

## 핵산계 화학요법제의 합성 및 생물활성에 관한 연구

강신원 · 김경희\* · 신정희 · 이봉헌 · 장태식

부산시 금정구 장전동 산 30 부산대학교 자연과학대학 화학과

\*School of Natural Sciences and Mathematics, The University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama 35294-1240, U.S.A

### A study on the Synthesis and Biological Activity of Nucleoside Chemotherapeutic Agents

Kang, Shin-Won, Kyong-Hee Kim, Jung-Hee Shine, Bong-Hun Lee and Tae-Sik Jang

Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Koera

\*School of Natural Sciences and Mathematics, The University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama 35294-1240, U.S.A

**ABSTRACT:** 5-substituted uridine(1, Br, Cl), 5'-amino-5'-deoxyuridine conjugates of amino acid, peptide and penicillin G, 5'-monophosphate uridine derivatives and 5'-monophosphate-fatty acid derivatives were chemically synthesized. Their biological activities were determined as MIC and IC<sub>50</sub> unit against various pathogenic microorganisms *in vitro*. 5'-amino-5'-deoxyuridine-cyclo(Phe-Asp)(23), 5-iodo-5'-amino-deoxyuridine-penicillin G(26) were the most efficient; their IC<sub>50</sub> against L5178Y murine lymphoma cell was 6.5 g/ml, MIC against *S. aureus* (+) and *E. coli* (-) was 6.25 g/ml. MIC of 5-bromo-2',3'-O-isopropylideneuridine(6) against *Trichophyton rubrum* was 0.2 g/ml. And 5'-monophosphate derivatives are more active than simple uridine derivatives, suggesting other modified nucleoside 5'-phosphate may be worthwhile examining further as a new prodrugs.

**KEY WORDS** □ Nucleoside, Biological activity, Chemotherapeutic agent, Uridine 5'-monophosphate

1910년 에를리히(Paul Ehrlich)와 泰左八郎박사와의 공동연구로 매독의 특효약인 salvarsam이 개발된 이후 AIDS치료제로 각광받고 있는 AZT까지, 화학요법제는 급속하게 발전하여 여타의 약제와는 비할수 없는 눈부신 성과를 올리고 있다. 화학요법제는 질병의 원인이 되는 병원성 미생물이 인체내에서 발육하거나 증식하는 것을 직접적으로 억제함으로써 수많은 전염병을 극복하여 인간의 수명연장에 기여해왔다(Kurylowics, 1980).

본 연구에서는 항 바이러스제로 개발된 핵산유도체(Aoshima *et al.*, 1976; Okad *et al.*, 1985)를 5'-위치의 hydroxy기를 amino기로 변형시킨 후, 그람 양성균에 감수성을 가졌으나 최근 내성균 생성으로 활성이 저하된 penicillin G(Huber *et al.*, 1973) 및 세균류에 대해 미약하나마 활성이 보고된(Kim *et al.*, 1987) cy-

clo peptide와 화학적 방법으로 결합시킴으로서(Baker *et al.*, 1955) 항균스펙트럼 확장을 도모하고자 한다. 이는 항생제 복합사용에 따른 불균(Stephen, 1986)과 막연한 항균스펙트럼 확장을 위한 약물의 과다남용을 방지하면서 약물의 효능을 증진시키는 데 그 목적이 있다. 한편, 주로 구조-활성관계를 중심으로 개발되어 현재 사용중에 있는 핵산계 화학요법제들은 그 약효못지않은 문제점을 내포하고 있는데, 이는 내성발현과 숙주세포에 대한 독성문제로 대표된다. 특히 변형된 핵산유도체가 kinase의 적절한 기질이 되지 못하거나, kinase의 기질특이활성이 저하되어 DNA 나 RNA의 생합성시 실질적으로 요구되는 triphosphate형태의 핵산유도체가 되지 못하므로 생기는 내성문제를 극복하는 방안으로서 핵산유도체를 인산화한 뒤, 수송분자를 결합시키는 것이다. (Ros-

wsky *et al.*, 1982). 수송분자로서는 약물이 세포막을 통과할 때 능동수송을 용이하게 하고(Ryu *et al.*, 1982; Turcotte *et al.*, 1980), 약물자체가 가진 독성을 완화시키거나 상승효과를 수반할 수 있으며(Hong *et al.*, 1985) 혹은 병원성 미생물의 세포막에만 특이하게 작용하는 물질이 결합된 화합물들이 *in vivo*, *in vitro* test모두에서 좋은 활성을 보여주고 있다(Matsushita *et al.*, 1981; Raetz *et al.*, 1977). 이에 본 연구에서는 본격적인 phosphatidyl compound 합성의 전단계로써 uridine 유도체의 5'-위치를 인산화한 뒤 긴 사슬 지방산과 Z-Ala를 수송분자로 결합시킨 화합물을 합성하였다.

합성한 각 화합물들의 생물활성도를 *Trichophyton rubrum*, *Penicillium notatum*, *Aspergillus niger*; *Escherichia coli*(-), *Staphylococcus aureus*(+); L5178Y murin lymphoma cell 등에 대하여 *in vitro*에서 MIC( $\mu\text{g/ml}$ )와 IC<sub>50</sub>( $\mu\text{g/ml}$ ) 단위로 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

본 실험에서 사용한 시약들은 uridine(Aldrich); 2, 2-dimethoxypropane(Aldrich); bis-(p-nitrophenyl) phosphate hydrate(Aldrich); sodium azide(Hayashi); N-halosuccinimide(Fluka); penicillin G sodium salt(Sigma); p-tolunesulfonylchloride(Aldrich); L-amino acid(Hanawa); EDC(Aldrich); DCC(Sigma); Mbzl-Cl(동경화성); HOBT(Aldrich); reduced-glutathion(Merck); triethylphosphate(Fluka); phosphoryl chloride(Hayashi); palmitic acid, stearic acid(Hayashi)등이며, TLC판은 Kieselgel 60 F254(Merck), PLC용은 Kieselgel 60PF254(Merck), DEAE cellulose(Sigma)와 Silicagel 40(Fluka)을 column chromatography에 사용했다.그 외의 시약 및 일반용매들은 시판용 특급, 일급을 정제하여 사용했다.

