

N-Cyanoaziridine 유도체의 합성 및 항암효과 평가

정 상 현

충남대학교 약학대학

(Received July 26, 1991)

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

Sang-Hun Jung

College of Pharmacy, Chungnam National University, Yousung Gu, Dae-Jeon 305-764, Korea

Abstract—Seven derivatives of 2,3-alkyl substituted N-cyanoaziridine were stereoselectively prepared from alkyl substituted alkenes and cyanamide. NMR spectral property and conformation of N-cyanoaziridine were analysed. Protons(3.34 ppm) at 2,3 position of N-cyanoaziridines are significantly deshielded in case of cyclopentyl fused N-cyanoaziridine. These protons are getting more anisotropically shielded with increasing the fused carbocycle size of N-cyanoaziridine. Therefore chemical shift for these protons are upfield shifted to 2.80 ppm in case of cyclooctyl fused N-cyanoaziridine. Their ED₅₀ values against L₁₂₁₀ cell *in vitro* were evaluated as 0.5~8.0 µg/ml. Conformation of carbocycle of fused N-cyanoaziridine is more important to their cytotoxicity than the increment of the strain energy of 3-membered ring.

Keywords □ N-cyanoaziridine, conformation, spectral property, cytotoxicity.

Nitrogen mustard의 항암작용이 aziridinium ion 중간체를 거쳐 일어나는 것이 알려진 이후,^{1,2)} aziridine계 화합물들이 alkylating agent로서 항암제로 개발되어 사용되고 있다. Aziridine의 alkylation 반응성은 3-membered ring이 갖는 strain energy에 기인하는 것으로, 암세포의 중요 macromolecule의 nucleophilic site와 반응하여 alkylation시켜 이 macromolecule들을 불활성화함으로서 항암작용을 발현하는 것으로 잘 알려져 있다. 이와 같은 aziridine의 반응성은 ring의 질소에 electron withdrawing기를 도입함으로써 증가되는 것으로 알려져 있다. 이런 구조를 갖는 aziridine계의 항암제로 thiotepa, ethyleneamine, 1-(2,4-dinitrophenyl) aziridine 등의 화합물을 들 수 있다.

이와 같은 구조적 특성을 포함하는 구조로서 N-cyanoaziridine의 일반적 합성법 및 성질이 Ponsold와 Ihn에 의하여 보고된 바 있다.³⁾ N-cyanoaziridine은

electron withdrawing 효과를 발현하는 cyano기의 영향으로 nucleophile(I⁻, CH₂O⁻, SCN⁻, CH₃CH₂S⁻, N₃⁻ 등)에 의해 쉽게 S_N2 반응을 겪어 ring opening 반응이 일어난다. 이와 같은 N-cyanoaziridine의 반응성을 고려할 때 이 계열의 화합물이 항암제로 개발될 가능성이 크다고 할 수 있다. 이에 따라 alkyl로 치환된 alkene이나 cycloalkene을 출발물질로 하여 2, 3위치에 alkyl기가 치환되었거나 carbocycle이 융합된 N-cyanoaziridine의 유도체를 합성하고 쥐의 백혈병 세포인 L₁₂₁₀ cell을 사용하여 1차적인 세포독성을 관찰하여 항암효과의 가능성을 평가한 결과를 보고하고자 한다.

