

Pyrimidine Nucleoside 유도체들의 합성 및 약물학적 효능 검색

신혜순* · 이희주

덕성여자대학교 교양학부

Synthesis of Pyrimidine Nucleoside Analogues and Screening of Their Biological Effects

Hea Soon SHIN* and Heejoo LEE

Division of General Education, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

(Received August 17, 1995; accepted August 29, 1995)

Abstract—Several acyclonucleoside analogues of pyrimidine base and N¹-derivatives of 5-fluorouracil have been synthesized and evaluated for their biological effects. When tested with *in vitro* L₁₂₁₀ cells, the 5-fluorouracil derivatives exhibited slightly higher antitumor activity than the parent 5-fluorouracil. When tested against Herpes Simplex Virus type 1 and type 2 cultured in the Vero cell, the 5-fluorouracil derivatives showed weak antiviral activity.

Keywords □ pyrimidine acyclonucleoside, antitumor activity, antiviral activity, Herpes Simplex Virus type1,2, L₁₂₁₀ cells

항 virus 또는 항암성 약물 개발연구는 염기 또는 당 부분을 화학구조적으로 변형시키는 nucleoside 유도체들의 합성분야가 중요한 부분을 담당하고 있다. 1970년대 후반 Schaeffer 등에 의해 항 virus제로 개발된 acyclovir [9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine]나 1980년대에 AIDS에 유효한 것으로 알려진 AZT(3'-azido-2',3'-dideoxythymidine)를 그 대표적인 예로 들 수 있겠다(Martindale, 1982; The Merck Index, 1989; Schaeffer 등, 1978; Peterson & Vince 1991). Nucleoside 유도체로 특이적인 개환상태의 chain을 가지고 있는 acyclovir는 Herpes Simplex Virus내 thymidine kinase에 의해 인산화되어서 활성화되어 virus의 DNA polymerase의 작용을 저해한다고 보고되어 있다(Fyfe 등, 1985). 한편 AZT는 생물체내에서 활성화되어 선택적으로 HIV(human immunodeficiency virus)의 reverse transcriptase 효소의 작용을 저해함이 보고되어 있다(Mansuri & Martin 1987).

본 논문에서는 그간의 연구진행과정(이희주, 김태련, 1988; 이희주 등, 1990; 신혜순 등, 1993)과 문헌조사

결과에 따라 개환상태의 chain을 가진 일련의 pyrimidine nucleoside들을 합성하여 이들의 약물학적 작용성을 검색해 보고자 하였다. 목적 화합물들은 당부분이 개환된 chain을 가진 acyclovir와 유사하다고 볼 수 있겠으나, Fig. 1에서 보여지는 바와 같이 당환의 아래부분을 chain상으로 가진 것이 유사하고 염기와 chain간에는 glycosidic 결합이 아닌 ribose당부분이 C¹에서 C⁵까지로 거리가 유사한 acycloalkyl 형태로 결합하고 2' 및 3' 위치에 변형을 가져오고자 한 점이 다른 특징이다. 합성 화합물들 중에 증식이 빠른 virus 또는 암세포에 대해 증식억제 작용성이 있을 수 있다는 기대는 이들이 pyrimidine nucleoside 구조유도체로 천연의 pyrimidine nucleotide 합성에 관여 되는 효소들, 특히 ribonucleotide reductase 또는 thymidylate synthase 등에 기질들과 경쟁적으로 저해작용을 할 수 있다고 보았기 때문이다(Baker 등, 1991; Wolff, 1980). 한편 이들 유도체들은 일반 nucleoside들과는 달리 glycosidic결합을 가지고 있지 않기 때문에 장벽효소인 phosphorylase에 의해 분해작용을 받지 않고 장내로 흡수되어 체내로 이동될 수 있다고 보았다(Peterson & Vince, 1991).

합성화합물들의 생물학적 작용실험으로 *in vitro* 암세

*To whom correspondence should be addressed.

