

7-O-(α -L-람노피라노실) 또는 7-O-(4'-아미노- α -L-람노피라노실)-다우노마이시논과 -아드리아마이시논 유도체의 합성과 항암활성

옥광대* · 박정배 · 김문성 · 정동윤 · 안상용 · 배중석 · 양중익
동아제약(주) 연구소

(Received September 18, 1995)

Synthesis and Antitumor Activity of 7-O-(α -L-rhamnopyranosyl) or 7-O-(4'-amino- α -L- rhamnopyranosyl)-daunomycinone and -adriamycinone Derivatives

Kwang-Dae Ok*, Jeong-Bae Park, Moon-Sung Kim, Dong-Yoon Jung,
Sang-Yong An, Chung-Seok Bae and Junnick Yang
Research Laboratories, Dong-A Pharm. Co., Ltd., Kyunggi 449-900, Korea

Abstract—Daunorubicin and doxorubicin analogues (5, 7, 8, 9) in which the natural amino sugar, daunosamine, is replaced by rhamnopyranosyl or 4'-amino rhamnopyranosyl residues have been prepared. The *in vitro* cytotoxicity of compound 5 or 7 was similar to that of doxorubicin for P388 murine leukemic cell line. But compound 8 or 9 was less cytotoxic than doxorubicin. When administered intravenously on day 1, compound 9 showed antitumor activity comparable to that of doxorubicin against ip-inoculated L1210 murine leukemia and found to be less toxic than doxorubicin. But the *in vivo* antitumor activity of compound 7 or 8 was inferior to that of doxorubicin.

Keywords □ Anthracycline, MTT assay, Antitumor activity.

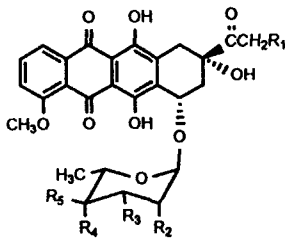
Daunorubicin(DNR, 1), doxorubicin (DXR, 2) 등을 비롯한 anthracycline계 항암제는 가장 널리 사용되어지는 중요한 암화학요법제 중의 하나이지만 탈모, 조혈기독성과 누적 용량 의존적 심장독성 등의 심각한 부작용을 나타내는 단점을 가지고 있다. DXR의 경우에 있어서는 심장독성의 위험성 때문에 누적 총투여량이 550 mg/m² 이하로 제한되고 있으며, 이로 인해 충분한 치료효과를 얻을 수가 없다.

그래서, 이들 부작용을 줄이면서 항암활성을 증강시킨 신규 유도체연구가 활발히 진행되어 왔는데, 그 중 당부분의 구조수식변화에 따른 구조활성 상관관계를

살펴보면 다음과 같다. 3'-deamino-3'-hydroxy-doxorubicin 유도체¹⁾가 독성이 경감되고 좋은 활성을 나타내었기 때문에 3'-hydroxy기가 독성과 활성에 관련이 있는 것을 알 수 있을 뿐만 아니라, DXR의 4'-hydroxy epimer 화합물로 1984년에 시판된 4'-epirubicin²⁾(3)은 DXR과 동등 이상의 활성을 나타내면서 심장독성이 줄어들어 4'-epimer체 역시 독성경감에 관계하고 있음을 알 수 있다. 그리고 glycosidic bond의 결합력을 증강시킬 목적으로 2'-halogen기가 도입된, 특히 2'-fluoro-3'-hydroxy-doxorubicin 유도체 (4)³⁾는 독성경감과 함께 항암활성이 현저하게 증강되었다. 그러므로, 저자들은 이러한 상관관계를 기초하여, C-2'에는 glycosidic bond의 결합력을 증강시킬 수 있는 hydroxy(ax)기를, C-3'에는 deamino체로서 hyd-

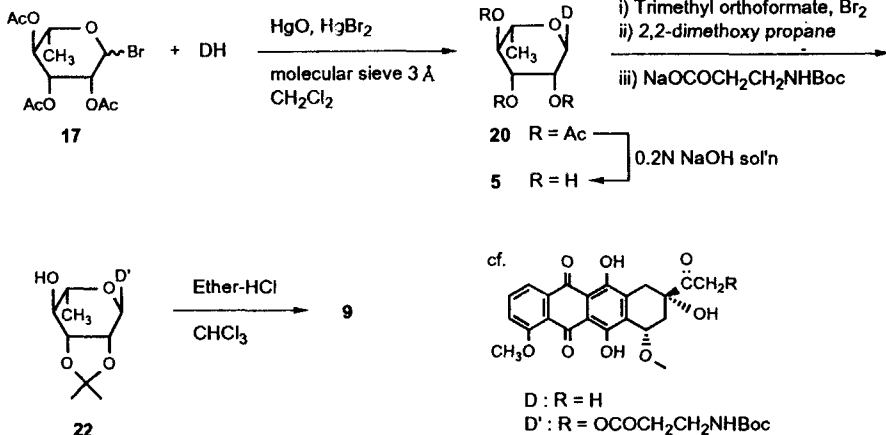
* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0331-282-2516 (팩스) 0331-282-8564

roxy(eq)기를, C-4'에는 daunosamine의 epimer 구조인 amino(eq)기나 hydroxy(eq)기를 각각 도입한 유도체 **5**, **7**, **8** 과 **9**를 합성하였다. 그중 유도체 **9**는 체 내에서 C-14 ester가 가수분해 되어 화합물 **6**이 쉽게 될 수 있는 물질로서 **7**, **8**과 함께 수용성 물질이다. (Fig. 1) 이들 물질의 합성적 방법을 살펴보면 다음과 같다. 즉, L-rhamnose를 출발물질로 하여 acetyl화, brom화 반응을 통해 얻은 brom화합물 **17**을 daunomycinone(DH)과 Koenigs-Knorr glycosidation 하여 α -anomer 화합물 **20**만을 정량적으로 얻은 후, 탈acetyl 반응하여 화합물 **5**를 얻었다. 또한 화합물 **9**는



