

## 制癌性物質의 合成 및 抗腫瘍試驗에 關한 研究 IV\*

### N-置換, *p*-Arsanilic Acid 유도체의 合成 및 抗腫瘍試驗

鄭 源 根\*\* · 千 文 宇\*\*\* · 金 重 協\*\* · 李 南 馥\*\*

(Received February 9, 1971)

Won Kun Chung, Moon Woo Chung, Chung Hyup Kim and Nam Bock Lee: Studies on the Synthesis and Antitumor Activities of Potential Antineoplastic Agents. IV. Synthesis and Antitumor Activities of N-Substituted-*p*-Arsanilic Acid.

Seven organic arsine compounds are synthesized as potential anti-tumor agents are subjected to the screening test of activity against SN-36 Leukemia, Sarcoma 180 and Ehrlich ascites carcinoma. Three compounds, namely N-(5-Nitrofroyl)-*p*-arsanilic acid, N-(2,4-Dihydroxybenzoethyl)-*p*-arsanilic acid and N- $\alpha$ (*p*-arsanilido) acetyl thiourea of the all synthesized compounds showed comparatively potential activities against experimental ascitic tumors both through cytological findings and survival duration.

有機砷素化合物은 1907年 Ehrlich에 의하여 最初로 化學療法劑로서의 應用可能性이 提唱된 以來, 數 많은 砷素化合物이 合成되어 왔고, 特히 1910年 Ehrlich에 의한 3,3'-diamino-4,4'-dioxarsenobenzene sodium의 合成은 有機砷素化合物의 生體內還元機轉에 依한 化學療法을 體系化 하였다.

그 後 King 및 Strangeways等<sup>1)</sup>은 有機砷素化合物의 微生物體에 對한 窮極的인 作用機轉을 研究한 結果 5價의 有機砷素化合物이 生體內에서 3價로 還元되어 glyoxalase의 co-enzyme인 glutathione에 作用함으로써 微生物體에 細胞毒作用을 發現한다고 報告하였다.

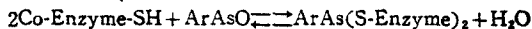
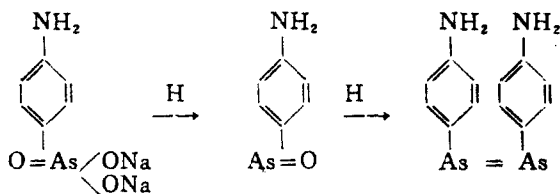


Chart 1—Physiological behaving of organic arsine compounds.

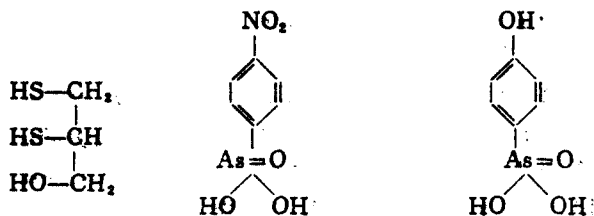
有機砷素化合物의 抗腫瘍試驗에 關한 研究는 1952年 Lyle等<sup>2)</sup>이 最初로 B. A. L(British Anti-Lewsite)를 實驗腫瘍(Sarcoma 37)을 移殖한 mouse에 投與하여 腫瘍細胞의 損傷作用을 檢討하였고 Games等<sup>3)</sup>은 arsenic trioxide가 *Leukemia*에 對한 增殖抑制作用이 있다고 報告하였으며, Ishidate等<sup>4,5)</sup>과 Asano等<sup>6)</sup>도 有機砷素化合物로서 *p*-ureido arsinic acid, *p*-oxy-

\* Part III, 本誌 14, 51(1970)

\*\* College of Pharmacy, Seoul National Univencyty.

\*\*\* Hyosung Women's College.

phenyl arsinic acid 및 *p*-nitrophenyl arsinic acid 等 化合物의 Yoshida Sarcoma 에 對한 抗腫瘍試驗을 報告한 으로서 有機砷素化合物의 惡性腫瘍에 對한 細胞毒作用에 關心이 傾注되어 왔다.



B. A. L. *p*-Nitrophenyl arsinic acid *p*-Oxyphenyl arsinic acid

Chart 2—Organic arsine compounds having anti-tumor activities.