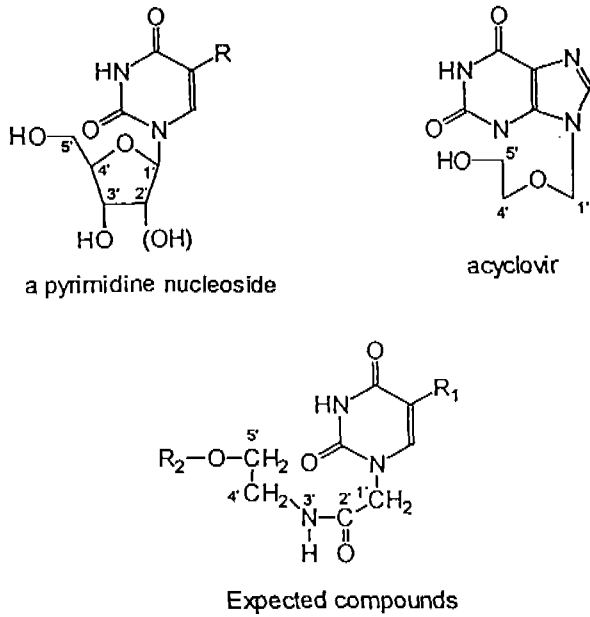


Fig. 1. Acyclonucleoside derivatives

포를 이용하여 이들 합성 화합물들이 세포증식에 어떤 영향을 미치는지 검색하고, 또한 virus에 대한 작용성도 Herpes Simplex Virus를 이용하여 검색해 보았다.

실험방법

시약 및 재료

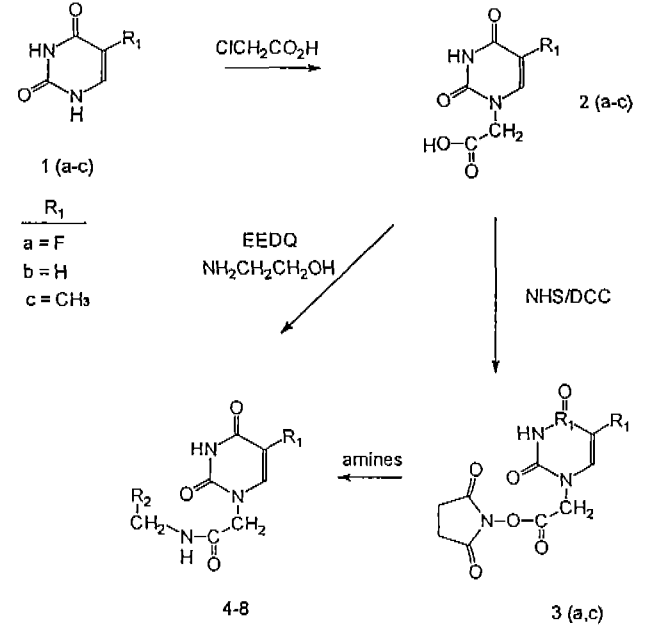
Sigma Chemical Co.로부터 화합물 5-fluorouracil, L-glycine, N,N'-dicyclohexyl carbodiimide (DCC), N-hydroxysuccinimide(NHS) 등을 구입하였다. Merck Co.로부터 TLC에 필요한 silica gel 60 F-254를 구입하여 사용하였다. L1210 세포 배양을 위하여 GIBCO Co.로부터 Fisher's medium powder, sodium carbonate(조적배양용), penicillin-streptomycin액 및 horse serum 등을 구입하여 배지를 만들었고, 검체용매로는 Merck Co.의 DMSO를 사용하였다. 기타 시약 및 용매는 시판 특급 또는 일급시약을 사용하였다.

