약학회지 제35권 제4호 258~263(1991)
Yakhak Hoeji Vol. 35, No. 4

2,3-Alkyl Aziridinecarboximidate류의 합성 및 항암효과 평가

정상헌 · 안병준
충남대학교 약학대학
(Received June 11, 1991)

Synthesis of 2,3-Alkyl Substituted Aziridinecarboximidates and Their *in vitro* Cytotoxicity

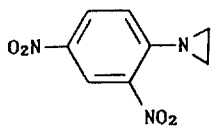
Sang-Hun Jung* and Byung-Zun Ahn
College of Pharmacy, Chung-Nam National University, Yousung Gu, Dae Jeon 305-764, Korea

Abstract—Seven drivatives of 2,3-alkyl substituted aziridinecarboximidates were prepared from alkyl substituted alkene and cyanamide. Their ED_{50} values against L_{1210} cell *in vitro* were evaluated as 1.5 to 4 μg/ml.

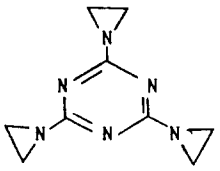
Keywords □ Synthesis, aziridinecarboximidate, cytotoxicity.

Aziridine ring을 포함하는 많은 화합물들이 alkylating agent로서 항암요법제로 사용되어 왔다. 이 aziridine계 항암제의 효과는 암세포 중에서 DNA 또는 효소의 nucleophilic site가 aziridine ring을 공격하여 S_N2 type으로 개환(ring opening)시킴으로서, alkylation이 일어나기 때문인 것으로 알려져 있다.[1,2] 이와 같은 aziridine의 반응성은 본질적으로 3-membered aziridine ring의 strain energy에 기인하는 것이다. aziridine계의 효과는 일반적으로 aziridinium ion 중간체를 거쳐 alkylation시키는 nitrogen mustard계와 비교하면 작음을 알 수 있다. 이는 S_N2 반응에 있어서 aziridine의 반응성이 aziridinium ion의 반응성에 비해 상대적으로 작기 때문이다. 따라서 aziridine계 항암제의 경우 aziridine ring의 반응성을 강화시킬 목적으로 aziridine ring의 질소와 resonance를 이룰 수 있는 moiety를 도입하여 이 질소의 leaving group의 기능을 증대시키는 방향으로 연구가 진행되어 왔다. 이와 같은 resonance를 이룰 수 있는 구조로 1-(2,4-dinitrophenyl)aziridine(**1**)의 2,4-dinitrophenyl기, triethyleneamine(**2**)의 triazine기, thiotepa(**3**)의 thiophosphono기 등을 볼 수 있다.

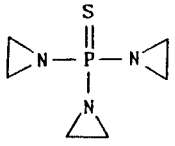
최근 이와 같은 aziridine계 항암제의 특성을 갖는 구조로 aziridinecarboximidate **4**의 일반적 합성법 및 그 성질이 보고된 바 있다.[3] aziridinecarboximidate는 구조 **4**에서 보는 바와 같이 isourea moiety를 갖고 있어 aziridine ring의 질소가 resonance에 참여함으로서 aziridine의 질소에 비해 더 좋은 leaving group으로 작용할 수 있다. 더우기 기존의 aziridine계 항암제와는 달리 이 물질은 basic한 물질(pKa 약 9.1)[4]로서 생체내 pH에서 쉽게 protonation되어 isourea salt가 됨으로서 용이하게 nucleophile에 의해 개환반응을 겪을 수 있어, 증강된 항암효과를 보여줄 것으로 믿어진다. 이는 aziridinecarboximidate를 2-alkoxyimidazoline으로 isomerization시킬 때 nucleophilic catalyst(NaI)보다 acidic nulcleophilic catalyst (HI)를 사용할 때 촉진되는 것을 볼 때 예측할 수 있다.[3] 이에따라 단순한 alkyl로 치환된 alkene(**5g-5g**)을 출발물질로 하여 aziridinecarboximidate 7종을 합성하고, 쥐의 백혈병 세포인 L_{1210} cell을 이용하여 시험관 내에서 세포독성을 관찰한 결과를 보고하고자



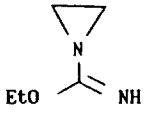
1: 1-(2,4-dinitrophenyl) aziridine



2: triethyleneamine



3: thiotepa



4

한다.

