

아미노산으로 부터 3-(2-Chloroethyl) hydantoin 들의 합성과 그들의抗癌作用 評價

金正均 · 尹二達 · 高永心* · 尹雄燦 · 朴茂榮** · 文慶瑛**
釜山大學校 化學科 · 메릴랜드大學校 化學科* · 韓國科學技術院 生物工學科**
(Received October 20, 1983)

Jack C. Kim, Li Kyu Yun, Young Sim Koh*, Ung Chan Yoon,
**Moo Y. Pack and **Kyung Ho Moon

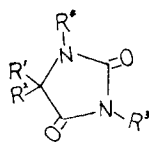
*College of Natural Sciences, Busan National University, Busan 607, Korea and *Department
of Chemistry, University of Maryland, College Park, M.D. U.S.A. and **Department
of Biological Science and Engineering, The Korea Advanced Institute of
Science and Technology, Seoul 133, Korea*

Synthesis and Antitumor Evaluation of 3-(2-Chloroethyl)- hydantoin from Some Amino Acids

Abstract—Six hydantoin derivatives, 3-(2-chloroethyl) hydantoin (**6a**), 3-(2-chloroethyl)-5-isopropyl-hydantoin (**6b**), 3-(2-chloroethyl)-5-isobutylhydantoin (**6c**), 3-(2-chloroethyl)-5-(2-butyl) hydantoin (**6d**), 3-(2-chloroethyl)-5-benzylhydantoin (**6e**), 3-(2-chloroethyl)-5-(indolyl-3-methyl) hydantoin (**6f**), were prepared by the treatment of the corresponding salt of amino acids with 2-chloroethyl isocyanate in cold water, followed by refluxing in concentrated HCl solution. Anticancer activity of the synthesized hydantoin derivatives were examined on murine leukemia L1210 cells growing in Fischer medium. Among them, 3-(2-chloroethyl)-5-isobutyl-hydantoin (**6c**) showed substantially low ED₅₀ value of 9.6 $\mu\text{g/ml}$.

1970年代 이래 몇몇 연구자들은 항암제 및 항종양제로서의 hydantoin 유도체 개발에 힘써왔다. 이를테면, Driscoll¹⁾ 등은 neoplasm inhibitor로 유용한 1과 2와(Fig. 1) 같은 일련의 hydantoin 유도체를 합성하여 leukemia L1210, leukemia P388, B16 melanocarcinoma, Lewis lung carcinoma 및 ependymoblastoma에 항암실험한 결과 효과가 있었음을 보고하였으며, Rodgers²⁾ 등은 hydantoin의 1-position과 3-position에 있는 치환체(chloro, acetyl, chloroacetyl 및 methyl)에 특히 중점을 두면서 5-position을 다양하게 치환시킨 27종의 유도체를 합성하여 mice p-388 lymphocytic leukemia에 생체실험한 결과 5,5-bis(4-chlorophenyl)-1,3-dichlorohydantoin (**3**)이(Fig. 1) 가장 활성이 좋았다고 보고했다. 이 외에도, Peng³⁾ 등은 중추신경계에 대한 항종양성을 평가하기 위해 hydantoin의 3-position에 nitrogen mustard가 치환된 21종의 hydantoin 유도체를 합성하여 murine ependymoblastoma brain tumor system 외에 몇몇 생체실험한 결과, 이 중에서 세 개의 유도체(**4**)가(Fig. 1) 많은 치료효과를 지녔음을 보고했다.

이상과 같은 항종양성 및 항암성이 예상되는 hydantoin 유도체 합성에 아미노산을 출발물질로 사용한 예는 Suzuki⁴⁾ 등에 의해 행하여진 바 있지만, glycine(**5a**), L-valine(**5b**), L-leucine(**5c**), L-isoleucine(**5d**), L-phenylalanine(**5e**) 및 L-tryptophan(**5f**) 등 필수 아미노산에 2-



1. $R'' = -CH_2CH_2Cl, -CH_2CH_2N(CH_2CH_2Cl)_2, -CH_2CH_2N(CH_2CH_2OH)_2$,
 $R' = H$

(a) $R' = H, Me, Ph$; $R'' = Me, Et, Ph$.

