLFU와 CLFU, FUAP 및 FUAH의 흡수속도상수는 각각 0.131, 0.121, 0.111, 0.168, 0.116 및 0.125 hr⁻¹이었다.

5. 5-FU, BGFU, CGFU, BLFU, CLFU, FUAP 및 FUAH의 LD₅₀값은 각각 204, 325.97(133.59, 5-FU로서 용량), 708.16(262.13), 663.50(211.77), 382.33(192.54) 및 272.33(130.09) mg/kg이었다.

6. 항암력 실험 결과 N-acyloxycarbonyl 유도체인 BGFU, CGFU 및 CLFU는 각각 3.30, 3.06, 4.19 및 3.11의 높은 치료 계수를 나타내며 우수한 항암 효과를 나타내었으나 acetic acid ester 유도체인 FUAP와 FUAH는 0.83과 0.79의 낮은 치료 계수를 나타내며 낮은 항암 효과를 나타내었다.

감사의 글

이 논문은 1994. 3~1996. 2의 한국과학재단 핵심전문연구비에 의해 연구되었다. 이에 감사드립니다.

Table IX—Body weight changes, mean survival days, antitumor activities and therapeutic ratios of 5-fluorouracil and synthesized 5-fluorouracil derivatives against Sarcoma 180 by intraperitoneal injection

Compound	Dose* (mg/kg/day)	Change in body weight (%) ^b				Mean survival days ^c	T/C (%)	ILS over control (%)	Therapeutic Antitumor	
		Day 4	Day 7	Day 10	ratio				activity ^b	
control		+5.33	+18.46	+24.25	22.33±6.53					
FU	50	+2.36	-10.24	-24.80	31.50±0.61	144.50	44.50		1.81	+++
	30	+3.07	-7.46	-11.40	44.08±15.8	202.20	102.20			+++
	15	+2.55	+11.73	+17.09	346.51±1.54	213.35	113.35			+++
BCFU	200 (81.97)	-2.27	-25.19	-	9.17±1.07	42.05	-57.95			toxic
	100 (40.98)	+5.81	+5.39	+4.98	37.60±13.63	172.48	72.48			+++
	70 (28.01)	+6.67	+6.25	+7.92	44.33±15.56	203.35	103.35		3.30	+++
	50 (20.49)	+0.79	+3.15	+7.48	38.00±1.79	174.31	74.31			+++
	30 (12.30)	+5.58	+15.86	+18.13	41.40±8.55	189.91	89.91			+++
BLFU	200 (69.65)	-34.14	-	-	8.20±0.75	35.65	-64.35			toxic
	100 (34.82)	-7.40	-14.9	-23.45	35.60±8.19	154.79	54.79			+++
	70 (24.38)	-0.66	+1.03	+5.08	46.00±6.71	200.00	100.00		3.06	+++
	50 (17.41)	+2.44	+7.83	+9.58	51.33±8.10	231.17	123.17			+++
	30 (10.45)	+0.57	+10.71	+13.35	48.33±11.0	210.13	110.13			+++
CGFU	200 (74.03)	-7.92	-16.35	-21.02	24.60±17.58	106.96	6.96			toxic
	100 (37.02)	+3.30	+5.66	+8.81	47.40±11.2	206.09	106.09			+++
	70 (25.91)	+2.19	+9.72	+13.37	43.00±15.99	186.96	86.96		4.19	+++
	50 (18.51)	-2.32	+11.12	+7.04	41.20±15.99	179.13	79.13			+++
	30 (11.10)	+5.63	+12.61	+13.96	39.83±4.84	173.17	73.17			+++
CLFU	200 (69.84)	-18.1	-7.91	-22.69	9.67±1.49	42.04	-57.96			toxic
	100 (31.92)	-5.50	-4.25	-6.50	17.80±9.83	77.39	-22.61			toxic
	70 (22.34)	+3.04	+11.99	+13.36	45.00±10.63	195.65	95.65		3.11	+++
	50 (15.96)	+4.37	+10.66	+12.98	46.80±9.83	203.48	103.48			+++
	30 (9.58)	+4.42	+14.25	+12.35	42.25±6.14	183.70	83.70			+++
FUAP	200 (50.36)	+4.58	+10.96	+16.05	27.20±2.64	120.87	20.87			++
	100 (35.25)	+6.0	+19.11	+24.1	32.00±4.56	139.13	39.13			+++
	70 (25.18)	+3.2	+12.91	+21.7	31.40±10.6	136.52	36.52		0.83	+++
	50 (15.11)	+4.4	+13.93	+11.5	36.60±13.88	159.03	59.13			+++
	30 (7.55)	+4.42	+12.23	+21.35	21.17±14.14	92.04	-7.96			toxic
FUAH	200 (47.76)	+5.29	+15.24	+27.01	16.20±1.83	70.43	-29.57			toxic
	100 (33.43)	+5.49	+13.30	+17.09	25.60±11.64	111.30	11.30			+
	70 (23.88)	+4.22	+12.24	+16.37	30.60±16.63	133.04	33.04		0.79	+++
	50 (14.33)	+6.19	+21.10	+29.83	30.80±5.91	133.91	33.91			+++
	30 (7.16)	+7.48	+17.40	+20.55	29.00±4.60	26.09	26.09			++