- 1: R₁=R₂=R₅=H R₃=NH₂·HCl R₄=OH
- 2: R₁=R₄=OH R₂=R₅=H R₃=NH₂·HCl
- 3: R₁=R₅=OH R₂=R₄=H R₃=NH₂·HCl
- 4: R₁=R₃=R₄=OH R₂=F R₅=H
- 5: R₁=R₄=H R₂=R₃=R₅=OH
- 6: R₁=R₂=R₃=R₅=OH R₄=H
- 7: R₁=R₄=H R₂=R₃=OH R₅=NH₂·HCl
- 8: R₁=R₂=R₃=OH R₄=H R₅=NH₂·HCl
- 9: R₁=OCOCH₂CH₂NH₂·HCl R₂=R₃=R₅=OH R₄=H

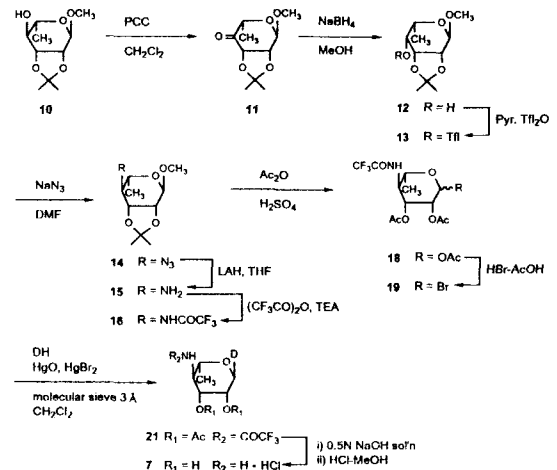
Fig. 1 — Structures of daunorubicin and doxorubicin analogues.



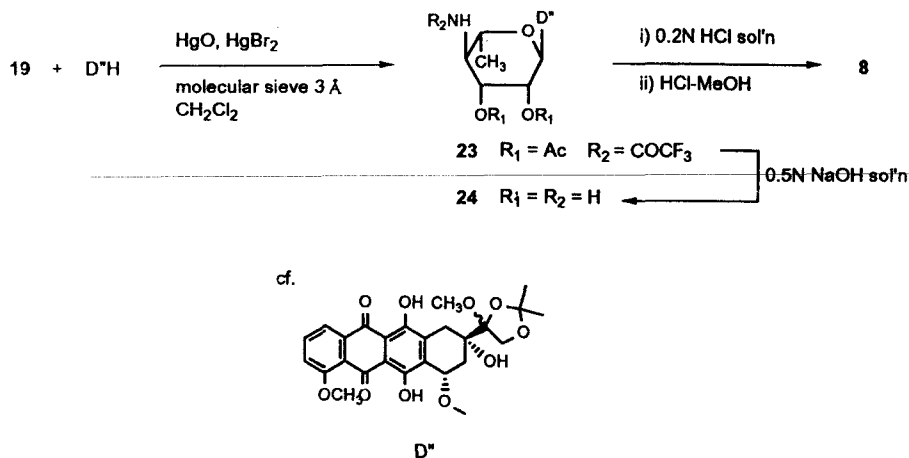
Scheme I — Synthesis of Compound 9.

화합물 **5**를 원료물질로 해서 i) Trimethyl orthoformate, Br₂ ii) 2,2-dimethoxypropane iii) NaOCOCH₂CH₂NHBoc 순서로 반응시켜 ester 화합물 **22**를 61.2% 수율로 합성한 후, ether-HCl에서 탈보호 반응하여 99% 수율로 얻었다(Scheme I).

한편, 화합물 **7**은 methyl-2,3-O-isopropylidene- α -rhamnopyranoside(**10**)⁴⁾를 출발물질로 하여 얻었다. 즉, 화합물 **10**을 산화, 환원 반응을 하여 6-deoxy- α -L-talopyranoside 화합물 **12**로 합성한 후, 4-hydroxy기에 trifluoromethanesulfonyl기를 도입한 다음 sodium azide와 반응시켜 azido 화합물 **14**를 얻었다. 화합물 **14**를 환원, 보호, acetyl화, brom화 반응을 거쳐 brom 화합물 **19**를 얻은 후 DH와 glycosidation



Scheme II — Synthesis of compound 7.



Scheme III — Synthesis of Compound 8.

반응하여 α -anomer 화합물 21만을 얻은 다음 알칼리 가수분해하여 화합물 7을 얻었다(Scheme II).

그리고, 화합물 8은 9-de-acetyl-9(2',2'-dimethyl-4'-methoxydioxolan-4'-yl)daunomycinone⁵⁾ (D* H)을 bromo화합물 19와 반응시켜 58.8% 수율로 화합물 23만을 얻은 후, 알칼리, 산의 순서로 탈보호 반응을 하여 얻었다(Scheme III).

이들 화합물의 항암활성을 검토하고자 신규 유도체 5, 7, 8과 9에 대해서는 P388 마우스 백혈병 세포에 대한 *in vitro* 세포독성과 유도체 7, 8과 9에 대해서는 L 1210 마우스 백혈병 세포에 대한 *in vivo* 항종양 활성 시험을 실시하였다.

실험방법

재료 및 기기

¹H-NMR spectra는 Bruker AC200 spectrometer를 이용하여 tetramethylsilane을 internal standard로 사용하거나, CDCl₃에 잔류해 있는 CHCl₃ (7.24 ppm)을 internal reference로 하여 측정하였으며, chemical shift는 δ unit로 나타내었다. Infrared spectra는 MIDAC FT-IR 분광 광도계로 측정하였으며, frequency는 cm⁻¹로 표시하였다. 선광도는 PERKIN-ELMER 243 polarimeter를 사용하여 측정하였으며, 녹는점은 Mettler FP 5 융점측정기를 사용하고 보정은 하지 않았다.

Column chromatography는 silicagel (Kieselgel 60, 70~230 mesh, Merck)을 사용하였고, 모든 무수

반응은 질소 또는 아르곤 기류하에서 시행되었고, 용매는 사용직전에 건조, 증류되었다.

