

항암제인 Cyclophosphamide의 중간체인 ¹⁵N-Isophosphoramidate Mustard에 관한 연구

구교임* · 염 곤*

한양대학교 식품영양학과, *단국대학교 미생물학과

(Received October 10, 1994)

The Study of Cyclophosphamide Metabolite ¹⁵N-Isophosphoramidate Mustard

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—The each nitrogen site of ifosfamide metabolite isophosphoramidate mustard was synthesized with isotope enriched nitrogen. Glycine-¹⁵N was converted to 2-chloroethylamine-¹⁵N hydrochloride which was then reacted with phenyl dichlorophosphate to provide *N,N'*-bis(2-chloroethyl)phosphordiamidic-¹⁵N₂ acid phenylester(50%, PhO(O)¹⁵N(CH₂CH₂Cl)₂). Catalytic hydrogenation of this phenyl ester followed by the addition of cyclohexylamine (CHA) provided IPM-¹⁵N as the CHA salt(70%).

Keywords □ 2-chloroethylamine-¹⁵N hydrochloride.

Cyclophosphamide(Cytoxane, CP)는 anti-cancer drug으로 여러형태의 암치료에 널리 사용되고 있다. CP의 항암제로서의 좋은 효율에도 불구하고 CP의 강한 독성때문에 그동안 수백종의 CP 유사체들이 연구되어 왔으며, 그중에 ifosfamide(Ifox)와 같은 유사체들은 CP 대체물질로서 가능성을 보여주고 있다.¹⁻⁴⁾

일반적으로 CP 유사체들은 metabolic transformation을 거쳐, phosphoramidate mustard[PM, HOP(O) (NH₂)N(CH₂CH₂Cl)₂]나 isophosphoramidate mustard[IPM, HOP(O) (NHCH₂CH₂Cl)₂]와 같은 중간체를 생성하며,^{2,3)} 생성된 PM이나 IPM은 aziridines 또는 aziridinium 이온의 중간체를 거쳐 DNA와 alkylation하는 것으로 알려져 있다.⁵⁻⁷⁾ 세포내 DNA와 PM 또는 IPM의 alkylation 반응성은 PM 또는 IPM의 각각에서 생성된 aziridinium 이온의 반응성과 관계되며, 포함된 분자들의 전자밀도 특히 질소원자의 전

자밀도는 alkylation 반응성을 결정하는데 핵심적인 요인일 것이다.^{5,6)} 이러한 관점에서 PM의 alkylation 반응성을 조사하기 위하여, ¹⁵N isotopic labelling된 PM을 합성하고, NMR 분광기를 이용하여 조사된 PM의 반응성을 조사하기 위하여 ¹⁵N을 도입한 IPM [*N,N'*-bis(2-chloroethyl)phosphordiamidic-¹⁵N₂ acid(1)]에 관하여 보고하고자 한다.

재료 및 실험방법

Cyclohexylamine(CHA), tetrahydrofuran(THF), thionyl chloride, triethylamine은 건조하고, 용매와 시약은 distillation한다. 물을 포함하지 않는 반응 혼합물은 질소 분위기하에서 행한다. 4°C에서 행하는 반응은 얼음 bath 하에서 한다. Glycine-¹⁵N(98 원자% ¹⁵N)은 Aldrich와 Sigma화학회사로 부터 구입했다. 모든 다른 용매와 시약들은 Aldrich 화학회사와 Fisher화학회사로 부터 구입했다. Unlabelled IPM은

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

보고된 방법으로부터 합성되었고,^{12,13)} 폴란드의 란츠에 있는 폴란드국립아카데미의 Wojciech J. Stec 박사로부터 얻은 물질과의 분광학적인 비교에 의해 확인하였다.

분석의 TLC는 250 mm층의 silica gel GF(Analtech)로 코팅된 2.5 cm×10 cm판을 사용하였다. 이때 요오드(I₂)와 254 nm의 UA램프가 성분확인을 위하여 사용되었다. 녹는점은 Fisher-Johns Melting Point Apparatus를 사용하였다. 수소화 반응은 Parr medium pressure shaker hydrogenator와 50 mL 압력병을 이용하여 행했다.