a: ICR mice were intraperitoneally implanted with 10^6 cells of Sarcoma 180 and were administered intraperitoneally once daily for 7 days, starting after transplantation. () are the dose as 5-FU

b: The increase or decrease in the ratio of the mean body weight at day 4, 7 and 10 to that at day 1

c: The mice were observed until 60 days after the tumor implantation. Values are Mean±S.D.

문헌

- 1) Maley, F. : *Pyrimidine antagonists*, in Becker(Ed) Cancer 5-A comprehensive treatise chemotherapy. p327 (Plenum press, New York, 1977).
- 2) Chaudhuri, N. K., Montag, B. J. and Heidelberg, C. : Studies on fluorinated pyrimidines III. The metabolism of 5-fluorouracil-2-C¹⁴ and 5-fluorouracil-2-C¹⁴ acid *in vivo*. *Cancer Res.* **18**, 318 (1958).
- 3) Gilman, A. G., Goodman, L. S., Rall, T. W. and Murad, F., Goodman and Gilman's : *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 7th Ed., Macmillan publishing Co., New York, p1268 (1985).
- 4) Hoshi, A., Iigo, N. and Nakamura, A. : Antitumor activity of 1-alkylcarbamoyl derivatives of 5-fluorouracil against L1210 leukemia. *Chem. Pharm. Bull.* **26**, 161 (1978).
- 5) Ueda, S., Takeda, S., Yamawaki, I., Yamashita, J., Yasumoto, M. and Hashimoto, S. : Antitumor activities of compound related to 1-tetrahydro-2-furanyl-5-fluorouracil metabolites. *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 125 (1982).
- 6) Buur, A. and Bundgaard, H. : 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).
- 7) Ozaki, S., Watanabe, Y., Nagase, T., Ike, Y. and Mori, H. : 5-fluorouracil derivatives. Synthesis of 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil metabolites. *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 893 (1986).
- 8) Ozaki, S., Watanabe, Y., Hoshiko, T., Mizuno, H., Ishikawa, K. and Mori, H. : 5-fluorouracil derivatives IV. Synthesis and antitumor-active acyloxyalkyl-5-fluorouracils. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 733 (1984).
- 9) Hoshiko, T., Ozaki, S., Watanabe, Y., Ogasawara, T., Yamauchi, S., Fujiwara, K., Hoshi, A. and Iigo, M. : 5-fluorouracil derivatives V. Synthesis and antitumor activities of (alkylthio) carbonyl-5-fluorouracils. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 2832 (1985).
- 10) Ozaki, S., watanabe, Y., Hoshiko, T., Nagase, T., Ogasawara, T., Furukawa, H., Uemura, A., Ishikawa, K., Mori, H., Hoshi, A., Iigo, M. and Tokuzen, R. : 5-fluorouracil derivatives X. Synthesis and antitumor activities of α -alkoxyalkyl-5-fluorouracils. *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 150 (1986).
- 11) Anmad, S., Ozaki, S., Nagase, T., Iigo, M., Tokuzen, R. and Hoshi, A. : A facile method for synthesis of N-acyloxymethyl-5-fluorouracils as a class of antitumor agents. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 4137 (1987).
- 12) Mitsui Pharmaceutical, Inc., and Mitsui Toatsu Chemical, Inc. *Japan Patent Open* 50-148365 (1975); *German Patent Open* 2455423 (1975), 2639135 (1977); *Belg. Patent* 846956 (1977).
- 13) Bundgaard, H. : *Design of prodrugs*, Elsevier Science Publishers B.V., p. 216 (1985).
- 14) Bundgaard, H., Larsen, C. and Arnold, E. : Prodrugs as drug delivery system XXVII. Chemical stability and bioavailability of a water-soluble prodrug of metronidazole for parenteral administration. *Int. J. Pharm.* **18**, 79 (1984).
- 15) Jee, U. K., Lee, G. W. and Park, M. S. : Stability and bioavailability on prodrug of 5-fluorouracil(I). Synthesis, physicochemical properties, stabilities and antitumor activities of 1-glycyloxymethyl-5-fluorouracil Hydrochloride. *J. Kor. Pharm. Sci.* **22**, 185 (1992).
- 16) Kingsbury, D. W., Boem, J. C., Mehta, R. J., Grappel S. F. and Gilvarg, C. : A novel peptide delivery system involving peptidase activated prodrugs as antimicrobial agents. Synthesis and biological activity of peptidyl derivatives of 5-fluorouracil. *J. Med. Chem.* **27**, 1447 (1984).
- 17) Tada, M. : Antineoplastic agents. The preparation of 5-fluorouracil-1-acetic acid derivatives. *Bull. Chem. Soc. Japan* **48**, 3427 (1979).
- 18) Kakemi, K., Arita, T., Hori, R. and Konishi, R. : Absorption and excretion of drugs XXX. Absorption of barbituric acid derivatives from rat stomach. *Chem. Pharm. Bull.* **15**, 1534 (1967).
- 19) Hasegawa, J., Fujita, T., Hayashi, Y., Iwamoto K. and Watanabe, J. : pKa determination of verapamil by lipid-lipid partition. *J. Pharm. Sci.* **73**, 442 (1984).
- 20) Yamana, T., Tsuji, A., Miyamoto, E. and Kubo,

