

N-(Alkyl-N'-nitrosocarbamoyl)-amino Acid Ester류의 合成 및 抗癌 作用 評價

金正均 · 朴文泰 · 申洪大 · 高永心* · 尹雄燦 · 柳成浩** · 文慶浩** · 金民淑

釜山大學校 化學科, *에덜랜드大學校 化學科, **韓國科學技術院 生物工學科

(Received March 19, 1984)

Synthesis of N-(Alkyl-N'-nitrosocarbamoyl)-amino Acid Ester Derivatives and their Anticancer Activity

Jack C. Kim, Moon Tae Park, Hong-Dae Shin, Young-Sim Koh*, Ung-Chan Yoon,
Sung Ho Ryu**, Kyung Ho Moon** and Min-Sook Kim

Department of Chemistry, Busan National University, Busan 607, Korea and

**Department of Chemistry, University of Maryland, College Park, Maryland, U.S.A 20742*

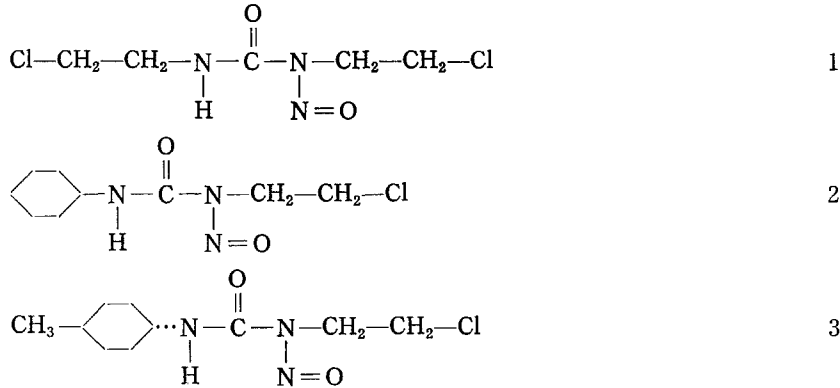
*and **Department of Biological Science and Engineering, The Korea Advanced Institute of
Science and Technology, Seoul 132, Korea*

Abstract—The derivatives of N-(alkylcarbamoyl) amino acid methyl ester, N-(2-chloroethylcarbamoyl)-glycine methyl ester (7a), -valine methyl ester (8a), -phenylalanine methyl ester (9a), N-(N'-methylcarbamoyl)-glycine methyl ester (7b), -valine methyl ester (8b), and -phenylalanine methyl ester (9b), were prepared by reacting the corresponding free amino acid methyl ester (glycine-, valine-, phenylalanine-methyl ester) with isocyanate ($R-N=C=O$; $R=Cl-CH_2-CH_2-$ or CH_3-). The prepared N-(alkylcarbamoyl) amino acid methyl esters (7, 8, 9) were treated with $NaNO_2/98\%$ HCOOH in order to obtain their nitrosoated products, N-(alkyl-N'-nitrosocarbamoyl) amino acid methyl ester. The compound (7, 8, 9) gave N-(2-chloroethyl-N'-nitrosocarbamoyl)-valine methyl ester (14a), -phenylalanine methyl ester (15a), N-(N'-alkyl-N'-nitrosocarbamoyl)-glycine methyl ester (13b), -valine methyl ester (14b), and -phenylalanine methyl ester (15b) respectively under the nitrosoation. On the other hand, N-(2-chloroethylcarbamoyl) glycine methyl ester produced N-(2-chloroethylcarbamoyl)-N-nitrosoglycine methyl ester (13a). The inhibitory activity of the prepared N-(alkylcarbamoyl) amino acid methyl ester (7, 8, 9) and N-(alkyl-N'-nitrosocarbamoyl) amino acid methyl ester (13, 14, 15) towards the growth of L1210 murine leukemia cells were examined. Among them the compound (14a) and (15a) exhibit excellent activity having ED_{50} to be 1.5 μ g/ml and 3.0 μ g/ml respectively.

암의 치료법은 화학요법¹⁾, 방사선요법²⁾, 면역요법³⁾ 등으로 구분될 수 있다.

현재 화학요법 항암제 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 이미 많은 종류의 화학요법 항암제가 승설되어 그 약효를 인정받고 있다.

최근에 들어서 nitrosourea 유도체들에 대한 항암활성작용을 Montgomery⁴⁾가 발표한 후 뛰어난 항암효과를 나타내는 많은 nitrosourea 유도체들이 합성되어 현재 약 50여종이 실제로 암환자에게 사용되고 있다. 그 대표적인 nitrosourea 유도체 항암제는 N, N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea (BCNU) (1), N-(2-chloroethyl)-N'-cyclohexyl-N-nitrosourea (CCNU) (2), N-(2-chloroethyl)-N'-(trans-4-methylcyclohexyl)-N-nitrosourea (Me CCNU) (3) 등이 있다.



