

1-β-D-Arabinofuranosylcytosine-5'-methylthioacetate의 합성 및 이의 DNA 합성에 대한 억제작용 평가

이 회 주 · 송 민 경*

덕성여자대학 · *미국 NIH 국립암연구소

(Received October 25, 1986)

Synthesis of 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine-5'-methylthioacetate and Evaluation of Its Inhibitory Effect on DNA Synthesis

Heejoo Lee and Min-Kyung H. Song*

Duksung Women's College, Seoul 132, Korea and *Laboratory of Experimental
Carcinogenesis, National Cancer Institute, National Institute of Health, U.S.A.

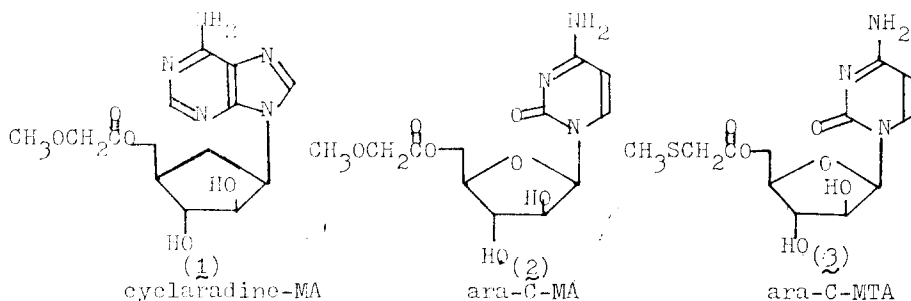
Abstract—As one of the starting materials, methylthioacetyl chloride(7) was synthesized in fair yield from mercaptoacetic acid *via* methyl methylthioacetate(5) prepared by alkylation employing N,N'-dicyclohexyl-O-methylisourea(4). Then 1-β-D-arabinofuranosylcytosine-5'-methylthioacetate (3) was prepared by esterification of ara-C with obtained methylthioacetyl chloride and tested for inhibitory activity on DNA synthesis in the growing primary hepatocytes and hepatoma strains(H4-II-E and HTC cells). In these *in vitro* cell lines, the inhibitory effect of ara-C-MTA(3) on DNA synthesis was similar to that of its parent ara-C but slightly lower.

Nucleoside중 1-β-D-arabinofuranosylcytosine (ara-C, cytarabine[®])이 항암성 작용이 있음은 널리 알려진 바이다. 그러나 이는 세포증식 cycle에 있어 S-phase만을 억제하고,¹⁾ 체내 존재하는 cytidine deaminase에 의해 쉽게 탈아미노화되어 혈액내에서 곧 세포분열 억제작용이 없는 1-β-D-arabinofuranosyluracil(ara-U)로 진화한다(혈중 t_{1/2}이 약 2시간).²⁾ 한편 ara-C는 수용성이 크고 지용성이 낮으므로(분배계수 log *Poctanol/water* = -2.1)³⁾ 경구투여시 체내 흡수가 매우 낮다(20% 이하). 따라서 ara-C의 유효한 혈중 농도를 지속해서 유지하기가 매우 어렵다. 이와 같은 탈아미노화를 극복하며 흡수, 분포도가 증가되어 지속적인 효과를 나타내는 ara-C의 prodrug를 얻어보코자 많은 연구들이 진행·보고되고 있다.^{3,4)}

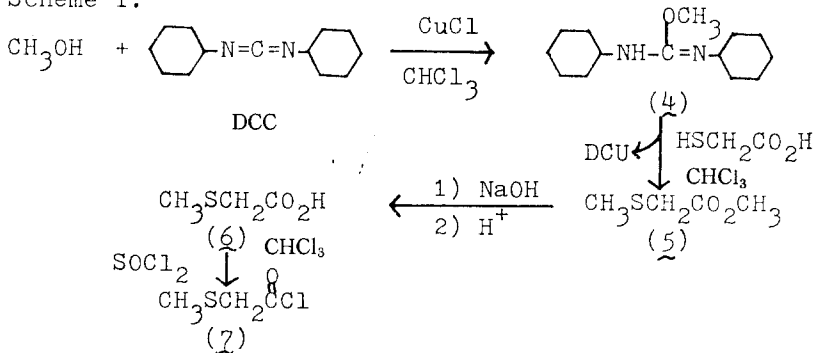
본저등도 nucleoside의 prodrug연구를 지속해 오던 중 특히 nucleoside의 5'-OH에 methoxyacetyl기를 도입하여 보다 효율이 높은 화합물들을