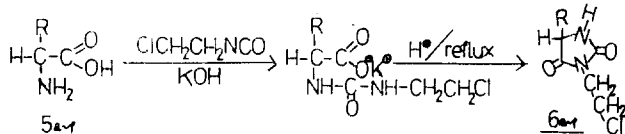
(b) $R', R'' = (CH_3)_2$.

2. $R'' = -CH_2CH_2N(CH_2CH_2Cl)_2$, $R' = H$

(a) $R' = R'' = Me, Et$.

(b) $R' = H$; $R'' = Ph$.

(c) $R', R'' = (CH_3)_2$.



3. $R' = R'' = \text{---} \text{O} \text{---} \text{Cl}$, $R', R'' = Cl$.

$R =$ (a) $-H$, (b) $-CH(CH_3)_2$, (c) $-CH_2CH(CH_3)_2$,

(d) $-CH(CH_3)-CH_2CH_3$, (e) $-CH_2-\text{---} \text{O} \text{---}$,

(f) $-CH_2-\text{---} \text{N} \text{---} \text{H}$

4. $R'' = -CH_2CH_2N(CH_2CH_2Cl)_2$,
 $R' = H$

(a) $R', R'' = (CH_3)_2$.

(b) $R' = R'' = CH_3$.

(c) $R' = R'' = C_2H_5$.

Fig. 1

Scheme I

chloroethylisocyanate를 반응시켜 아미노산으로부터 hydantoin 유도체, 즉 3-(2-chloroethyl)-hydantoin (6a), 3-(2-chloroethyl)-5-isopropylhydantoin (6b), 3-(2-chloroethyl)-5-isobutylhydantoin (6c), 3-(2-chloroethyl)-5-(2-butyl)hydantoin (6d), 3-(2-chloroethyl)-5-benzylhydantoin (6e) 및 3-(2-chloroethyl)-5-(indolyl-3-methyl) hydantoin (6f)을 합성한 것은 (Scheme I) 일찌기 보고된 바 없다.

그러므로, 본 연구실험은 Dudley⁵⁾ 등에 의하여 기술된 일반적인 합성법에 따라, hydantoin ring system의 5-position에 다양한 알킬기 및 아릴기를 도입시켜 지용성 (lipophilicity)에 변화를 주면서 3-position에는 2-chloroethyl기를 도입시킨 아미노산 hydantoin 유도체 (6a~f)들을 합성하였으며 또한, 이들 hydantoin 유도체 (6a~f)들을 Fischer 배지에 자라는 murine leukemic lymphoblast, L1210 세포에 첨가하여 48시간 후에 50% 세포성장을 억제할 수 있는 hydantoin 화합물의 농도 ED₅₀값을 측정하였기에 이를 보고하는 바이다.

實驗 方法

試藥 및 器機—본 실험에 사용한 2-chloroethylisocyanate(동경화성, E.P), KOH(Hanawa, G.R) 및 아미노산들은 (5a, 5b, 5d : merk제, 5c : Sigma Grade, 5c : Hanawa G.R, 5b : 동경화성 G.R) 모두 desiccator에 보관하여 사용했으며, positive control compound인 methyl-CCNU(NSC 95441; 1-(2-chloroethyl)-3-(trans-4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea)는 NCI (National Cancer Institute)에서 얻었으며 그 외 보통시약은 시판용을 그대로 사용했다.

용점 측정은 Electrothermal Capillary Melting Point Apparatus를 사용하여 측정되었으며, 보정하지 않았다. IR 스펙트럼은 KBr pellet를 얻어 Perkin-Elmer 710B IR Spectrophotometer로서

구했고, NMR 스펙트럼은 DMSO-d₆를 용매로, TMS를 internal reference로 하여 Varian EM-360A ¹H-NMR Spectrophotometer (60MHz)로써 구했다.

또한, 생물학적인 실험에서 암세포, Murine leukemic lymphoblast, L1210은 Winsconsin 대학 Perman 실험실에서 얻은 것을 screw-capped tubes (20×150mm)에 넣어 37°C에서 배양시켜 사용했으며, Fischer's powder medium은 GIBCO연구실(Grand Island, New York, USA)에서 구입한 것을 사용했으며, 말혈청은 도살(slaughter)후 바로 500ml centrifuge tubes에 채취한 flesh blood를 2시간 정도 실온으로 두었다가 응고시킨 뒤, 5,000 rpm에서 10분간 원심분리시켜 나온 상등액을 Millipore filters를 사용하여 멸균한 뒤 -20°C에 보관시켜 사용했다. 또한, 세포수는 Coulter Electronic Particle Counter(Electrozone Celloscope, Particle Data, Inc., Elmhurst, III. USA) 기기로 측정되었다.

