

## 항암제인 Cyclophosphamide의 중간체인 $^{15}\text{N}$ 과 $^{17}\text{O}$ -phosphoramidic Mustards의 합성

구교임\* · 염곤\*

한양대학교 식품영양학과, \*단국대학교 미생물학과

(Received April 9, 1994)

### The Study of Cyclophosphamide Metabolite $^{15}\text{N}$ and $^{17}\text{O}$ Phosphoramidic Mustards

Kyo Im Koo\* and Kon Ryem\*

Department of Food and Nutrition, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

\*Department of Microbiology, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

**Abstract**—Each nitrogen and oxygen site isotope enriched the cyclophosphamide metabolite phosphoramidic mustard was synthesized. Reaction of *N,N*-bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride [ $\text{Cl}_2\text{P}(\text{O})\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$ ] with benzyl alcohol and ammonia gave *N,N*-bis(2-chloroethyl)phosphorodiamidic acid phenylmethyl ester [ $\text{BzO}(\text{H}_2\text{N})\text{P}(\text{O})\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$ ]. Catalytic hydrogenation of this benzyl ester followed by the addition of cyclohexylamine provided PM. Incorporation of  $^{15}\text{NH}_3$  into this general scheme gave PM with a  $^{15}\text{NH}_2$  moiety. Glycine- $^{15}\text{N}$  was converted to bis(2-chloroethyl)amine- $^{15}\text{N}$  hydrochloride which, in turn, provided for *N,N*-bis(2-chloroethyl)phosphorodiamidic- $^{15}\text{N}$  dichloride. Use of this compound in the general synthetic pathway yielded PM·CHA with  $^{15}\text{N}$  in the mustard moiety.  $^{17}\text{O}$ -Enriched PM was generated through the use of benzyl alcohol- $^{17}\text{O}$ . To obtain the alcohol, labelled benzaldehyde was made by exchange with  $^{17}\text{OH}_2$  and was then reduced with sodium borohydride.

**Keywords** □ cyclophosphamide.

Cyclophosphamide(cytoxan, CP)는 항암제로서 여러 형태의 암치료에 그 효율성을 인정받고 있다. 그러나 CP의 항암제로서의 좋은 효율에도 불구하고 강한 toxicity 때문에 CP 대체물질이 필요시 되어왔고, 그동안 isofamide 같은 많은 CP 유사체들이 연구되어 CP 대체 항암제로 가능성을 보여주기는 하였지만<sup>1)</sup> 이들중 어느것도 임상적인 효과나 응용면에서 CP를 대체할 수 없었다. 이와 같은 사실에 대하여 1979년 Fridman, Myles 또는 Sladek은 CP의 더 좋은 대체 물질을 개발하기위해서는 CP의 oncostatic selectivity mechanism을 좀더 이해할 필요가 있다고 제안하였다.<sup>2)</sup> 현재 CP의 metabolism에 대하여 많은 논문이 발표 되었으나 다른 항암제와 비교하여 CP의 뛰어난

cell selectivity와 관련된 의문들은 아직 만족스럽게 대답되어 있지 않다.<sup>1)</sup>

일반적으로 인정된 CP와 CP 유사체들의 Metabolism은 초기 enzyme-mediated oxidation(activation)으로 4-Hydroxycyclophosphamide(4-HO-CP)가 생성되고 뒤따른 spontaneous reversible ring-opening으로 aldophosphoramidate(AP)를 생성한다. 생성된 AP는 irreversible한 fragmentation(toxicogenesis)으로 acrolein과 alkylating agent인 phosphoramidic mustard(PM)를 형성하거나,<sup>1-3)</sup> enzymatically oxidize(detoxification)되어 carboxyphosphoramidate (CBP)를 형성한다. 생성된 PM에서 형성된 aziridinium cyclic ion 중간체는 DNA와 ring opening alkylation 반응에 의하여 DNA와 cross-link 하는 것

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

으로 알려져있다.<sup>4)</sup>

이때 PM 분자의 산소와 질소원소의 전자밀도는 DNA와 PM에서 생성된 aziridinium cyclic ion 중간체와 반응성을 결정하는데<sup>5,6)</sup> 중요한 요인으로 알려져 있다. 화합물에서 특정원소의 전자밀도는 NMR 분광학을 이용하여 특정원소가 동위원소로 치환된 물질과 비교하여 특정원소의 전자밀도를 측정할 수 있다. PM의 반응성을 측정하기 위하여 <sup>15</sup>N을 갖는 PM (*N,N*-bis(2-chloroethyl) phosphorodiamidic-<sup>15</sup>N acid)와 <sup>17</sup>O을 포함한 PM(*N,N*-bis(2-chloroethyl) phosphorodiamidic-<sup>17</sup>O acid) 합성결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 실험방법