실 험

융점의 측정은 Electrothermal melting point apparatus를 사용하였으며 보정하지 않았다. IR spectra의 측정은 Perkin-Elmer 780 IR spectrometer를 사용하였으며 polystyrene의 1601 cm^{-1}의 흡수대를 기준으로 보정하였다. proton NMR spectra의 측정은 Bruker AC 80(80 MHz)과 Jeol 270(270 MHz) FT-NMR spectrometer를 사용하였으며, chemical shift는 tetramethylsilane의 흡수대로부터 ppm 값으로 기록하였다. TLC는 E.M. Merck pecoated silica gel GF_{254}를 사용하였으며 UV lamp(254 nm)와 phosphomolybdic acid로 산화시켜 물질을 확인하였다. 모든 alkene, N-bromosuccinimide, cyanamide는 Aldrich chemical company에서 가장 순수한 것으로 구입하였으며 그대로 반응에 사용하였다. dichlomethane과 ethanol은 질소 중에서 CaH_2를 첨가시켜 reflux한 후 증류하여 사용하였다. methanesulfonic acid 및 hexane, acetone 등의 용매류는 증류하여 사용하였다.

β-Bromoalkylcyanamide 6의 일반적 합성법－N-bromosuccinimde 1.1당량을 cyanamide 2당량을 함유한 dichloromethane(alkene의 농도가 10%가 되도록 전체 dichloromethane의 양을 조절함)에 가한 후 0.5시간 실온에서 교반하였다. 이 혼합물을 5～10℃로 냉각시킨 후 1당량의 alkene을 dichloromethane을 용매로 하여 50% 용액을 제조하여 약 0.5시간에 걸쳐 적가한 후 실온에서 24시간 교반시켰다. 얻어진 반응혼합물을 증류수로 4회 세척한 후 dichloromethane층을 무수 sodium sulfate로 탈수시켰다. 용매를 감압제거시키고 얻어진 조생성물을 flash column chromatography(acetone-hexane, silica gel)로 분리정제하였다.

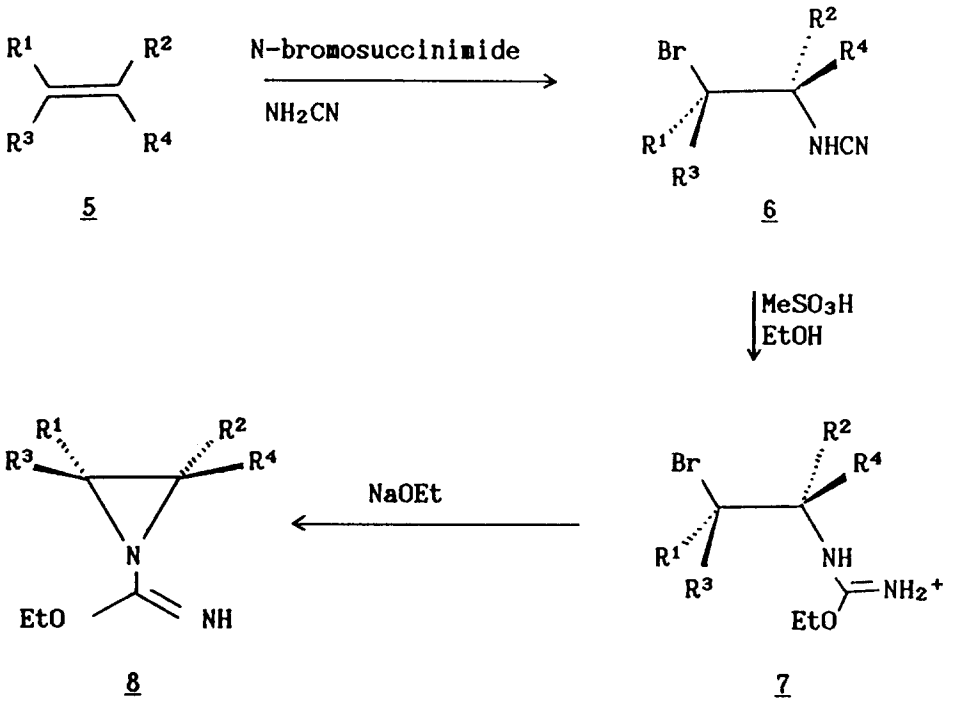
(***erythro*-2-Bromo-1-ethyl-n-butyl)cyanamide(6b)**－Rf 0.25(15% acetone-hexane) ; pale brownish liquid ; yield 81% ; IR(neat, NaCl) 3180(broad), 2220 cm^{-1} ; NMR($CDCl_3$, 80 MHz) δ 1.08(t, J=7.0 Hz, 3H), 1.10(t, J=7.0 Hz, 3H), 1.58～2.07(m, 4H), 3.15(m, 1H), 4.10(ddd, J=4.1, 5.7, 7.7 Hz, 1H), 4.63(broad, J=6.4 Hz, 1H).