合成實驗—3-(2-chloroethyl)-5-alkyl-hydantoin들의 合成—대표적인 3-(2-chloroethyl) 아미노산 hydantoin의 합성은 다음과 같다.

1. 3-(2-chloroethyl)-hydantoin(**6a**)의 합성 : glycine 3.00g(40.01 mmole)을 10%-KOH 22.42 ml(40.01 mmole)에 완전히 용해시킨 후, ice-water상에서 교반시키면서 5분정도 냉각시켰다. 여기에, 2-chloroethyl-isocyanate 3.81ml(44.00 mmole)를 4차례로 나눠 1시간 동안 가한 후, 2시간 더 ice-water상에서 교반시키면서 반응시켰다. 이 반응 혼합물을 실온에서 교반시키면서 overnight시킨 다음, 여과하여 얻은 여액을 진한 염산(약 30ml 정도)으로 산성화(pH≈1)시켰다. 여기에, 냉각장치를 설치하여 water-bath 상에서 교반하면서 약 2시간 정도 환류시켰다. 그런 다음, 이 반응 혼합물을 감압농축하여 흰 결정 residue를 얻고(단, glycine을 제외한 나머지 아미노산 hydantoin들에 대해서는 반응 혼합물을 감압농축하지 않고, 충분히 냉각시켜 바로 결정을 얻었음), 이 residue를 차게한 isopropanol로 몇 번 세척하여 건조시켜, crude한 생성물 5.21g (glycine에 대한 수율 : 80%)을 얻었다. 이렇게 하여 얻은 crude한 생성물을 isopropanol로 2번 재결정하여 침상결정을 얻었으며, 이것을 모든 측정에 사용했다(Table I 참조).

2. 3-(2-chloroethyl)-5-isobutyl-hydantoin(**6b**)의 합성 : (**6a**)와 동일한 방법으로 합성되었다(L-valine 3.00g, 10% KOH 용액 14.34ml, 진한염산 30ml 및 2-chloroethylisocyanate 2.44ml)(Table I 참조).

3. 3-(2-chloroethyl)-5-isobutyl-hydantoin(**6c**)의 합성 : (**6a**)와 동일한 방법으로 합성되었다(L-leucine 1.40g, 2-chloroethylisocyanate 1.01ml, 10% KOH용액 5.98ml 및 진한 염산 15ml)(Table I 참조).

4. 3-(2-chloroethyl)-5-(2-butyl)-hydantoin(**6d**)의 합성 : (**6a**)와 동일한 방법으로 합성되었다(L-isoleucine 1.40g, 10% KOH 용액 5.98ml, 2-chloroethylisocyanate 1.01ml 및 진한염산 15 ml)(Table I 참조).

5. 3-(2-chloroethyl)-5-benzyl-hydantoin(**6e**)의 합성 : (**6a**)와 동일한 방법으로 합성되었음(L-phenylalanine 1.05g, 10% KOH 용액 3.57ml, 2-chloroethylisocyanate 0.60ml 및 진한염산 10ml)(Table I 참조).

6. 3-(2-chloroethyl)-5-(indolyl-3-methyl)-hydantoin(**6f**)의 합성 : (**6a**)와 동일한 조건으로 합성되었다(L-tryptophan 2.05g, 10% KOH 5.62ml, 2-chloroethylisocyanate 0.96ml 및 진한염산 20ml)(Table I 참조).

生物學的 實驗—암세포 : murine leukemic lymphoblast, L1210 세포는 環形이며 binary division

으로 성장한다. 적당한 조건하에서 doubling time은 12~18시간이며, 37°C에서 screw-capped tubes(20×150mm)에 배양시켜 사용했다.