이들 화합물 (1) (2) (3)은 혈관 뇌장벽(blood-brain-barrier)를 통과할 수 있는 낮은 이온화도, 작은분자의 크기, 그리고 강한 지질 용해도와 같은 물리적인 특성때문에 뇌종양에 선택적인 효과가 있다고 밝혀졌다.⁶⁾

N'-alkyl-N-nitrosourea 항암제인 (1) (2) (3)의 항암작용에 대한 약리적인 생물학적 연구결과, N'-alkyl-N-nitrosourea 화합물의 모체(intact molecule)는 항암 작용을 나타내지 못하나 수용액(pH7.4, 37°C)에서 분해되어 active alkylating intermediate로 바뀔 때 알킬화제들이 항암 활성을 나타낸다고 보고 있다.

Nitrosourea가 수용액에서 알킬화제로 분해되는 화학반응의 가능한 기전이 Montgomery⁷⁾, Brundrett⁸⁾, Weinkam⁹⁾, Lown¹⁰⁾ 등에 의해서 크게 3가지로 제시되었다. 이들 기전을 종합해

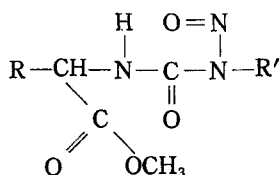
볼때 2-chloroethyl-N-nitrosoureido group($\text{Cl}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}-\text{C}-\text{N}-$)이 항암작용을 위한

$$\begin{array}{c}
 \text{N}=\text{O} \quad \text{H} \\
 | \qquad | \\
 \text{Cl}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}-\text{C}-\text{N}- \\
 \parallel \\
 \text{O}
 \end{array}$$

active moiety이며 그 나머지 alkyl 부분은 이 물질의 물리적 성질에 영향을 미치는 부위로 체내의 흡수 분포 및 암세포 부위로의 운반등 要因의 변화를 통해 항암제의 효능을 좌우한다고 생각된다. 이때까지의 화학요법 항암제의 성공여부는 이들 항암제들이 정상세포에는 치명적인 손상을 끼치지 않고 암세포의 성장을 집중적으로 저지시키는 세포종 선택성의 大小 여하에 달려있다고 본다. 왜냐하면 선택성이 없으면 이들 항암제들의 생체에 대한 독작용으로 사용이 불가능하기 때문이다. 지금까지 nitrosourea 항암제의 선택성을 증가시켜 암세포에 집중적으로 유효한 새로운 nitrosourea 항암제를 만들기 위한 노력으로 alkyl 부분을 alkaloid류¹¹⁾ steroid류¹²⁾ 탄소화물류¹³⁾ 아미노산류¹⁴⁾ 등으로 치환시킨 새로운 화합물들이 합성되어 상당한 항암작용이 있음이 실험결과 보고되고 있다. 이중 특히 아미노산 유도체는 생체내 세포막을 통과하는데 활성적인 운반체 역할을 할 수 있는 아미노산기와 항암 활성기를 가지는 항암제의 작용을 가질 수 있다고 생각된다. 이러한 전제하에서 최근 Suami¹⁵⁾와 Zeller¹⁶⁾ 등은 N-(2-chloroethyl-N'-nitrosocarbamoyl) 아미노산 유도체를 합성하여 그들의 항암활성시험 결과 좋은 결과를 얻었음을 보고하고 있다.