얻었다. 즉 cyclaradine의 5'-methoxyacetate유도체(1)가 herpse simplex virus type 1 및 2 (HSV-1 및 HSV-2)에 저해작용이 모약보다 *in vivo*에서 높은 것을 보고하였다.^{5,6)} 또 한편 ara-C의 5'-methoxyacetate(2)를 합성하여 모약 ara-C와 항암작용을 비교하여 보고하였다.⁷⁾

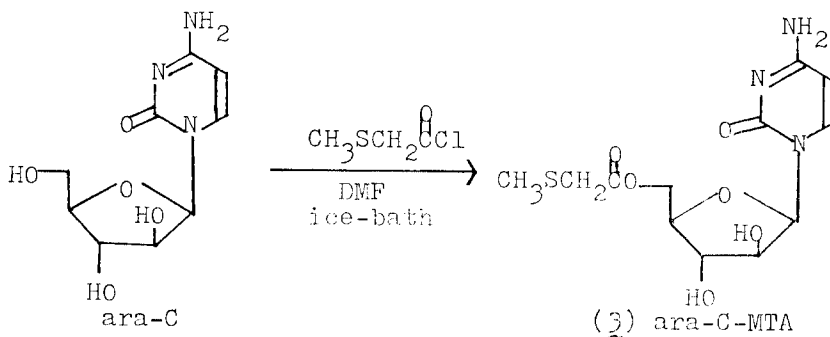
이번 연구에 있어서는 약으로서 문제점이 많은 ara-C를 선택하여 5'-OH기에 methoxyacetyl기 대신에 지용성이 보다 큰 thio원소가 포함된 methylthioacetyl기를 도입하여 보았다. 즉 methylthioacetyl ester기 도입은 일반 에스테르기 도입과 마찬가지로 cytidine deaminase에 기질이 되지 않고,³⁾ 또 methoxyacetyl ester나 마찬가지로 흡수분포 후 세포내에서 용이하게 가수분해되어 모약 ara-C를 지속적으로 유리시켜줌으로 활성형으로 인산화⁸⁾되리라 기대되었다. 먼저 원료물질로 필요한 methylthioacetyl chloride(7)를 비교적 용이한 방법으로 합성하게 되었고 (Scheme 1), 이어 ara-C-5'-methylthioacetate(3,



Scheme 1.



Scheme 2.



ara-C-MTA)를 얻게되고(Scheme 2), 이 화합물이 일부 간세포를 *in vitro* 증식시 DNA 합성을 억제함을 보이는 결과를 얻어 보고하는 바이다.

실험 방법

시약 및 기구—합성에 필요한 화합물들은 Aldrich Co. 또는 Sigma Co.에서 구입사용하였

고, 용매는 특급 또는 일급 시약을 사용하였다. TLC는 Merck Co.의 Kieselgel 60 F₂₅₄를 사용하고, 칼람용 실리카 겔은 같은 회사 Kieselgel 60(0.063~0.200mm)를 사용하였다. 기타 재료로 [³H]-deoxythymidine([³H]-TdR)은 Amersham Co.로부터, Swim's S-77 medium은 Grand Island Biochemical Co.에서, 그리고 fiber glass 필터는 Whittaker M.A. Bioproducts에서 구입하

여 사용하였다.

용점 측정은 Melting apparatus bockmonoscope를 사용하고, IR 스펙트럼은 Perkin-Elmer 1310, NMR 스펙트럼은 Varian FT-80A를 이용하여 얻었다.