Benzene, Cyclohexylamine, phosphorus oxychloride, tetrahydrofuran(THF), thionyl chloride, triethylamine 등은 건조하며, 용매와 시약들은 distillation 한다. 물을 포함하지 않는 반응 혼합물은 질소 분위기하에서 행한다. 5°C에서 행하는 반응은 얼음 bath 하에서 하고, -25°C에서의 반응들은 드라이아이스와 사염화탄소의 bath 하에서 행한다. Unlabelled diethyl iminodiacetate는 Eastman Kodak으로 부터 구입했고, 모든 다른 용매와 시약들은 Aldrich 화학회사와 Fisher 과학회사로부터 구입했으며, Unlabelled phosphoramidic mustard (cyclohexylammonium salt)는 국제암연구소내 암치료분과의 The Drug Synthesis and Chemistry Branch, Developmental Therapeutics Program으로 부터 얻었다. 분석의 TLC는 250 mm 층의 silica gel GF(Analtech)로 코팅된 2.5 cm×10 cm 판을 사용하였다. 이때 요오드(I<sub>2</sub>)와 254 nm의 UV 램프가 성분 확인을 위해 사용되었다. 녹는점은 Fisher-Johns Melting Point Apparatus를 사용하였다. 수소화반응은 Parr medium-pressure shaker-hydrogenator와 50 혹은 500 mL 압력병을 이용하여 행했다.

NMR 스펙트럼은 Bruker MSL500 분광기를 사용하였다. <sup>1</sup>H (500 MHz) NMR의 화학적 이동값(ppm)은 TMS(CDCl<sub>3</sub>)나 TSP(D<sub>2</sub>O)를 표준으로 사용하였다. <sup>31</sup>P(202.5 MHz) NMR의 화학적 이동값(ppm)은 D<sub>2</sub>O 내에 25% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>를 모세관에 주입하여 표준으로 사용하였다. <sup>17</sup>O NMR의 화학적 이동값(ppm)은 모세관

을 이용하여 0.035% <sup>17</sup>O(천연량)을 표준으로 사용하였다. <sup>15</sup>N NMR의 화학적 이동값(ppm)은 모세관 주입내에 0.1M 인화나트륨내에 <sup>15</sup>N urea(pH 7.0에서 <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl의 56.5 ppm에 비해 상대적으로)을 표준으로 사용한다.

*N,N'*-Bis(2-chloroethyl)phosphorodiamidic-<sup>15</sup>N Acid Phenyl Ester(2a)—benzene(10 mL)과 benzyl alcohol(1.03 mL, 10.0 mmol)의 용액을 benzene(10 mL)과 benzene으로 씻은 NaH(57% oil dispersion 중의 530 mg, 12.6 mmol)의 suspension에 5°C에서 방울로 더한다. 완전히 더한 후, 반응혼합물은 상온에서 24시간 동안 교반한다. 만들어진 sodium benzylate는 benzene(10 mL)과 *N,N*-bis(2-chloroethyl) phosphoramidic dichloride(2.58 g, 10.0 mmol)의 용액에 5°C에서 주사기로 더한다. 상온에서 24시간 동안 교반한 후 필터하고, MgSO<sub>4</sub>로 말린 후 농축하여 *N,N*-bis(2-chloroethyl)phosphoramidic chloride phenylmethyl ester [3.00 g, 9.10 mmol, R<sub>f</sub> 0.91(ethyl acetate)]를 얻는다.

<sup>15</sup>NH<sub>3</sub> (250 mL 'break-seal' flask, ca. 10 mmol, Aldrich Chemical Co., 98 atom% <sup>15</sup>N)의 유리용기는 septum으로 묶은 후 얼음 bath에서 냉각한다. 유리 밀봉을 깨후 triethylamine (1.39 mL, 10.0 mmol)과 benzene(10 mL)의 용액을 주사기를 사용하여 용기에 넣는다. 그뒤 crude *N,N*-bis(2-chloroethyl)phosphoramidic chloride phenylmethyl ester(3.00 g, 9.10 mmol)과 benzene(10 mL)의 용액을 유사한 방법으로 도입한다. 반응 플라스크는 얼음으로 계속 냉각시키고 3시간에 걸쳐 서서히 흔들어 준다. 상온에서 3일 동안 방치한 후 용기를 조심스럽게 열고 반응혼합물을 필터한다. 필터액은 농축하고, 남은 물질은 flash chromatography(4.7 cm×6.5 in column, ethyl acetate)에 의해 정제한다. 생성물 (2a) [0.42 g, 14% 수율, R<sub>f</sub> 0.43(ethyl acetate), mp. 55~58°C]은 5°C에서 고체화된 오일로 얻어진다. <sup>1</sup>H NMR(360 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.45~7.30(m, 5H, Ar), 5.11~4.96(m, 2H, CH<sub>2</sub>O), and 3.61(td, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=6.5 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HP</sub>=2.0 Hz 4H, CH<sub>2</sub>Cl), 3.52~3.33(m, 4H, CH<sub>2</sub>N), 2.71(dd, <sup>1</sup>J<sub>H-15N</sub> 81 Hz, <sup>2</sup>J<sub>HP</sub>=4.3 Hz, 2H, <sup>15</sup>NH<sub>2</sub>). <sup>31</sup>P NMR(202.46 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 15.93 (d, <sup>1</sup>J<sub>31P-15N</sub> = 37.4 Hz). <sup>15</sup>N NMR(50.70 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 17.81(d, <sup>15</sup>NH<sub>2</sub>).