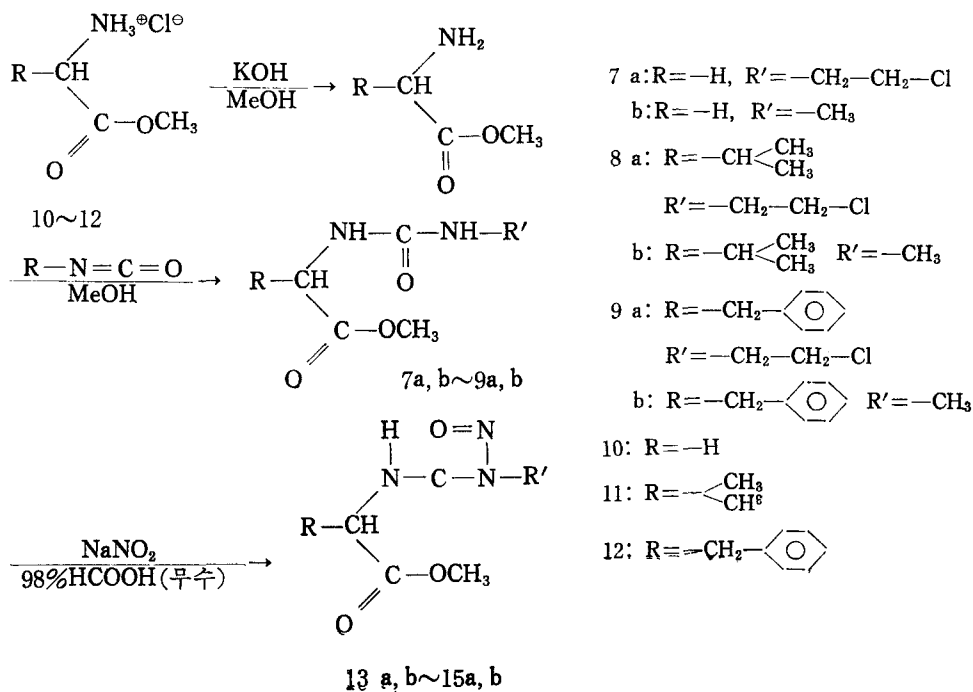
本 실험실에서는 이러한 결과보고를 토대로 하여 이러한 N-(2-chloroethylnitrosocarbamoyl) amino acid 유도체들의 항암활성에 대한 광범위한 검토와 그리고 궁극적으로 보다 선택성이 큰 화학요법 항암제 개발을 위한 노력으로 다음에 열거하는 3종의 N-(2-chloroethyl-N'-nitrosocarbamoyl)-amino acid ester 화합물을 합성하여 이들 화합물들의 L1210 leukemia cell에 대한 항암활성을

검토하였다. 그리고 위의 화합물의 chlorine에 의한 항암활성에 대한 기여도를 조사하기 위해 그에 해당하는 N-(N'-methyl-N-nitrosocarbamoyl)-amino acid ester 화합물도 합성하여 그들 항암활성을 검토하였다. 아울러 이들 N-(alkyl-N'-nitrosocarbamoyl) amino acid ester의 합성 중간체인 N-(alkylcarbamoyl) amino acid의 항암활성도 검토하였다.



- 4 a: R=-H, R'=-CH₂-CH-Cl
b: R=-H, R'=-CH₃
- 5 a: R=-CH<
CH₃ R'=-CH₂-CH₂-Cl
b: R=-CH<
CH₃ R'=-CH₃
- 6 a: R=-CH₂-< R'=-CH₂-CH₂-Cl
b: R=-CH₂-< R'=-CH₃

새로운 화학요법 항암제 개발을 위해 합성코자 한 N-(2-chloroethyl-N'-nitrosocarbamoyl) amino acid ester 유도체 및 N-(N'-methyl-N-nitrosocarbamoyl) amino acid ester 유도체 (4b-6b)는 amino acid methyl ester-HCl들, L-glycine methylester·HCl (10), L-valine methyl ester·HCl(11), L-phenylalanine methyl ester·HCl(12)를 출발물질로 하여 다음 반응식에서 요약한 순서로 합성하였다. (Scheme I)



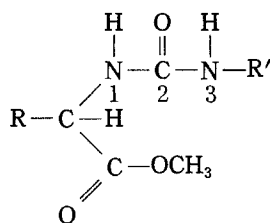
- 7 a: R=-H, R'=-CH₂-CH₂-Cl
b: R=-H, R'=-CH₃
- 8 a: R=-CH<
CH₃ R'=-CH₂-CH₂-Cl
b: R=-CH<
CH₃ R'=-CH₃
- 9 a: R=-CH₂-< R'=-CH₂-CH₂-Cl
b: R=-CH₂-< R'=-CH₃
- 10: R=-H
- 11: R=-<
CH₃
CH₃
- 12: R=-CH₂-<

Scheme I.