합성

7-O-(2',3',4'-tri-O-acetyl- α -L-rhamnopyranosyl)daunomycinone (20) — Daunomycinone (DH, 3.04 g, 7.631 mmol), 산화 제2수은 (황색) (6.41 g), 브롬화 제2수은 (1.86 g), 분말 molecular sieves 3Å (30.6 g)을 CH₂Cl₂ (405 ml)에 현탁시킨 후, 화합물 17을 넣어 실온에서 차광한 다음 20시간 교반하였다. 반응액을 여과하고 여액을 CH₂Cl₂으로 희석한 후 이 용액을 0.2 N HCl 수용액, 물, 포화식염수 순서로 세척한 다음 농축하여 얻어진 잔사를 column chromatography (Benzene : Acetone=4 : 1)로 분리 정제하여 화합물 20 (5.4 g, 100%)을 얻었다.

R_f=0.42 (Benzene:Acetone=4 : 1)

mp : 131.1~137.2°C

$[\alpha]_D^{20}$: +138.8 (c 0.098 in CHCl₃)

IR(KBr) : 3504.9, 1751.5, 1618.4, 1577.9 cm⁻¹

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 13.94 (1H, s, phenolic-OH) 13.26 (s, 1H, phenolic-OH) 8.02 (d, 1H, H-1) 7.76 (t, 1H, H-2) 7.36 (d, 1H, H-3) 5.34 (d, 1H, H-1') 5.29 (t, 1H, H-2') 5.26 (t, 1H, H-7) 5.08 (d, 1H, H-4') 5.07 (m, 1H, H-3') 4.05 (s, 3H, OCH₃) 4.05 (m, 1H, H-5') 3.25 (d, 1H, H-10) 2.93 (d, 1H, H-10') 2.41 (s, 3H, OAc) 2.32 (dd, 1H, H-8) 2.15 (s, 3H, CH₃) 2.09 (m, 1H, H-8') 2.04 (s, 3H, OAc) 1.92 (s, 3H, OAc) 1.26 (d,

3H, CH₃)

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) : 211.6 (C-13) 186.7, 186.6 (C-5, C-12) 169.9, 169.7, 169.6 (3×OC(=O)CH₃) 160.9 (C-4) 156.1 (C-6) 155.4 (C-11) 135.6 (C-2) 135.2, 134.2, 132.9 (C-6a, C-10a, C-12a) 119.7, 118.4 (C-1, C-3, C-4a) 111.5 (C-5a, C-11a) 100.5 (C-1') 76.4 (C-9) 70.7, 70.4, 69.3, 69.0, 67.7 (C-7, C-2', C-3', C-4', C-5') 56.6 (OCH₃) 35.0, 33.3 (C-8, C-10) 24.7 (C-14) 20.84, 20.76, 20.56 (3×OC(=O)CH₃) 17.3 (CH₃)

7-O-(α-L-rhamnopyranosyl)daunomycinone (5) - 화합물 20 (1 g, 1.491 mmol)의 0.2 N NaOH 용액 (80 ml)을 0°C에서 2시간 교반시켰다. 2N-HCl 수용액으로 산성화 한 후, CH₂Cl₂로 추출하고, 물, 포화식염수로 세척한 다음 농축하였다. 얻어진 적색 고체를 CH₂Cl₂와 n-Hexane으로 재결정하여 화합물 5 (515 mg, 63.4%)를 얻었다.

Rf=0.18 (CHCl₃ : MeOH=10 : 1)

mp : 166.8~169°C

[α]_D²⁰ : +60.5 (c 0.086 in CHCl₃)

IR(KBr) : 3423.9, 1718.7, 1618.4, 1577.9 cm⁻¹

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ : 14.04 (s, 1H, phenolic-OH) 13.25 (s, 1H, phenolic-OH) 7.90 (d, 2H, H-1, H-3) 7.64 (m, 1H, H-2) 5.47 (s, 1H, OH) 5.02 (s, 1H, H-1') 4.95 (t, 1H, H-7) 4.72 (t, 2H, OH×2) 4.42 (d, 1H, OH) 3.98 (s, 3H, OCH₃) 3.76 (m, 1H, H-5') 3.58 (br, 1H, H-2') 3.2~3.4 (m, 2H, H-3', H-4') 3.01 (d, 1H, H-10) 2.88 (d, 1H, H-10') 2.24 (s, 3H, COCH₃) 2.15 (d, 2H, H-8) 1.17 (d, 3H, CH₃)

¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-d₆) δ : 211.6 (C-13) 186.2, 186.1 (C-5, C-12) 160.6 (C-4) 156.0 (C-6) 154.3 (C-11) 136.0 (C-2) 135.2, 134.43, 134.38 (C-6a, C-10a, C-12a) 119.7, 119.5 (C-1, C-3) 118.8 (C-4a) 110.51, 110.45 (C-5a, C-11a) 103.8 (C-1') 75.2 (C-9) 71.8, 70.6, 70.5, 69.1 (C-7, C-2', C-3', C-4', C-5') 56.5 (OMe) 36.3, 31.5 (C-8, C-10) 24.0 (COCH₃) 17.7 (CH₃)

7-O-(2',3'-O-isopropylidene-α-L-rhamnopyranosyl)adriamycinone-14-O-(N-tert-butyloxycarbonyl) β-alaninate (22) - 화합물 5 (400 mg, 0.7346 mmol)를 Trimethyl orthoformate (0.55 ml), MeOH (10 ml)과

Dioxane (15 ml)의 혼합용액에 현탁시킨 후 20분간 교반한 다음 Br₂/CH₂Cl₂ (1.08 ml, 1 ml Br₂ in 20 ml CH₂Cl₂)을 넣어 2시간 동안 교반하였다. 이 반응액에 Acetone (72 ml)을 넣어 3시간 반응시키고, 2,2-dimethoxypropane (25 ml)을 가하여 1시간 반응하였다. 그 다음 sodium-N-tert-butyloxycarbonyl-β-alaninate (1.4 g)의 H₂O(12 ml) 용액을 반응 혼합물에 가한 후 15시간 반응시켰다. 반응 혼합물을 감압 농축한 다음 CH₂Cl₂에 용해하여 물, 포화식염수로 세척 후 감압 건조하여 얻어진 잔사를 column chromatography (Benzene : Acetone=4 : 1)로 분리 정제하여 22 (347 mg, 61.2%)을 얻었다.