(***trans*-2-Bromocyclopentyl)cyanamide(6d)**－Rf 0.23(15% acetone-hexane) ; pale brownish liquid ; yield 64% ; IR(neat, NaCl) 3210(broad), 2230 cm^{-1} ; NMR($CDCl_3$, 270 MHz) δ 1.67～2.13(m, 4H), 2.23(m, 1H), 2.40(m, 1H), 3.74(m, 1H), 4.11(q, J=6.4 Hz, 1H), 4.15(broad *s*, 1H).

(***trans*-2-Bromocycloheptyl)cyanamide(6f)**－Rf 0.25(15% acetone-hexane) ; white solid ; mp. 74～75℃ ; yield 74% ; IR(KBr) 3160(broad), 2230 cm^{-1} ; NMR($CDCl_3$, 270 MHz) δ 1.45～1.66(m, 4H), 1.70～1.88(m, 3H), 2.02～2.19(m, 2H), 2.30(m, 1H), 3.40(m, 1H), 4.11(dt, J=3.7, 8.6 Hz, 1H), 5.25(broad *s*, 1H).

(***trans*-2-Bromocyclooctyl)cyanamide(6g)**－Rf 0.25(15% acetone-hexane) ; white solid ; mp. 81～82℃ ; yield 80% : IR(KBr) 3140(broad), 2220 cm^{-1} ; NMR($CDCl_3$, 270 MHz) δ 1.40～1.90(m, 9H), 2.15～2.27(m, 2H), 2.39(m, 1H), 3.58(m, 1H), 4.29(ddd, J=9.7, 6.4, 6.4 Hz, 1H), 4.89(broad *s*, 1H).

Aziridinecarboximidate 8의 일반적 합성－질소기류하에서 농도가 15% 되도록 β-bromoalkylcyanamide **6**을 ethanol에 용해시킨 후 5～10℃로 냉각시켰다. 여기에 20% methanesulfonic acid의 ethanol 용액을 10분간에 걸쳐 적가하였다. 얻어진 반응용액을 6시간 동안 실온에서 교반한 후 3당량의 $NaOCH_3$의 ethanol 용액을 신속히 가하고 2시간 더 교반시켰다. 반응혼합물의 용매를 감압하에서 제거한 후 잔사에 ether(150～200 m*l*)를 가하여 교반시킨 후 여과하였다. 여액을 감압하에서 농축시켜 조생성물을 얻었다.



5 6 7 8

	R^1	R^2	R^3	R^4		R^1	R^2	R^3	R^4
a	H	H	H	nBu	e	$-(CH_2)_4-$		H	H
b	Et	H	H	Et	f	$-(CH_2)_5-$		H	H
c	Me	Me	Me	Me	g	$-(CH_2)_6-$		H	H
d	$-(CH_2)_3-$		H	H					

Scheme 1—Synthesis of aziridinecarboximidate **8**

얻어진 화합물을 flash column chromatography로 분리하여 정제하였다.

Ethyl *trans*-2,3-diethyl-1-aziridinecarboximidate(8b)—Rf 0.63(hexanedichloromethane) ; colorless liquid ; yield 70% ; IR(neat, NaCl) 3300(broad), 1630 cm^{-1} ; NMR($CDCl_3$, 270 MHz) δ 0.93(t, J=7.0 Hz, 6H), 1.19(t, J=7.0 Hz, 3H), 1.56(m, 4H), 1.92(m, 2H), 4.03(q, J=7.0 Hz, 2H), 5.50~5.95(broad *s*, 1H).