사용기기

화학물 분석을 위하여 mp 측정기로 Buchi 535(Switzerland)를 사용하였다. IR spectra는 Perkin-Elmer 1310 spectrometer로부터, NMR spectra는 Varian EM spectrophotometer를 사용하였다. HPLC 분석은 Waters Chromatography(Bondapak-C₁₈ column)를 사용하였다. 세포 배양기구로는 Vision Scientific Co.의 CO₂-incubator를 쓰고, 세포수 증식 count는 Olympus Co.의 100배 비율의 현미경을 쓰고, Waters의 Milli-QTM Water System을 이용하여 정제수를 제조하였다.

화합물 합성

목적하는 open chain을 가진 pyrimidine 유도체를



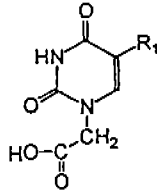
	R ₁	R ₂	Rx amines
4	F	CO ₂ H	NH ₂ CH ₂ CO ₂ H
5	F	CO ₂ CH ₃	NH ₂ CH ₂ CO ₂ CH ₃
6	F	CH ₂ OH	NH ₂ CH ₂ CH ₂ OH
7	H	CH ₂ OH	NH ₂ CH ₂ CH ₂ OH
8	CH ₃	CH ₂ OH	NH ₂ CH ₂ CH ₂ OH

Fig. 2. Synthesis of pyrimidine acyclonucleoside derivatives.

얻기 위하여 pyrimidine 염기 즉 thymine, uracil 및 5-fluorouracil에 alkyl chain을 아래와 같이 두단계로 연결하였다(Fig. 2). 각 pyrimidine 환의 N¹에 수소를 KOH 염기처리하며 chloroacetic acid와 고온에서 반응시켜 pyrimidine-1-acetic acid들(2a-c)을 얻었다(Tada, 1975; 이희주 등, 1989). 이들 화합물의 구조확인용 NMR spectra를 이용하였는데 pyrimidine 환내 C₅ 또는 C₆의 수소가 δ 7.0~8.0에서 나타나는 것과 acetyl에 -CH₂-기가 δ 4.0~4.5에서 singlet으로 나타나는 것으로 확인되었다(Table I).

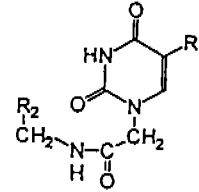
제2의 chain연장은 이들 pyrimidine-1-acetic acid 유도체들의 carboxylic acid기를 DCC 촉매하에 활성 NHS ester로 전향한 후에(3a,c) Na₂CO₃ 염기 촉매하에 해당 amine들과 결합시켜 목적하는 화합물들을 결정형으로 얻었다(4-6,8). 한편 uracil유도체인 화합물 7은 DMF용매하에서 uracil-1-acetic acid와 ethanolamine을 EEDQ 촉매하에서 직접 결합반응시켜 얻었다. 이 uracil 유도체는 특히 물에 대한 용해도가 낮아 전술한 수용액 반응으로는 얻을 수가 없었다. 합성된 화합물(4~8)의 순도는 TLC로 확인하였으며, 구조는 NMR spectra를 이용하여 확인하였다. 즉 7.0~8.0에서 pyrimidine 환내 수소들과 δ 4.0~4.5의 CH₂CO singlet과 δ 3.0 주위의

Table I. Physical properties of pyrimidine-N¹-acetic acid derivatives (2a-c).



Compounds	R ₁	mp (°C)	H ¹ -NMR (DMSO-d ₆)
(2a)	F	272~274	(Tada, 1975)
(2b)	H	278~280 (dec)	δ 4.20 (s, 2H, NCH ₂), 7.36 (d, 2H, J=8 Hz, C ₅ H-C ₆ H)
(2c)	CH ₃	270~273 (dec)	δ 1.15 (s, 3H, CH ₃), 4.15 (d, 2H, CH ₂ CO), 7.25 (s, 1H, C ₆ H)

Table II. Physical properties of synthesized pyrimidine nucleosides (4-8).