사용된 간세포^{9,10)}—1) 정상 간세포(primary hepatocytes): 보통 rat의 간으로 부터 분리한 간세포이다.

2) H4-II-E cells: Pitot등에 의해 acetylaminofluorene을 써서 얻어낸 Reuber(H35) hepatoma strain이다.

3) HTC cells: N, N'-2, 7-fluorenylene-bis-2, 2, 2-trifluoroacetamide 함유 식이요법을 male buffalo rats에 12개월간 적용함으로 얻어진 solid hepatoma로 부터 얻어진 것이다.

Methylthioacetyl chloride(2)의 합성—Scheme 1의 과정을 걸쳐 중간산물들은 IR spectra만을 확인하고 끝으로 methylthioacetyl chloride(7)를 분리확인 하였다. 먼저 N,N'-dicyclohexylcarbodiimide(DCC, 41.2g, 0.2 mole)을 CHCl₃(20ml)에 녹인 후 냉각조상에서 교반하며, MeOH(6.4g, 0.2mole)과 CuCl(500mg)을 가하고 1시간 동안 교반하였다. 다음 반응액을 상온에서 2일간 반응시킨 후(DCC의 -N=C=N-기의 IR 흡수 peak가 2100cm⁻¹에서 거의 소실되고, 생성물인 isourea(4)의 흡수 peak가 1660cm⁻¹에서 크게 나타났음), CHCl₃-hexan 혼합액을 가하고 생긴 침전(CuCl)을 여과 제거하였다. 여액을 증발 농축하여 잔액으로 NN',N'-dicyclohexyl-O-methylisourea(4, IR 1660cm⁻¹ 흡수)를 얻었다.

위에서 얻은 화합물을 CHCl₃(100ml)에 녹인 용액을 냉각조에서 교반하며, mercaptoacetic acid(8.0g, 0.087 mole)을 CHCl₃(100ml)에 희석하여 서서히 가하고 30분간 반응시켰다. 이어 반응액을 5시간 환류가열하고, 상온에서 1일간 방치하였다. 생성된 부산물 N,N'-dicyclohexylurea(DCU, mp 230~231°C) 침전을 여과제거하고, CHCl₃층을 10% Na₂CO₃ 수용액 및 NaCl-포화 수용액으로 계속 세척한 후 용매를 증류제거하고 잔액(10.3g)으로 methyl methylthioacetate(5, IR 1740cm⁻¹에서 흡수)를 얻었다. EtOH(100ml)

과 2.5N NaOH수용액(50ml) 혼합액을 냉각하고 얻은 메칠에스테르(5)를 가한 후, 환류가열하여 3시간 동안 가수분해하였다. EtOH 용매를 증류 제거하고 냉각시킨 후 H₂SO₄로 산성으로 하고 CHCl₃로 추출, 용액을 Na₂SO₄로 건조한 후 용매를 증류제거하고 잔액으로 methylthioacetic acid(6, 6g)를 얻었다.

얻은 acid 화합물(6)를 CHCl₃(30ml)에 녹이고 냉각하며 과잉의 SOCl₂(30ml)와 혼합하고 상온에서 하룻밤 동안 반응하였다. 여분의 SOCl₂와 용매를 증류제거한 후 잔액을 감압증류(50°C/10 mmHg)하여 액체 methylthioacetyl chloride(7, 3.5g, 수율은 처음부터 약 32%)를 얻었다: IR(neat) 1780cm⁻¹(COCl); NMR(CDCl₃) δ 2.25(s, 3H, CH₃), 3.68(s, 2H, CH₂).