Rf=0.23 (Benzene : Acetone=4 : 1)

mp : 209.7~216.9°C

[α]_D²⁰ : +169.8 (c 0.086 in CHCl₃)

IR(KBr) : 3448.9, 3383.4, 1734.1, 1685.9, 1618.4 cm⁻¹

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 13.95 (s, 1H, phenolic-OH) 13.20 (s, 1H, phenolic-OH) 8.01 (d, 1H, H-1) 7.77 (t, 1H, H-2) 5.61 (s, 1H, H-1') 5.35 (t, 1H, H-7) 5.35 (d, 1H, H-14) 5.13 (d, 1H, H-14') 4.49 (s, 1H, OH) 4.07 (d, 1H, H-2') 3.94 (dd, 1H, H-3') 3.78 (dq, 1H, H-5') 3.31~3.10 (m, 3H, H-4', CH₂CNH-) 3.26 (d, 1H, H-10) 2.94 (d, 1H, H-10') 2.64 (t, 2H, COCH₂CH₂) 2.50 (br, 1H, H-8) 2.90 (d, 1H, OH) 2.12 (dd, 1H, H-8') 1.51, 1.30 (2×s, 2×3H, 2×CH₃) 1.43 (s, 9H, CONHC(CH₃)₃) 1.37 (d, 3H, CH₃)

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ : 206.7 (C-13) 187.1, 186.7 (C-5, C-12) 171.9 (C-15) 161.1 (C-4) 156.2, 155.7 (C-6, C-11) 155.8 (C-18) 135.8 (C-2) 135.5, 134.0, 133.3 (C-6a, C-10a, C-12a) 120.9, 119.9, 118.5 (C-1, C-3, C-4a) 111.6, 111.5 (C-5a, C-11a) 109.5 (-OC(CH₃)₂O-) 100.5 (C-1') 79.8 (C-19) 78.0, 77.2, 75.8, 74.4, 69.8, 67.1 (C-7, C-9, C-2', C-3', C-4', C-5') 66.2 (C-14) 56.7 (OCH₃) 36.5, 35.4, 34.7, 33.6 (C-8, C-10, C-16, C-17) 28.4, 28.0, 26.2, 17.1 (4×CH₃)

7-O-(α-L-rhamnopyranosyl)adriamycinone-14-O-β-alaninate hydrochloride (9) - 화합물 22 (280 mg, 0.3628 mmol)의 CHCl₃(17 ml)용액에 Ether-HCl (13 ml)을 가한 후 상온에서 2시간 동안 반응시켰다.

반응혼합물을 Ether로 희석한 후 여과하여 목적으로 하는 화합물 **9**(240 mg, 99%)를 얻었다.

Rf=0.44 (n-BuOH : AcOH : H₂O=35 : 10 : 20)

mp : 169.5~175.2°C

$[\alpha]_D^{20}$: +176.2 (c=0.105 in c-HCl : MeOH(1 : 1000))

IR(KBr) : 3400.7, 1734.1, 1618.4, 1577.9 cm⁻¹

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ : 13.90 (s, 1H, phenolic-OH) 13.07 (s, 1H, phenolic-OH) 8.13 (br.s, 3H, NH₃Cl) 7.72 (m, 2H, H-1, H-2) 7.50 (dd, 1H, H-3) 5.66 (s, 1H, OH) 5.32 (d, 1H, H-14) 5.22 (d, 1H, H-14'), 5.02 (s, 1H, H-1'), 4.96 (br.s, 1H, H-7) 4.75 (d, 2H, OH×2) 4.45 (d, 1H, OH), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 3.78 (m, 1H, H-5') 3.58 (br.s, 1H, H-2') 3.38~3.17 (m, 2H, H-3', H-4') 3.10~3.00 (m, 4H, H-10, CH₂CH₂CONH) 2.77 (t, 2H, COCH₂CH₂) 2.30 (m, 1H, H-8) 2.02 (dd, 1H, H-8') 1.18 (d, 3H, CH₃)

¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-d₆) δ : 207.7 (C-13) 186.1, 186.0 (C-5, C-12) 169.7 (C-15) 160.6 (C-4) 156.0 (C-6) 154.6 (C-11) 136.1 (C-2) 135.0, 134.3, 133.7 (C-6a, C-10a, C-12a) 119.64, 119.55 (C-1, C-3) 118.8 (C-4a) 110.5, 110.4 (C-5a, C-11a) 103.9 (C-1') 75.2 (C-9) 71.9, 70.6, 70.0, 67.0 (C-7, C-2', C-4', C-3', C-5') 66.1 (C-14) 56.5 (OCH₃) 36.4, 34.6, 31.8, 31.2 (C-8, C-10, C-16, C-17) 17.7 (CH₃)

Methyl-6-deoxy-2,3-O-isopropylidene-α-L-lyxohexopyranosid-4-ulose (11) - 화합물 **10** (4 g, 18.33 mmol)의 CH₂Cl₂ (180 ml)용액에 PCC (15.8 g)와 분말 molecular sieves 3Å (15.8 g)을 넣고 상온에서 2시간 교반시켰다. 반응혼합물에 Ether를 가하여 희석한 다음 여과하고 여액을 감압 농축하여 얻어진 잔사를 column chromatography (n-Hexane:Acetone=2 : 1)로 분리 정제하여 화합물 **11** (4.13 g, 100%)을 얻었다.

Rf=0.40 (Benzene : Acetone=15 : 1)

IR(neat) : 1739.9 cm⁻¹

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 4.82 (s, 1H, H-1) 4.40 (s, 2H, H-2, H-3) 4.22 (q, 1H, H-5) 3.44 (s, 3H, OCH₃) 1.47, 1.34 (2×s, 2×3H, 2×CH₃) 1.38 (d, 3H, CH₃)

Methyl-6-deoxy-2,3-O-isopropylidene-α-L-talo-

pyranoside (12) - 화합물 **11** (4.1g, 18.96 mmol)의 MeOH (95 ml)용액을 0°C로 한 후 NaBH₄ (717 mg)를 가하여 30분간 반응시킨 다음 상온으로 올려 1시간 30분간 더 교반시켰다. 반응 혼합물을 감압 농축하고 CH₂Cl₂을 넣어 희석한 다음 물, 포화식염수용액으로 세척하고 감압 농축하였다.