Compounds	R ₁	R ₂	mp (°C)	H ¹ -NMR (DMSO-d ₆)
(4)	F	CO ₂ H	229~231	δ 3.35 (s, 2H, NCH ₂), 4.15 (s, 2H, NCH ₂), 7.75 (d, J=6 Hz, 1H, C ₆ H)
(5)	F	CO ₂ CH ₃	191~193	δ 3.35 (s, 2H, NCH ₂), 3.48 (s, 3H, CH ₃), 4.25 (s, 2H, NCH ₂), 7.75 (d, J=6 Hz, 1H, C ₆ H)
(6)	F	CH ₂ OH	237~239 (dec)	δ 3.0 (m, 4H, CH ₂ CH ₂), 4.05 (s, 2H, CH ₂), 7.67 (d, J=6 Hz, 1H, C ₆ H)
(7)	H	CH ₂ OH	243~246	δ 3.0 (m, 4H, CH ₂ CH ₂), 4.10 (s, 2H, NCH ₂), 7.25(d,J=8 Hz,2H,C ₅ H-C ₆ H)
(8)	CH ₃	CH ₂ OH	273~275	δ 1.47 (s, 3H, CH ₃), 3.0 (m, 4H, CH ₂ CH ₂), 3.97 (s, 2H, NCH ₂), 7.10 (s, 1H, C ₆ H)

CH₂NH multiplet으로 확인되었다(Table II).

Pyrimidine-1-acetic acid (2a-c)의 일반적인 합성법

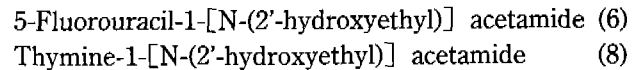
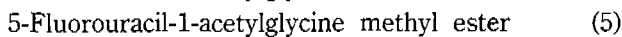
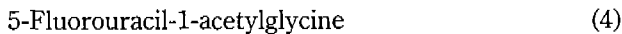
Tada 등의 5-florouracil-1-acetic acid 합성법을 활용하였다(Tada, 1975; 이희주 등, 1989). 즉 각 pyrimidine 20 mmol과 KOH 40 mmol을 물 30 ml에 녹이고 교반하면서 chloroacetic acid 20 mmol을 서서히 가해주고, 한편 반응액은 pH 10을 유지하도록 KOH용액을 가해주었다. 혼합반응액을 2~4시간 95°C 정도에서 가열시키고 TLC로 반응을 확인한 후 냉각하였다. 반응액을 진한 HCl을 써서 pH7로 조절하고 방치한 후 대부분이 미반응 pyrimidine인 침전을 여과 제거하였다. 여액을 다시 pH2로 조절한 후 하룻밤동안 냉장고에 보관하여 결정형의 pyrimidine-1-acetic acid들(2a-c)을 여과하여 분리하였다. 수율은 40~50% 정도였다.

Pyrimidine-1-acetic acid의 NHS ester(3a, c) 합성법

각 pyrimidine-1-acetic acid 20 mmol과 NHS 22 mmol을 DMF 30 mmol에 녹이고 냉조에서 교반하며 DCC 22 mmol을 가하고 하루밤동안 반응시켰다. 반응후 DCU 화합물인 침전물을 여과제거하고, 용매를 제거한 후 얻어지는 NHS ester(3a,c)를 다음 반응에 그대로 이용하였다.

Pyrimidine-1-acetic acid의 NHS ester들과 각 amine 류들과 축합반응

각 amine 15 mmol과 Na₂CO₃ 20 mmol을 THF-H₂O 혼합용매에 녹이고 냉조에서 교반하면서 각 pyrimidine-1-acetic acid NHS ester를 분말상태로 소량씩 가해주었다. 반응은 2시간동안 계속하고, 반응액을 ether로 세척하고, 필요에 따라 pH를 조절한 수용액을 냉장고에 보관하여 결정상의 화합물을 얻었다.



Uracil-1-(N-2'-hydroxyethyl) acetamide(7) 합성

Uracil-1-acetic acid(2b) 20 mmol 및 monoethanolamine 20 mmol을 DMF 30 mmol에 녹이고 EEDQ 21 mmol을 넣고 60°C로 가온하며 2일간 반응시켰다. 반응액에 ethyl acetate와 petroleum ether를 가한 후 상온에 방치하여 생성된 침전 화합물 7을 얻었으며, 수율은 70% 정도였다.