### 기기

TLC상의 반응 생성물 확인은 대부분 UV lamp (254 nm)로 했으며, mp는 electrothermal capillary melting point apparatus를 사용하여 측정하였고 보정은 하지 않았다. IR spectra는 KBr pellet을 만들어 HITACHI 260-30 spectrometer로 얻었고, NMR spectra는 TMS를 내부표준물질로 사용하여 Varian EM-30A <sup>1</sup>H-NMR spectrometer(60MHz)로 얻었다. <sup>31</sup>P-NMR spectra는 포항공대에, Mass spectra는 렉키중양연구소에 각각 의뢰하여 얻었다. 그리고 Spectronic 20(Bausch and Lomb Inc., Rochester N.Y.) 을 사용하여 MIC을 판정하였다.

### 항진균활성측정

*Trichophyton rubrum*; *Penicillium notatum*; *Aspergillus niger*에 대해 broth dilution method(Victor Lorlan, 1980)로 MIC(Minimum Inhibition Concentration)를 결정하였다(Smith *et al.*, 1970; Walter

*et al.*, 1969). 균주는 부산대학교 미생물학과에서 제공받았다.

1) Medium: Sabouraud's dextrose Medium

2) Inoculum 제조: 접종물의 cell density는  $1 \times 10^5$  cells/ml로 하였다. 이것은 분광학적 방법으로 530 nm에서 95% 투과도를 보일 때를  $10^6$  cells/ml로 판정하였을 때를 기준으로 한 것이다.

3) Drug stock solution 제조: stock solution은 5,000  $\mu\text{g/ml}$ 가 되게 제조하고 이를 다시 1:1000배 희석하여 50  $\mu\text{g/ml}$ 가 되게 한다. 11개의 시험관에 차례로 2-fold dilution하여 농도범위가 50-0.05  $\mu\text{g/ml}$ 가 되게 한다.

4) 배양시간과 온도: 37°C에서 24시간내에 growth control tube에서 미생물의 성장이 눈으로 보일 때까지 배양시킨다.

5) 분광학적 방법으로 control tube와 각 drug농도의 투과도를 비교하여 MIC를 판정한다.

### 항세균활성측정

*Escherichia coli* (-); *Staphylococcus aureus* (+) 등을 선택하여 broth dilution method로 MIC를 결정하였다. 균주는 부산대학교 미생물학과에서 제공받았다.

1) Medium: Sabouraud's dextrose Medium

2) Inoculum 제조: 접종물의 cell density는 McFarland No. 0.5 standard solution을 기준으로 한다 ( $10^8$  CFU/ml). 이 용액을 1:200 배로 희석하여 cell density가  $10^5$  -  $10^6$  cells/ml가 되게 한다.

3) Drug stock solution 제조: stock solution은 2,000  $\mu\text{g/ml}$ 가 되게 제조하고 이를 다시 medium으로 1:10배 희석하여 200  $\mu\text{g/ml}$ 가 되게 한다. 11개의 시험관에 차례로 2-fold dilution하여 농도범위가 200-0.19  $\mu\text{g/ml}$ 가 되게 한다.

4) 배양시간과 온도, MIC판정방법은 항진균활성 측정에서와 동일함.

### 항종양활성측정

일본 동경대학 응용미생물 연구소에 의뢰하여 *Mouse lymphoblastoma L5178Y cells*을 균주로한 항종양활성을 50% 성장억제농도 (IC<sub>50</sub>) 단위로 측정하였다.

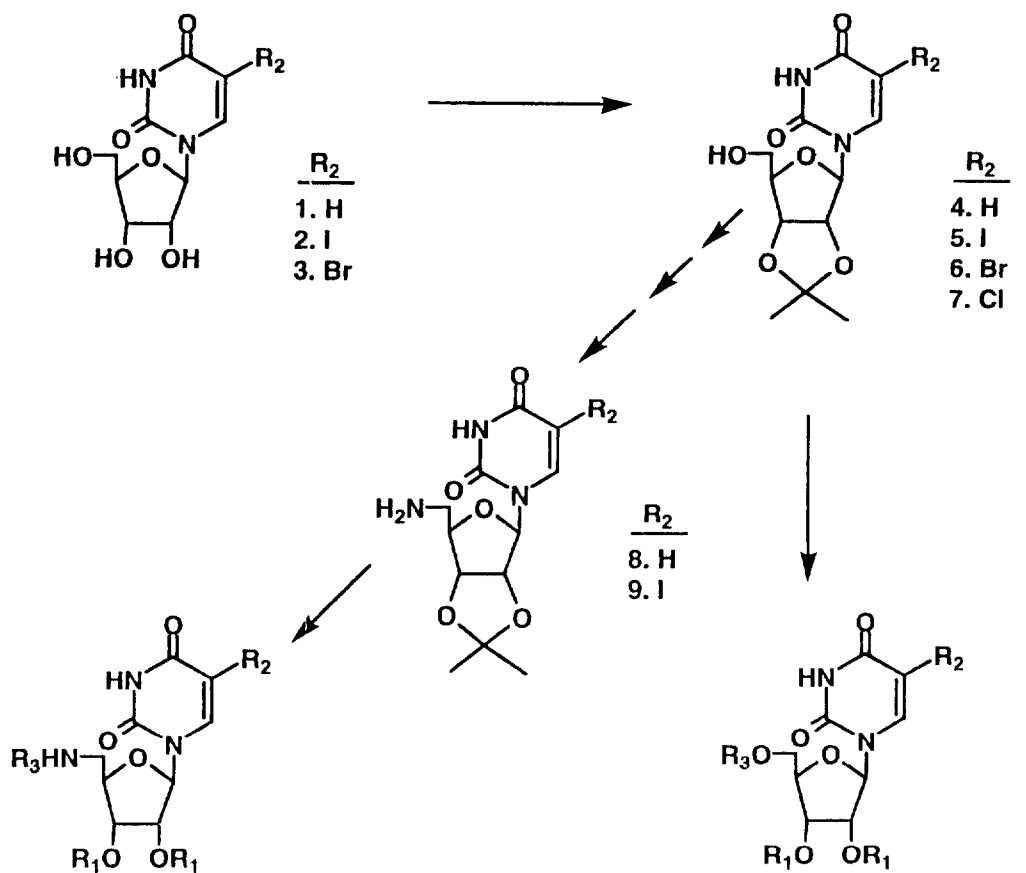
1) Medium 제조: *Mouse lymphoblastoma L5178Y murine cells*에 RPMI 1640 medium과 10% horse serum, benzylpenicillin 100 units/ml, streptomycin 100  $\mu\text{g/ml}$ 를 첨가하고 pH 7.2, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>하에서 성장시킨다.