著者等은 前述한바와 같은 有機砷素化合物의 抗腫瘍作用에 關한 報告를 根據로하여 새로운 有機砷素化合物을 合成하여 制癌性物質의 開發에 寄與할 目的으로 arsanilic acid에 5-Nitrofuoyl chloride, 2,4-dichlorophenoxyacetyl chloride 等을 脫酸縮合하고, 一便 resorcine, 2,4-dihydroxy acetophenone 等을 Mannich reaction을 利用하여 縮合하여 7種의 amino基水素 置換體를 合成하였으므로 이를 報告코져 하며, 合成物質의 抗腫瘍試驗은 dd系 mouse(우)의 腹腔內에 移殖한 SN-36 Leukemia, Erlich ascites carcinoma 및 Sarcoma 180에 對하여 生存試驗, 細胞形態變化試驗 및 細胞數減少試驗을 遂行하여 有意한 知見을 얻었으므로 그 結果를 아울러 報告코져 한다.

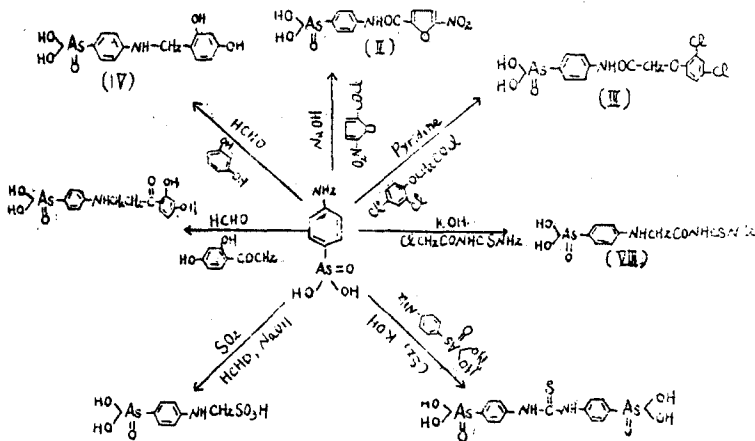


Chart 3—Course of synthesis

實驗方法 및 結果

I 合 成

N-(5-Nitrofuoyl)-*p*-arsanilic acid(II)의 合成 — *p*-Arsanilic acid 10.8g (0.05mole)을 10% NaOH Solu. 60ml에 溶解하고 室溫에서 攪拌하면서 5-nitrofuoyl chloride 9.65gm (0.055mole)를 少量式 加하여 反應시킨다. 約 10分間攪拌을 繼續한後, 反應液에 conc. HCl

을 加하여 液性을 酸性으로하면 黃色結晶粉末이 析出한다. H<sub>2</sub>O 및 EtOH로 充分히 洗滌한後, 10% NaOH溶液 및 20% HCl로 再結晶하면 微黃色結晶性粉末을 얻는다. m.p. > 300° 收得量 11.7g(67%)

*Anal.* Calcd for C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub>As: C, 37.08; H, 3.37; N, 3.93. Found: C, 37.15; H, 3.28; N, 4.05.

**N-(2,4-Dichlorophenoxy)-*p*-arsanilic acid(III)의 合成**—*p*-Arsanilic acid 10.8g (0.05 mole)와 2,4-dichlorophenoxyacetyl chloride 13.2g(0.055 mole)를 pyridine 100 ml 中에서 30分間 還流한後 反應物을 1/2容량까지 濃縮하고 冷後 冷水約 100ml 中에 攪拌하면서 注加하면 黃褐色의 結晶性粉末이 析出한다. H<sub>2</sub>O로 數回 洗滌한 後 10% NaOH 및 20% HCl 溶液으로 再結晶하면 黃色結晶性粉末을 얻는다. m.p. > 300°, 收得量 7.9.g(38%)

*Anal.* Calcd for C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>NCl<sub>2</sub>As: C, 40.10; H, 2.86; N, 3.34. Found: C, 40.36; H, 3.15; N, 3.06.