Aziridinecarboximidate 8d—Rf 0.42(10% methanol-chloroform) ; colorless liquid ; yield 62% ; IR(neat, NaCl) 3300(broad), 1640 cm^{-1} ; NMR($CDCl_3$, 80 MHz) δ 1.30(t, J=7.0 Hz, 3H), 1.30~2.18(m, 6H), 2.85(m, 2H), 4.12(q, J=7.0 Hz, 2H), 5.56~6.00(broad *s*, 1H).

Aziridinecarboximidate 8f—Rf 0.56(10% methanol-dichloromethane) ; colorless liquid ; yield 92% ; IR(neat, NaCl) 3300(broad), 1640 cm^{-1} ; NMR($CDCl_3$, 270 MHz) δ 1.29(t, J=7.0 Hz, 3H), 1.40~1.65(m, 6H), 1.77~1.97(m, 4H), 2.42(m, 2H), 4.11(q, J=7.0 Hz, 2H), 5.55~5.90(broad *s*, 1H).

Aziridinecaboximidate 8g—Rf 0.55(10% methanol-dichloromethane) ; colorless liquid ; yield 61% ; IR(neat, NaCl) 3300(broad), 1640 cm^{-1} ; NMR($CDCl_3$, 270 MHz) δ 1.20~1.80(m, 15H), 2.50(m, 2H), 4.12(q, J=7.0 Hz, 2H), 6.10~6.70(broad *s*, 1H).

항암효과의 측정[12]—항암효과의 측정은 쥐의 백혈

병 세포인 L_{1210} cell을 사용하여 시험관내에서 보고된 방법에 따라 세포독성을 측정하고 이 값으로부터 ED_{50} 값을 산정하여 수행하였다. 합성한 물질들의 10 mg/ml ethanol 용액을 만들어 필요에 따라 10배씩 계대 희석하고, 희석액을 100, 50, 20 μl씩을 시료 시험관에 가하였다. Fisher 배지에서 L_{1210} 세포를 배양한 후 세포의 농도가 5×10^4 cell/ml가 되도록 세포 현탁액을 만들어 대조 시험관 및 시료 시험관에 5 ml씩 가하였다. 이들을 CO_2 incubator 안에서 37℃로 48시간 배양한 후 trypan blue로 염색하고, 염색되지 않은 세포를 hematocytometer를 사용하여 살아있는 세포수를 구하였다. 이 값으로부터 ED_{50}값을 알려진 방법에 준하여 계산하였다.

결과 및 고찰

Aziridinecarboximidates의 합성—aziridinecarboximidate 유도체의 합성은 보고된 방법[3]을 수정하여 사용하였으며, 합성방법은 Scheme 1에 보여주는 바와 같다.

먼저 alkene을 1.1 당량의 N-bromosuccinimide와 2당량의 cyanamide로 dichloromethane 중에서 24시간 실온에서 처리하여 β-bromoalkylcyanamimde **6**을 얻었다. 얻어진 생성물 **6**은 acetone과 hexane(1 : 10) 혼합용매를 사용하여 silica gel 중에서 flash column chromatography를 사용하여 분리 정제하였다. 정제된 화합물의 수율은 60~80%이었다. 보고된 바와 같이[3] β-bromoalkylcyanamide **6** 유도체들은 IR에서 특징적으로 3300 cm^{-1}의 NH 및 2210~2230 cm^{-1}의 CN에 해당하는 강한 흡수대를 보여주었다. 또한 NMR에서 역시 특징적으로 1,2-disubstituted alkene에서 얻어진 **6b, 6d-6g**의 경우 3.00~3.50 ppm에서 질소를 함유하는 탄소의 proton의 흡수대와, 4.10 ppm 부근에서 Br을 갖고 있는 탄소의 proton의 흡수대를 관찰할 수 있었다. **6a, 6c, 6e**의 spectral data는 문헌[3]과 동일한 결과를 보여주었다. 이 반응은 cyclic bromonium ion 중간체가 생성된 후 cyanamide에 의해 trans opening되어 β-bromoalkylcyanamide가 생성되는 것으로 1,2-disubstituted alkene로부터 trans addition된 화합물이 얻어졌다. 이는 **6e**의 경우 NMR spectroscopy에 의해 증명되었을[3] 뿐만 아니라, halogen이나 pseudohalogen이 관여하는 유사한 많은 electrophilic addition 반응에서 증명된 바 있다.[5-10]