1-β-D-Arabinofuranosylcytosine-5'-methylthioacetate(3)의 합성—이미 보고된 방법⁷⁾과 유사하게 ara-C(1 mmole)을 DMF(20ml)에 녹이고 냉각, 교반하며 위에서 얻은 methylthioacetyl chloride(7, 1.2 mmole)을 DMF(5ml)에 희석하여 서서히 가해주었다. 반응은 냉각조에서 하룻밤 동안 진행한 후 생성된 HCl을 분말 NaHCO₃로 중화하고 용매를 증류제거하였다. 남은 잔사를 silica gel column을 써서 20% MeOH-CHCl₃-0.5% AcOH 혼합용매로 용출하여, 해당부분(R_f 0.36, 20% MeOH-CHCl₃-2% AcOH)을 모아 MeOH-EtOAc을 써서 결정의 ara-C-5'-MTA(3)을 얻었다: mp 188~190°C; IR(KBr) 3360, 1720(ester), 1660, 1280, 1110cm⁻¹; NMR(DMSO-d₆) δ 2.12(s, 3H, CH₃), 3.32(s, 2H, CH₂), 3.75~4.5(m, 5H), 5.6(br. s, D₂O exchangeable), 5.90(d, J=8Hz, 1H, C₅-H), 6.02(d, J=4Hz, 1H, C₁'-H), 7.65(d, J=8Hz, 1H, C₆-H).

DNA 합성 억제 실험—Richard⁹⁾ 및 Song¹⁰⁾ 등이 보고한 방법에 따라 rat의 정상 간세포, Reuber hepatoma strain인 H4-II-E cells 및 solid hepatoma인 HTC cells의 증식시 ara-C와 합성 ara-C-MTA가 DNA 합성을 억제함을 [³H]-TdR이 DNA에 삽입되어 들어가는 정도의 차이로 측정하였다. 간략히 요약하면 Swim's S-77 medium

에 각 hepatocytes(2×10^4 cells)를 현탁정착시키고, 각 농도의 ara C 및 ara-C-MTA 및 $[^3\text{H}]-\text{TdR}$ ($0.5 \mu\text{Ci}$) 존재하에 일정시간씩 배양하였다. 각 시간에 있어 배양된 간세포들을 배양액으로 씻고, 유리섬유 필터에 모으고 증류수로 충분히 씻었다(이때 세포파괴로 세포질용해물까지 제거됨). 다음 DNA를 모은 섬유 디스크를 aquasol에 넣고 scintillation counter로 방사능을 측정하였다. 이와 같은 동일 실험을 3회 반복하였고, 측정된 방사능은 $[^3\text{H}]-\text{TdR}$ 이 각 간세포들의 DNA 합성시 도입된 정도로 간주하고, 대조군과 비교하여 화합물들의 저해작용을 보았다.

실험결과 및 고찰

화합물 합성—Nucleoside의 5'-OH기에 methyl-

thioacetyl기 ($\text{CH}_3\text{S}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-$)를 도입하기 위해 methylthioacetyl chloride 화합물이 요구되어 이의 합성을 mercaptoacetic acid ($\text{HSCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, Aldrich Co.)로 부터 시작하였다. 처음 시도는 methyl iodide를 써서 thiol기에 monomethyl화시킨 화합물을 분리하고자 하였으나 TLC상에 여러 혼합물이 형성되고 수용성이 커 목적하는 물질의 분리가 불가능하였다. 여러가지 방법으로 시도 끝에 isourea를 이용하는 알킬화법¹¹⁾을 써서 mercaptoacetic acid의 thiol기와 acid기를 동시에 알킬화한 화합물로 분리할 수 있었다 (Scheme 1). 즉 촉매로 $\text{CuCl}(I)$ 존재하에 DCC와 동량의 메탄올을 반응시켜 N,N' -dicyclohexyl-O-methylisourea (4, IR 스펙트럼에서 처음 DCC의 $-\text{N}=\text{C}=\text{N}-$ 기에 기인한 2100cm^{-1} 에서 흡수가 소실되고, 1660^{-1} 에서 isourea기의 흡수 증가로 반응완결을 확인)를 얻었다. 이를 1/2 당량의 mercaptoacetic acid와 반응시켜 dialkylation된 methyl methylthioacetate (5, IR 1740cm^{-1} 에서 흡수로 에스테르기 확인)을 얻고, isourea는 DCU (mp $230 \sim 231^\circ\text{C}$)로 쉽게 여과제거되었다. 이와같이 DCC와 한 알킬과 반응시킴으로 다양하게 얻을 수 있는 alkylisourea를 이용하는 알킬화법은 thiol기와 acid기를 동시에 알

킬화시킬 수 있을 뿐만 아니라, 그밖에 다른 부산물이 형성되지 않아 분리가 용이하며 수율이 높았다(거의 100%).