실 험

융점의 측정에는 electrothermal melting point apparatus를 사용하였으며 측정치는 보정하지 않았다. IR

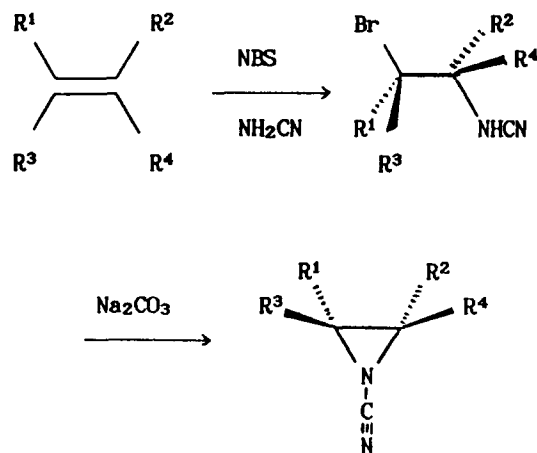
spectra의 측정은 Perkin-Elmer 780 IR spectrometer를 사용하였으며, polystyrene의 1601 cm^{-1} 의 흡수대를 기준으로 보정하였다. proton NMR spectra의 측정은 Bruker AC 80(80 MHz)와 Jeol 270(270 MHz) FT-NMR spectrometer를 사용하였으며, chemical shift는 tetramethylsilane의 흡수대를 기준으로 ppm값으로 기록하였다. TLC는 E.M. Merck precoated silica gel GF₂₅₄를 사용하였으며, UV lamp(254 nm)와 phosphomolybdic acid로 산화하여 물질을 확인하였다. 출발물질로 사용한 모든 alkene, cyanamide 및 N-bromosuccinime는 aldrich chemical company에서 가장 순수한 것으로 구입하여 그대로 사용하였다. dichloromethane은 질소기류하에서 CaH₂를 첨가하여 증류시켜 사용하였으며, hexane, acetone 등 chromatography에 사용한 용매는 증류하여 사용하였다.

N-cyanoaziridine 3의 일반적 합성법—알려진 방법³⁻⁵⁾ 따라 합성한 β -bromoalkylcyanamide **2**를 acetone에 용해시키고 sodium carbonate 2당량을 증류수 (acetone 양의 0.5배)에 용해시켜 가한 후 실온에서 30분간 교반시켰다. 이 때 TLC(15% acetone-hexane)로 확인한 결과 반응이 완결되었음을 확인하였다. 증류수를 10배 가하여 회석시킨 후 dichloromethane으로 3회 추출하였다. dichloromethane층을 sodium sulfate로 탈수시킨 후 감압하에서 용매를 제거하여 조생성물을 얻었다. 이를 flash column chromatography(silica gel, 15% acetone-hexane)로 분리하여 정제하였다.

2-n-Butyl-N-cyanoaziridine(3a)—Rf 0.42(20% acetone-hexane); colorless liquid; yield 93%; IR(neat, NaCl) 2200, 1660 cm^{-1} ; NMR(CDCl₃, 80 MHz) δ 0.80~1.05(m), 1.20~1.70(m), 2.25(d), 2.60~2.70(m) 일부 분해됨.

trans-2,3-Diethyl-N-cyanoaziridine(3b)—Rf 0.40(15% acetone-hexane); colorless liquid; yield 83.6%; IR(neat, NaCl) 2200, 1660 cm^{-1} ; NMR(CDCl₃, 270 MHz) σ 1.09(t, J=7.0 Hz, 6H), 1.70(quinet, J=7.0 Hz, 4H), 2.44(t, J=7.0 Hz, 2H).

2,2,3,3-Tetramethyl-N-cyanoaziridine(3c)—Rf 0.40(15% acetone-hexane), white crystalline solid; m.p. 89~90°C; yield 92.3%; IR(KBr) 2200 cm^{-1} ; NMR(CDCl₃, 270 MHz) δ 1.43(s).



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
a	nBu	H	H	H
b	Et	H	Et	H
c	Me	Me	Me	Me
d	—(CH ₂) ₃ —		H	H
e	—(CH ₂) ₄ —		H	H
f	—(CH ₂) ₅ —		H	H
g	—(CH ₂) ₆ —		H	H

Scheme 1—Synthesis of N-cyanoaziridine.

N-cyanoaziridine 3d—Rf 0.40(15% acetone-hexane); colorless liquids; yield 82%; IR(neat, NaCl) 2210 cm^{-1} ; NMR(CDCl₃, 270 MHz) δ 1.61~1.79(m, 4H), 2.07~2.16(m, 2H), 3.34(s, 2H).

N-cyanoaziridine 3e—Rf 0.40(15% acetone-hexane); colorless liquids; yield 85%; IR(neat, NaCl) 2205 cm^{-1} ; NMR(CDCl₃, 80 MHz) δ 1.28~1.41(m, 4H)m 1.50~2.10(m, 4H), 3.00~3.10(m, 2H).

N-cyanoaziridine 3f—Rf 0.43(15% acetone-hexane); white solid; m.p. 46~47°C; IR(KBr) 2205 cm^{-1} ; NMR(CDCl₃, 270 MHz) δ 1.25~1.36(m, 2H)m 1.45~1.60(m, 4H), 1.85~2.20(m, 4H), 2.97~3.05(m, 2H).