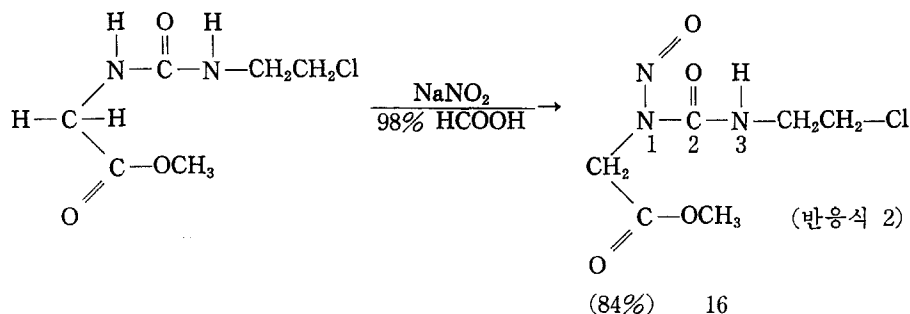
amino acid methyl ester의 HCl 염을 methanol용매 중에서 KOH로 처리하여 free amino acid methyl ester로 전환시킨 후 isocyanate ($R-N=C=O$; $R=Cl-CH_2-$ 혹은 CH_2-)와 저온($0\sim 3^\circ C$)에서 반응시켜 별 부반응의 관찰없이 합성중간체인 N-(alkylcarbamoyl) amino acid methyl ester (7a, b~9a, b) 좋은 수율로 얻었다. 이들 합성 중간체 (7a, b~9a, b)의 구조는 IR과 proton NMR spectral data에 의거하여 완전히 결정할 수 있었다. 이들의 IR spectra에서 $1730\sim 1740cm^{-1}$ 에 ester의 C=O stretching band, $1620\sim 1640cm^{-1}$ 사이에 urea의 C=O stretching band가 관찰되고 $3380\sim 3390cm^{-1}$ 에 NH stretching band와 $1520\sim 1590cm^{-1}$ 에 NH bending band가 특징적으로 관찰되므로 이들의 중요 관능기의 존재가 확인되었다. 그리고 이들의 proton NMR은 이들 화합물의 구조와 완전히 일치되는 수소의 수와 coupling pattern을 보여주고 있다(실험부 참조).

이들의 특징을 보면 함유된 urea 기의 2개의 NH 수소들이 $\delta 5.98\sim 6.41$ 사이에 예상되는 splitting pattern으로 나타났으며 NH-CH₂-CH₂-Cl의 2개의 methylene기는 예상되는 바와 같이 A₂B₂X type의 splitting pattern의 peak로 관찰되었다.

그리고 2개의 NH peak는 D₂O처리시 교환에 의해 사라졌다. 이들 합성된 N-(alkylcarbamoyl) amino acid methyl ester (7a, b~9a, b)들은 우리들이 목적하는 N-(alkyl-N'-nitroso-carbamoyl) amino acid methyl ester 유도체 (13a, b~15a, b)를 얻기위해 98% HCOOH중에서 NaNO₂로 반응시켜 nitroso化 시켰다. 이 nitroso化 반응에서 N-(alkylcarbamoyl) amino acid methyl ester 유도체 중 7a를 제외한 모든 유도체 (7b, 8a, b, 9a, b)들에서 우리들이 목적하는 바와같이 N-3의 위치에 nitroso化가 집중적으로 일어났으며 이들의 반응을 통해 최종생성물(13b, 14a, b, 15a, b)을 때



우 높은 수율(70~85%)로 얻었다. 그러나 glycine methyl ester로 부터 얻은 N-(2-chloroethyl-carbamoyl) glycine methyl ester는 같은 조건에서 (NaNO₂/HCOOH) 다른 regioisomer, N-1에 nitroso化가 된 생성물이 특이하게 생성되었다. (반응식 2)



이러한 glycine유도체 (7a)에서 관찰한 nitroso化의 regioisomer의 생성은 이상한 결과로 보이나 이 결과는 valine유도체 (8)와 phenylalanine 유도체 (9)가 N-1의 α자리에 각각 입체적 장애가

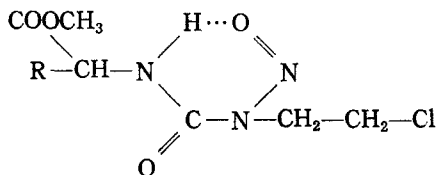
큰 isopropyl기와 benzyl기를 가지고 있는점과 Montgomery¹⁷⁾의 nitroso化에서의 입체효과에 의한 regioselectivity 변화에 대한 결과 보고를 감안할 때 충분히 설명이 가능하다. 이들 nitroso化 생성물 구조결정 및 regioisomer 구별은 IR과 proton NMR spectral data의 자세한 분석으로 충분히 가능했다.

Nitroso化 후 생성된 nitrosourea유도체 (13b, 14a, b, 15a, b, 16)의 IR spectra를 중간체인 urea 유도체 (7a, b~9a, b)의 IR spectra와 비교해 볼때 urea유도체 (7a, b~9a, b)에서의 urea C=O peak가 1620~1640cm⁻¹에서 관측된 반면(양쪽 amine기에 의한 공명효과), nitroso化후 urea C=O peak의 90~100cm⁻¹정도 higher frequency쪽으로 shift됨을 관측하였다. 이들은 NO기의 inductive 효과¹⁸⁾ 때문에 한쪽 amine기의 resonance 효과의 감소로 설명이 되며 아울러 NH의 stretching에 의한 흡수대(3480~3500cm⁻¹), NO기의 stretching에 의한 흡수대(1500~1580cm⁻¹), 그리고 ester C=O stretching에 의한 흡수대(1730~1750cm⁻¹)의 관찰은 nitroso기가 치환된 urea 관능기와 ester 기의 존재를 뒷받침 한다.