위에서 얻은 에스테르(5)를 NaOH로 가수분해하여 유리 산으로 환후 thionylchloride와 반응시켜 methylthioacetyl chloride (7, IR 1780cm^{-1} 흡수로 COCl기 확인)를 증류하여 얻었다. 이는 NMR 스펙트럼에서 CH_3 와 CH_2 의 각 proton들이 $\delta 2.25$ 와 3.68 에서 singlet로 3 : 2의 비를 나타냄으로 확인되었다.

Ara-C의 5'-OH기에 methylthioacetyl기 도입은 보고된 일반 에스테르기 도입 방법을 이용하였다.⁷⁾ 즉 ara-C를 DMF에 녹이고 여기에 합성된 methylthioacetyl chloride를 가해 반응시켜 목표하는 ara-C-MTA (3)을 칼람크로마토그래피를 써서 분리하였고, TLC R_f 0.36 (20% MeOH- CHCl_3 -2% AcOH)으로 단일 물질임을 확인하고 NMR 스펙트럼으로 구조를 확인하였다(실험방법 참조).

DNA 합성 억제—Richard⁹⁾ 및 Song¹⁰⁾ 등의 방법에 따라 rat의 정상 간세포, Reuber hepatoma strain인 H4-II-E cells 및 solid hepatoma인 HTC cells의 증식시, 합성, ara-C-MTA와 positive대조물 ara-C가 DNA 합성에 주는 영향을 $[^3\text{H}]-\text{TdR}$ 이 DNA에 삽입되어 들어가는 정도의 차이를 대조군과 비교하여 보았다. 먼저 rat의 정상 간세포 증식시 ara-C-MTA와 ara-C의 영향을 보았는데, 그결과는 Fig. 1과 같이 ara-C-MTA가 ara-C와 거의 같은 억제효과를 보여주고, 10^{-4}M 용액에서는 양쪽이 92% 이상의 DNA 합성을 억제하였다. 이는 48시간 동안 약물을 처리한 결과로 그간에 ara-C-MTA가 충분히 가수분해되어 모약 ara-C를 유리하여 ara-C 자체와 마찬가지로 활성형으로 인산화⁸⁾되어 억제작용을 하였다고 볼 수 있다.

다음으로 간암세포 line인 H4-II-E cells와 HTC cells에서 DNA 합성에 미치는 영향을 각 농도의 약물을 1, 4 및 24시간 처리하여 Table I 과 II와 같은 결과를 얻었다. 각 경우에 있어 ara-C-MTA가 ara-C보다 약간 낮으나 비슷한 양상의 DNA 합성 억제 결과를 보여주고 있다. 즉 4

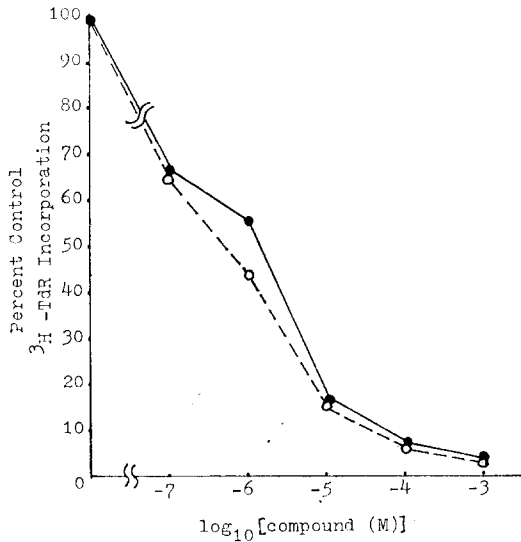


Fig. 1—Effects of ara-C and ara-C-MTA on the incorporation of [³H]-Tdr into DNA of the growing primary hepatocytes. Cells(2×10^4) in Swim's S-77 medium were labeled for 48 hrs with [³H]-Tdr in the absence(control) or presence of increasing concentrations of each compound: ara-C ○·····○; ara-C-MTA ●—●. The radioactivity retained in the filter discs was measured and the means of triplicate determinations were used to obtain in percentages of control values.