2) 접종물의 density는  $2 \times 10^4$  cells/ml로 하여 다양한 농도의 drug를 접종시켜 37°C에서 3일간 배양한다.

3) Coulter Counter method로 50% 성장억제농도 (IC<sub>50</sub>)를 결정하였다.

## 결과 및 고찰

### 핵산유도체의 합성



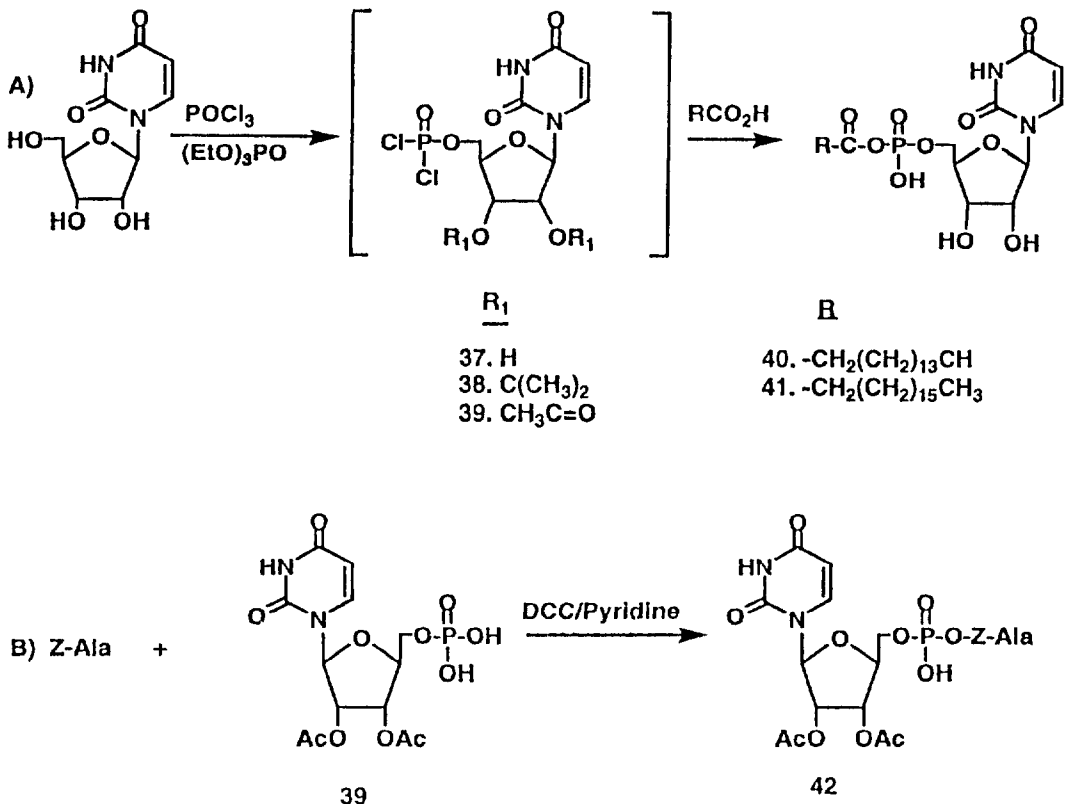
$\frac{R_1}{R_2} \quad \frac{R_3}$

10.  $C(CH_3)_2$ , H, Z-Phe
11.  $C(CH_3)_2$ , H, Z-Asn
12.  $C(CH_3)_2$ , H, Z-Ser
13.  $C(CH_3)_2$ , H, Z-Lys(Z)
14.  $C(CH_3)_2$ , H, Z-Glu
15.  $C(CH_3)_2$ , H, Z-Phe-Leu
16.  $C(CH_3)_2$ , H, Z-Glu-Tyr
17.  $C(CH_3)_2$ , H, C(Phe-Asp)
18.  $C(CH_3)_2$ , H, C(Phe-Glu)
19.  $C(CH_3)_2$ , H, Z-Glutathion(MBzl)
20.  $C(CH_3)_2$ , H, Ala
21.  $C(CH_3)_2$ , H, Penicillin G
22. H, H, Penicillin G
23. H, H, Cyclo(Phe-Asp)
24. H, H, Cyclo(Phe-Glu)
25.  $C(CH_3)_2$ , I, Penicillin G
26. H, I, Penicillin G

$\frac{R_1}{R_2} \quad \frac{R_3}$

27.  $C(CH_3)_2$ , H, Ala
28.  $C(CH_3)_2$ , H, Z-Phe
29.  $C(CH_3)_2$ , H, Z-Asn
30.  $C(CH_3)_2$ , H, Ser
31.  $C(CH_3)_2$ , H, Lys
32.  $C(CH_3)_2$ , H, Glu
33.  $C(CH_3)_2$ , H, Penicillin G
34. H, H, Penicillin G
35.  $C(CH_3)_2$ , I, Penicillin G
36. H, I, Penicillin G

Scheme 1



Scheme II

Scheme I, II에 따라 uridine을 출발물질로 각 화합물들을 화학적 방법으로 합성하였다.

#### 5-bromouridine (3)의 합성

Uridine (4.10 mmol), NBS(4.92 mmol)에 10 ml DMF를 가하고 강한 노란색을 띠 때까지 실온에서 반응하였다. 용매는 감압농축 후  $\text{CHCl}_3$ 로 결정화하였다. 흰 고체는 cold EtOH로 씻고 재결정하여 흰색 고체를 얻었다.