N-cyanoaziridine 3g—Rf 0.48(15% acetone-hexane); colorless liquids; yield 95.4%; IR 2205 cm^{-1} ; NMR(CDCl₃, 270 MHz) δ 1.15~1.74(m, 10H), 2.20~2.26(m, 2H), 2.76~2.85(m, 2H).

결과 및 고찰

합성—N-cyanoaziridine 유도체의 합성은 Scheme 1에서 보는 바와 같다. 먼저 보고된 방법에³⁻⁵⁾ 따라 7종의 alkene **1**을 N-bromosucinimide와 cyanamide로 처리하여 β -bromoalkylcyanamide **2**를 얻고 이를 flash column chromatography로 정제하였다. 이들 정제된 β -bromoalkylcyanamide를 acetone에 용해시켜 2당량의 sodium carbonate를 함유한 20% 수용액에 일시에 가하고 상온에서 30분간 교반시켰다. 이때 TLC(15% acetone-hexane : SiO₂)로 반응액을 조사한 결과 반응이 완결되었음을 알 수 있었다. 증류수를 가하여 10배 희석시킨 후 dichloromethane으로 3회 추출하고 dichloromethane층을 sodium sulfate로 탈수한 후 용매를 감압하에서 제거하였다. 얻어진 조생성물은 대부분 TLC에서 하나의 물질로 인지되었으나 tar나 그 밖에 무기물을 제거할 목적으로 flash column chromatography를 하여 빠른 속도로 분리 정제하였다. 얻어진 N-cyanoaziridine 유도체의 수율은 80~95%로서 매우 좋은 결과를 보여주었다. 대부분의 N-cyanoaziridine은 안정하였으나 **3a**의 경우 NMR 측정시 상당량 분해됨을 볼 수 있었다. 이 방법에 따른 N-cyanoaziridine의 합성은 alkene **1**에 bromocyanamide가 trans addition 되어^{3,4)} 얻어진 β -bromoalkylcyanamide를 분자내 S_N2 반응으로 cyclization시킴으로서 alkene의 stereochemistry가 그대로 N-cyanoaziridine에 유지되는 것이 특징이다.

N-cyanoaziridine의 분광학적 성질—합성된 N-cyanoaziridine 유도체들은 IR과 NMR로 그 구조를 확인하였다. IR에서 2200~2210 cm⁻¹의 CN에 해당하는 특징적인 흡수대가 관찰되었다.⁶⁾ NMR에서는 **3a**나 **3b**와 같이 2, 3위치에 alkyl기가 치환된 경우 aziridine ring의 2, 3위치의 proton에 해당하는 흡수대가 2.25~2.44 ppm에서 나타난다. 이는 2위치가 alkyl로 치환된 경우 일반적으로 관찰되는 chemical shift이다.⁶⁻⁹⁾ Fused된 N-cyanoaziridine의 경우에는 Table I에서 보는 바와 같이 2, 3위치의 proton에 해당하는 흡수대가 3.34에서 2.76 ppm 사이에 분포되어 있음을 볼 수 있다. 일반적으로 carbocycle이 융합되어 있는 경우 alkyl이 치환된 경우에 비해 2위치의 proton이 더 많이 deshielding되는 것이 잘 알려져 있다.⁸⁾ Cyclopentyl이 융합된 **3c**의 경우 3.34 ppm에서, cyclooctyl이

융합된 **3g**의 경우 2.76~2.85 ppm에서 흡수대를 보여주었다. 즉 융합된 carbocycle이 cyclopentyl인 경우 2, 3위치의 proton이 aziridine ring의 평면에 가까워져 3-membered ring의 anisotropy를 거의 받지 않는 것을 의미한다. 그러나 carbocycle이 커짐에 따라 up-field shift하는데, 이는 융합된 carbocycle의 크기가 커짐에 따라 2, 3위치의 proton이 aziridine ring과 수직인 방향으로 이동함으로써 3-membered ring이 갖는 anisotropy effect를 더 많이 받기 때문으로 생각된다. 이와같은 carbocycle이 융합된 aziridine의 경우 carbocycle의 크기가 커짐에 따라 aziridine ring의 2, 3위치의 proton이 aziridine ring의 평면의 수직방향으로 이동과 aziridine ring의 C-C와 C-N bond가 길어지며, 융합각도가 커지는 것이 X-ray crystallography 결과 잘 알려져 있다.¹⁰⁻¹³⁾