얻어진 잔사를 column chromatography (n-Hexane : Acetone=5 : 1)로 분리 정제하여 화합물 **12** (3.78 g, 92.2%)를 얻었다.

Rf=0.41 (n-Hexane : Acetone=3 : 1)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 4.91(s, 1H, H-1) 4.18 (dd, 1H, H-3) 4.01 (d, 1H, H-2) 3.81 (q, 1H, H-5) 3.53 (dd, 1H, H-4) 3.38 (s, 3H, OCH₃) 2.16 (d, 1H, OH) 1.57 (s, 3H, CH₃) 1.36 (s, 3H, CH₃) 1.31 (d, 3H, CH₃)

Methyl-6-deoxy-2,3-O-isopropylidene-4-O-trifluoromethanesulfonyl-α-L-talopyranoside (13) - 화합물 **12** (3.78 g, 17.40 mmol)를 CH₂Cl₂ (72 ml)와 pyridine (48 ml)에 용해시킨 후 Triflic anhydride (3.7 ml, 21.99 mmol)를 0°C에서 천천히 가한 후 1시간 30분 동안 교반시켰다.

반응 혼합물을 CH₂Cl₂으로 희석한 후 물, 10% KHSO₄ 수용액, 물 그리고 포화식염수로 세척한 다음 감압 농축하여 화합물 **13**을 얻었다. 이 화합물은 불안정하므로 다음 반응에 바로 사용하였다.

Methyl-6-deoxy-2,3-O-isopropylidene-4-azido-α-L-rhamnopyranoside (14) - 화합물 **13**의 DMF (100 ml)용액에 NaN₃ (3.4 g)를 넣어 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 혼합물을 감압 농축한 후 CH₂Cl₂로 희석하고 물로 세척한 다음 감압 농축하였다. 얻어진 잔사를 column chromatography (n-Hexane : Ethylacetate=10 : 1)로 분리 정제하여 화합물 **14** (2.32 g, 55.1%)를 얻었다.

Rf=0.33 (n-Hexane : Ethylacetate=10 : 1)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 4.86 (s, 1H, H-1) 4.09 (dd, 1H, H-3) 4.05 (d, 1H, H-2) 3.50 (q, d, 1H, H-5) 3.34 (s, 3H, OCH₃) 3.14 (dd, 1H, H-4) 1.54 (s, 3H, CH₃) 1.34 (s, 3H, CH₃) 1.28 (d, 3H, CH₃)

Methyl-6-deoxy-2,3-O-isopropylidene-4-amino-α-L-rhamnopyranoside (15) - 화합물 **14** (2.2 g, 9.08 mmol)의 THF (45 ml)용액을 0°C로 한 후 LiAlH₄

(1.03 g)를 넣어 N₂기류하에서 30분간 반응한 다음 실온에서 1시간 30분간 더 교반시켰다. 반응 혼합물에 포화NH₄Cl 수용액을 가한후 CH₂Cl₂로 추출한 다음 감압 농축하였다. 얻어진 잔사를 column chromatography (CHCl₃ : MeOH=20 : 1)로 분리 정제하여 화합물 **15** (1.6 g, 81.5%)를 얻었다.

Rf=0.46 (CHCl₃ : MeOH=10 : 1)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 4.86 (s, 1H, H-1) 4.03 (d, 1H, H-2) 3.83 (dd, 1H, H-3) 3.45 (m, 1H, H-5) 3.35 (s, 3H, OCH₃) 2.59 (dd, 1H, H-4) 1.49 (s, 3H, CH₃) 1.33 (s, 3H, CH₃) 1.24 (d, 3H, CH₃)

Methyl-6-deoxy-2,3-O-isopropylidene-4-acetamido-α-L-rhamnopyranoside (16) - 화합물 **15** (1.65 g, 7.63 mmol)의 CCl₄ (60 ml)용액에 Et₃N (4.24 ml)을 가한 후 0°C로 하고, 이 용액에 trifluoroacetic anhydride (1.63 ml)를 천천히 가하여 1시간 동안 반응시켰다. 반응 혼합물을 물, 10% NaHSO₄ 수용액, 포화중조수 그리고 물로 세척한 후 감압 농축하였다. 얻어진 잔사를 column chromatography (n-Hexane : Acetone=4 : 1)로 분리 정제하여 화합물 **16** (2.2 g, 92.3%)을 얻었다.

Rf=0.34 (n-Hexane : Acetone=3 : 1)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 6.59 (d, 1H, NH) 4.84 (s, 1H, H-1) 4.15 (dd, 1H, H-3) 4.08 (d, 1H, H-2) 3.93 (dd, 1H, H-4) 3.80 (m, 1H, H-5) 3.39 (s, 3H, OCH₃) 1.53 (s, 3H, CH₃) 1.32 (s, 3H, CH₃) 1.26 (d, 3H, CH₃)

1,2,3-tri-O-acetyl-4,6-dideoxy-4-acetamido-α-L-rhamnopyranose (18) - 화합물 **16** (2.2 g, 7046 mmol)의 80% 초산 (31 ml)용액을 70°C에서 30분 교반한 다음 반응 혼합물을 감압 농축하였다. 여기에 다시 무수초산 (6.63 ml), H₂SO₄ (112 μl), CH₃NO₂ (50 ml)을 넣어 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 CH₂Cl₂로 희석한 다음 포화중조수, 물 그리고 포화식염수로 세척한 후 감압 농축하여 얻어진 잔사를 column chromatography (n-Hexane : Acetone=3 : 1)로 분리 정제하여 화합물 **18** (2.43 g, 89.7%)을 얻었다.