약물학적 작용 검색

합성화합물들의 약물학적 효과를 검색하기 위하여 일차적으로 *in vitro* 암세포 증식에 대한 영향을 보고자 하였다. 이들 화합물들이 세포증식 억제효과를 보인다면 세포내외의 어디에서인가 분해되어 모 5-FU를 유리시켜 주었다고 볼 수도 있고, 또는 그 자체로 생체의 어떤 경로에 영향을 미쳤다고도 볼 수 있기 때문이다. Fisher's 배지에 배양한 L1210 cell(5×10⁴ cell/ml×5 ml)에 각 합성화합물들을 DMSO 또는 ethanol 용매에 녹여 10⁻⁶ 및 10⁻⁷ M 농도로 첨가하고 CO₂-incubator내에서 37°C, 48시간동안 배양한 후 일정량을 취하여 trypan blue액으로 염색하고 염료배출법에 의하여 염색되지 않는 세포수를 hemocytometer를 써서 구하였다. 시험군 각각의

농도에서 세포증식 억제율을 구하였다. 또한 virus에 대한 작용성을 알아보기 위하여 Herpes Simplex Virus type 1 및 type 2에 대한 반응도 검색해 보았다.

결과 및 고찰

화합물합성

Pyrimidine acyclonucleoside(Fig. 1)들을 합성하기 위

Table III. Inhibitory effects of obtained pyrimidine acyclonucleosides on the *in vitro* growth of L1210 cells.

Compounds	Inhibition(%)		
	1×10^{-6} M	1×10^{-7} M	ED ₅₀ (M)
2a	—	36	2.52×10^{-7}
2b	14	4	
2c	23	2	
4	87	65	1.03×10^{-7}
5	74	59	1.30×10^{-7}
6	95	36	1.34×10^{-7}
7	9	1	
8	23	14	
5-FU	89	16	2.06×10^{-7}
araC	—	100	1.27×10^{-8}

하여 일차적으로 염기선택을 편의상 pyrimidine 계열의 thymidine, 그 유사체인 5-fluorouracil 및 uracil을 선택하였고, 이 염기들의 N¹에 alkyl chain 결합을 두단계로 진행하였다. 즉 보고된 방법(Tada, 1975)에 준해 ClCH₂CO₂H를 결합시켜 N¹-acetic acid 유도체를 각각 합성하였다(Fig. 2). 합성된 화합물 2a의 mp는 272~274°C, 화합물 2b의 mp는 278~280°C(dec), 그리고 화합물 2c의 mp는 270~273°C(dec)로 측정되었다(Table I). 화합물(4~8)계는 carboxylic acid 부분을 DCC 촉매하에 NHS와 반응시켜 활성 NHS ester 형태로 얻은 후에, ethanolamine과 반응시켜 목적하는 화합물(4-6, 8)을 각각 합성하였다. 한편 uracil 유도체인 화합물 7은 용해도 관계로 별도의 방법을 적용하여 합성하였는데, DMF 용매에 화합물 2b와 ethanolamine을 넣고, EEDQ 촉매하에 반응시켜 결합된 화합물 7을 분리하였다. 이들 목적 화합물의 구조는 NMR spectra로 확인하였다. Pyrimidine 염기환의 C₆-H는 doublet으로 δ 7.0~8.0에 나타나고, acetyl기의 CH₃는 singlet으로 δ 4.0 근처에 나타났으며, 그리고 alkyl chain의 CH₂CH₂는 δ 3.0 근처에 multiplet으로 확인되었다(Table II).

약물학적 작용

in vitro 항암성 작용 검색

Table IV. Results of antiviral activity test for compounds (2a-c).