aziridinecarboximidate **8**의 합성은 β-bromoalkylbromide **6**를 ethanol 중에서 1.1 당량의 methanesulfonic acid로 6시간 실온에서 처리하여 isourea salt **7**을 형성시킨 후 4당량의 sodium methoxide를 ethanol에 용해시켜 가하여 분자내 S_N2 반응으로 폐환시킴으로서 합성하였다. 얻어진 조생성물의 정제는 flash column chromatography로 수행하였다. Table 1에서 보여주는 바와 같이 aziridinecarboximidate 7종을 합성하였으며, 수율은 60% 이상이었다. 이들 화합물은 IR에서 3300 cm^{-1}의 NH 흡수대와 1650 cm^{-1}에서 C=NH의 흡수대를 특징적으로 보여주었으며, NMR에서 aziridine ring의 proton이 1.90~2.60 ppm에서, ethoxy group의 proton이 4.10과 1.20 ppm 부근에서 해당하는 흡수대를 특징적으로 보여주었다. 일반적으로 cyanamide를 isourea로 전환할 때 alcoholic HCl이 주로 사용되나,[3,11] 넓은 반응조건에 사용할 목적으로 nonnucleophilic acid 촉매를 조사한 결과 methanesulfonic acid가 용이하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다. 이 aziridinecarboximidate 합성에 따른 stereochemistry를 살펴보면 alkene에 bromocynamide가 trans addition되고 isourea salt **7**의 cyclization이 분자내 S_N2 반응으로 진행됨으로 stereospecific하게 alkene의 stereochemistry가 azirinecarboxyimidate까지 그대로 유지되었음을 알 수 있다.

Aziridinecaboximidate의 항암효과—합성화합물의 항암효과는 측정은 보고된 방법[12]에 의해 쥐의 백혈병 세포인 L_{1210} cell을 사용하여 실험관내에서 세포독성을 측정하여 ED_{50}값을 산정하여 평가하였다. Table 1에서 보여주는 바와 같이 모든 aziridinecarboximi-

Table 1—Cytotoxic effect of aziridinecarboximidate **8**

	aziridinecarboximidate **8**				ED_{50}
	R^1	R^2	R^3	R^3	(μg/ml)
a[1]	H	H	H	nBu	2.0
b	Et	H	H	Et	4.0
C[1]	Me	Me	Me	Me	2.0
d	$-(CH_2)_3-$		H	H	4.0
e[1]	$-(CH_2)_4-$		H	H	1.5
f	$-(CH_2)_5-$		H	H	4.0
g	$-(CH_2)_6-$		H	H	4.0
	MeCCNU				4.0

[1]These compounds were synthesized according to reference 3.

date 화합물의 ED_{50}값이 4 μg/ml로서 대조약제인 MeCCNU(N-(2-chloroethyl)-N′-(trans-methylcyclohexyl)-N-nitrosourea)와 동등하거나 약간 우수한 효과를 보여주었다. 이는 MeCCNU가 L_{1210} cell에 대하여 특히 우수한 항암작용을 갖고 있음을 고려할 때 매우 우수한 효과로 판단된다. 따라서 aziridinecarboximidate moiety를 갖는 물질이 항암제로 개발될 수 있는 가능성이 있음을 확인할 수 있었다. 이들 화합물들은 2, 3위치의 alkyl 치환기에 관계없이 강한효과를 나타냈으며, 특히 이들 화합물 중 **8a, 8c, 8e**가 보다 강한효과를 보여주었다. **8a**와 **8e**의 경우 효과가 큰 것은 **8a**는 aziridine ring에 primary carbon을 갖고 있어 S_N2 반응을 쉽게 겪을 수 있고, **8e**는 다른 fused aziridinecarboximidate(**8d, 8f, 8g**) 비해 nucleophile에 의한 S_N2 반응을 용이하게 겪을 수 있는 conformation을 가질 수 있기 때문으로 믿어진다. 유사한 구조를 갖는 cyclohexene epoxide 등의 경우 이와 같은 ring opening 반응이 stereoelectronic effect에 의하여 지배되고 있음이 잘 알려져 있다.[13,14] 그러나 aziridine ring의 탄소가 tertiary로 이루어져 있어 S_N2 반응을 겪지 못하는 것으로 알려진[15] 화합물 **8c**의 경우 효과가 큰 것은 특기할 만하다. 이는 aziridinecarboximidate의 세포독성이 S_N2 type에 의한 alkylation 뿐 아니라 S_N1 type의 반응에 의해서도 진행될 수 있음을 의미하는 것으로 믿어진다.