*N,N'*-Bis(2-chloroethyl)phosphorodiamidic-<sup>15</sup>N

Acid Cyclohexylammonium Salt(1a-CHA). Ethanol (10 mL) 속에 2a(350 mg, 1.12 mmol)과 Pt/C(10%, 101 mg)의 혼합물을 4시간 동안 50 psi에서 수소화시킨다. 압력을 낮춘 후 수분 동안 반응혼합물을 통해 질소를 bubbling 시킨다. 혼합물은 ethanol(10 mL)로 희석시킨 후 여기에 cyclohexylamine(0.260 mL, 2.27 mmol, 2당량)를 더한다. 상온에서 2.5시간 동안 교반한 후 suspension은 celite를 통해 필터하고, 필터액은 농축한다. 남은 고체(83% crude 수율)는 ether (1 mL)로 씻는 후, 이 고체는 소량의 ethanol에 녹인 후 탁해질때까지 ether를 더한다. 혼합물은 5°C에서 1시간 동안 방치한 후 피펫으로 액체부분을 제거한다. 남은 고체는 ether로 씻고, 씻은 ether는 액체부분에 합친 후 상온에서 흰가루의 생성물(209 mg, 58%, mp. 112~114°C)이 얻어지도록 상온에서 농축한다.  $^1\text{H}$  NMR(500 MHz, 0.05M phosphate/ $\text{D}_2\text{O}$ , pH 7.4, 5°C)  $\delta$  3.65(t, J=7.0 Hz, 4H,  $\text{CH}_2\text{Cl}$ ), 3.37~3.28(m, 4H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ); cyclohexylammonium 이온의 경우, 3.18~3.09(m, 1H), 2.04~1.95(m, 2H), 1.85~1.76(m, 2H), 1.70~1.63(m, 1H), 1.40~1.27(m, 4H), 1.24~1.12(m, 1H).  $^{31}\text{P}$  NMR(202.46 MHz, 0.10M phosphate, pH 7.0, 4°C)  $\delta$  12.9(d,  $J_{31\text{P}-^{15}\text{N}} = 18$  Hz).  $^{15}\text{N}$  NMR(50.70 MHz, 0.10M phosphate, pH 7.0, 4°C)  $\delta$  23.42(d,  $^{15}\text{NH}_2$ ). Glycine- $^{15}\text{N}$  Ethyl Ester Hydrochloride. HCl 기체를 glycine- $^{15}\text{N}$ (3.00 g, 39.4 mmol, Aldrich와 Sigma화학회사, 98원자 %  $^{15}\text{N}$ )과 (90 mL)의 suspension에 5분 동안 bubbling한다. 결과되는 맑은 용액은 용액으로부터 생성물이 침전될 수 있도록 12시간 동안 교반한다(ethanol은 교반을 원활히 하기 위해 필요한 만큼 더한다). 남은 HCl은 water aspirator로 제거하고, 반응혼합물은 흰색가루(5.36 g, 97%, mp. 141°C(unlabelled 화합물의 경우 mp.: 145~146°C)의 생성물을 얻도록 농축한다.  $^1\text{H}$  NMR(360 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  4.18(q, J=7.2 Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.79(s, 2H,  $^{15}\text{NCH}_2$ ), 1.17(t, J=7.2 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

**Diethyl 2-Aminoacetate- $^{15}\text{N}$ -Triethylamine**(5.3 mL, 38 mmol)를 glycine- $^{15}\text{N}$  ethyl ester hydrochloride(5.4 g, 38 mmol)과  $\text{CHCl}_3$ (40 mL)의 얼음으로 냉각시킨 suspension에 더한다. 수분-동안 교반한 혼합물에 ethylboroacetate(5.6 mL, 51 mmol, 1.3당량)과 triethylamine(5.3 mL, 38 mmol)과  $\text{CHCl}_3$ (40 mL)의 용액을 방울로 더해준다. 반응혼합물은 3일 동안 상

온에서 교반하고, 필터하여 농축한다. 남은 물질은 silica gel(4.5 cm $\times$ 41 cm column,  $\text{CHCl}_3$ - $\text{CH}_3\text{OH}$ , 9 : 1)에서 chromatography로 분리하여 노란 오일의 생성물 4.5 g, 61%,  $R_f$  0.78( $\text{CHCl}_3$ - $\text{CH}_3\text{OH}$ , 9 : 1)을 얻는다.  $^1\text{H}$  NMR(360 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.20(q, J=7.2 Hz, 4H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.46(s, 4H,  $^{15}\text{NCH}_2$ ), 1.28(t, J=7.2 Hz, 6H,  $\text{CH}_3$ ).