Virus information		Host cell information			Assay information	
Virus	Inoc.size	Cell #	Vero (CCL 81)	Assay day	CPE/MTT	
HSV-1 (F)	100	Condition	good	3	92H-32A	
HSV-1 (MI)	100	Medium	DMEM	Exp.No	92/9/28	
HSV-2 (MS)	100			Date		
Compound	Conc.(μ g/ml)	MOCK	F	MI	MS	Remark
2a	250	55.3%	29.1%	34.7%	17.7%	stock : 40 mg/ml (DMSO)
	100	60.9%	23.2%	32.8%	9.4%	
	40	65.7%	7.5%	16.8%	2.4%	
	10	91.8%	-0.2%	2.7%	0.1%	
	4	94.7%	-0.6%	2.7%	0.3%	
2b	250	89.7%	0.1%	-0.9%	0.0%	stock : 40 mg/ml (DMSO)
	100	94.6%	-0.3%	-1.1%	0.2%	
	40	92.6%	0.9%	-1.0%	0.2%	
	10	93.9%	-0.5%	-0.8%	0.4%	
	4	94.5%	0.5%	0.1%	0.0%	
2c	250	89.6	0.0%	-0.6%	0.2%	stock : 40 mg/ml (DMSO)
	100	90.8%	-0.1%	0.5%	0.5%	
	40	94.1%	0.1%	1.2%	0.1%	
	10	96.4%	-0.4%	0.9%	0.4%	
	4	98.1%	-0.7%	0.5%	-0.1%	
	CC50 & EC50	>250	>250	>250	>250	

Table V. Anti-herpetic activity of various derivatives of the obtained compounds.

Compound	Cytotoxicity CC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	Antiviral activity EC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)			Selectivity Index (SI, CC ₅₀ /EC ₅₀)		
		HSV-1		HSV-2	HSV-1		HSV-2
		F	MI	MS	F	MI	MS
4	>250	>250	>250	>250	NC	NC	NC
5	>250	>250	>250	>250	NC	NC	NC
6	>250	>250	>250	>250	NC	NC	NC
7	>250	>250	>250	>250	NC	NC	NC
8	>250	>250	>250	>250	NC	NC	NC
acyclovir	>10	0.6	1.5	2	>16.7	>6.67	>5
araC	6.6	0.66	3.9	>6.6	10	1.67	<1

합성해서 얻은 화합물들은 기존의 L1210 cell system을 이용하여 *in vitro* 항암성 작용을 검색하고 결과를 Table III에 요약하였다. 대체로 합성한 화합물들의 항암성 작용이 모 5-FU보다 크게 높지는 않았다. 그러나 특이하게도 5-FU의 유도체들만은 모 약보다 항암성 작용이 약간 높았으며, 합성한 화합물들은 N¹-alkyl 유도체로서 모 5-FU를 유리시켜 작용성을 나타내었다고 보기 보다는 그 화합물 자체로서 항암성 작용을 나타내었을 것으로 사료되며, 이에 따른 작용기전에 관한 지속적인 연구가 요구된다.

항 virus성 작용 검색

합성해서 얻은 화합물들(2a-c, 4-8)을 화학연구소의 약활성 연구실에서 Herpes Simplex Virus type 1(strain F 및 MI)과 type 2(strain MS)를 이용하여 항 virus성 작용을 검색하였다. Table IV,V에서 볼 수 있는 바와 같이, 천연의 pyrimidine 염기 유도체인 화합물(2b-c, 7-8)보다는 본래 세포증식 억제작용이 있는 5-fluorouracil의 유도체인 2a가 100~250 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 다소 높은 세포독성 및 항 virus성 효과를 보였다.

결 론

항암성 또는 항 virus성 약물의 개발목적으로 천연의 pyrimidine nucleoside 구조 유사체로 pyrimidine acyclonucleoside들을 합성하고자 하였다. 목적 화합물들은 당부분이 개환된 chain 형태이고 염기의 N¹에 glycosidic 결합이 아니고 alkyl 결합상태로 되어있다. 이들 화합물들이 체내에서 nucleotide로 활성화된다면 천연의 nucleotide 대사에 관여되는 효소들에 기질유사체로 관여되어 저해작용을 하여 암세포 또는 virus 증식에 억제작용을 나타낼 수 있다고 보았기 때문이다.