Rf=0.24 (n-Hexane : Acetone=3 : 1)

IR(KBr) : 3313.9, 1722.5 cm⁻¹

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 6.38 (d, 1H,

NH) 6.03 (d, 1H, H-1) 5.31 (dd, 1H, H-3) 5.17 (dd, 1H, H-2) 4.25 (q, 1H, H-4) 3.89 (m, 1H, H-5) 2.17, 2.13, 2.02 (3×s, 3×3H, 3×COCH₃) 1.27 (d, 3H, CH₃)

4,6-dideoxy-2,3-di-O-acetyl-4-acetamido-α-L-rhamnopyranosyl bromide (19) - 화합물 **18** (900 mg, 2.34 mmol)을 초산 (1 ml)과 CH₂Cl₂ (1 ml)에 용해한 후 30% HBr-AcOH (2 ml)를 가해 질소기류하에서 0°C에서 3시간 동안 교반시켰다. 반응 혼합물을 CH₂Cl₂로 희석한 다음 얼음물, 포화중조수, 그리고 얼음물로 세척한 후 감압 농축하여 **19**를 얻었다. 이 화합물은 불안정하므로 다음 반응에 바로 사용하였다.

7-O-(4',6'-dideoxy-2',3'-di-O-acetyl-4'-acetamido-α-L-rhamnopyranosyl)daunomycinone (21) - Daunomycinone(DH)과 화합물 **19**로 화합물 **20**의 제조방법과 동일하게하여 화합물 **21** (53.1%)을 얻었다.

Rf=0.32 (CHCl₃ : Ethylacetate=7 : 4)

mp : 158.0~159.7°C

[α]_D²⁰ : +105.3 (c 0.075 in CHCl₃)

IR(KBr) : 3520.3, 3470.2, 1734.1, 1618.4, 1577.9 cm⁻¹

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 13.85 (s, 1H, phenolic-OH) 13.18 (s, 1H, phenolic-OH) 7.97 (dd, 1H, H-1) 7.76 (t, 1H, H-2) 7.35 (dd, 1H, H-3) 6.88 (d, 1H, NH) 5.35 (d, 1H, H-1') 5.31 (t, 1H, H-7) 5.22 (d, 1H, H-2') 5.18 (dd, 1H, H-4') 4.25 (q, 1H, H-5') 4.03 (dd, 1H, H-3') 4.02 (s, 3H, OCH₃) 2.90 (d, 1H, H-10') 3.22 (dd, 1H, H-10) 2.39 (s, 3H, CH₃) 2.36 (br.d, 1H, H-8) 2.16 (m, 1H, H-8') 2.18, 1.98, 1.68 (3×s, 3×3H, 3×COCH₃) 1.30 (d, 3H, CH₃)

7-O-(4',6'-dideoxy-4'-amino-α-L-rhamnopyranosyl)daunomycinone hydrochloride (7) - 화합물 **21** (700 mg, 0.967 mmol)을 0.5 N NaOH 용액 (39 ml)에 용해하여 0~5°C에서 2시간 동안 교반시켰다. 1 N-HCl로 pH=9~10으로 조절한 후 CH₂Cl₂로 추출한 다음 감압 농축하였다. 얻어진 잔사를 HCl-MeOH로 salt화한 후 Ether로 결정화하여 화합물 **7** (70.1%)을 얻었다.

Rf=0.47 (n-BuOH : AcOH : H₂O=35 : 10 : 20)

mp : 219.7~223.6°C

[α]_D²⁰ : +253.4 (c 0.075 in MeOH)

IR(KBr) : 3404.6, 1618.4, 1579.4 cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.89 (m, 2H, H1, H-2) 7.65 (m, 1H, H-3) 5.50 (s, 1H, OH) 5.26 (t, 1H, OH) 5.13 (s, 1H, H-1') 4.97 (t, 1H, H-7) 4.17 (m, 1H, H-5') 3.98 (s, 3H, OCH₃) 3.74~3.57 (br.s, 2H, H-2', H-3') 2.96~2.86 (m, 3H, H-4', H-10) 2.29 (s, 3H, COCH₃), 2.23~2.04 (m, 2H, H-8) 1.25 (d, 3H, CH₃)

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, DMSO- d_6) δ : 212.5 (C-13) 186.11, 186.07 (C-5, C-12) 160.6 (C-4) 156.1, 154.3 (C-6, C-11) 136.1 (C-2) 135.1, 134.4 (C-6a, C-10a, C-12a) 119.6, 119.5 (C-1, C-3) 118.8 (C-4a) 110.47, 110.42 (C-5a, C-11a) 103.2 (C-1') 74.9 (C-9) 70.0, 69.0, 66.7, 65.5 (C-7, C-2', C-3', C-5') 56.5 (OMe) 54.2 (C-4') 36.1, 31.7 (C-8, C-10) 24.7 (C-14) 17.8 (CH₃)

7-O-(4',6'-dideoxy-4'-amino- α -L-rhamnopyranosyl) adriamycinone hydrochloride (8) - 화합물 D⁺H (694 mg, 1.43 mmol), HgO (1.16 g), HgBr₂ (335 mg), 분말molecular sieves 3Å (5.7 g)을 CH₂Cl₂ (37 ml)에 현탁시킨 후 화합물 **19** (0.5 g, 1.26 mmol)를 가하여 실온에서 차광하여 20시간 교반하였다. 반응 혼합물을 여과한 후 여액을 10% KHSO₄용액, 증류수 그리고 포화식염수로 세척한 다음 감압 농축하였다. 얻어진 잔사를 column chromatography (CHCl₃ : Acetone = 10 : 1)로 분리 정제하여 화합물 **23** (618 mg, 58.8%)을 얻었다. 이 화합물 **23** (618 mg, 0.76 mmol)을 0.5 N NaOH 용액 (30 ml)에 용해하여 0~5°C에서 2시간 동안 교반하였다. 이 반응액을 1 N-HCl로 pH=8~9로 조절한 다음 CH₂Cl₂로 추출하고 감압 농축하여 화합물 **24** (385 mg, 80%)를 얻었다. 이어서 이 화합물 **24** (385 mg, 0.608 mmol)를 0.2 N HCl (30 ml)에 용해시킨 다음 50°C에서 약 2시간 교반시켰다. 0.2 N NaOH로 pH=8~9로 조절한 후 CH₂Cl₂로 추출하고 감압 농축하였다. 얻은 잔사에 methanolic HCl를 넣어 salt화 한 다음 다시 ether를 가해 생성된 붉은색 고체를 여과하여 화합물 **8** (262 mg, 72.1%)를 얻었다.