**Diethanolamine- $^{15}\text{N}$ -THF**(25 mL)와 diethyl iminodiacetate- $^{15}\text{N}$ (4.81 g, 25.0 mmol)의 용액을 얼음으로 냉각시킨  $\text{LiAlH}_4$ (4.51 g, 119 mmol, 4.8)과 THF (100 mL)의 suspension에 방울로 더해준다. 완전히 더한 후에 반응혼합물은 5°C에서 5분, 상온에서 20분 동안 6교반한 후 24시간 동안 reflux한다. suspension이 완전히 상온까지 식은 후에, 물(2.0 mL), 15% NaOH(2.0 mL), 물(6.1 mL)의 순으로 서서히 더한다. 반응혼합물은 2시간 동안 교반한 후 필터한다. 필터액은 농축하고, 남은 물질은  $\text{CHCl}_3$ 으로 녹인 후  $\text{MgSO}_4$ 로 말리고, 필터한 후에 농축하여 TLC  $R_f$  0.25( $\text{CHCl}_3$ - $\text{CH}_3\text{OH}$ , 8 : 2)에 의해 확인된 순수한 오일로서의 생성물(0.61 g, 24% 수율)을 얻는다. 반응 고체들의 soxhlet 추출(THF, 4일)로 TLC에 의해 약간의 불순물만을 포함하여 분리하지 않고 다음 반응에 사용할수있는 부가적인 생성물(1.72 g, 64%)을 얻을 수 있다. 전체 crude 수율: 2.33 g, 88%.  $^1\text{H}$  NMR (360 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.78~3.61(m, 4H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 2.81 (t, J=5.1 Hz, 4H,  $^{15}\text{NCH}_2$ ), 2.30~1.90(br s, 3H,  $^{15}\text{NH}$ 와 OH).

**Bis(2-chloroethyl)amine- $^{15}\text{N}$  Hydrochloride (3)-thionyl chloride**(4.26 mL, 58.3 mmol, 1.8당량)과  $\text{CHCl}_3$ (14 mL)의 용액을 diethanolamine- $^{15}\text{N}$ (1.72 g, 16.2 mmol)과  $\text{CHCl}_3$ 의 용액에 방울로 더해준다. 완전히 더한 후에, 반응혼합물은 2시간 동안 reflux 한다. 그뒤 갈색혼합물을 -20°C에서 12시간 동안 보관하면, 분리하지 않고 다음반응에 사용할수 있는 맑은 갈색 결정(1.47 g, 51%)을 얻을 수 있다. 필터액에 ether의 첨가는 좀 덜 깨끗한 생성물(0.25 g, 9%)을 준다. 전체 crude 수율: 1.72 g, 60%.  $^1\text{H}$  NMR(360 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3.94~3.90(m, 4H,  $\text{CH}_2\text{Cl}$ ), 3.53(t, J=5.5 Hz, 4H,  $^{15}\text{NCH}_2$ ).

**Bis(2-chloroethyl)phosphamidic- $^{15}\text{N}$  Dichloride (4)-pyridine**(57 mL, 0.70 mmol)을 3(0.13 g, 0.70 mmol)과 benzene(5 mL)의 suspension에 5°C에서

더해준다. 10분 동안 교반한 후에, 같은양의 pyridine (57 mL, 0.70 mmol)과 POCl<sub>3</sub>(65 mL, 0.70 mmol)을 차례로 더한다. 반응혼합물을 밤새도록 교반한 후에 필터하고 농축한다.

남은 오일은 silica gel(dry-packed column, 8 mm × 11 cm, CHCl<sub>3</sub>)을 사용하여 chromatography로 분리하고, -20°C에서 고체화되는 오일로 생성물 4 [101 mg, 57%, R<sub>f</sub> 0.64(CHCl<sub>3</sub>)]을 얻는다. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.76~3.71(m, 4H, CH<sub>2</sub>Cl), 3.71~3.63(m, 4H, <sup>15</sup>NCH<sub>2</sub>). <sup>31</sup>P NMR(202.46 MHz, CHCl<sub>3</sub>) δ 17.6(d, <sup>1</sup>J<sub>31P-15N</sub> = 17 Hz).

**N,N-Bis(2-chloroethyl)phosphorodiamidic-<sup>15</sup>N-Acid Phenylmethyl Ester(2b).** benzyl alcohol(40 mL, 0.38 mmol)을 benzene(2 mL)과 benzene으로 씻은 NaH(57% oil dispersion중의 20 mg, 0.48 mmol)의 suspension에 5°C에서 더한다. 반응혼합물은 5°C에서 30분간 교반하고, 그 뒤 상온에서 2시간 동안 교반한다. 만들어진 sodium benzyolate는 열음으로 냉각시킨 4(2.58 g, 10.0 mmol)와 benzene(2 mL)의 용액에 주사기로 더한다. 완전히 더한 후에, 상온에서 24시간 동안 교반한다. 그 뒤 열음으로 냉각한 후 15분 동안 암모니아를 bubbling 한다. 반응혼합물은 필터하고, 농축하여 남은 물질은 silica gel (8 mm × 11 cm column, ethyl acetate)을 사용하여 chromatography로 분리한다. 생성물 (2b) 44 mg, 36% 수율, R<sub>f</sub> 0.39(ethyl acetate), mp. 55~58°C은 -20°C에서 고체화된 오일로 얻어진다. <sup>1</sup>H NMR(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.31(s, 5H, Ar), 5.01~4.89(m, 2H, CH<sub>2</sub>O), and 3.57~3.48(m, 4H, CH<sub>2</sub>Cl), 3.41~3.27(m, 4H, <sup>15</sup>NCH<sub>2</sub>), 2.91~2.75(br s, 2H, <sup>15</sup>NH<sub>2</sub>). <sup>31</sup>P NMR (202.46 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 15.9(d, <sup>1</sup>J<sub>31P-15N</sub> = 36 Hz).

