

Thymidylate synthase의 Multisubstrate analog Inhibitor의 합성***

곽인영*유응걸**

Synthesis of Multisubstrate analog Inhibitor of Thymidylate synthase

In-Young Kwak* and Eung K. Ryu**

Abstract

The pyrimidyl derivative of 2'-deoxythymidine 5'-monophosphate, 3 has been synthesized for the development of anticancer agents. The compound 3 derived from prototype inhibitor 2 by modifying the p-aminobenzoyl glutamic acid portion has been designed to facilitate the membrane penetration. Variable temperature ¹H NMR spectrum for the protected nucleotide has indicated the existence of two conformers which are stable on the NMR time scale at ambient temperature.

I 서 론

Thymidylate synthase(EC 2.1.1.45)는 2'-deoxyuridine 5'-monophosphate(dUMP)를 기질로 하여 2'-deoxythymidine 5'-monophosphate(dTMP)를 생성하는데 관여하는 효소이며, 이때 N⁵, N¹⁰-methylenetetrahydrofolate는 cofactor로 작용하여 탄소 하나를 제공하고 자신은 dihydrofolate로 전환된다. 이 반응 과정에서 기질, cofactor 및 효소에 의해서 일시적인 Ternary complex 1이 형성됨이 FdUMP의 사용을 통해 제안된¹⁻³⁾ 이래 이 ternary complex의 구조에서 두 기질의 구조를 모방하는 소위 Multisubstrate analog Inhibitor들이 합성되어, 효소의 활성부위의 연구와 항암제 개발에 새로운 길을 열어주고 있다. 그중 화합물 2는 Human cancer에서 추출한 Thymidylate synthase에 높은 억제 효과를 나타

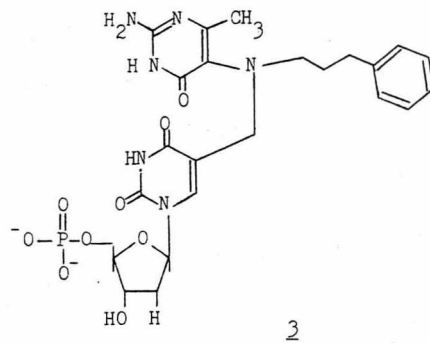
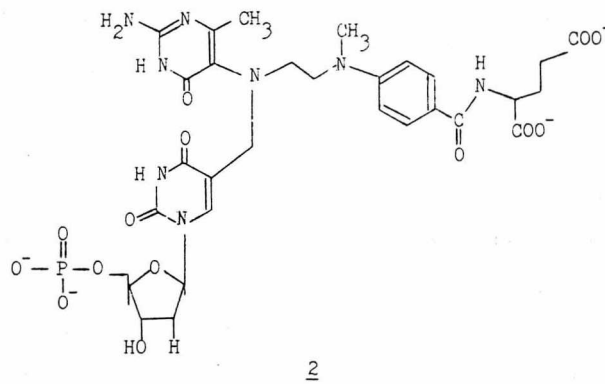
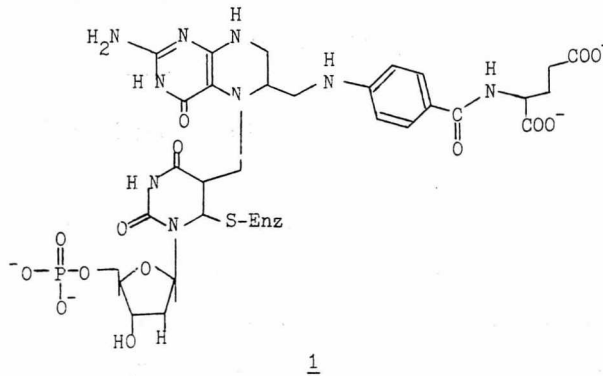
* 배재대학교 이공대학 유전공학과 부교수

** 한국화학연구소 유기1부 5실

*** 이 논문은 1989-1990 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의해 연구된 것의 일부이기에 이에 감사드립니다.

냈으나⁴⁻⁷⁾ 몇종의 암세포에 대한 세포독성은 없었다. 이와같이 세포독성이 결여된 이유는 생물학적 pH에서 이 화합물이 4가의 음이온으로 하전되어 세포투과성이 떨어졌기 때문으로 추측된다.