배지 : Fischer's powder medium 1 liter package를 재증류한 증류수에 녹인 후 NaHCO₃ 1.125g과 100ml의 말혈청을 첨가하여 전체를 1,000ml로 하였고 pH는 7.2로 맞추었다. 이것을 여과시켜 멸균하여 냉장고에 보관하였다. 사용전에 penicillin 100 units/ml와 streptomycin 0.1mg/ml를 첨가하여 사용하였다.

L1210細胞準備培養 : Spinner cultures(cells in logarithmic phase of growth)를 250ml 용량의 screw-capped Ehrlenmeyer flask에 준비했다. L1210세포를 50ml의 豫熱시킨 배지에 접종시켜 assay하기 하루 전 초기농도를 2~5×10⁵ cells/ml 되게 하였다. 37°C로 보온시켜 24시간 후에 관찰하였더니 세포농도는 보통 0.8~1.0×10⁶ cells/ml에 달했다. 세포를 individual growth tubes에 나누어 넣기 바로 전의 최후 농도가 5.5×10⁴ cells/ml가 되도록 Spinner cultures를 豫熱시킨 fresh medium으로 희석시켰다(run bottle).

ED₅₀값 측정 : 일정농도의 합성 hydantoin유도체(6a~f)에 탄올 용액 0.5ml를 5ml의 "run-bottle" 양이 든 culture tube에 첨가했다. 또한, control test를 하기위해 동일한 용적의 증류수를 아미노산 hydantoin(6a~f) 대신 넣은 culture test를 준비했다. positive control test를 하기위하여 다른 농도를 갖는 methyl-CCNU(a known cytotoxic compound) 화합물을 아미노산 hydantoin(6a~f)대신 사용했다. 모든 경우에 있어서, 각 tube의 total liquid volume은 5.5ml이며, 대략 5×10⁴ cells/ml에 해당하는 최종세포 농도를 갖도록 했다. 그러므로, 각각의 아미노산 hydantoin(6a~f)에 대하여 tube 2개씩을 준비하였다. 이와같이 준비된 culture tubes는 48시간 동안 37°C로 定溫배양되었다. 그런 다음, culture electronic particle counter를 사용하여 세포수를 헤아렸다. 각 tube마다 2번씩 측정했으며, 같은 化合物농도(one dose level)에서 얻은 4개의 平均값을 growth ratio 測定에 사용했다. 즉, 대조群의 50%에 해당하는 세포成長을 억제하는 合成 hydantoin 유도체(6a~f)의 농도인 ED₅₀값은 NCI방식⁸⁾에 따라 측정되었다.

實驗結果 및 考察

化學的 考察—아미노산 hydantoin 유도체(6a~f)들의 합성은 Zwitterion 상태로 존재하는 아미노산(5a~f)을 10% KOH 용액에 각각 용해시켜 K-아미노산염을 만들어 여기에 친전자체로 작용하는 2-chloroethylisocyanate와 반응시켜 얻은 아미노산의 2-chloroethylurea염(5'a~f)을 산성 촉매하에서 환류시켜 얻었다(Scheme I).

부산물로서는 용매로 사용한 물과 2-chloroethylisocyanate와의 반응으로 2-chloroethyl carbamic acid와 bis(2-chloroethyl) urea^{6,7)}가 얻어졌다. 이들 부산물을 제거한 후 여액을 진한 염산(pH≈1)하에서 환류시켜서 예상되는 intramolecular cyclization에 의해서 3-position에 2-chloroethyl기가 붙은 아미노산 hydantoin 유도체들(6a~f)을 얻었다. 그 결과는 Table I과 같다.

이들 3-(2-chloroethyl) 아미노산 hydantoin들(6a~f)의 IR결과를 살펴보면, 출발물질(5a~f)에 특징적인 NH₃⁺기의 돌출 peak(2,100~2,200cm⁻¹)가 모두 사라지고, 그 대신 출발물질(5a~f)에는 나타나지 않았던 새로운 -NH 신축진동 흡수 peak가 3,280~3,350cm⁻¹ 영역에서 나타났으며, amide form의 C=O peak가 1,700~1,720cm⁻¹ 영역에서, 그리고 ureido form의 C=O peak가 1,750~1,780cm⁻¹ 영역에서 각각 나타난 것으로 미루어, 이러한 결과는 open-chain의 amide form과 ureido form에선 기대할 수 없는, 5-membered ring에 기인한, ring side effect에 의해 기

Table I-ED₅₀ and physical constants of synthesized 3-(2-Chloroethyl) hydantoin.