N-cyanoaziridine의 항암효과—얻어진 cyanoaziridine **3**의 일차적인 항암효과를 알려진 방법¹⁴⁾ 따라 쥐의 백혈세포인 L₁₂₁₀ cell에 대하여 세포독성을 시험관내에서 관찰하고 ED₅₀값을 산정하여 평가하였다. 그 결과는 Table I에서 보는 바와 같이 ED₅₀값이 0.8~8.0 μ g/ml로서 대조약제인 MeCCNU(N-(2-chloroethyl)-N'-(trans-methylcyclohexyl)-N-nitrosourea)와 동등하거나 우수한 효과를 보여주었다. 이는 MeCCNU가 L₁₂₁₀ cell에 대하여 매우 우수한 세포독성을 갖고 있음을 고려할 때 매우 우수한 효과로 평

Table I—Select chemical shift and cytotoxic effect of N-cyanoaziridine **3**.

	N-cyanoaziridine 3				Chemical shift of 2, 3-proton ^{a)} (ppm)	ED ₅₀ ^{b)} (μ g/ml)
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴		
a	nBu	H	H	H	—	— ^{c)}
b	Et	H	Et	H	2.44	1.0
c	Me	Me	Me	Me	—	8.0
d	—(CH ₂) ₃ —	H	H	H	3.34	5.0
e	—(CH ₂) ₄ —	H	H	H	3.00~3.10	0.5
f	—(CH ₂) ₅ —	H	H	H	2.97~3.05	4.0
g	—(CH ₂) ₆ —	H	H	H	2.76~2.85	8.0
	MeCCNU					4.0

^{a)}This values are the chemical shifts of 2, 3-protons of N-cyanoaziridines.

^{b)}ED₅₀ values were calculated from the results of bioassay against L₁₂₁₀ cell *in vitro*.

^{c)}N-cyanoaziridine **3a** was not tested against L₁₂₁₀ cell because of its instability.

가된다. 따라서 N-cyanoaziridine 계열의 물질이 항암제로 개발될 가능성이 있음을 알 수 있었다. 합성한 화합물 중 **3b**와 **3e**의 경우 ED₅₀값이 각각 1.0과 0.5 µg/ml로서 특히 괄목할만한 효과를 보여주었다. 화합물 **3b**의 경우 2, 3위치가 methyl로 완전히 치환된 **3c**의 효과보다 강한 것은 nucleophile에 의해 2 또는 3위치에 nucleophile이 용이하게 공격하여 S_N2 반응을 쉽게 일으키기 때문으로 생각된다. Cyclohexyl이 융합된 화합물 **3e**가 cyclopentyl이 융합되어 aziridine ring의 strain energy가 강화된^{15,16)} 화합물 **3d**보다 효과가 강한 것은 carbocycle의 conformation에 따른 것으로, **3e**의 경우 nucleophile에 의해 용이하게 S_N2 반응을 겪어 trans diaxial opening할 수 있기 때문으로 믿어진다. Cyclohexyl이 융합된 7-(p-iodobenzenesulfonyl)-7-azabicyclo[4.1.0] heptane의 경우 cyclohexyl ring의 구조가 cyclohexane의 chair conformation보다 약간 flat하게 되어 있음¹⁰⁾ 볼 때 trans diaxial opening을 잘 할 수 있는 구조임을 알 수 있다. 이와같은 stereoelectronic effect는 2,3-cyaninmincholestane⁴⁾이나 유사한 공간구조를 갖고 있는 cyclohexene epoxide¹⁷⁾의 opening reaction의 경우 잘 알려져 있다.

결 론

단순한 alkene을 N-bromosuccinimide와 cyanamide로 처리하여 β-bromoalkylcyanamide **2**를 얻고, 이를 sodium carbonate로 처리하여 분자내 S_N2 반응으로 폐환시킴으로서 stereospecific하게 alkene의 stereochemistry가 유지된 N-cyanoaziridine **3**을 7종 합성하였다. 합성한 N-cyanoaziridine **3**의 세포독성을 시험관내에서 쥐의 백혈병 세포인 L₁₂₁₀ cell을 사용하여 측정된 결과 ED₅₀ 값이 0.5~8 µg/ml로서 탁월한 효과를 보여주었다. 따라서 N-cyanoaziridine 구조가 세포독성을 갖는 구조로 항암제로 개발될 수 있는 가능성이 있음을 확인하였다.