Rf=0.37 (n-BuOH : AcOH : H₂O = 35 : 10 : 20)
[α]_D²⁰ : +253.6 (c 0.056 in MeOH)

IR(KBr) : 3412.3, 1726.4, 1618.4, 1577.9 cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ : 14.09 (br.s, 1H, penolic-OH) 13.20 (br.s, 1H, phenolic-OH)

8.00 (br.s, 3H, NH₃Cl) 7.92 (m, 2H, H-1, H-2) 7.65 (m, 1H, H-3) 5.40 (s, 1H, OH) 5.26 (t, 1H, OH) 5.14 (s, 1H, H-1') 4.97 (t, 1H, H-7) 4.82 (t, 1H, OH) 4.70 (dd, 1H, H-14) 4.52 (dd, 1H, H-14') 4.17 (m, 1H, H-5') 3.98 (s, 3H, OCH₃) 3.75~3.60 (br.m, 2H, H-2', H-3') 3.02~2.80 (m, 3H, H-4', H-10) 2.29~2.03 (m, 2H, H-8) 1.24 (d, 3H, CH₃)

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, DMSO- d_6) δ : 214.2 (C-13) 186.42, 186.39 (C-5, C-12) 160.8 (C-4) 156.0, 154.3 (C-6, C-11) 136.2 (C-2) 135.0, 134.6, 134.2 (C-6a, C-10a, C-12a) 119.9, 119.7 (C-1, C-3) 119.0 (C-4a) 110.68, 110.64 (C-5a, C-11a) 103.2 (C-1') 74.7 (C-9) 69.9, 68.9, 66.5, 65.4, 64.1 (C-14, C-7, C-2', C-3', C-5') 56.6 (OMe) 54.0 (C-4') 36.6, 32.3 (C-8, C-10) 17.8 (CH₃)

생물학적 활성

시약 및 재료 - 세포배양에 사용한 Fetal Bovine Serum(FBS), DMEM media, Streptomycin-Penicillin 용액, Sodium bicarbonate, L-glutamine용액, Phosphated-Buffered Saline(PBS)등은 Life Technologies사(New York, U.S.A)로부터 구입하여 사용하였으며, DXR과 DNR은 일본 명치제과(주)로부터 입수하여 사용하였다. MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 및 기타기약은 Sigma사(St. Louis, U.S.A)로부터 구입하여 사용하였다.

암세포주 및 세포배양 - *In vitro* 세포독성 측정에 사용된 생쥐 백혈병 암세포주 P388은 미국 ATCC사로부터 구입하여 사용하였다. 암세포주의 배양은 10%(v/v) heat-inactivated(56°C, 30분) FBS, 2 mM L-glutamine, 50 units/ml penicillin sodium, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin sulfate가 첨가된 DMEM media (이하 D10배지라 약칭)로 37°C, 5% CO₂의 CO₂배양기(Precision Scientific Inc., Napco Model 5430, Chicago, U.S.A)에서 실시하였다.

실험동물 - *In vivo* 항암효과 시험에 사용된 동물은 6주령 암컷 CD2F1 생쥐 (암컷 DBA/2 생쥐와 수컷 BALB/c 생쥐 F1)로서 일본 Charles River사(Atz-uki, Japan)로부터 특이 질병원 부재 (SPF, Specific Pathogen Free) 상태로 구입하여, 본 연구소

Table I— *In vitro* cytotoxicity of Compound **5**, **7**, **8**, **9**, DXR, and DNR against P388 murine lymphoid leukemia cell line

Drugs ^a	IC ₅₀ (ng/ml) ^b
5	14.8±5.4 ^c
7	21.3±3.4
8	104.6±29.5
9	141.1±35.6
DXR	20.5±4.9
DNR	12.8±2.2

^a: Tumor cells were continuously exposed for 48 hours to various concentration of drugs.

^b: The concentration of drugs inhibiting 50% of OD₅₄₀ value of control well were calculated by linear regression methods.

^c: Mean±S.D for at least 4 derterminations.

SPF 동물 사육시설내에서 사육시키면서 사용하였다. 5주령의 동물을 구입하여 1주일간 순화후 사용하였으며, 실험개시시의 체중범위는 18~22 g이었다. 생쥐 백혈병세포의 *in vivo* 계대에 사용한 동물은 DBA/2 생쥐로서 최초 일본 Charles River사로부터 분양받은 생쥐를 본 연구소 사육실에서 번식시켜 사용하였다. 실험기간 중 물과 먹이는 자유로이 섭취토록 하였으며, 물은 자외선 멸균수를 사료는 방사선 멸균 생쥐/흰쥐용 고품사료(Orie-ntal Yeast Co., Japan)를 사용하였다.

***In vitro* 세포독성** - **5**, **7**, **8**, **9**, DXR 및 DNR의 *in vitro* 세포독성은 MTT assay법⁶⁾을 다소 변형하여 측정된 옥 등¹⁰⁾이 발표한 실험 방법에 준하여 실시하였다.

***In vivo* 항암효과** - L1210 생쥐 백혈병에 대한 각 약물의 항암효력 시험은 Geran등의 방법⁷⁾을 다소 변형하여 실시하였다. CDF1 생쥐당 10⁵개의 L1210 생쥐 백혈병 세포를 이식하고 암 이식후 24시간 뒤에 단회 정맥주사하였다. 60일 까지의 생사를 확인한 후 옥 등¹⁰⁾의 방법에 따라 각 약물의 T/C(%)를 구하였다.

결 과

***In vitro* 세포독성** - 합성 신규 유도체 **5**, **7**, **8**, **9**의 생쥐 백혈병세포주 P388에 대한 *in vitro* 세포독성을, DXR과 DNR을 양성대조물질로 사용해 MTT법으로 측정하였다(Table I).