Yield: 0.90g(67.3%), mp: 191-193°C (The Aldrich Library of NMR and IR spectra)

#### 5-bromo-2', 3'-O-isopropylideneuridine (6)의 합성

2', 3'-O-isopropylideneuridine (4)를 출발물질로 하여 5-bromouridine (3)의 합성방법으로 (6)을 얻었다(Hamton, 1961)  $\text{H}_2\text{O}$ 로 결정화 했으며, 재결정은 무수 diethyl ether로 하였다.

Yield: 1.02g (68.0%), mp: 225-228°C (The Aldrich Library of NMR and IR spectra)

#### 2', 3'-O-isopropylideneuridine-5'-O-p-toluenesulfonyluridine의 합성

Tipson의 방법에 의해 무수 pyridine (10 ml) 용액에 2', 3'-O-isopropylideneuridine(4) (2.6 mmol) 과 *p*-toluenesulfonylchloride (5.2 mmol)를 가하 후

0°C에서 반응시켰다. MeOH(3 ml)을 가한 후 감압 농축하고 남아있는 pyridine은 toluene과 coevaporation하였다. 잔여물에 ice- $\text{H}_2\text{O}$ 를 가한 뒤  $\text{CHCl}_3$ 로 추출하고  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조시킨 다음 농축하여  $\text{CHCl}_3$ - $\text{Me}_2\text{CO}$ (7:3)를 용매로 silicagel column chromatography를 이용하여 분리하였다. Diethyl ether로 재결정하였다.

Yield: 0.97g (85%), mp: 89-90°C

IR(KBr): 2750  $\text{cm}^{-1}$ (5'-O-tosyl), 1650  $\text{cm}^{-1}$  (amide C=O) 1490 & 1370  $\text{cm}^{-1}$  ( $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{O}$ )

$^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ 8.67(d, 1H, C<sub>6</sub>H), 7.74 & 7.35 (s, 4H, aromatic protons), 4.83(m, 2H, 5'- $\text{CH}_2\text{O-Ts}$ ), 2.30(s, 3H,  $\text{CH}_3$  of *p*-Ts), 1.35 & 1.55(s, 3H,  $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{O}$ )

Mass: *m/e* 438 ( $\text{C}_9\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ )

#### 5'-azido-5'-dioxy-2', 3'-O-isopropylideneuridine의 합성

Tomson의 방법에 따라 2', 3'-O-isopropylideneuridine-5'-O-*p*-toluenesulfonyluridine(2.2 mmol)과  $\text{NaN}_3$ (4.4 mmol)을 무수 DMF에 녹이고 75-80°C로 가열하였다. 감압하에 DMF를 제거하고 EtOH로 coevaporation하였다.  $\text{H}_2\text{O}$ 로 tritulation한 후 gla-

ciasl AcOH로 산성화하고  $\text{CHCl}_3$ 로 추출하여  $\text{CHCl}_3$ 층은 5%  $\text{NaHCO}_3$  수용액으로 씻었다. 유기층을  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조시킨 다음 감압농축하고 diethyl ether로 결정화 하였다.

Yield: 0.51g (95.3%), mp: 161-163°C

IR(KBr): 2101  $\text{cm}^{-1}$  (azide), 1670  $\text{cm}^{-1}$  (amide C=O) 1490 & 1370  $\text{cm}^{-1}$  ( $(\text{CH}_3)_2\text{C}-$ )

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8.65(d, 1H, C<sub>6</sub>H), 5.80(d, 1H, C<sub>1</sub>'H), 4.41-4.76(m, 3H, C<sub>2</sub>'H, C<sub>3</sub>'H, C<sub>4</sub>'H), 3.54(m, 2H, 5'- $\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 1.27 & 1.47(s, 3H,  $(\text{CH}_3)_2\text{C}-$ )

Mass:  $m/e$  308 ( $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_8\text{O}_8$ )

5'-amino-5'-deoxy-2', 3'-O-isopropylideneuridine (8)의 합성

Tomson방법에 따라 5'-axido-5'-O-deoxy-2', 3'-O-isopropylideneuridine (2.6 mmol)을 EtOH(50 ml)에 녹여 80 mg의 palladium black을 가하고 수소화시켰다(3.5 kg/cm<sup>2</sup> pressure). Diethyl ether로 결정화하여 흰색 고체를 얻었다.

Yield: 0.62g (85%), mp: 221-225°C

IR(KBr): 3100-3500  $\text{cm}^{-1}$  (medium, primary- $\text{NH}_2$ ), 1680  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1500 & 1430  $\text{cm}^{-1}$  ( $(\text{CH}_3)_2\text{C}-$ )

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.51(d, 1H, C<sub>6</sub>H), 4.41-4.76(m, C<sub>2</sub>'H, C<sub>3</sub>'H, C<sub>4</sub>'H), 3.21 & 3.70(m, 2H, 5'- $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 1.32 & 1.55(s, 3H,  $(\text{CH}_3)_2\text{C}-$ )

5'-amino-5'-deoxy-2', 3'-O-isopropylideneuridine-5'-(Z)-Lys(13)의 합성

Schinazi의 방법에 따라(Schinazi *et al.*, 1979) 0°C에서 Z-Lys(1.7 mmol)와 HOBT(3.5 mmol), DCC(3.5 mmol)을 무수 EtOAc 50 ml에 녹인 후  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 에 녹인 5'-amino-5'-deoxy-2', 3'-O-isopropylideneuridine(1.3 mmol)을 가하여 교반하였다. 반응액을 여과하여 과량의 DCU를 제거한 뒤  $\text{NaHCO}_3$ 와 10% citric acid로 washing하고 감압건조하여 흰색 결정을 얻었다.  $\text{CHCl}_3$ 로 재결정하여 화합물 (13)을 얻었다.