- O. : Novel method for determination of partition coefficients of penicillins and cephalosporins by high-pressure liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.* **66**, 747 (1977).
- 21) Buur, A. and Bundgaard, H. : Prodrugs of 5-fluorouracil I. Hydrolysis kinetics and physicochemical properties of various N-acyl derivatives of 5-fluorouracil. *Int. J. Pharm.* **21**, 349 (1984).
- 22) Buur, A. and Bundgaard, H. : Prodrugs of 5-fluorouracil II. Hydrolysis kinetics, solubility and lipophilicity of N-alkoxycarbonyl derivatives of 5-fluorouracil. *Arch. Pharm. Chem. Sci. Ed* **12**, 37 (1984).
- 23) Buur, A. and Bundgaard, H. : 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).
- 24) Graham, J. : *Isolation of Subcellular Organelles and Membranes*, In Rickwood D.(EDS.), Centrifugation: A Practical Approach, IRL Press Ltd., Eynshan, p. 165 (1984).
- 25) Thayer, P. S., Himmelfarb, P. and Watt, G. L. : Cytotoxicity assay with L1210 cell *in vitro*, comparison with L1210 *in vitro* and KB cells *in vitro*. *Cancer Chemother. Rep.* **2**, 1 (1971).
- 26) Lee, W. H., Kim, J. B., Jee, U. K. and Rhyu, B. T. : Pharmaceutical study on ketoprofen lysinate. *J. Korean Pharm. Sci.* **12**, 37 (1982).
- 27) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. : A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmac. Exp. Ther.* **96**, 99 (1949).
- 28) Sasaki, H., Nakamura, J., Konishi, R. and Shibasaki, J. : Intestinal absorption characteristics of 5-fluorouracil, florafur and 6-mercaptopurine in rats. *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 4260 (1986).
- 29) Hogben, C. A., Tocco, D. J., Brodie, B. B. and Schanker, L. S. : On the mechanism of intestinal absorption of drugs. *Intestinal absorption* **125**, 275 (1958).
- 30) Hoshi, A., Nakamura, M. and Kuretani, K. : Antitumor activity of benzoyl and benzenesulfonyl derivatives of 5-fluorouracil. *Gann* **65**, 463 (1974).
- 31) Anderson, G. W. and Macgregor, A. C. : t-Butoxycarbonyl amino acid and their use in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 6180 (1957).
- 32) Mackay, F. C. and Albertson, N. F. : New amine masking groups for peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4686 (1957).