또는 24시간 처리한 경우는 ara-C 및 ara-C-MTA 어느 것도 10^{-4} M 일때 H⁴-II-E cells 및

HTC cells에서 80% 이상의 DNA 합성 억제 작용을 보이고, HTC cells에서 보다 H⁴-II-E cells에서 약간 높은 작용을 보였다. 약물을 이와 같이 4 또는 24시간 처리한 경우는 ara-C-MTA가 가수분해되어 ara-C와 유사한 결과를 나타내었다고 사료되며, 한편 약물을 한시간 처리하였을 때 ara-C-MTA가 ara-C보다 DNA 합성 억제력에 많은 차이가 있는 것은 ara-C-MTA가 가수분해되기에 충분한 시간이 되지 못하는 때문으로 사료된다.

이상의 실험결과로 ara-C-MTA가 *in vitro* 간세포 내에서 가수분해되어 ara-C와 유사하게 활성형으로 인산화되어 DNA합성에 억제효과를 나타내는 것으로 볼 수 있다. 그리고 본래 ara-C-MTA는 5'-ester 유도체로 ara-C보다 지속적인 효과를 보이리라 예상되었는데 그렇지못함은(4 또는 24시간 처리시), ara-C-MTA가 가수분해되어 유리시킨 ara-C가 ara-C-triphosphate(ara-CTP)로 활성화되기 전에 이들 간세포에 다량 존재²⁾하는 cytidine deaminase에 의해 탈아민화되는 것이 아닌가 사료된다.

또한 이번 결과는 전에 보고한 ara-C-MA(2)의 실험결과와 비교하여 볼 수 있다.⁷⁾ 즉 *in vitro* DNA 합성 억제 실험에서 ara-C-MA가 ara-C에 비해 작용이 낮았으나(10^{-3} M에서 ara-C는 100% 억제; ara-C-MA 94%), *in vivo* 항

Table I—Effects of ara-C and ara-C-MTA on the incorporation of [³H]-Tdr into DNA of the growing H⁴-II-E cells.

Concentration (M)	Percent control in [³ H]-Tdr incorporation					
	ara-C			ara-C-MTA		
	1hr	4hr	24hr	1hr	4hr	24hr
0	100	100	100	100	100	100
10^{-7}	104	98	114	98	105	112
10^{-6}	77	44	85	102	67	111
10^{-5}	51	11	7	84	20	15
10^{-4}	33	5	3	54	6	12
10^{-3}	17	4	2	27	4	3

Cell(2×10^4) in Swim's S-77 medium were labeled for 1, 4, and 24hrs with [³H]-Tdr in the absence(control) or presence of increasing concentrations of each compound. The radioactivity retained in the filter discs was measured and the means of triplicate determinations were used to obtain in percentage of control values.

Table II—Effects of ara-C and ara-C-MTA on the incorporation of [^3H]-TdR into DNA of the growing HTC cell.

Concentration (M)	Percent control in [^3H]-TdR incorporation					
	ara-C			ara-C-MTA		
	1hr	4hr	24hr	1hr	4hr	24hr
0	100	100	100	100	100	100
10^{-7}	93	69	85	82	100	110
10^{-6}	85	35	53	90	55	88
10^{-5}	44	8	17	75	19	30
10^{-4}	30	4	11	50	5	15
10^{-3}	20	5	8	25	4	11

This experiment is the same as in the case of H4-II-E cells.