Yield: 0.32g(43%)

IR(KBr): 3350  $\text{cm}^{-1}$  (medium, -NH), 1680  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1460 & 1370  $\text{cm}^{-1}$  ( $(\text{CH}_3)_2\text{C}-$ )

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.70(d, 1H, C<sub>6</sub>H), 7.25(s, 5H, phenyl), 5.05(s, 2H, benzyl), 4.15(m, 2H, 5'- $\text{CH}_2$ ), 1.25 & 1.50(ss, 6H,  $(\text{CH}_3)_2\text{C}-$ )

5'-amino-5'-deoxy-2', 3'-O-isopropylideneuridine-5'-penicillin G(21)의 합성

5'-amino-5'-deoxy-2', 3'-O-isopropylideneuridine (8) (3.16 mmol)과 penicillin G sodium salt (9.43 mmol), N-hydroxysuccinidime (9.48 mmol), DCC (9.48 mmol)을 ice-bath(-10°C)에서 dry pyridine (40 ml)에 녹여 5시간 동안 반응시켰다. 반응물이 다 녹은 후에 -3°C에서 48시간동안 교반시켰다. 침전물은 여과하고 여액을 감압농축하여 PLC로 분리한 뒤 cold  $\text{H}_2\text{O}$ 로 결정화 하였다. 재결정은  $\text{CHCl}_3$ 로 하였다.

Yield: 0.45g(30%)

IR(KBr): 3100-3500  $\text{cm}^{-1}$  (-NH-, medium), 3050  $\text{cm}^{-1}$  (aromatic C-H) 2980  $\text{cm}^{-1}$  (alkane C-H), 1640  $\text{cm}^{-1}$  (amide C=O), 1600-1475  $\text{cm}^{-1}$  (aromatic C=C), 1490 & 1370  $\text{cm}^{-1}$  ( $(\text{CH}_3)_2\text{C}-$ )  
5'-amino-5'-deoxyuridine-cyclo(Phe-Asp) (23)의 합성

5'-amino-5'-deoxyuridine (3.16 mmol), cyclo(Phe-Asp) (9.48 mmol), N-hydroxysuccinimide(9.48 mmol), DCC(9.48 mmol)을 무수 pyridine(40 ml)에 녹인 후 (21)과 같은 방법으로 생성물을 얻었다.

Yield: 0.39g(25%)

IR(KBr): 3500  $\text{cm}^{-1}$  (-NH, medium), 3100  $\text{cm}^{-1}$  (aromatic C-H), 2990  $\text{cm}^{-1}$  (alkane C-H), 1660  $\text{cm}^{-1}$  (amide C=O), 1600 & 1490  $\text{cm}^{-1}$  (aromatic C=C)

Mass:  $m/e$  487 ( $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_8$ )

5-iodo-5'-amino-5'-deoxyuridine-penicillin G(26)의 합성

5-iodo-5'-amino-5'-deoxyuridine (9) (3.16 mmol)과 penicillin G sodium salt (9.48 mmol), DCC(9.48 mmol)을 무수 pyridine(40 ml)에 녹인 후 (21)과 같은 방법으로 5-iodo-5'-amino-2',3'-O-isopropylideneuridine-penicillin G (25)를 얻었다. (25)에 90%  $\text{CF}_3\text{COOH}$ 를 가하여 실온에서 반응시킨 후 감압농축하여 생성물을 얻었다.

Yield: 0.44g(80%)

IR(KBr): 3100  $\text{cm}^{-1}$  (-NH, medium), 3050  $\text{cm}^{-1}$  (aromatic C-H), 2900  $\text{cm}^{-1}$  (alkane C-H), 1640-1700  $\text{cm}^{-1}$  (amide C=O), 1600 & 1470(aromatic C=C)

Mass:  $m/e$  684( $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_8\text{SI}$ )

5'-2', 3'-O-isopropylideneuridine-penicillin G (33)의 합성

2', 3'-O-isopropylideneuridine (4) (7.5 mmol), penicillin G sodium salt(11.2 mmol), N-hydroxysuccinimide(11.2 mmol), DCC(11.2 mmol)을 무수 pyridine (40 ml)에 녹여 ice-bath(-10°C)에서 3시간, -3°C에서 24시간 반응시켰다. 침전물은 여과한 후 여과된 용매는 농축하여  $\text{H}_2\text{O}$ 로 결정화시켰다. 결정화된 침전물은 여과하고, 여액을 다시 농축하여 PLC로 분리하였다. 재결정은  $\text{CHCl}_3$ 로 하였다.

Yield: 1.92g(45%)

IR(KBr): 3100-3500  $\text{cm}^{-1}$  (-NH-, medium), 3050  $\text{cm}^{-1}$  (aromatic C-H), 2860  $\text{cm}^{-1}$  (alkane C-H), 1680  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1600-1470  $\text{cm}^{-1}$  (aromatic C=C), 1490 & 1370  $\text{cm}^{-1}$  ( $(\text{CH}_3)_2\text{C}-$ )

5-iodouridine-penicillin G (36)의 합성

5-iodo-2', 3'-O-isopropylideneuridine (7.5 mmol), penicillin G sodium salt(11.2 mmol), N-hydroxysuccinimide (11.2 mmol), DCC(11.2 mmol)을 pyridine(40 ml)에 녹여 (33)의 합성과 같은 방법으로 (35)을 얻었다. 분리된 5'-iodo-2',3'-isopropylideneuridine-penicillin G (35)에 90%  $\text{CF}_3\text{COOH}$ 를 가하여

실온에서 반응시킨 후 감압농축하여 생성물을 얻었다.