**N-(2,4-Dihydroxybenzyl)-*p*-arsanilic acid(IV)의 合成**—*p*-Arsanilic acid 10.8g (0.05 mole)을 EtOH 100ml에 溶解하고 40% HCHO 9ml와 resorcinol 6.6g (0.06 mole)를 加하여 3時間동안 還流한다. EtOH를 溜去한後, 얻는 結晶을 10% NaOH 및 20% HCl로 再結晶하면 微黃色針狀結晶을 얻는다. m.p. 225~230°(dec.)收得量 7.3g(43%)

*Anal.* Calcd for C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>NAs: C, 46.02; H, 4.13; N, 4.13. Found: C, 45.85; H, 3.89; N, 4.25

**N-(2,4-Dihydroxy benzoethyl)-*p*-arsanilic acid(V)의 合成**—*p*-Arsazilic acid 10.8g (0.05 mole)를 EtOH 100ml에 溶解하고 40% HCHO 9ml와 resacetophenone 9.1gm (0.06 mole)를 加하여 (IV)와 같은 方法으로 合成하였다. 黃色針狀結晶 m.p. 256—261(dec.) 收得量 11.6(61%)

*Anal.* Calcd for C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>NAs: C, 47.24; H, 4.23; N, 3.67. Found: C, 46.88; H, 3.93; N, 3.42.

**N-(Sulfomethyl)-*p*-arsanilic acid(VI)의 合成**—*p*-Arsanilic acid 10.8g(0.05mole)를 H<sub>2</sub>O 70ml에 懸濁시키고 40% HCHO 9ml를 加한後 攪拌하면서 12.8g(0.2mole, 計算量의 4倍量)의 SO<sub>2</sub> gas를 吸收시킨다. 反應終了後, 室溫에서 繼續 3時間攪拌하면 微黃色結晶性粉末이 析出한다. 10%NaOH 溶液 및 20% HCl로 再結晶하면 黃白色針狀結晶을 얻는다. m.p. 183~185°, 收得量 12.4g(80%)

*Anal.* Calcd for C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>NAs: C, 27.01; H, 3.22; N, 4.51. Found: C, 27.35; H, 3.04; N, 4.36

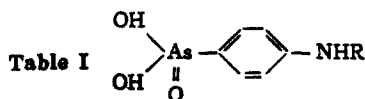
***p,p*-Diarsanophenyl thiourea(VII)의 合成**—EtOH 80ml에 *p*-arsanilic acid 4.34g(0.02 mole), CS<sub>2</sub> 5ml 및 KOH 1.5g를 加한 混液을 水浴中에서 2時間 還流한後, 室溫에 放置하면 黃褐色 結晶性粉末이 析出한다. 10% NaOH 및 20% HCl로 再結晶하면 濃黃色結晶性粉末을 얻는다. m.p. 221—224°(dec.), 得收量 3.3g(72%)

*Anal.* Calcd for C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub>SA<sub>2</sub>: C, 33.48; H, 3.01; N, 6.05. Found: C, 33.75; H, 2.85; N, 5.73.

**N- $\alpha$ (*p*-Arsanilido) acetyl thiourea(VIII)의 合成**—*p*-Arsanilic acid 10.8g(0.05 mole)를 H<sub>2</sub>O 100ml中에 加溫溶解하고 NaOH 6g를 加한後 chloroacetyl thiourea 8.4g(0.055

mole)를 加하여 水浴上에서 3時間 還流한다. 反應終了後, 10% HCl로 中和하여 析出하는 粗結晶을  $H_2O$ 로 洗滌하고 EtOH로 再結晶하면 黃色板狀結晶을 얻는다. m.p. 234~235° (dec.), 收得量 10.5g(65%)

Anal. Calcd for  $C_9H_{12}O_4N_3SA_5$ : C, 32.43; H, 3.61; N, 12.62 Found: C, 32.83; H, 3.58; N, 12.33.



No.	R	m.p.(°C)	Appearance	Yield	Formula*
A-11		>300	yellow cryst. powder	67	$C_{11}H_9O_7N_2As$
A-12		>300	yellow cryst. powder	38	$C_{14}H_{12}O_5NCl_2As$
A-13		225-300(dec.)	yellow needle	43	$C_{13}H_{14}O_5NA_5$
A-14		256-161(dec.)	yellow needle	61	$C_{18}H_{18}O_6NA_5$
A-15	$-CH_2SO_3H$	183-185	white needle	80	$C_7H_{10}O_6NSA_5$
A-16		221-224(dec.)	yellow cryst. powder	72	$C_{13}H_{14}O_6N_2SA_5$
A-17	$-CH_2CONHCSNH_2$	234-235(dec.)	yellow plate	65	$C_9H_{12}O_4N_2SA_5$

\* Analytical results obtained for C,H and N were within  $\pm 0.4\%$  of the theoretical values.