그리고 이들의 proton NMR spectral data를 중간체 urea 유도체 (7a, b~9a, b)의 것과 비교할 때 우리가 결정한 nitroso urea유도체의 구조를 강력히 뒷받침 한다. 이들 비교를 간단히 요약하면

다음과 같다. urea유도체 (7a, b~9a, b)의 δ5.15~6.66에서 나타남 N—C—N의 2개 수소의 peak

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ \text{N}-\text{C}-\text{N} \\ | \quad | \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$$
 는 NO기의 치환으로 치환되지 않는 NH수소 1개가 δ8.12~9.15 사이의 상당한 저자장에서 나타남 것은 다음과 같이 6-membered ring 구조를 통한 수소 결합에 의한 것으로 설명된다.



Nitrosourea화합물, 14a와 15a의 NMR spectra를 그에 해당하는 urea 유도체 8a와 9a의 NMR spectra와 비교하면 함유된 N—CH₂—CH₂—Cl group에 의해 나타나는 2개의 methyl기의 peak는

$$\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{N}-\text{CH}_2-\end{array}$$
 N—H기와의 coupling으로 A₂B₂X type의 splitting pattern을 가진 반면 nitroso化후 이 peak는 A₂B₂ type splitting pattern^{19, 20)}을 가지고 chemical shift도 N에 치환된 NO기의 inductive 효과로 인해 N—CH₂—는 δ3.92—4.10 영역에서 δ0.4~0.5 정도 저자장에서 triplet으로 나타나며

$$\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{CH}_2-\text{Cl} \end{array}$$
 CH₂—Cl도 다소 저자장쪽으로 이동하여 δ3.37~3.62에 triplet으로 나타났다. 이러한 N—CH₂—CH₂—Cl의 2개의 methylene peak의 coupling pattern의 변화(A₂B₂X→A₂B₂)와 chemical shift의 저자장쪽에서의 이동은 nitroso化 반응에 있어서의 생성된 regioisomer의 (N-3 자리에 nitroso化된) 구조결정에 결정적인 뒷받침이 된다. 그리고 N=O로 치환되지 않은 N—H의 peak(δ8.12~9.15)는 D₂O처리시 교환으로 사라졌다. 그 반면 glycine urea에서부터 유도된 urea, 7a의 nitroso化 후 생성된 생성물의 proton NMR spectral data와 7a의 것과 비교할 때 14a와 15a와는 달리 2-chloroethyl기의 수소 peak의 splitting pattern은 7a의 pattern과 유사한 A₂B₂X의 type인 반면

Table I-Antitumor activities of the synthesized compounds.

Nitrosourea compound	ED ₅₀ (μg/ml)	Urea compound	ED ₅₀ (μg/ml)	Nitrosourea compound	ED ₅₀ (μg/ml)	Urea compound	ED ₅₀ (μg/ml)
16	24	7a	7.4	13b	~	7b	47.2
14a	1.5	8a	>20	14b	29	8b	>20
15a	3.0	9a	>20	15b	15	9b	30

ester의 α -methylene의 두 수소의 splitting pattern이 doublet (7a)가 singlet으로 변화된 것으로 보아 7a의 nitroso化은 8a와 9a의 nitroso化에서와는 다른 regioisomer(N-1이 N=O로 치환)를 생성시킨 것이 분명하다. 그리고 그들의 IR data와 더불어 고려할 때 7a의 nitroso化 생성물은 16의 구조를 가진 것으로 본다.

합성한 N-(alkylcarbamoyl) amino acid methyl ester들(7a, b~9a, b)과 N-(alkyl-N'-nitrosocarbamoyl) amino acid methyl ester들(14a, b, 15a, b, 16)의 murine leukemia lymphoblast, L1210 암세포 성장억제 정도를 측정하여 이들 항암활성도를 알아보았다. 그 결과는 Table 1에 요약되어 있다. 이 결과에서 보는 바와 같이 대체로 nitroso 화합물의 항암활성도가 urea 화합물보다 훨씬 크고 이 nitroso 화합물중 N-(2-chloroethyl-N'-nitrosocarbamoyl) valine methyl ester (14a)와 N-(2-chloroethyl-N'-nitrosocarbamoyl) phenylalanine methylester (15a)의 항암활성도는 매우 커서 NCI 품질관리 한계인 1.7~7.7 (μg/ml) 범위내에 들어가는 ED₅₀값을 가진 것으로 앞으로 상세한 항암효과를 평가해 볼 가치가 있는 것으로 고려된다.