감사의 말씀

이 논문은 1989년도 충남대학교 부설 의약품 개발 연구소의 연구비 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 깊이 감사드립니다. 실험을 도와주신 충남대학교 약

학대학 백호현군과 세포독성 연구를 도와 주신 한국인삼연초연구소의 이유희 연구원께 감사드립니다.

문 헌

- 1) Montgomery, J.A., Johnston, T.A. and Shealy, Y.F.: *Burger's Medicinal Chemistry, 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) Ponsold, K. and Ihn, W.: Die addition von cyanamid und halogen an olefine ein neues verfahren zur darstellung von vic.-halogenocyanaminen und aziridinen. *Tetraheatron Letters*, 1125(1970).
- 4) Jung, S.H. and Kohn, H.: Stereoselective synthesis of vicinal diamines from alkenes and cyanamide. *J. Amer. Chem. Soc.*, **107**, 2931(1985).
- 5) Jung, S.H. and Ahn, B.Z.: Syntheses of 2,3-alkyl substituted aziridinecarboximidates and their *in vitro* cytotoxicity. *J. Pharm. Soc. Korea* **35**, (1991) in press.
- 6) Jung, S.H.: *New Methods for the preparative of vicinal diamines and monooximes from olefin and cyanamide*, Ph. D. dissertation, University of Houston, Texas, U.S.A., pp.48-49, 173(1984).
- 7) Padwa, A., Dean, D. and Oine, T.: Involvement of azomethine ylides in the thermal rearrangement of aziridinyl ketones to pyrroles. *J. Amer. Chem. Soc.*, **97**, 2822(1975).
- 8) Franck, R.W. and Auerbach, J.: The singlet oxygen oxidation of N-phenylpyrroles. Its application to the synthesis of a model mitomycin. *J. Org. Chem.* **36**, 31(1971).
- 9) Jackman, L.M. and Sternhell, S.: *Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy in organic chemistry 2nd Ed*, Pergamon Press, Oxford, pp.98-101(1969).
- 10) Trefonas, L.M. and Majeste, R.: Crystal and molecular structure of 7-(p-iodobenzenesulfonyl)-7-azabicyclo[4.1.0]heptane. *J. Heterocyclic Chem.* **2**, 80 (1965).
- 11) Trefonas, L.M. and Sato, T.: Crystal and molecular structure of 6-(p-iodobenzenesulfonyl)-3-oxa-6-

- azabicyclo[3.1.0]hexane. *J. Heterocyclic Chem.* **3**, 404(1966).
- 12) Zacharis, H.M. and Trefonas, L.M.: Crystal and molecular structure of 6-(p-bromobenzoyl)-6-azabicyclo [3.1.0] hexane. *J. Heterocyclic Chem.* **5**, 343 (1968).
- 13) Zacharis, H. and Trefonas, L.M.: Crystal and molecular structure of cis-11-(p-iodobenzenesulfonyl)-11-azabicyclo[8.1.0]undecane. *J. Heterocyclic Chem.* **7**, 755(1970).
- 14) Thayer, P.S. and Himmelfarb, P. and Watts, G.L.: Cytotoxicity assays with L₁₂₁₀ cells *in vitro*, Comparison with L₁₂₁₀ *in vivo* and KB cells *in vitro*. *Concer Chem. Rep.* **2**, 1(1971).
- 15) Padwa, A. and Woolhouse, A.D., Aziridines, azirines and fused ring derivatives, *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Volume 7, Lwoski, W., Ed., Pergamon Press, New York, pp.48-51(1984).
- 16) Clark, T. and Mckerverey, M.A.: Saturated hydrocarbons. *Comprehensive Organic Chemistry*, Stoddart, J.F.Ed., Pergamon Press, New York, pp.84-91 (1979).
- 17) Deslongchamps, P.: *Stereoelectronic effects in organic chemistry*, Pergamon Press, New York, pp.163-174(1983).