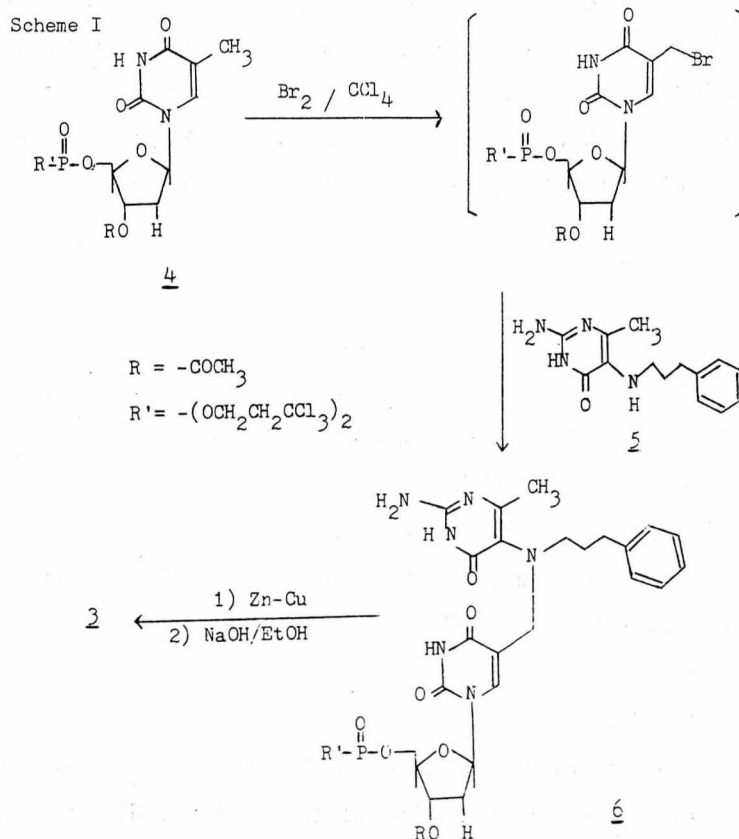
본 연구에서는 세포 투과성의 향상을 도모하고 아울러 암세포에 대한 세포독성을 기대하여 화합물 3을 고안하여 합성하게 되었다. 이 화합물은 화합물 2의 p-aminobenzoyl glutamic acid 부분을 alkyl benzene으로 변형시킨 것으로 carboxyl group에서 비롯되는 음하전을 가지지 않고 인산기에서 비롯되는 2가 음이온만을 가지게 되어 기존의 효소 다기질 저해제에 비해 극성이 다소 감소된 구조로 볼 수 있다.



II 본 론

이의 합성은 2,5-diaminopyrimidine의 5-amino group의 선택적인 알킬화반응⁸⁾에 근거를 두었다. 우선 보호기를 단 dTMP, 4를 자유라디칼 브롬화 반응시킨 뒤 Baker등¹¹⁾의 방법으로 합성한 2,5-diaminopyrimidine 유도체, 5와 알킬화 반응시켜 화합물 6을 얻었다(Scheme I). 이 화합물의 ¹H NMR에서 thymidine의 6-H signal과 pyrimidine의 6-methyl이 sharp singlet이 되어야함에도 불구하고 갈라진 singlet의 양상을 보였다. 형태이성체의 생성여부를 살피기 위해 NMR probe의 온도를 올리면서 관찰하였을 때 40°C에서 위 두종류의 갈라진 singlet들이 sharp singlet으로 겹쳐졌고 다시 상온으로 내렸을 때 갈라진 singlet으로 되돌아오는 가역적 현상을 보임으로 형태이성체의 존재를 확인할 수 있었다.

최종적으로 화합물 6의 보호기가 제거되었다. Zn-Cu couple에 의해 인산기의 보호기가 제거되고 비누화 반응을 거쳐 3'의 acetyl group이 제거되어 nucleotide 3이 합성되었다. 순수 정제를 위해 DEAE-Sephadex에서 Triethylammonium bicarbonate(TEAB)를 linear gradient로 하여 이온교환 크로마토 그래피를 하였다. 순수한 분액을 취해 용액을 증발시킨 뒤 NaClO₄로 Na염을 만든 후 증류수에 녹여 냉동건조하여 Fast Atom Bombardment를 이용한 질량분석법으로 분자량을 확인하였다.