**N,N-Bis(2-chloroethyl)phosphorodiamidic-<sup>15</sup>N-Acid Cyclohexylamm-onium Salt (1b·CHA).** Ethanol(5 mL) 속에 2b(44 mg, 21 mmol)과 Pt/C(10%, 21 mg)은 1a·CHA의 합성시에 언급했던 방법으로 수소화 시킨다. Cyclohexylamine(32 mL, 2.27 mmol, 2당량)을 반응혼합물에 더한 뒤 1.5시간 동안 교반한다. crude 생성물(47%)은 1a·CHA의 경우 위에서 언급했던 방법으로 분리하고, 생성물 1b·CHA는 가루 (13 mg, 30%, mp. 53~55°C)로 얻어진다. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, 0.05 M phosphate/D<sub>2</sub>O, pH 7.4, 5°C) δ 3.66(td, J = 7.1, 1.1 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>Cl), 3.33 (dt, J = 10.6,

7.1 Hz, 4H, <sup>15</sup>NCH<sub>2</sub>); cyclohexylammonium 이온의 경우, 3.21~3.12(m, 1H), 2.05~1.96(m, 2H), 1.88~1.75(m, 2H), 1.71~1.63(m, 1H), 1.41~1.30(m, 4H), 1.13~1.23(m, 1H). <sup>31</sup>P NMR(202.46 MHz, 0.10 M phosphate, pH 7.0, 5°C) δ 13.36(d, <sup>1</sup>J<sub>31P-15N</sub> = 30 Hz). <sup>15</sup>N NMR(50.70 MHz, 0.10 M phosphate, pH 7.4, 4°C) δ 31.5(d, <sup>15</sup>NCH<sub>2</sub>).

Benzyl Alcohol-<sup>17</sup>O. benzaldehyde(1.02 mL, 10.0 mmol)과 THF속의 0.001 M HCl(6 mL속의 1 M HCl 6 mL)과 물-<sup>17</sup>O(1.00 g, 55.2 mmol, MSD, 10원자 % <sup>17</sup>O)의 용액은 상온에서 2일간 교반한다. THF는 감압하에서 제거하고, 남은 물층은 ether(2 × 5 mL)로 추출한다. ether층은 MgSO<sub>4</sub>로 말리고, 필터한 후에 농축한 뒤, 남은 색 없는 액체는 methanol(10 mL)에 녹인다. 이것은 주사기를 사용하여 NaBH<sub>4</sub>(380 mg, 10.0 mmol, 4당량)과 CH<sub>3</sub>OH(10 mL)의 suspension에 방울로 첨가한다. 반응혼합물은 24시간 동안 교반한 후, 반응혼합물의 TLC 분석은 매우 작은 양의 생성물(CHCl<sub>3</sub>에서 benzaldehyde의 경우 R<sub>f</sub> 0.67이고, benzyl alcohol의 경우는 0.31)이 생성되었음을 말해준다. 더 많은 NaBH<sub>4</sub>(380 mg, 10.0 mmol)를 더하고, 반응혼합물을 reflux 한다. 2시간 교반 후, TLC 분석은 반응하지 않은 반응물이 없음을 보여준다. 혼합물은 1 M HCl을 가지고 중화시킨 후 감압하에서 CH<sub>3</sub>OH을 제거한다. 물층은 CHCl<sub>3</sub>(2 × 20 mL)으로 추출하고, 유기층은 황화마그네슘으로 말린 후 농축하여 crude benzyl alcohol-<sup>17</sup>O(613 mg, 57%)를 얻는다. 생성물은 unlabelled benzyl alcohol을 사용한 TLC의 비교에 의해 확인하고, 더 이상의 분리없이 사용한다.