## II 抗腫瘍試驗

試料—Table I.에 表示된 合成物質 7種을 生理食鹽水에 懸濁시키고 懸濁液 0.5ml中에 所要量(7.5mg, 5mg, 2.5mg)이 含有되도록 調製하였다. (0.5%에 該當하는 Carboxymethyl cellulose와 0.2%에 該當하는 EtOH 첨가)

動物\*—*dd*系 健康 mouse(우, 體重 19~20g)를 使用하였다.

腫瘍\*—Ehrlich ascites carcinoma (Ehrlich), SN-36 Leukemia(SN-36), Sarcoma 180 (S-180)

\* obtained from Biological Research Institute of Tanbe Pharm. Manuf. Co., Saitama, Japan.

腹水性腫瘍의 生成 및 繼代—Ehrlich, SN-36 및 S-180 等を 各各 細胞數  $10^6$  個式(He macytometer로 計測한 結果, 1週日期 腹水 約 0.1ml에 該當)을 mouse의 腹腔內에 移植한 後 7~9日만에 繼代하였다.

腹水性腫瘍에 對한 抗腫瘍試驗<sup>20)</sup>—Ehrlich, SN-36 및 S-180 等を 各各 腹腔內에 移植 後, 24時間부터 試料 7.5mg, 5mg, 2.5mg式을 1日1回 連續 7日間 腹腔內에 注射하여 生 存效果를 觀察하였다(1群 5~10匹)

腫瘍細胞의 顯微鏡的 觀察—Ehrlich, SN-36, S-180 等を 移植後, 7日만에 藥物(7.5mg)을 投與한後, 1時間부터 72時間까지 經時的으로 腹水를 採取하여 腫瘍細胞의 數的變化와 形態變化를 觀察하였다(Wright stain).

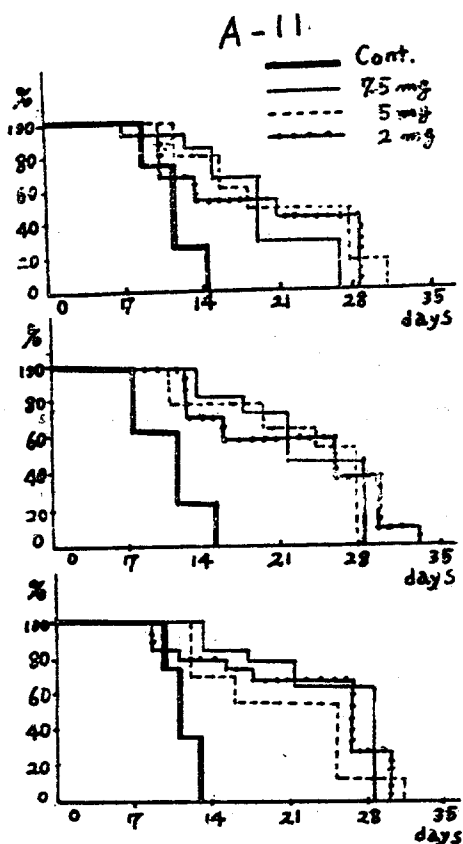


Fig. 1—Anti-tumor activity of N-Substituted-*p*-arsanilic acid on Sanko ma 180 (ascites)