실 험 부

적외선 스펙트라는 KBr pellet를 만들어 Perkin-Elmer 710B로 측정했으며, 핵자기 공명스펙트라는 DMSO-d₆를 용매로 TMS를 internal standard로 사용하여 Varian EM-360A로 측정했다. (s; singlet, d; doublet, t; triplet, q; quartet)

TLC판은 silicagel G Type 60(Merk)로 만들어 사용하고 I₂ 발색병과 U.V lamp로 확인했다. 또한 생물학적 실험에서 암세포 murine leukemic lymphoblast, L1210은 Winsconsin대학 Perman 실험실에서 얻은 것을 screw-capped tubes(20×150mm)에 넣어 37°C에서 배양시켜 사용했으며 Fisher's powder medium은 GIBCO연구실(Grand Island, New York, USA)에서 구입한 것을 사용했으며 말혈청은 도살한 후 바로 500ml 원심분리관에 채취한 혈액을 2시간 정도 실온으로 두었다가 응고시킨뒤 5,000rpm에서 원심분리하여 상정액을 -20°C에 보관시켜 사용했다. 또한 세포수는 Coulter Electronic Particle Counter (Electrozone Celloscope, Particle Data, Inc, Elmhurst, III. USA) 기기로 측정하였다.

(1) N-(2-Chloroethylcarbamoyl)-amino Acid Esters (7a, 8a, 9a)의 합성—N-(2-chloroethylcarbamoyl)-amino acid ester (7a, 8a, 9a)는 각각의 해당되는 L-amino acid ester를 2-chloroethyl isocyanate와 반응시켜 얻었다. L-phenylalanine은 methyl ester·HCl 4.3g (19.9mmole)을 최소량의 methanol에 용해한 후 methanolic KOH (1.12g, 20mmol) 용액을 혼합하고 교반하여 free L-phenylalanine methyl ester를 만들고 이때 생성되는 KCl 침전은 여과하여 제거하였다. 그 여액에 2-chloroethyl isocyanate (2.1ml, 24.3mmole)을 교반하면서 20분간에 걸쳐 0°C에서 한 방울씩 첨가한 후 2시간 30분 동안 계속해서 교반하였다. 반응의 진행정도를 TLC(전개용매

ethylacetate: methanol/1 : 1)로 조사하였으며 반응이 90% 이상 진행된 후 그 반응용액을 최대 로 감압농축한 후 찬 증류수로 희석시켜 N-(chloroethylcarbamoyl)-phenylalanine methyl ester (9a) 3.1g (54%)의粗 결정을 얻었다. 이 결정을 다시 찬 증류수에서 재결정하여 순수한 결정을 얻어 사용하였다. 그 외 N-(chloroethyl carbamoyl) amino acid ester (7a, 8a)도 같은 방법으로 그에 해당되는 L-amino acid methyl ester·HCl을 사용하여 얻었다. 이들 생성물의 물리적 성질, spectral data 및 항암활성도는 다음과 같다.

N-(2-Chloroethylcarbamoyl)-phenylalanine Methyl Ester (9a)—m.p.=96~97°, IR (KBr): 1730cm⁻¹ (ester C=O stretching), 1620cm⁻¹ (urea C=O stretching), 3390cm⁻¹ (NH stretching), 1520cm⁻¹ (N—H bending) ¹HNMR (DMSO-d₆): δ6.32 그리고 6.40(2s, 2H, —NH—C—NH—), 3.50 (s, 3H, —OCH₃) 4.36 (q, 1H, J=7Hz, —CH—), 2.94 (d, 2H, J=7Hz, benzylic CH₂), 7.20 (br. s, 5H, phenyl), 3.22~3.59 (m, 4H, —CH₂—CH₂—Cl) 항암 활성도: ED₅₀ 30μg/ml

N-(2-Chloroethylcarbamoyl)-glycine Methyl Ester (7a)—60% yield, mp=105~106°, IR(KBr): 1740cm⁻¹ (ester C=O stretching), 1620cm⁻¹ (urea C=O stretching), 3,390cm⁻¹ (NH stretching), 1,590cm⁻¹ (NH bending). ¹HNMR (DMSO-d₆): δ6.34 (br. s, 2H —NH—C—NH—), 3.50 (s, 3H, OCH₃), 3.69 (d, 2H J=6Hz, N—CH₂—CO₂CH₃), 3.19~3.51(m, 4H, N—CH₂—CH₂—Cl). 항암활성도: ED₅₀=47.2μg/ml