NMR 스펙트럼은 Bruker MSL 500 분광기를 사용하였다. ¹H(500 MHz) NMR의 화학적 이동값(ppm)은 TMS(CDCl₃)나 TSP(D₂O)를 표준으로 사용하였다. ³¹P(202.5 MHz)NMR의 화학적 이동값(ppm)은 D₂O내에 1% H₃PO₄를 모세관에 주입하여 표준으로 사용하였다.

Glycine-¹⁵N Ethyl Ester Hydrochloride—문헌의 실험과정은 Glycine-¹⁵N(3.00 g, 39.4 mmol, 98원자 % ¹⁵N)으로부터 ¹⁵N Labelled Isophosphoramidate Mustard를 준비하였다.⁸⁾ 생성물은 흰색 needles(5.36 g, 97%, mp 141°C unlabelled 화합물의 경우 mp: 145~146°C)로 분리되었다. ¹H NMR(D₂O) δ 4.19(q, J=7.2 Hz, 2H, OCH₂), 3.79(s, 2H, ¹⁵NCH₂), and 1.17(t, J=7.2 Hz, 3H, CH₃).

Ethyl 2-Aminoacetate-¹⁵N (Glycine-¹⁵N Ethyl Ester)—Et₃N (8.6 mL, 62 mmol)를 ether(125 mL)내에 glycine-¹⁵N ethyl ester hydrochloride(7.91 g, 56 mmol)의 현탁액에 방울로 떨어뜨린다. 24시간 동안 교반한 후에 혼합물은 여과한 후 여액을 열은 노란색 농축 오일(3.66 g, 64%)의 생성물을 얻을때까지 농축하고, 더 이상의 정제없이 사용한다. ¹H NMR(CDCl₃) δ 4.19(q, J=7.2 Hz, 2H, OCH₂), 3.43(s, 2H, ¹⁵NCH₂), 1.60~1.35(br, s, 2H, ¹⁵NH₂), and 1.28(t, J=7.2 Hz, 3H, CH₃).

Ethanolamine-¹⁵N—THF(35 mL)속의 ethyl 2-aminoacetate-¹⁵N(3.56 g, 34 mmol)의 용액을 THF(150 mL)속의 LiAlH₄ (5.16 g, 136 mmol)에 방울로 떨어뜨린다. 반응 혼합물은 24시간 동안 reflux한 후 상온까지 식힌 후 물(2.7 mL), 15% NaOH(2.7 mL), 이어 물(8.1 mL)의 순서로 주의해서 더한다. 혼합물은 2시간 동안 교반한 후 여과한다. 여액은 황하마그네

슘으로 말린 후 농축하여 오일(0.53 g, 25%)의 crude 생성물을 얻었다. 반응고체의 Soxhlet(THF, 2일)은 TLC에 의해 다소 덜 순수한 부가적인 생성물[R_f 0.2(CHCl₃-CH₃OH, 8:2), 0.71 g, 34%]을 얻을 수 있다. 전체 crude 생성물 수율: 1.24 g, 59%. ¹H NMR(CDCl₃) δ 3.62, (td, J=5.2, 3.0 Hz, 2H, CH₂O), 2.85(t, J=5.2 Hz, 2H, ¹⁵NCH₂), and 2.58~2.21(br, s, 3H, ¹⁵NH₂, OH).

2-Chloroethylamine-¹⁵N Hydrochloride (2)—¹⁵N Labelled Isophosphoramidate Mustard는 문헌방법을 변형하여 합성하였다.¹¹⁾ Ethanolamine-¹⁵N (200 mg, 26.4 mmol)를 상온에서 acetonitrile(8 mL)에 녹인다. Thionyl chloride(1.92 mL, 26.4 mmol)를 3분에 걸쳐 더한 후, 용액은 24시간 동안 교반한다. Ether (60 mL)를 그뒤 더하고, 상온에서 10분동안 방치하면, 침전되는 생성물이 빠르게 관찰된다. 원심분리후 분리된 고체는 색있는 불순물을 제거하기 위하여 ether로 씻는다. 생성물은 밝은 베이지색 고체(175 mg, 57%)로서 얻어진다. ¹H NMR(D₂O) δ 3.88(td, J=5.5 Hz, 2H, CH₂Cl), and 3.45(t, J=5.5 Hz, 2H, ¹⁵NCH₂).