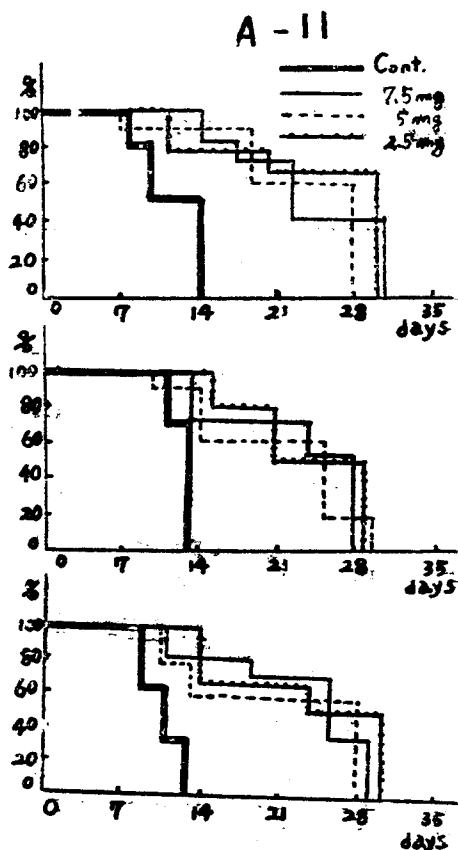


Fig. 2—Anti-tumor activity of N-Substituted *p*-arsanilic acid on SN-36 Leukemia (ascites)

腹水性腫瘍에 對한 生存效果—50% 生存日數가 對照群(0.5% carboxymethyl cellulose와 0.2%의 EtOH를 添加한 生理食鹽水 0.5ml 注射)의 2倍以上인것을 有效로 判定하였다. S-180 에서는 A-11, A-14 및 A-17이 有效值를 나타냈고 SN-36에서는 A-11, A-12 및 A-14 이 各各 有效值를 나타냈으며, Ehrlich 에서는 A-15만이 有效值를 나타냈다.

細胞數變動—Fig. 4와 같이 어떤 藥物도 投與後 1時間부터 急激히 細胞數가 減少하여 24시간 持續하나 A-11, A-14 및 A-17를 除外하고는 48~72時間內에 80~100%로 復元하였다.

形態變化—腫瘍細胞의 投與藥物에 依한 形態變化를 觀察한結果, 對照群細胞와 比較할 때 A-11, A-14 및 A-17의 投與로 核의 破壞, 分離, 細胞質內의 空泡(vacuol) 生成을 認知하였다(plate 1, 2)

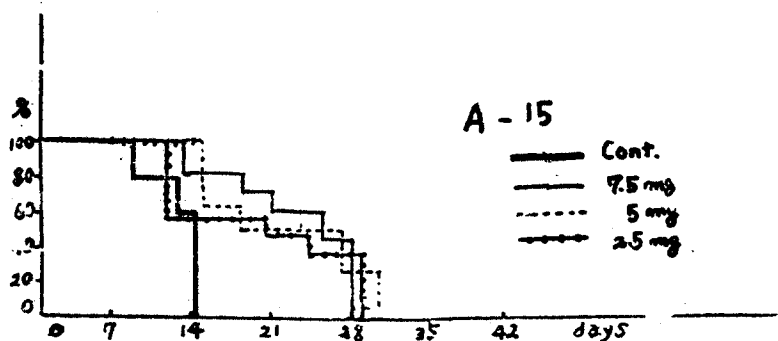


Fig. 3—Anti-fumor activity of N-Substituted-p-Arsanilio acid on Erlich ascites carcinoma.