N-(2-Chloroethylcarbamoyl)-valine Methyl Ester (8a)—(56% yield), m.p.=103~103.5°, IR (KBr): 1,740cm⁻¹ (ester C=O stretching), 1,630cm⁻¹ (urea C=O stretching), 3,390cm⁻¹ (NH stretching), 1,560cm⁻¹ (NH Bending). ¹HNMR (DMSO-d₆): δ6.32 (d, 1H, J=6Hz, —C—NH—CH—), 5.98~6.47 (br. s, 1H, CH₂—NH—C—), 3.56 (s, 3H, OCH₃), 4.10 (d of d, 1H, J=7 and 6Hz, α-methine), 3.28~3.69 (m, 4H, N—CH₂—CH₂—Cl), 1.93 (sept, 1H, J=7Hz, isopropyl methine), 0.90 (d, 6H, gem-dimethyl). 항암활성도: ED₅₀>20μg/ml

(2) **N-(Methylcarbamoyl) amino Acid Esters (7b, 8b, 9b)의 합성**—N-(methylcarbamoyl) amino acid ester (7b, 8b, 9b)는 해당하는 amino acid methyl ester와 methylisocyanate와 반응시켜 N-(2-chloroethylcarbamoyl) amino acid methyl ester (7a, 8a, 9a)의 합성방법과 동일한 방법으로 얻었다. 이들 생성물의 물리적 성질, spectral data 및 항암활성도는 다음과 같다.

N-(Methylcarbamoyl)-phenylalanine methylester (9b)—(64% yield), m.p. =140~140.9° IR(KBr) 1,720cm⁻¹ (ester C=O stretching), 1,620cm⁻¹ (urea C=O stretching), 3,400cm⁻¹ (NH stretching), 1,580cm⁻¹ (NH bending), ¹HNMR (DMSO-d₆): δ7.5 (br. s, 5H, phenyl), 6.4 (d, 1H, J=8Hz, C—NH—CH<), 5.80 (q, 1H, C—NH—CH₃), 4.39 (d of t, 1H, J=7Hz 그리고 8Hz, α-methine), 3.56(s, 3H, OCH₃), 2.86 (d, 2H, J=7Hz, benzylic CH₂), 2.50 (d, 3H, J=8Hz, N—CH₃). 항암활성도; ED₅₀>20μg/ml

N-(Methylcarbamoyl)-glycine Methyl Ester (7b)—(45% yield), m.p.=87°, IR (KBr) 1,740 cm^{-1} (ester C=O stretching), 1,580 cm^{-1} (NH bending), 1,640 cm^{-1} (urea C=O stretching),

3,380 cm^{-1} (NH stretching), $^1\text{HNHR}$ (DMSO- d_6): 5.72~6.39 (m, 2H, $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ | \quad | \\ \text{N}-\text{C}-\text{N} \\ || \\ \text{O} \end{array}$), 3.70 (d, 2H, J=6Hz, — CH_2 —), 3.58 (s, 3H, OCH_3), 2.50 (d, 3H, J=4Hz, N— CH_3). 항암활성도: ED_{50} = 7.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

N-(Methylcarbamoyl)-valine Methyl Ester (8b)—(45% yield), mp=103~103.5°, IR (KBr) 1,740 cm^{-1} (ester C=O stretching), 1,640 cm^{-1} (urea C=O stretching), 3,380 cm^{-1} (NH stretching), 1,580 cm^{-1} (NH, bending), $^1\text{HNHR}$ (DMSO- d_6): δ 6.10 (d, 1H, J=7Hz,

$\begin{array}{c} \text{C}-\text{N}-\text{CH} < \\ || \quad | \\ \text{O} \quad \text{H} \end{array}$), 5.80 (q, 1H, J=5Hz, NH— CH_3), 3.97 (d of d, 1H, J=7Hz and 7Hz, α -methine), 3.52 (s, 3H, OCH_3), 2.54 (d, 3H, J=5Hz, N— CH_3), 1.92 (m, 1H, isopropyl methin), 0.90 (d, 6H, J=7Hz, gem-dimethyl). 항암활성도: ED_{50} > 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

(3) **N-(Alkylcarbamoyl) amino Acid Methyl Ester (7, 8, 9)들의 니트로소화 반응**—(a) **N-(Alkyl-N'-nitrosocarbamoyl) amino Acid Methyl Ester (13b, 14a,b, 15a,b)**: 각각의 해당되는 N-(alkyl carbamoyl) amino acid methyl ester (7a, 8a,b, 9a,b)를 $\text{NaNO}_2/\text{HCOOH}$ 로 0°C에서 처리하여 N-(alkyl-N'-nitrosocarbamoyl) amino acid methylester (13b, 14a, b, 15a, b)를 얻었다.