Hydantoin derivatives	ED ₅₀ (μg/ml)	m.p. (°C)	Crystallization solvent	I.R. (cm ⁻¹)	¹ H-NMR in DMSO-d ₆ (ppm)	Yield (%)
3-(2-chloroethyl)-hydantoin (6a)	40	115~117	iso-propanol	ν _{C=O} 1780 (ureido form) ν _{C=O} 1715 (amide form) ν _{N-H} 3280	H —N— : δ8.01(s, 1H) >N—CH ₂ —Cl : δ3.65~3.78(t, 4H) >CH ₂ (Hα) : δ3.91(s, 2H)	80
3-(2-chloroethyl)-5-isopropyl-hydantoin (6b)	50	91~92.5	H ₂ O	ν _{C=O} 1760 (ureido form) ν _{C=O} 1700 (amide form) ν _{N-H} 3320	H —N— : δ8.18(s, 1H) >N—CH ₂ CH ₂ —Cl : δ3.56~3.79(t, 4H) Hα : δ3.86~4.03(δ, 1H) >CH— : δ1.63~2.26(m, 1H) (CH ₃) ₂ —C— : δ0.63~1.09(d, d, 6H)	80
3-(2-chloroethyl)-5-isobutyl-hydantoin (6c)	9.6	93.5~94.5	H ₂ O	ν _{C=O} 1760 (ureido form) ν _{C=O} 1720 (amide form) ν _{N-H} 3280	H —N— : δ8.30(s, 1H) Hα : δ3.83~4.23(t, 1H) >NCH ₂ CH ₂ Cl : δ3.46~3.83(t, 4H) >CH—CH ₂ — : δ1.20~1.97(m, 3H) (CH ₃) ₂ C— : δ0.63~1.07(d, 6H)	80
3-(2-chloroethyl)-5-(2-butyl)-hydantoin (6d)	23.2	58~59	H ₂ O	ν _{C=O} 1765 (ureido form) ν _{C=O} 1705 (amide form) ν _{N-H} 3325	H —N— : δ8.17(s, 1H) >NCH ₂ CH ₂ Cl : δ3.62~3.82(t, 4H) Hα : 3.90~4.10(d, 1H) —CH ₂ —CH— : δ1.10~2.10(m, 3H) CH ₃ —C—C—CH ₃ : δ0.66~1.10(m, 6H)	75
3-(2-chloroethyl)-5-benzyl-hydantoin (6e)	20	129~132	CCl ₄	ν _{C=O} 1770 (ureido form) ν _{C=O} 1715 (amide form) ν _{N-H} 3325	H —N— : δ8.23(s, 1H) >N—CH ₂ CH ₂ Cl : 3.40~3.63(t, 4H) Hα : δ4.16~4.50(t, 1H) δ _b 7.18(s, 5H) δ _a 2.80~3.10 side chain at 5 position (d, 2H)	75
3-(2-chloroethyl)-5-(indolyl-3-methyl) hydantoin (6f)	20	160~162.5	CHCl ₃	ν _{C=O} 1750 (ureido form) ν _{C=O} 1710 (amide form) ν _{N-H} 3350	H —N— : δ8.14 (s, 1H) >N—CH ₂ CH ₂ Cl : δ3.26~3.67(m, 4H) Hα : δ4.03~4.50(t, 1H) δ _a : 2.70~3.26(d, 2H) δ _c : 6.57~7.63(m, 5H) side chain at 5 position δ _b : 10.77(s, 1H)	75

대할 수 있는 높은 진동수 값인 것으로 미루어, **hydantoin ring**이 형성되었음을 일단 예견할 수 있었으며 이들의 확실한 구조증명은 이들 아미노산 **hydantoin(6a~f)**의 NMR 결과에 의하여 확인할 수 있었다. 따라서, NMR (DMSO- d_6)상에 나타난 이들 3-(2-chloroethyl) 아미노산 **hydantoin(6a~f)**의 NMR 해석 결과는 Table I에서와 같다. 이 중에서 **hydantoin 1-position**의 NH proton peak들은 $\delta 8.01 \sim 8.30$ 영역에서 모두 singlet로 나타났는데, 이들은 D_2O exchange시킨 결과 모두 사라졌으므로 NH proton임이 확인되었다.