III 실 험

NMR 스펙트럼은 TMS를 내부표준물로 하여 Bruker AM-300을 사용하여 얻었으며 Mass 스펙트럼은 JEOL JMS-DX 303 질량분석기를 사용하였고 칼럼 크로마토그래피는 silica gel(SF, 60-240 mesh)을 사용하였다. DEAE Sephadex(A-25-120)는 Sigma chemical로부터 구입하여 10g을 3차 증류수(100ml)에 팽윤시킨 후 생성된 gel을 fritted glass funnel(medium porosity)에서 1) 0.5M NaOH(300 ml); 2) 증류수(400ml); 3) 0.5M acetic acid(300ml); 4) 증류수(400ml); 5) 0.5 NaHCO₃(300 ml); 6) 증류수(400ml)로 세척하여 bicarbonate형으로 만들었다. 이 gel은 증류수에서 4°C로 보관 되다가 이온교환 칼럼크로마토그래피에 사용되었다.

N-(2-amino-4-oxo-6-methylpyridin-5-yl)-N-[1-[2'-deoxy-3'-O-acetyl-5'-[bis(trichloroethyl)]phosphoryl-β-D-ribofuranosyl]thymine]-N-aminopropylbenzene[6]

A. 브롬화 반응

Bärwolf¹⁰⁾의 방법을 응용한 Yang⁶⁾의 방법에 의해 3'-O-acetylthymine-5'-bis(2,2,2-trichloroethyl)phosphate을 브롬화 하였다. 이 화합물(783.8mg, 1.25 mmol)을 무수 CCl₄(50ml)에 용해시킨 뒤 500W Sunlamp를 비치면서 환류하였다. 여기에 CCl₄(5ml)에 희석한 Bromine(220mg, 1.4 mmol)을 분액깔때기를 통해 한방울씩 가하되 Bromine의 적갈색이 완전히 사라지면 다음방울을 더하는 식으로 가하는 속도를 조절하였다. tlc(Ethylacetate : Hexane=80 : 20)에 의해 반응물이 약 70% 정도 반응된 점에서 Bromine의 적갈색을 중지하였다. 용액을 실온으로 냉각한 후 증발시키고 그 잔사에 대해 알킬화 반응을 계속하였다.

B. 알킬화 반응

위의 잔류물을 무수 DMF(20ml)에 용해시킨 뒤 2-amino-6-methyl-5-(3-phenylpropylamino)-4-oxopyrimidine¹¹⁾(258mg, 1 mmol)을 가하고 NaHCO₃(100mg)을 혼합하여 실온에서 2시간 교반하였다. tlc(Chloroform : Methanol=90 : 10)에서 반응물이 완전히 없어진 것을 확인하고 감압하에 DMF를 제거한 후 잔류물을 물(200ml)에 현탁시킨 뒤 Chloroform(300ml)으로 추출하였다. Chloroform층을 물(100ml)로 2회 씻고 무수 sodium sulfate으로 탈수하여 여과한 후 증발시켰다. 이를 silica gel 칼럼 크로마토그래피(Chloroform : Methanol=97 : 3)로 정제하여 미색의 고체를 얻었다.

수득율 : 274mg(31%)

MS(m/z) ; FAB 883(MH⁺)

¹H-NMR(DMSO-d₆) (40°C) ; δ1.53(q, 2H, CH₂), 2.04(s, 3H, C-CH₃), 2.08(s, 3H, COCH₃), 2.31(m, 2H, H-2'), 4.23(m, 1H, H-3'), 4.40(m, 2H, H-5'), 4.80(m, 4H, 2×OCH₂CCl₃) 5.25(m,

1H, H-3'), 6.18(t, 1H, H-1'), 6.44(br s, pyr. NH₂), 7.13, 7.21, 7.23(m, 5H, Ph), 7.48(s, 1H, Ur H-6), 10.90(br s, 1H pyr.NH), 11.38(s, 1H, Ur NH).

N-(2-amino-4-oxo-6-methylpyridin-5-yl)-N-[(2'-deoxyuridine-5'-monophosphate-5-yl)methyl]aminopropylbenzene[3]