Yield: 0.73g(35%)

IR(KBr): 3100-3500  $\text{cm}^{-1}$ (-NH-, medium), 3050  $\text{cm}^{-1}$ (aromatic C-H), 2860  $\text{cm}^{-1}$ (alkane C-H), 1660  $\text{cm}^{-1}$ (amide C=O), 1600 & 1470  $\text{cm}^{-1}$ (aromatic C=C)

Mass:  $m/e$  694( $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{N}_4\text{O}_9\text{SI}$ )

Uridine 5'-monophosphate(diammonium salt) (37)의 합성

Redistilled  $(\text{EtO})_3\text{PO}$ 에  $\text{POCl}_3$ (7.42 mmol)을  $-10^\circ\text{C}$ 에서 첨가한다.  $110^\circ\text{C}$ 에서 건조시킨 uridine (4 mmol)을  $(\text{EtO})_3\text{PO}$ 에 용해시켜 첨가한 후  $0-5^\circ\text{C}$ 에서 3시간 반응시킨다.  $\text{Ice-H}_2\text{O}$ (20 ml)를 dropwise한 다음 conc.  $\text{NH}_4\text{OH}$ 로 pH 7.0까지 중화시킨다.  $\text{Et}_2\text{O}$ -petroleum ether (1:1)로 씻은 후 반응액을 감압건조시키면 흰색 고체를 얻는다. 무수 MeOH로 tritulation하여 diammonium salt형의 화합물(37)을 얻었다. 분석용 시료는 DEAE cellulose column으로 처리하여 얻었다.

Yield: 1.17g(72%)

IR(KBr): 3100  $\text{cm}^{-1}$ ( $\text{NH}_2$ ), 1610  $\text{cm}^{-1}$ (C=O), 1250  $\text{cm}^{-1}$ (P=O), 1080 & 1055  $\text{cm}^{-1}$ (POC)

$^{31}\text{P}$ -NMR: 80.98(s, 1P)

2',3'-O-diacetyluridine 5'-monophosphate(disodium salt) (39)의 합성

잘 건조시킨 Uridine 5'-monophosphate(diammonium salt) (37) (5 mmol)에 30 ml의  $\text{AC}_2\text{O}$ 와 60 ml anhydrous pyridine을 넣고 상온에서 18시간 반응시킨다. TLC로 반응이 완결되었음을 확인한 후 20 ml의  $\text{ice-H}_2\text{O}$ 를 ice bath 상에서 첨가한다. 상온에서 3시간 더 교반한 후 감압건조시키면 syrup 형태의 (39)를 얻는다. Anhydrous pyridine으로 몇차례 coevaporation하여  $\text{H}_2\text{O}$ 를 완전히 제거한다.

Yield: 2.13g(96%)

IR(KBr): 3400  $\text{cm}^{-1}$ (-NH-), 1720  $\text{cm}^{-1}$ (C=O), 1657 & 1610  $\text{cm}^{-1}$ (C=O, C=C), 1220  $\text{cm}^{-1}$ (P=O), 1080 & 1040  $\text{cm}^{-1}$ (POC)

$^1\text{H}$ -NMR( $\text{DMSO-d}_6$ ): 89.48(d, 1H,  $\text{C}_6\text{H}$ ), 5.1-5.6 (broad), 3.0(s, 2H,  $\text{C}'\text{CH}_2$ ), 1.9-2.2(t, 6H,  $-(\text{CH}_3)_2$ ) 2', 3'-O-diacetyluridine 5'-phosphate Z-Ala(sodium salt) (42)의 합성

2', 3'-O-diacetyluridine 5'-monophosphate (39) (2.5 mmol)과 Z-Ala (5 mmol), DCC(10 mmol)을 25 ml의 anhydrous pyridine에 용해시킨다. 감압농축시킨 후 다시 25 ml의 anhydrous pyridine을 첨가한다. 이 과정을 몇번 반복한 후 최종적으로 5 ml의 pyridine을 남기고 상온에서 5일간 반응시킨다. 과량의 DCU를 여과시키고 pyridine으로 씻은 후 여과액을 농축시켜 PLC로 분리하여 sodium salt형의 고체 화합물 (42)를 얻었다.

Yield: 0.49g(32%)

IR(KBr): 3400  $\text{cm}^{-1}$ (-NH-), 1740  $\text{cm}^{-1}$ (C=O),

Table 1. The MIC against *Trichophyton rubrum*

| Compound No.   | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|----------------|--------------------------|
| 2              | 1.56                     |
| 3              | 1.56                     |
| 6              | 0.2                      |
| 5-Fluorouracil | 0.05                     |
| Amphotericin B | 7.3                      |
| Nystatin       | 31.2                     |

Table 2. The MIC against *P. notatum* and *A. niger*

| Compound No.           | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) |                 |
|------------------------|--------------------------|-----------------|
|                        | <i>P. notatum</i>        | <i>A. niger</i> |
| 8                      | >50                      | >50             |
| 10, 13, 14             | 50                       | 25              |
| 11                     | 50                       | 12.5            |
| 12, 15, 20             | 50                       | 50              |
| 16                     | 50                       | 25              |
| 17                     | 25                       | 12.5            |
| 27, 28, 29, 30, 31, 32 | 50                       | 50              |
| Polyoxine              | 25                       | 6.25            |

1655 & 1610  $\text{cm}^{-1}$ (C=O, C=C), 1230  $\text{cm}^{-1}$ ((P=O), 1080 & 1050  $\text{cm}^{-1}$ (POC).

$^1\text{H}$ -NMR( $\text{DMSO-d}_6$ ): 87.42(s, 6H, benzyl), 6.8(d, 1H,  $\text{C}_6\text{H}$ ), 5.0(s, 2H), 3.1(s, 2H,  $\text{C}'\text{CH}_2$ ), 1.8-2.1(t, 6H),  $-(\text{CH}_3)_2$ , 1.1-1.2(d, 3H,  $\text{CH}_3$ )

생물활성측정결과

합성한 화합물들을 진균류인 *Trichophyton rubrum*; *Penicillium notatum*; *Aspergillus niger*, 세균류인 *Escherichia coli*(-); *Staphylococcus aureus*(+)등을 선택하여 broth dilution method로 최저저해 농도(MIC)를 결정하였다. 그리고 *Mouse lymphoblastoma L5178Y cells*에 대한 항종양활성을 Coulter Counter method로 50% 성장억제농도( $\text{IC}_{50}$ )를 측정하고 그 결과를 Table 1, 2, 3, 4에 나타내었다.