암실험에서 ara-C-MA가 ara-C보다 높은 효과를 보여주었다($57\mu\text{M/kg}$ 투여시 ara-C의 ILS 35%; Ara-C-MA 42%). Ara-C-MA가 ara-C보다 *in vivo* 실험에서 좋은 결과를 보인 것이 ara-C 보다 지용성이 크므로 약물 분포가 증가한 때문이었다면, ara-C-MTA인 경우도 ara-C-MA와 마찬가지로 *in vivo* 항암작용 실험을 한 후에 보다 정확한 평가를 할 수 있겠다. 현재 실험이 계속되고 있다.

감사의 말씀

본 연구가 진행되게 지원해 준 한국과학재단에 감사하며, 기기분석에 많은 도움을 준 서울대학교 생약연구소에 감사드린다.

문헌

- 1) Skipper, H.E., Schabel, Jr, F.M. and Wilcox, W.S.: Experimental evaluation of potential anti-cancer agents. XXI. Scheduling of arabinosylcytosine to take advantage of its S-phase specificity against leukemia cells. *Cancer Chemother. Rep.*, **51**, 125 (1967).
- 2) Ho, D.H.W. and Frei III, E.: Clinical pharmacology of 1- β -D-arabinofuranosyl cytosine. *Clin. Pharmac. and Therap.*, **12**, 944 (1971).
- 3) Wechter, W.J., Johnson, M.A., Hall, C.M., Warner, D.T., Berger, A.E., Wenzel, A.H., Gish,

D.T. and Neil, G.L.: Ara-Cytidine acylates. Use of drug design predictors in structure-activity relationship correlation. *J. Med. Chem.*, **18**, 339 (1975).

- 4) Ryu, E.K., Ross, R.J., Matsushita, T., MacCoss, M., Hong, C.I. and West, C.R.: Phospholipid-nucleoside conjugates. 3. Syntheses and preliminary biological evaluation of ara-C-5'-monophosphate-L-1,2-dipalmitin and selected ara-C-5'-diphosphate-L-1,2-diacylglycerols. *J. Med.Chem.*, **25**, 1322 (1982).
- 5) Vince, R., Daluge, S., Lee, Heejoo, Shannon, W.M., Arnett, G., Schafer, T.W., Nagabhushan, T.L., Reichert, P. and Tsai, H.: Carbocyclic arabinofuranosyladenine(cyclaradine): Efficacy against genital herpes in guinea pigs. *Science*, **221**, 1405 (1983).
- 6) Shannon, W.M., Westbrook, L., Arnett, G., Daluge, S., Lee, Heejoo and Vince, R.: Comparison of the efficacy of vidarabine, its carbocyclic analog(cyclaradine), and cyclaradine-5'-methoxyacetate in the treatment of herpes simplex virus type 1 encephalitis in mice. *Antimic. Agent and Chemothe*, **24**, 538 (1983).
- 7) 이희주, 차영애, 안정옥, 장일무 : Ara-A-5'-methoxyacetate 및 ara-C-5'-methoxyacetate의 합성 및 sarcoma 180 암에 대한 항암작용. *한국생화학회지* **17**, 332 (1984).
- 8) Montgomery, J.A. and Struck, R.F.: The relationship of the metabolism of anticancer agents to

- their activity. *Drug Research*, Jucker, E. Ed., Birkhäuser Verlag Basel und Stuttgart, vol. 17, 320 (1973).
- 9) Richards, W.L., Song, M.H., Krutzsch, H., Evarts, R.P., Marsden, E. and Thorgeirsson, S.S.: Measurement of cell proliferation in microculture using Hoechst 33342 for the rapid semiautomated microfluorimetric determination of chromatin DNA. *Exp. Cell Res.*, 159, 235 (1985).
- 10) Song, M.H., Krutzsch, H., Hankins, W.D., Richards, W.L. and Thorgeirsson, S.S.: Rapid determination of DNA synthesis in adherent cells grown in microtiter plates. *Exp. Cell Res.*, 156, 271 (1985).
- 11) Mathias, L.H.: Esterification and alkylation reactions employing isoureas. *Synthese*, 561 (August, 1979).