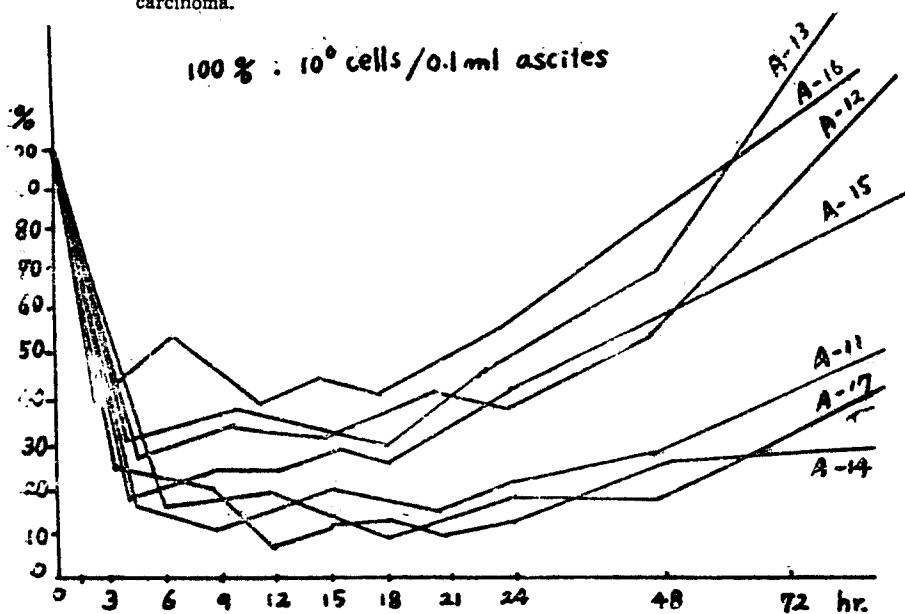
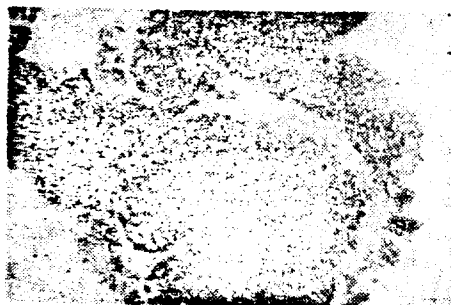
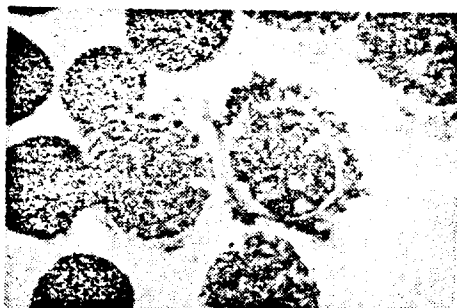


Fig. 4—Change in Number of Sarcoma 180(ascites) cells.

Plate 1—Tumor cell at 7days after transplantations (control).

Plate 2—Denaturation of tumor cells caused by the administration of A-11.



S-180

S-180



Ehrlich

Ehrlich



SN-36

SN-36

### 考 察

A-11, A-12 및 A-17의 合成은 脫鹽酸縮合法에 依하여 合成하였으며, 脫酸劑로는 10% NaOH 溶液 및 pyridine을 使用하는 것이 有利하였다.

*d*-Arsanilic acid의 水素置換에 導入된 原子團은 可能한 限 制癌性物質로 報告된 原子團을 採擇하였다.

腹水性腫瘍(Ehrlich, SN-36, S-180)의 生成에 있어서 移殖한 mouse의 腹水量은 7~9日에 最高值( $10^6$  cells/0.1ml ascites)를 나타냈고 13~15日에 大部分의 mouse가 死亡하였다.

抗腫瘍試驗에 있어서는 S-180의 境遇는 A-11, A-14 및 A-17이 有効値를 나타냈고 SN-36의 境遇는 A-11, A-12 및 A-14가 有効値를 나타냈으며 Ehrlich의 境遇는 A-15가 有効値를 나타냈다.

抗腫瘍試驗에 있어서 固形腫瘍(solid tumor)에 對한 作用, 細胞分裂 및 liver catalase에 미치는 影響등을 繼續하여 試驗고져 한다.

### 結 論

新制癌性物質로서 *p*-arsanilic acid의 amino 基水素置換體 7種을 合成하였다(Table I) 合成物質의 抗腫瘍試驗으로 Ehrlich SN-36 및 S-180 등을 各各 腹腔內에 移殖한 dd系 mouse(우)에 對하여 生存試驗, 細胞形態試驗 및 細胞數減少試驗을 遂行한 結果. A-11, A-14 및 A-17은 S-180에 對하여, A-11, A-12, A-14는 SN-36에 對하여 有効物質로 判定되었고 A-15는 Ehrlich에 對하여 有効物質로 判定되었다(plate 1, 2, Fig. 1-4).

### 文 獻

1. Cohen, King and Strangeways., *J. Chem. Soc.*, 1928, 2426
2. Lo V. Beek, *J. Natl. Cancer Inst.*, 13, 619 (1952)
3. Games W. Ingalls, *Am. Prof. Pharm.*, 20, 432 (1954)
4. M. Ishidate, *et. al.*, *Gann*, 46, 482 (1955)
5. M. Ishidate, *et. al.*, 石鎭守三 및 그 協力者報文案 p. 620
6. 淺野等, *Tokoku J., Exp. Med.*, 57, (1953)
7. 新井等, *日藥誌*, 88, 56 (1968)
8. 鄭, *Seoul Univ. J.*, (C)19, (1968)