화합물[6](176.6mg, 0.2mmol)을 무수 DMF(5ml)에 용해시키고 acetylacetone(200mg, 2mmol)과 새로 조제된 Zn-Cu couple⁹⁾(260mg)을 가한다. Oil bath에서 55°C를 유지시켜 1시간 교반한 후 tlc(2-propanol : NH₄OH : H₂O=7 : 1 : 2)로 관찰하여 출발물질이 완전히 반응된 것을 확인한 후 30분 더 교반하고 물(50ml)로 희석한다. 여기에 H₂S gas를 주입하여 Zn-Cu couple의 잔류물을 sulfide 형태로 침전시킨 뒤 여과하고 용매를 감압하에 제거시켰다. 이 잔류물에 Ethanol(1ml)과 1N-NaOH(2ml)를 넣고 48시간 교반한 후, 물(300ml)를 더 가하고 0.5N-HCl로 pH를 4.5로 조정한다. 물(300ml)을 더 가한 후 DEAE Sephadex(A-25-120, bicarbonate형) 칼럼(0.9×10cm)에서 정제하였다. 칼럼은 10ml의 증류수로 세척한 후 TEAB(0.05M-TEAB 500ml/0.5M-TEAB 500ml)를 linear gradient로 하여 크로마토그래피하였다. 순수한 분획을 모아 감압하에 용매를 제거하고 10ml의 Ethanol로 3회 증발시킨 후 다시 Ethanol(5ml)에 용해시켰다. 무수 Acetone(10ml)에 NaClO₄(280mg, 2mmol)을 용해시킨 뒤 위의 용액을 가하면 sodium염이 형성되는데 이 현탁액을 냉장고에 보관하였다가 원심 분리하여 침전물을 얻고 이것을 Acetone으로 3회 세척한 후 고형물을 증류수(0.5ml)에 용해시키고 냉동건조하여 흰색의 고체를 얻었다.

수득율 : 6.2mg(5%)

MS ; FAB 601(M+Na+2H)⁺, 623(MH+2Na)⁺, 645(M+3Na)⁺, 667[(M+4Na)-H]⁺.

IV 결과 및 고찰

보호기를 단 dTMP의 5-methyl을 monobromination하여 Tetrahydrofolate의 유도체의 amine group과 알킬화 반응시킨 뒤 보호기를 제거하여 고안한 화합물을 합성하였다. NMR에 의한 구조분석에서 형태이성체의 존재를 확인하였으며 2-D NMR에 의한 이성체들간의 구조적 연구가 진행 중이다.

이 화합물은 pH 7에서 2가로 음하전되어 기존의 이 계열의 화합물들 보다 세포 투과성이 향상될 것으로 사료되며, 그의 SAR(Structure-Activity relationship)은 Thymidylate synthase에 대한 저해 작용과 더불어 L1210 세포에 대한 세포 독성시험을 통해 이루어 질 예정이다.

참 고 문 헌

1. Danenberg, P.V., and Lockshin, A. : Thymidylate synthase-substrate complex formation. *Mol. and Cell Biochem.* 43, 49(1982).
2. Santi, D.V. : Perspectives on the design and biochemical pharmacology of inhibitors of Thymidylate synthase. *J. Med. Chem.* 23, 103(1980).
3. Santi, D.V., McHenry, C.S., and Sommer, H. : Mechanism of interaction of Thymidylate synthase with 5-Fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry.* 13, 471(1974).
4. Srinivasan, A., Amarnath, V., Broom, A.D., Zou, F.C., and Cheng, Y.-C. : A potent multi-substrate analogue inhibitor of human Thymidylate synthase. *J. Med. Chem.* 27, 1710 (1984).
5. Broom, A.D., and Yang, I.-Y. : Active site probe of Thymidylate synthase. *Chem. and Biol. of Pteridines.* Cooper, B.A., and Whitehead, V.M. ed., Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York, P. 631(1986).
6. Yang, I.-Y., Slusher, R.M., Broom, A.D., Ueda, T., and Cheng, Y.-C. : A pyrimidine-based "Flexible" bisubstrate analogue inhibitor of human Thymidylate synthase. *J. Med. Chem.* 31, 2126(1988).
7. Broom, A.D. : Rational design of enzyme inhibitor : Multisubstrate analogue inhibitors. *J. Med. Chem.* 32, 2(1989).
8. Brown, D.J., and Jacobsen, N.W. : The methylation of triaminopyrimidines. *J. Chem. Soc.* 3770(1965).
9. Legoff, E. : Cyclopropanes from on easily prepared, highly active Zn-Cu couple, dibromomethane, and olefins. *J. Org. Chem.* 29, 2048(1964).
10. Bärwolff, D., and Langen, P. : *Nucleic acid chemistry*, Townsend, L.B., and Tipson, R.S. ed., John Wiley and Sons, New York, P. 359(1979).
11. Baker, B.R., and Santi, D.V. : Analogs of Tetrahydrofolic Acid XXIV. *J. Pharm. Sci.* 54, 1252(1965).