**N,N-Bis(2-chloroethyl)phosphorodiamidic Acid Phenylmethyl Ester-<sup>17</sup>O (2c).** n-buthyllithium(1.6 M의 3.54 mL, 5.66 mmol)의 hexane 용액을 -23°C에서 주사기를 사용하여 benzyl alcohol-<sup>17</sup>O(613 mL, 5.66 mmol)과 THF(10 mL)의 용액에 더한다. 얻은 하얀 suspension은 상온에서 한시간 동안 교반하고, 주사기를 사용하여 -23°C에서 bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride(1.47 g, 5.66 mmol)과 THF(10 mL)의 용액으로 서서히 첨가한다. 반응혼합물은 -23°C에서 1.5시간 동안 교반하고, 그 뒤 5°C에서 0.5시간 동안 교반한다. 기체 암모니아를 5분 동안 열음으로 냉각시킨 혼합물에 bubbling시킨 후 플라

스크를 막아서 상온에서 24시간 동안 보관한다. suspension은 필터하고, 농축하여 남은 물질은 silica gel(2 cm×18 cm column, ethyl acetate)을 사용하여 chromatography로 분리한다. 생성물 (2c) [533 mg, 30% 수율, R<sub>f</sub> 0.46(ethyl acetate), mp. 55~58°C은 -20°C에서 세워두면 흰 왁스같은 고체화된 색 없는 오일로 얻어진다. <sup>1</sup>H NMR(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.41~7.30(m, 5H, Ar), 5.10~4.97(m, 2H, CH<sub>2</sub>O), and 3.70~3.52(m, 4H, CH<sub>2</sub>Cl), 3.52~3.35(m, 4H, CH<sub>2</sub>N), 2.95~2.80(m, 2H, <sup>15</sup>NH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR(126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 136.4, 128.6, 128.4, 127.8(aromatic), 67.2 [d, <sup>2</sup>J<sub>13C-31P</sub>=4.1 Hz, <sup>16</sup>O-CH<sub>2</sub> (전체 benzylic 탄소중에 91%)], 65.3 [d, <sup>2</sup>J<sub>13C-31P</sub>=6.1 Hz, <sup>17</sup>O-CH<sub>2</sub>(전체 benzylic 탄소중에 9%), 49.2[d, <sup>2</sup>J<sub>13C-31P</sub>=4.7 Hz, CH<sub>2</sub>N], 42.5(CH<sub>2</sub>Cl). <sup>31</sup>P NMR(202.46 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 16.2 [<sup>16</sup>O-<sup>31</sup>P(P 함양 91%)], 15.8 [<sup>17</sup>O-<sup>31</sup>P (P 함양 9%)]. <sup>17</sup>O NMR(68 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 64.1.

***N,N*-Bis(2-chloroethyl)phosphorodiamidic Acid-<sup>17</sup>O Cyclohexylammonium Salt(1b·CHA).** Ethanol (10 mL)속에 2c(0.26 g, 0.84 mmol)와 Pt/C(10%, 0.1 g)의 혼합물을 3시간 동안 50 psi에서 수소화 시킨다. 압력을 낮춘 후 수분 동안 반응혼합물을 통해 질소를 bubbling시킨다. 혼합물에 ethanol(10 mL)과 cyclohexylamine(0.19 mL, 1.7 mmol, 2당량)를 더하고, 1시간 동안 교반한다. suspension은 celite를 필터하고, 필터액은 농축한다. 남은 고체(135 mg, 50% crude 수율)는 1a·CHA의 합성시에 언급했던 방법으로 재결정한다. 재결정에 의해 얻어지는 흰 결정 고체로서 1c·CHA(56 mg, ca.50%)가 얻어진다. <sup>31</sup>P NMR(202.46 MHz, 0.10 M NaCl, pH 7.0, 4°C) δ 13.10(<sup>16</sup>O-<sup>31</sup>P), 13.07(<sup>17</sup>O-<sup>31</sup>P). <sup>17</sup>O NMR(68 MHz, 0.10 M NaCl, pH 7.0, 4°C) δ 98.6. [1a·CHA의 시료에서 확인되지 않은 불순물: <sup>31</sup>P NMR δ 9.46(<sup>16</sup>O-<sup>31</sup>P), 9.43

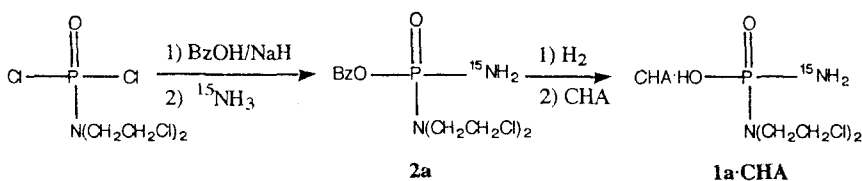
(<sup>17</sup>O-<sup>31</sup>P); <sup>17</sup>O NMR d 76.8].