아미노산 **Hydantoin 誘導體, 6a~f**의 ED_{50} -합성된 아미노산 **hydantoin** 유도체 (**6a~f**)에 대한 ED_{50} 값은 이미 報告되어 있는 NCI(National Cancer Institute)실험方法⁸⁾에 따라 測定되었으며 그들 測定値는 Table I에 표시되었다.

이상과 같이 抗瘤實驗한 여섯 종류의 아미노산 **hydantoin** 유도체들 (**6a~f**)中에서 특히 3-(2-chloroethyl)-5-isobutylhydantoin(**6c**)은 NCI 품질관리 한계인 $1.7 \sim 7.7(\mu g/ml)$ 범위의 값에 接近하는 ED_{50} 값인 $9.6(\mu g/ml)$ 을 가지는 것으로, 앞으로 이 化合物의 potential anticancer activity를 고려 해볼만한 가치가 있다고 思料된다.

結 論

Glycine(**5a**) 및 필수아미노산(**5b~f**)의 **hydantoin**유도체들인, 3-(2-chloroethyl) **hydantoin(6a)**, 3-(2-chloroethyl)-5-isopropylhydantoin(**6b**), 3-(2-chloroethyl)-5-isobutylhydantoin(**6c**), 3-(2-chloroethyl)-5-(2-butyl) **hydantoin(6d)**, 3-(2-chloroethyl)-5-benzylhydantoin(**6e**) 및 3-(2-chloroethyl)-5-(indolyl-3-methyl) **hydantoin(6f)** 등은 그 각 아미노산을 K의 염상태로 만든 뒤, 물을 반응용매로 하여 ice-water상에서 2-chloroethylisocyanate와 2시간 정도 반응시킨 다음, 실온상태로 overnight시킨 뒤, 여과하고 얻은 여액을 진한 염산으로 처리하여 산 촉매하에서 환류시켜 합성되었다.

이들 아미노산 **hydantoin** 유도체들 (**6a~f**)의 구조증명은 m.p., IR, 그리고 NMR로써 행해졌다. 또한, 이들 아미노산 **hydantoin** 유도체들 (**6a~f**)을 Fischer 배지에 배양시킨 murine leukemic lymphoblast L1210세포에 첨가한 다음, 48시간 후에 세포수를 헤아려 세포성장률 50% 억제할 수 있는 아미노산 **hydantoin(6a~f)**의 농도를 나타내는 ED_{50} 값은 **6a** 경우 $40\mu g/ml$ 를, **6b** 경우 $50\mu g/ml$ 를, **6c** 경우 $9.6\mu g/ml$ 를, **6d** 경우 $23.2\mu g/ml$ 를, **6e** 경우 $20\mu g/ml$ 를, 그리고 **6f** 경우 $20\mu/ml$ 를 각각 나타내었다.

본 연구의 일부는 1983년도 문교부 기초과학육성 연구비의 지원에 의한 것임.

文 獻

1. J.S. Driscoll, V.E. Marquez and G. Peng, Ger. Offen. 2,633,926 [C.A. **87**, 23278g (1977)].
2. T.R. Rodgers, M.P. LaMontagne, A. Markovac and A.B. Ash, *J. Med. Chem.* **20**, 591 (1977).
3. G.W. Peng, V.E. Marquez and J.S. Driscoll, *J. Med. Chem.* **18**, 846 (1975).
4. T. Suzuki, K. Igarashi, K. Hase and K. Tuzumura, *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 411 (1973); T. Suzuki, T. Tomioka and K. Tuzimura, *Can. J. Biochem* **55**, 521 (1977).
5. K.H. Dudley and D.L. Biss, *J. Heterocycl. Chem.* **10**, 173 (1973).
6. H. Finkbeiner, *J. Org. Chem.* **30**, 3414 (1965).
7. W.B. Jamieson, W.J. Ross, R.G. Simmonds and J.P. Verge, U.S. 4,230,716 (1980).
8. D.W. Statz, F.B. Coon, *Cancer Treatment Reports* **60**, 999 (1976).