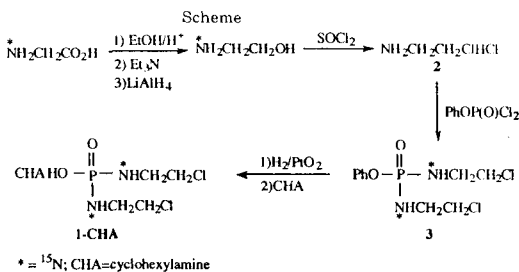
N,N'-Bis(2-chloroethyl)phosphorodiamidic-¹⁵N₂ Acid Phenyl Ester (3)—2-Chloroethylamine-¹⁵N hydrochloride (2, 100 mg, 0.85 mmol) CH₂Cl₂ (2 mL)에 suspend 시킨 후 4°C까지 식힌다. Phenyl dichlorophosphate(63.2 mL, 0.42 mmol)를 더하고, 뒤이어 Et₃N (236 mL, 1.72 mmol)를 방울로 더한다. 반응혼합물을 상온으로 서서히 덤힌 후 24시간 동안 교반한다. Et₃N·HCl은 여과하여 제거한 후 여액은 농축한다. crude 생성물은 chromatography[4 g, silica gel (EM Reagent, <230 mesh), R_f 0.18(CHCl₃-CH₃OH, 99:1)에 의해 정제되었고, 열은 노란색 오일[78.4 mg, 50%, R_f 0.66(CHCl₃-CH₃OH, 9:1)의 생성물이 얻어진다. ¹H NMR(CDCl₃) δ 7.38~7.12(m, 5H, Ar), 3.63~3.56(m, 4H, CH₂Cl), and 3.40~3.32(m, 4H, ¹⁵NCH₂); 두 ¹⁵N의 값은 가변적이다. ³¹P NMR(CDCl₃) δ 11.2(t, J_{31P-15N}=37.8 Hz).

N,N'-Bis(2-chloroethyl)phosphorodiamidic-¹⁵N₂ Acid Cyclohexyl ammonium Salt(1-CHA).—Ethanol(3 mL)속에 Phosphorodiamidate(3, 78 mg, 0.26 mmol)과 PtO₂(15 mg, 0.66 mL)의 혼합물을 7시간동안 50 psi에서 수소화 시킨다. 압력을 낮춘 후 수분

동안 반응혼합물을 통해 질소를 bubbling 시킨다. 혼합물은 ethanol(8 mL)로 희석시킨 후 cyclohexylamine(70 mL, 0.52 mmol)을 더한다. 상온에서 30분 동안 교반한 후 suspension은 여과하고, 여액은 농축한다. 남은 고체는 ether(1 mL)로 씻는다. 이 고체는 소량의 ethanol에 녹인 후 탁해질때까지 ether를 더한다. 혼합물은 4°C에서 1시간동안 방치한 후 피펫으로 액체부분을 제거한다. 남은 고체는 소량의 ethanol에 녹인 후 ether에 의하여 흰가루의 생성물(60 mg, 70%)이 얻어질때까지 두번 재결정한다. ¹H NMR(D₂O) δ 3.63~3.58(m, 4H, CH₂Cl), 3.11(dt, J = 9.9, 6.1 Hz, 2H, ¹⁵NCH₂). Cyclohexylammonium ion, 3.18~3.09(m, 1H), 1.99~1.95(m, 2H), 1.81~1.73(m, 2H), 1.68~1.60(m, 1H), 1.38~1.27(m, 4H), and 1.24~1.12(m, 1H). ³¹P NMR(D₂O) δ 12.9(t, J_{31P-15N} = 27.5 Hz).