**결과 및 결론**

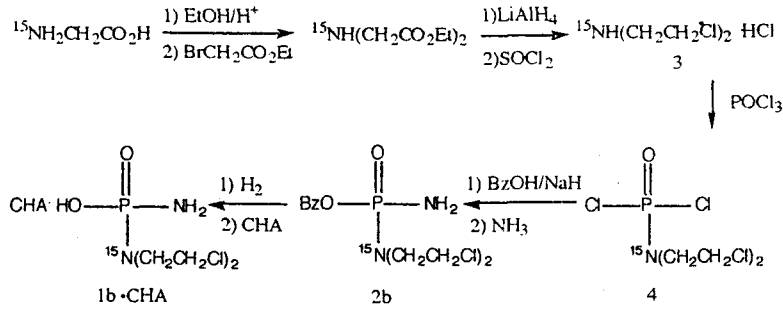
***N,N*'-Bis(2-chloroethyl)phosphorodiamidic-<sup>15</sup>N Acid (1a).** 문헌의 합성 방법들을 약간 변형하여,<sup>9-11</sup> PM의 NH<sub>2</sub>의 자리에 <sup>15</sup>N의 도입을 Scheme I에서 처럼 수행하였다. *N,N*-bis(2-chloroethyl) phosphoramidic dichloride는 sodium benzyolate와 <sup>15</sup>NH<sub>3</sub> (98% <sup>15</sup>N)이 반응하여, *N,N*-bis(2-chloroethyl)phosphorodiamidic-<sup>15</sup>N acid phenylmethyl ester(2a, 14%)를 생성한다. 2a의 촉매를 사용한 수소화 반응이 cyclohexylamine(CHA)의 첨가에 의해 뒤따라지며, 재결정법에 의해 더 안정한 cyclohexylammonium salt(1a·CHA, 58%)와 같은 *N,N*-bis(2-chloroethyl)phosphorodiamidic-<sup>15</sup>N Acid가 얻어진다.

Benzyl phosphordiamidate 2a의 낮은 수율(평균 13±1%)는 unlabelled 물질들을 이용해 조사함으로써 개선될 수 있다. 이 방법은 11 수소화 나트륨의 존재하에 n-buthyllithium을 사용하였고 과량의 암모니아를 공급하였다. 간추리면, n-buthyllithium 1 당량과 benzyl alcohol 1당량의 THF 용액은 -23°C에서 2시간 동안 교반했다. 반응혼합물은 그뒤 -23°C에서 1당량의 *N,N*-bis(2-chloroethyl)phosphoramidic dichloride의 THF 용액에 첨가한다. 두 시간에 걸쳐, 반응혼합물은 0°C까지 덩힌 후 과량의 암모니아를 2b의 합성을 위한 실험부분에서 언급했듯이 더한다. flash chromatography(ethyl acetate-n-hexane, ca, 1 : 1, R<sub>f</sub>=0.2)에 의해 평균수율 49±2% 내에서 unlabelled 2를 얻을 수 있다. 이것은 labelled phosphordiamidate의 수율이 과량의 암모니아를 사용한 결과 2.5배가 증가된 2b의 합성에서 알 수 있다. 그러나, 2a의 합성에 <sup>15</sup>N-암모니아를 사용하였기 때문에

[In all scheme: Bz = benzyli; CHA = cyclohexylamine.]



Scheme I



Scheme II

수율의 증가에 따른 이점이 labelled 시작물질의 가격을 증가시킴으로써 감소되었다. 다른 한편, 2b (36%)과 unlabelled 2(49%)의 합성에 의해 주어진 수율의 비교에 의하면 n-buthyllithium은 다른 모든 인자들이 모두 같을 때에 수율을 증가시킬 수 있음을 보여준다.

1a를 만들기 위한 2a의 수소화 반응은 또한 생성 혼합물의 15~30% 불순물을 갖는 불순물은 확인되지 않았지만 약간의 구조적인 면은  $^{31}\text{P}$  NMR 분광 데이터( $\delta$  9.7, d,  $^1J_{31\text{P}-15\text{N}} = 25$  Hz, 0.05M phosphate, pH 7.4,  $5^\circ\text{C}$ )에서 보여진다. pH에 대한  $^{31}\text{P}$ 의 화학적 이동에 대한 민감도는 P-OH 기능성의 존재를 지적해 준다. 덧붙여,  $^{31}\text{P}$ - $^{15}\text{N}$  coupling은 P- $^{15}\text{N}$  moiety의 증거이다. 2b의 합성에서 생기는 같은 불순물에서  $^{31}\text{P}$ - $^{15}\text{N}$  coupling의 부재는 bis(2-chloroethyl)amino group의 부재를 지적해 준다.

수소화반응 동안 생기는 불순물은 깨끗한 Pt/C 촉매를 사용하여 최소화 할 수 있다. 다른 한편, 1~4 시간까지 반응시간을 변화시킨 경우 생성물의 분포에는 영향을 주지 않았다. 불순물은 원하는 생성물보다 ether에서 덜 녹으므로 ether를 crude 생성물의 에탄올 용액에 조심스럽게 더하여 불순물을 갖는 결정혼합물을 갖는다. 순수한 1a·CHA는 그 뒤 원액으로부터 58% 수율로 얻는다.