Pyrimidine acyclonucleoside 8종(2a-c, 4-8)을 각 해당염기들로부터 합성하여 구조를 NMR, IR data를 써서 확인하였다. 이들 합성 화합물들은 L1210 암세포를 이용하여 *in vitro* 항암성 작용을 검색하였다. 합성된 화합물들중 5-fluorouracil acyclonucleoside들(2a-c 및 4-6)

은 다소나마 모 5-FU보다 높은 항암성 작용을 보였다. 이들 유도체들은 5-FU의 N¹에 glycosidic 결합이 아닌 alkyl 결합을 하고 있어, 모 5-FU를 그리 쉽게 유리시키리라 보이지 않으므로 이들의 작용은 acyclonucleoside 형태일 것 같아 이들의 작용기전 연구가 필요하다고 보여진다. 또한 합성한 유도체들(2a-c, 4-8)을 HSV-1 및 HSV-2를 이용하여 항 virus성 작용도 검색하여 본 결과, 천연의 pyrimidine base 유도체 화합물들 보다 5-fluorouracil acyclonucleoside인 2a 화합물이 100~250 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 다소 높은 세포독성 및 항 virus 효과를 나타내었다.

감사의 말씀

본 연구의 연구결과가 발표되기도 전에 작고하신 고이희주 교수님의 영전에 삼가 명복을 빌며, 감사의 말씀을 전합니다.

참고문헌

- Baker C. H. *et al.* (1991). 2-Deoxy-2'-methylene-cytidine and 2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine- 5'-diphosphates: Potent mechanism-based inhibitors of ribonucleotide reductase, *J. Med. Chem.* **34**, 1879.
- Fyfe J. A. *et al.* (1985). Thymidine kinase from herpes simplex virus phosphorylate the new antiviral compound, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine, *J. Biol. Chem.* **28**, 171.
- Mansuri M. M. and Martin J. C. (1987). Antiviral agent, *Ann. Rept. in Med.* **22**, 147.
- Martindale (1982). The Extra Pharmacopeia, 28th Ed. London
- Peterson M. L. and Vince R. (1991). Synthesis and biological Evaluation of 4-purinylypyrrolidine nucleosides, *J. Med. Chem.* **34**, 2787.
- Schaeffer H. J., Beauchamp L., de Miranda P. and Elion G. B. (1978). 9-(2-Hydroxyethoxy-methyl) guanine activity against viruses of herpes group, *Nature* **273**, 583.
- Tada, M. (1975). Antineoplastic agents: The preparation of

- 5-fluorouracil-1-acetic acid derivatives, *Bull. Chem. Soc. Japan* **48**, 3427.
- The Merck Index (1989). 8th Ed. Merck Co. INC.
- Wolff M.E. (1980). *Burger's Medicinal Chemistry. Part II*, 4th Ed.
- 신혜순, 진현숙, 김지현, 이희주, 김종국 (1993). 5-Fluorouracil 유도체의 합성 및 그들의 항암성 작용, *약학회지*, **37**, 89-94.
- 이희주, 김태련 (1988). 1- β -Arabinofuranosylcytosine의 production연구: AraC-5-alkylthioacetate 합성 및 그들의 물리화학적 성질과 항암작용 시험, *약학회지*, **32**, 334.
- 이희주, 신혜순外 5명, (1990). 5-fluorouracil-지질 결합체 합성 및 *in vitro* 항암효과 평가. *약학회지*, **34**, 395.
- 이희주, 신혜순, 이명걸, 박만기, 김종국, (1989). 약물-고분자 물질 결합체 합성 연구: 5-Fluorouracil과 사람의 혈청 albumin 및 poly-L-lysine 결합체 합성, *약학회지*, **33**, 267.