그 결과 가장 좋은 활성을 보여준 혼합물은 5'-amino-5'-deoxyuridincyclo(Phe-Asp) (23)과 5'-iodo-5'-amino-deoxyuridine-penicillin G(26)로서  $\text{IC}_{50}$ (antitumor activity)과 MIC(antibacterial activity)값이 각각 (6.5  $\mu\text{g/ml}$ ), 6.25 ( $\mu\text{g/ml}$ )로 나타났다 (Table 4, 3). 그리고 진균류에 대한 활성은 5-bromo-2', 3'-O-isopropylideneuridine (6)의 MIC 값이 0.2 ( $\mu\text{g/ml}$ )로 *Trichophyton rubrum*에 대하여 가장 낮은 값을 보였다(Table 1).

Antibacterial activity test결과를 보면 합성한 nucleoside-peptide 및 nucleoside-penicillin G 유도체가 penicillin G와 거의 같은 활성을 나타내지만 (Table 3), antitumor, antifungal activity test에서는 결합체들이 더 좋은 활성을 나타낸 점(Table 1, 2, 4)으로 미루어보아 Prusoff 등이 제시한 것과 같은

**Table 3.** The MIC against *S. aureus* (+) and *E. coli* (-)

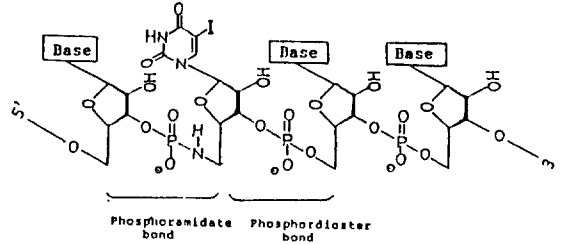
| Compound No.              | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) |                    |
|---------------------------|--------------------------|--------------------|
|                           | <i>S. aureus</i> (+)     | <i>E. coli</i> (-) |
| 6, 38, 39                 | 50                       | >100               |
| 8, 27, 28, 29, 30, 31, 32 | 100                      | >100               |
| 10, 11, 12, 13, 14        | 100                      | 200                |
| 16                        | 100                      | 200                |
| 17                        | 50                       | 200                |
| 18                        | 25                       | >100               |
| 20, 40, 42                | 100                      | >100               |
| 22, 23, 26                | 6.25                     | >100               |
| 33, 36                    | 12.5                     | >100               |
| 37, 40                    | 200                      | -*)                |
| Penicillin G              | 6.25                     | >100               |
| Polyoxine                 | 200                      | 200                |

\*) Not detected

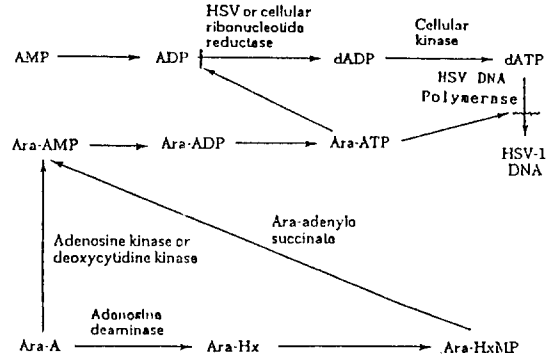
**Table 4.** The  $IC_{50}$  against L5178Y murine lymphoma cells.

| Compound No.  | Cell Growth Inhibition; $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|---------------|--|
| 2, 3, 4, 5, 8 | >30.0  |
| 6             | 27.0   |
| 7             | 25.0   |
| 22            | 18.0   |
| 23, 26        | 6.5  |
| 25            | 13.5   |
| 33            | 9.0  |
| 5-iodouridine | >30.0  |

메카니즘으로 이들의 저해작용이 진행된다고 생각된다. (Fig. 1). 즉, nucleoside-peptide 및 nucleoside-penicillin G 유도체는 peptide, penicillin G와 핵산 유도체로 분리된 후에 병원균에 RNA 생합성시 RNA 사슬에 비정상적인 결합으로 도입되어 RNA 사슬 전단을 유도하거나, 염기-염기간의 수소결합이 불가능하게되어 transcription을 저해한다고 생각된다. 또한, 단순한 핵산유도체와 이를 인산화한 화합물들의 항균활성측정 결과를 살펴보면, 미약하긴하나 뉴클레오타이드 유도체들이 더 좋은 활성을 보여 주고있다 (Table 3). 대부분의 핵산과 그 유도체들은 세포내에서 viral 또는 cellular kinase에 의해 5'-phosphate로



**Fig. 1.** Nucleoside derivatives incorporated into RNA



**Fig. 2.** Virus reproduction inhibition mechanism of Ara-A and Ara-HxMP

인산화되어지며 마지막단계에서 치료제로써 활성을 갖는 5'-triphosphate로 변환된다는 사실이 이와같은 실험결과를 해석하는데 도움을 주리라 생각한다(Fig. 2). 이들 인산화된 핵산유도체들은 세균이 분비하는 kinase에 의해 di, triphosphate로의 변환이 인산화하지 않은 유도체들보다 용이하게 진행되어 세균의 RNA에 결합하여 chain termination을 유도하거나, RNA 중합효소의 활성을 직접적으로 저해함으로써 세균의 번식을 억제 할 수 있었다고 생각된다.

따라서 본 연구에서 시도한 새로운 화학요법제: 5-할로젠치환체, 5'-aminouridine과 peptide 및 penicillin G의 결합체들은 상승효과와 lipophilicity 증가로 활성이 증진된 광범위 치료제로서의 가능성을 확인할 수 있었으며, 인산화된 핵산유도체들은 항바이러스제로 사용중의 기존 핵산 유도체의 내성, 독성문제를 극복할 수 있는 새로운 화학요법제 개발 시도에 대하여 방향을 제시하였다고 생각된다.