시험결과 DNR유도체인 **5**(IC₅₀=14.8 ng/ml)는 DNR(IC₅₀=12.8 ng/ml)과 거의 동일한 세포독성을

Table II— *In vivo* antitumor activity of Compound **7**, **8**, **9**, DXR, and DNR for ip-inoculated L1210 murine lymphoid leukemia

Drugs	Dose(mg/kg/day) ^a	T/C(%)	Body Weight Changes(g) ^b
Saline		100	+1.0
7	32	52	-3.9
	16	60	-3.0
	8	130	-1.3
	4	114	+0.6
8	32	58	-5.3
	16	60	-2.8
	8	>226(1/5) ^c	-0.4
	4	>232(1/5)	+0.8
9	128	66	-5.1
	64	>296(2/5)	-3.2
	32	>266(1/5)	-0.3
	16	140	+0.9
	8	120	+1.9
	4	148	+0.7
DXR	32	54	-3.7
	16	>374(2/5)	-2.7
	8	148	-0.8
	4	136	+0.6
	2	118	+2.8

^a: Drugs were intravenously administered on day 1.

^b: Body weight difference between day 5 and day 1.

^c: Numbers of animal survived 60 days after tumor cell inoculation.

보였으며, sugar의 4' 위치에 아미노기를 도입한 **7**(IC₅₀=21.3 ng/ml)의 세포독성은 DNR에 비해 감소되는 것으로 나타났다. 또한 DXR유도체인 **8**(IC₅₀=104.6 ng/ml)도 DXR(IC₅₀=29.4 ng/ml)보다 약 5배 약한 세포독성을 보였고, Sugar의 5'에 hydroxyl기를 도입하고 aglycone의 14번 위치에 β-alanine을 도입한 DXR 유도체 **9**(IC₅₀=141.1 ng/ml)도 DXR에 비해 약 7배 약한 세포독성을 보였다.

***In vivo* 항암효과** - 수용성인 신규 유도체 **7**, **8**, **9**의 *in vivo* 항암효과를 복강이식된 L1210 생쥐 백혈병에 대하여 검토하였다(Table II). 약물은 암 이식 1일 후 단회 정맥주사하였다.

7과 **8**은 모두 16 mg/kg 이상의 용량에서는 독성증상을 보였고, 8 mg/kg에서 최대 항암효력을 보였지만, 대조약물로 사용한 DXR보다 그 항암효과가 낮게 나타났다. **9**는 64 mg/kg의 용량에서 DXR보다 약간 낮은 항암효과를 보이고, 약 4배의 용량에서 거의 비슷한 체중감소를 보이므로 독성은 감소된 것으로 판단된다.

고찰 및 결론

1970년대 초 DXR과 DNR이 임상에 도입된 이래로 anthracycline계 항암제의 연구는 심장독성등의 부작용을 줄이고 항암효과가 우수한 항암유도체를 개발하려는 연구가 주류를 형성하고 있다. 저자 등도 daunosamine의 3'-amino기를 hydroxy기로 치환하고, 4'-hydroxy기를 fluorine이나 azide기를 도입함으로써 독성이 감소되고, 항암력이 개선된 새로운 유도체를 합성 보고한 바 있다.¹⁰⁾

이번 연구에서는 daunosamine의 4'-hydroxy(ax)기를 amino(eq)로, 3'-amino기를 hydroxy기로 각각 치환하고, 2'-hydroxy기를 새로 도입하여 합성한 DNR, DXR 유도체 7, 8은 *in vitro* 세포독성, *in vivo* 항암활성, 독성등에서 각각 DNR, DXR보다 열등한 것으로 나타났으나, 4'-amino기를 hydroxy기로 치환한 9의 경우는 DXR보다 약간 낮은 항암활성을 보인 반면 독성은 개선되는 것을 알수 있다. 이와같은 결과는 Fuchs 등^{8,9)}의 2'-halogen치환유도체와 마찬가지로 2'-hydroxy치환 유도체의 개발가능성을 제시하고 있을뿐만 아니라, 4'-amino치환 유도체로 개발시도는 신중히 고려해야 할 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처의 특정연구과제기금으로 수행되었기에 이에 감사하는 바입니다.

문헌

- Horton, D., Priebe, W. and Verela, O.: Synthesis and antitumor activity of 3'-deamino-3'-hydroxy doxorubicin : A facile procedure for the preparation of doxorubicin analogs. *J. Antibiotics* **37**, 853 (1984).
- Goldin, A., Venditti, J. M. and Geran, R.: The effectiveness of the anthracycline analog 4'-epidoxorubicin in the treatment of experimental tumors : A review. *Invest New Drugs* **3**, 3 (1985).
- Tsuchiya, T., Takagi, Y., Ok, K. D., Umezawa, S., Takeuchi, T., Wako, N. and Umezawa, H.: Synthesis and antitumor activities of 7-O-(2,6-dideoxy-2-fluoro- α -L-talopyranosyl) daunomycinone and adriamycinone. *J. Antibiotics* **39**, 731 (1986).
- Collins, P. M. and Overend, W. G.: A synthesis of 6-deoxy-L-talose. *J. Chem. Soc.* 1912 (1965).
- Arcamone, F., Penco, S., Vegevani, A., Redaelli, S., Franchi, G.: Synthesis and antitumor properties of new glycosides of daunomycinone and adriamycinone. *J. Med. Chem.* **18**, 703 (1975).
- Carmichael J., DeGraff W. G., Gazdar A. F., Minna J. D. and Mutchell J. B.: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936 (1987).
- Geran R. I., Greenberg N. H., Macdonald M. M., Schumacher A. M. and Abbott B. J.: Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems(Third Edition). *Cancer Chemother. Rep. Pt 3*, **3**, 1 (1972).
- Fuchs, E., Horton, D., Weckerle, W. and Winter-Mihaly, E.: Synthesis and antitumor activity of sugar-ring hydroxyl analogues of daunorubicin. *J. Med. Chem.* **224**, 406 (1979).
- Fuchs, E., Horton, D. and Weckerle, W.: Synthesis of 7-O-(2,6-dideoxy- α -L-lyxo-hexopyranosyl) daunomycinone, a functional analog of daunorubicin. *Carbohydr. Res.* **57**, c36 (1977).
- 옥광대, 박정배, 김문성, 정동윤, 양중익 : 당부분에서 4'-fluorine 또는 4'-azide로 치환된 3'-hydroxydaunorubicin 과 3'-hydroxydoxorubicin 유도체의 합성과 항암활성. 약학회지, 투고중 (1996).