결과 및 결론

N,N'-Bis(2-chloroethyl)phosphorodiamidic-¹⁵N₂ Acid Cyclohexylamm-¹⁵N₂ Acid(1)—¹⁵N labelled IPM의 합성에서 중간체는 2-chloroethylamine-¹⁵N hydrochloride (**2**)이다. 주어진 scheme에서 처럼 이 화합물은 에스테르화, 환원, 염소화반응의 과정을 거쳐 glycine-¹⁵N(98원자% ¹⁵N)로 부터 만들어진다. 염소화반응의 과정은 특별히 많은 문제점을 보여준다. 보고된 ¹⁵N과 ¹³C labelled bis(2-chloroethyl)amine hydrochloride^{8,10}의 합성에서 얻은 낮은 수율과 순도는 ethanolamine-¹⁵N로 부터 **2**의 합성을 위한 모델로서 사용되었다. 더 많은 성공적인 방법은 다음의 tritium labelled 2-chloroethylamine hydrochloride의 합성을 위한 문헌보고에서 밝혀져 있다.¹¹ Thionyl chloride ethanolamine-¹⁵N의 반응동안 더 온화한 조건(상온)뿐 아니라 CHCl₃와 dimethylformamide내에 acetonitrile의 존재는 **2**의 더 높은 수율을 보여준다. 문헌의 방법들을 변형하여,^{12,13} **2**는 N,N'-Bis(2-chloroethyl)phosphorodiamidic-¹⁵N₂ Acid Phenyl Ester(**3**)을 만들기 위해 pphenyl dichlorophosphate과 반응시켰다. **3**의 수소화 반응은 cyclohexylamine과의 반응에 의해 이어지며, N,N'-Bis(2-chloroethyl)phosphorodiamidic-¹⁵N₂ Acid Cyclohexylammonium Salt (**1-CHA**)를 생성한다. 부분적 결정으로 PM을 만드는



수소화 과정에서 발견되는 함유물과 유사한[ca. 12%, ³¹P NMR(D₂O) δ 8.3(d, J_{31P-15N} ca. 33 Hz)] 불순물을 제거한다.⁸ **3**의 수소화 과정에서 나오는 불순물은 identify할 수 없었지만 ³¹P NMR에서 doublet (triplet 이라기보다)의 존재는 ¹⁵N 부분 중의 하나를 잃어버렸음을 시사한다.

수소화 반응과정 동안에 반응혼합물의 aliquots는 시간간격을 두고 여과에 의해 제거한 뒤 ³¹P NMR에 의해 분석한다. Unlabelled 물질과 비교해보면, labelled phosphorodiamidate **3**[δ_{31p} 12.8(EtOH)]의 수소화 반응은 놀랍게도 느리다. 더 긴 시간은 생성물 **1**[δ_{31p} 10.8(EtOH)]에 비해 상대적으로 생성되는 불순물 [*vide supra*, δ_{31p} 6.9(EtOH)]의 양을 크게 증가시키거나 감소시키지 않는다.

이 보고서의 Isophosphoramidate Mustard에 관한 이상의 결과는 IPM의 전자밀도를 측정하여 PM과 IPM의 반응성을 비교 연구할 수 있는 기초가 될 것이다.

문헌

- 1) Zon G., *Progr. Med. Chem.*, **19**, 205 (1982).
- 2) Stec W. J., *Organophosphorus Chem.*, **13**, 145 (1982).
- 3) Friedman O. M., Myles A., Colvin M., *Adv. Cancer Chemother.*, **1**, 143 (1979).
- 4) Brock N., *Cancer Res. Clin. Oncol. III*, **1** (1986).
- 5) Engle T. W., Zon G., Egan W., *J. Med. Chem.*, **25**, 1347 (1982).
- 6) Boal J. H., Williamson M., Boyd V. L., Ludeman S. M., Egan W., *J. Med. Chem.*, **32**, 1786 (1989).
- 7) Colvin M., Brundrett R. B., Kan M., Jardine I., Fenselau C., *Cancer Res.*, **36**, 1121 (1976).
- 8) Ludeman S. M., Shulman-Roskes E. M., Gamcsik M. P., Hamill T. G., Change Y. H., Koo K. I., Colvin O. M., Ludeman S. M., *J. Labelled Comd. Radio-*

- pharm.*, **33**, 313 (1993).
- 9) Gamcsik M. P., Ludeman S. M., Shulman-Roskes E. M., McLennan I. J., Colvin M. E., Colvin O. M., *J. Med. Chem.*, (submitted, 1993).
- 10) Ho, C. K., Ludeman S. M., *J. Labelled Comd. Radiopharm.*, **28**, 587 (1990).
- 11) Madlmont J. C., Moreau M. F., Parry D., Godeneche D., Duprat J., MeyNiel G., Oiry J., Imbach J. L., *J. Labelled Comd. Radiopharm.*, **20**, 7 (1983).
- 12) Struck R. F., Dykes D. J., Corbett T. H., Suling W. J., Trader M. W., *Br. J. Cancer*, **45**, 15 (1983).
- 13) Ludeman S. M., Boyd V. L., Regan J. B., Gallo K. A., Zon G., Ishi K., *J. Med. Chem.*, **29**, 716 (1986).