결 론

단순한 alkene을 N-bromosuccimide와 cyanamide로 처리하여 trans adduct인 β-bromoalkylcyanamide **6**을 얻고, 이를 ethanol 용액 중에서 methanesulfonic acid로 처리하여 isourea salt **7**을 형성시킨 후 sodium methoxide를 가하여 폐환시켜 stereospecific하게 aziridinecarboximidate **8**을 7종 합성하였다. 합성된 화합물의 세포독성을 시험관내에서 쥐의 백혈병 세포인 L_{1210} cell을 사용하여 관찰한 결과 합성화합물 모두 ED_{50}값이 4 μg/ml 이하로서 매우 우수한 효과를 보여주었다. 따라서 aziridinecarboximidate 구조는 항암작용을 갖는 구조로서 항암제 개발에 lead compound로 사용될 수 있음을 확인하였다.

감사의 말씀

이 논문은 1989년도 문교부 학술 진흥재단의 자유공모과제 학술연구 조성비에 의하여 연구되었으며, 이에 깊이 감사드립니다. 세포독성 시험을 도와주신 한국인삼연초연구소의 이유희 연구원께 감사드립니다.

문 헌

1. Montgomery, J.A., Johnston, T.D. and Shealy, Y.F.: *Burger's Medicinal Chemistruy, part* II, 4th Ed., Wolff, M.E., Ed., John Wiley & Sons, New York, pp.619-627(1982).
2. Remers, W.A.: *Antineoplastic Agents,* John Wiley & Sons, New York, pp.86-126(1984).
3. Jung, S.H. and Kohn, H.: Stereoselective synthesis of vicinal diamines from alkenes and cyanamide. *J. Amer. Chem. Soc.* **107**, 2931(1985).
4. Hegarty, A.F., Bruice, T.C. and Benkovic, S.J.: Biotin and the nucleophilicity of 2-methoxyimidazoline toward SP^2 carbon. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1173(1969).
5. Ponsold, K. and Ihn, W.: Die addition von cyanamid und halogen an olefine ein neues verfahren zur darstellung von vic-halogencyanaminen und aziridinen. *Tetrahedron Letters* 1125(1970).
6. Freeman, F.: Possible criteria for distinguishing between cyclic and acyclic activated complexes and among cyclic activatedcomplexes inaddition reactions. *Chem. Rev.* **75**, 439(1975).
7. Grosjean, D., Mouvier, G. and Dubois, J.E.: Bromination of ethylenic compounds. 38. Isoreactivity of trisubstituted geometrical isomers. *J. Org. Chem.* **41**, 3869(1976).
8. Dubois, J.E. and Chretien, J.R.: Reactivity of methyl-substituted ethylene bromonium ions. Correlation between charge distribution and regio- or chemoselectivity. *J. Amer. Chem. Soc.* **100**, 3506(1978).
9. Olah, G.A.: *Halonium Ions,* John Wiley & Sons, New York, pp.98-124(1975).
10. Van Ende, D. and Krief, A.: Novel reagent for stereospecific aziridine synthesis from monoolefins. *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* **13**, 279(1974).
11. Sandler, S.R. and Karo, W.: *Organic Functional Group Preparation,* Academic Press, Inc., New York,

pp.192-212(1986).

12. Thayer, P.S., Himmelfarb, P. and Watts, G.L.: Cytotoxicity assaya with L_{1210} cells in vitro, Comparison with L_{1210} in vivo and KB cells in vitro. *Cancer Chemother. Rep.* **2**, 1(1971).
13. Murphy, D.K., Alumbaugh, R.L. and Rickborn, B.: Reduction of epoxides, 3. The lithium aluminum hydride and mixed hydride reduction of secondary-tertiary epoxides. *J. Amer. Chem. Soc.* **91**, 2649 (1969).
14. Deslongchamps, P.: *Stereoelectronic Effects in Organic Chemistry,* Pergamon Press, New York, pp.163-174(1983).
15. Jung, S.H. and Kohn, H.: The chemical reactivity of 2,2,3,3-tetramethylaziridinecarboximidate. *Heterocycles* **23**, 2045(1985).