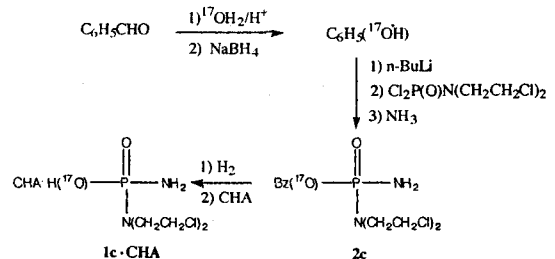
***N,N*-Bis(2-chloroethyl)phosphorodiamidic- $^{15}\text{N}$  Acid(1b).** 1b nitrogen mustard의 기능성을 위한  $^{15}\text{N}$ 의 도입을 위해 *N,N*-Bis(2-chloroethyl)phosphorodiamidic- $^{15}\text{N}$  hydrochloride(nor-nitrogen mustard, 3)의 합성이 중요한 target이다. Scheme II에서 보듯이 이 중간체는  $^{13}\text{C}$  labelled nor-nitrogen mustard에 대한 이전에 보고된 방법을 변형하여 glycine- $^{15}\text{N}$  (98% 원자 %  $^{15}\text{N}$ )로부터 만들어진다.  $^{13}\text{C}$ 와  $^{15}\text{N}$ 의

반응은 *N,N*-Bis(2-chloroethyl)phosphorodiamidic- $^{15}\text{N}$  hydrochloride(4)를 생성한다. 이것은 그 뒤 1a·CHA에 대해 위에서 언급했듯이 2b(36%)의 중간체를 통해 1b·CHA(30%)로 전환시킨다.

glycine- $^{15}\text{N}$ 의 합성은 간략하게  $^{15}\text{NH}_3$ 와 chloroacetic acid를 이용하여 조사하였다.<sup>14)</sup> labelled glycine의 수율을 바탕으로 5~10%의 비용절약은 비교적 싼  $^{15}\text{NH}_3$ 을 가지고 시작함으로써 가능하다.

***N,N*-Bis(2-chloroethyl)phosphorodiamidic Acid- $^{17}\text{O}$  (1c)**— $^{18}\text{O}$ -labelled benzyl alcohol의 합성에 대한 문헌의 방법은  $^{17}\text{O}$ 의 도입에 의해 적합하다.<sup>15-17)</sup> 따라서, labelled benzaldehyde는  $^{17}\text{O}$ 이 풍부한 물(10 원자%  $^{17}\text{O}$ )로 치환하여 만들어지며, 이 aldehyde는 sodium borohydride를 사용한 환원반응에 의해 benzyl alcohol- $^{17}\text{O}$ 를 만든다. Scheme III에서 보듯이 benzyl alcohol- $^{17}\text{O}$ 은 2c의 합성을 위해 제공되며, 궁극적으로 1c·CHA를 합성한다. 최종 생성물에서 두 산소원자는 동일하고, 이것은 두 중심에 label의 도입을 초래한다. 동소체의 존재는  $^{31}\text{P}$ - $^{16}\text{O}$  [( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  15.9]를 갖는 것에 대한  $^{31}\text{P}$ - $^{17}\text{O}$ ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  15.5를 갖는 화합물의  $^{31}\text{P}$  NMR의 피크 높이와 적분된 크기들을 비교하여 2c에서 측정할 수 있다.

이 보고서에서는  $^{15}\text{N}$ -와  $^{17}\text{O}$ -phosphoramidate mus-



Scheme III

tards에 관한 이상의 결과는 PM의 전자밀도를 측정하고 DNA와 Ring opening alkylation 반응의 반응성에 대하여 연구할 수 있는 기초가 될 것이다.

### 문 헌

- 1) G. Powis and R. A. Prough, *Ed. Metabolism and Action of Anticancer Drugs*; Tayler and Francis; London, 48-90 (1987).
- 2) O. M. Fridman, A. Myles and M. Colvin, *Adv. Cancer Chemother.*, **1**, 143 (1979).
- 3) Zon G., *Progr. Med. Chem.*, **19**, 205 (1982).
- 4) Stec W. J., *Organophosphorus Chem.*, **13**, 145 (1982).
- 5) Friedman O. M., Myles A., Colvin M., *Adv. Cancer Chemother.*, **1**, 143 (1979).
- 6) Colvin M., Brundrett R. B., Kan M., Jardine I., Fenselau C., *Cancer Res.*, **36**, 1121 (1976).
- 7) Engle T. W., Zon G., Egan W., *J. Med. Chem.*, **25**, 1347 (1982).
- 8) Boal J. H., Williamson M., Boyd V. L., Ludeman S. M., Egan W., *J. Med., Chem.*, **32**, 1768 (1989).
- 9) Fridman O. M., Seligman A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 655 (1954).
- 10) Fridman O. M., Boger E., Grubliauskas V., Sommer H., *J. Med. Chem.*, **6**, 50 (1963).
- 11) Wilde R. L., *Ph. D. Dissertation*, Colorado State University, Fort Collins, CO (1984).
- 12) Habib A., *Ph. D. Dissertation*, The Catholic University of America, Washington, DC (1991).
- 13) Ho C. K., Ludman S. M., *J. Labelled Comd. Radiopharm.*, **28**, 587 (1990).
- 14) Vogel, A. I., *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, 5th Ed.*, Furniss, B. S., Hannaford, A. J., Smith, P. W. G., Tatchell, A. R.(Eds.), Longman Scientific and Technical, Essex, England (1989), pg 752.
- 15) Byrn M., Calvin M., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 1916 (1966).
- 16) Vedras J. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 374 (1980).
- 17) Risley J. M., Van Etten R. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 4609 (1980).