적 요

Uridine을 출발물질로하여 5-위치의 수소원자를 할로젠(I, Br, Cl) 으로 치환한 유도체, 5'-위치의 하이드록시기를 아미노기로 변형시킨 뒤 아미노산 및 황성펩티드와 케니실린 지를 결합시킨 화합물과 5'-일인산 유도체 및 5'-일인산-지방산 결합체를 화학적 방법으로 합성하고 각종 병원성 미생물에 대한 최저저해농도(MIC)와 50%성장억제농도(IC<sub>50</sub>)를 *in vi-*

tro에서 결정하였다. 그 결과 5'-amino-5'-deoxyuridine-cyclo(Phe-Asp)(23), 5-iodo-5'-amino-deoxyuridine-penicillin G (26)이 L5178Y murine lymphoma cell에 대하여 IC<sub>50</sub>값이 가장 낮았고 (6.5 g/ml), *S. aureus* (+)와 *E. coli* (-)에 대한 MIC 값도 6.25 (μg/ml)로서 가장 좋은 활성을 보였으며, 5-bromo-2',3'-O-isopropylideneuridine(6)가 *Trichophyton rubrum*에 대한 MIC값이 0.2 (μg/ml)로 가장 낮은 값을 보였다. 또한 uridine 유도체보다는 이를 인산화 한 화합물들이 미약하나마 향상된 활성도를 보여줌으로서 nucleoside 5'-phosphate 와 같은 부류의 화합물을 새로운 화학요법제로 개발할 가능성이 있음을 보였다.

## 사 사

본 연구는 태평양장학문화재단의 지원(1990-1991년도)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Aoshima, M., S. Tsukgoshi, Y. Sakurai, Jun-ichi Oh-ishi, T. Ishida and H. Kobayashi, 1976. Antitumor Activites of Newly Synthesized N<sup>4</sup>-acyl-1-β-D-Arabinofuranosylcytosine. *Cancer. Research*, **36**, 2726-2732.
2. Baker, B.R. and J.P. Joseph, 1955. Puromycin. Synthetic Studies. X. A Novel Breakdown of the Purine-Ring System. *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 15-18.
3. Baker, B.R., J.P. Joseph and J.H. Williams, 1955. Puromycin. Synthetic Studies. VII. Partial Synthesis of Amino Acid Analogs. *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1-7.
4. Hampton, A., 1961. Nucleotides. II. A New Procedure for the conversion of Ribonucleosides to 2', 3'-O-Isopropylidene Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 3640-3644.
5. Hong, C.I., A.J. Kirisits, A. Nechaev, D.J. Buchheit and C.R. West, 1985. Nucleoside Conjugates 6. Synthesis and Comparison of Antitumor Activity of 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine conjugates of Corticosteroids and Selected Lipophilic Alcohols. *J. Med. Chem.*, **28**, 171-177.
6. Huber, F.M., R.R. Chauvette, B.C. Jacson, 1973. Cephalosporins and Penicillin. Chemistry and Biology. *Academic press*. New York.
7. Kim, J.I., J.S. Koo, S.W. Kang and H.D. Shin, 1987. Synthesis and Biological Activity of Cyclic N-α-methyl dipeptides containing acidic amino acids. *J. Sci. Pusan Natl. Univ.*, **441**, 33-40.
8. Kurylowics, W., 1980. 항생물질 총론. 대광문화사, 서울.
9. Matsushita, T., E.K Ryu, C.I. Hong and M. MacCoss, 1981. Phospholipid Derivatives of Nucleoside Analogs as Prodrugs with Enhanced Catabolic Stability. *Cancer Research*, **41**, 2707-2713.
10. Okad, T., K Nakano and H. Miyake, 1985. Uracil Derivatives. V. Synthesis and Growth-Inhibitory Activity against L-1210 Cells of 5-Substituted 2'-

Deoxyuridines and Orotidine Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 856-864.

11. Raetz, C.R.H., Chu, M.Y., Srivastava, S.P. and Turcotte, J.G., 1977. A Phospholipid Derivatives of cytosine arabinoside and its conversion to phosphatidylinositol by animal tissue. *Science* (Wash. D.C.), **196**, 303-305.
12. Rosowsky, A., S.H. Kim, J. Ross and M.M. Wick, 1982. Lipophilic 5'-(Alkyl Phosphate) Esters of 1-β-D-Arabinofuranosyl cytosine and Its N<sup>4</sup>-Acyl and 2,2'-Anhydro-3'-O-acyl Derivatives as Potential Prodrugs. *J. Med. Chem.*, **25**, 171-178.
13. Ryu, E.K., R.J. Ross, T. Matsushita, M. MacCoss, C.I. Hong and C.R. West, 1982. Phospholipid-Nucleoside Conjugates. 3. Synthesis and Preliminary Biological Evaluation of 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine 5'-Monophosphate-L-1,2-Dipalmitim and Selected 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine-5'-Diphosphate-L-1,2-Diacylglycerols. *J. Med. Chem.*, **25**, 1322-1329.
14. Schinazi, R.f., M.S. Chen and W.H. Prusoff, 1979. Antiviral and Antineoplastic Activities of Pyrimidine Arabinosyl Nucleosides and Their 5'-Amino Derivatives. *J. Med. Chem.*, **22**, 1273-1277.
15. Smith, G.H., M.B. Kagan, 1970. Antimicrobial Therapy. W.B. Sanders Co., Philadelphia, London.
16. Stephen C.S., 1986. Innovation Fuels Growing Market For Antibacterial Drugs. *C & EN*, 33-35.
17. The Aldrich Library of IR Spectra, 1974. *Aldrich chemical company INC*.
18. The Aldrich Library of NMR Spectra, 1974. *Aldrich chemical Company INC*.
19. Turcotte, J.G., S.P. Srivastava, J.M. Steim, P. Calabresi, L.M. Tibbettes and M.Y. Chu, 1980. Cytotoxic Liponucleotide Analogs II. Antitumor Activity of CDP-Diacylglycerol Analoges Containing the Cytocine Arabinoside Moiety. *Biochemia et Biophysica Acta*, **619**, 619-631.
20. Victor Lorlan, M.D. 1980. Antibiotics of Laboratory Medicine. *Williams and wilkins Press*. Baltimore/London.
21. Walter, A.M. and L. Heilm, 1969. Antibiotica-Fibel. *Georg Thieme Verlag. Stuttgart.*

(Received October 21, 1991)

(Accepted November 23, 1991)