N-(2-Chloroethylcarbamoyl)-phenyl alanine methylester (9a) 1.2g (4.2mmol)을 최소량의 HCOOH 에 용해 시킨후 0°C에서 교반 하면서 0.43g (7.6 mmol)의 NaNO_2 를 소량씩 20분간에 걸쳐 가하고 30분동안 교반 하였다. 반응이 진행됨에 따라 반응용액이 노란색으로 변했다. 반응정도는 TLC (100% CHCl_3)로 추적했으며 반응종료후 반응용액을 포화 NaHCO_3 용액으로 중화시키고 (pH 8) CHCl_3 로 추출하였다. CHCl_3 층 용액을 건조제 Na_2SO_4 로 건조하고 감압농축후 silica gel column chromatography (100% CHCl_3)로 정제하여 노란시럽상의 N-(2-chloroethyl-N'-nitrosocarbamoyl) phenylalanine methyl ester (15a) 1.02g(85%)을 얻었다. 그외 N-(alkyl-N'-nitrosocarbamoyl) amino acid methyl ester (13b, 14a, b)도 동일한 방법으로 얻었다. 이들 생성물의 spectral data 및 항암활성도는 다음과 같다.

N-(2-Chloroethyl-N'-nitrosocarbamoyl)phenylalanine Methyl Ester (15a)—IR(KBr): 3,430 cm^{-1} (NH stretching), 1,730 cm^{-1} (ester C=O stretching), 1,720 cm^{-1} (urea C=O stretching), 1,520 cm^{-1} (NH bending), 1,500 cm^{-1} (N=O stretching), $^1\text{HNMR}$ (DMSO- d_6): δ 9.00 (d, 1H, J=8Hz, —NH—), 7.25 (br. s, 5H, phenyl), 4.69 (d of t, 1H, J=8Hz and 8Hz, α -methine), 4.01

(t, 2H, J=6.5Hz, — $\begin{array}{c} \text{NO} \\ | \\ \text{N}-\text{CH}_2 \end{array}$ —), 3.49 (t, 2H, J=6.5Hz, $\begin{array}{c} \text{NO} \\ | \\ \text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Cl} \end{array}$), 3.20 (d, 2H, J=8Hz, benzylic CH_2). 항암활성도; ED_{50} = 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

N-(2-Chloroethyl-N'-nitrosocarbamoyl) valine Methyl Ester (14a)—(83% yield), IR(KBr) 3,500 cm^{-1} (NH stretching), 1,740 cm^{-1} (ester C=O stretching), 1,730 cm^{-1} (urea C=O stretching), 1,520 cm^{-1} (NH bending), 1,500 cm^{-1} (N=O stretching), $^1\text{HNMR}$ (DMSO- d_6): δ 8.55

(d, 1H, $J=8\text{Hz}$, $-\text{NH}-$), 3.66 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 4.26 (d of d, 1H, $J=5\text{Hz}$ and 4Hz , α -methine), 4.03 (t, 2H, $J=5\text{Hz}$, $\text{N}-\overset{\text{NO}}{\text{C}}\text{H}_2-$), 3.56 (t, 2H, $J=6\text{Hz}$, $-\text{CH}_2\text{Cl}$), 2.24 (sept, 1H, $J=6.5\text{Hz}$, isopropyl methine), 0.91 (d, 6H, gem-dimethyl).

N-(Methyl-N'-nitrosocarbamoyl)-phenylalanine Methyl Ester (15b)—(74% yield); IR (KBr): 3,340 cm^{-1} (NH stretching), 1,720 cm^{-1} (urea C=O stretching), 1,520 cm^{-1} (NH bending), 1500 cm^{-1} (N=O stretching), $^1\text{HNMR}$ ($\text{DHSO}-d_6$): δ 8.62 (d, 1H, $J=8\text{ Hz}$, $-\text{NH}-$), 7.20 (s, 5H,

phenyl), 3.68 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.29 (d, 2H, $J=5\text{Hz}$, benzylic CH_2), 3.05 (s, 3H, $\text{N}-\overset{\text{NO}}{\text{C}}\text{H}_3$).

N-(Methyl-N-nitrosocarbomyl)-glycine Methyl Ester (13b)—(84% yield), IR (KBr): 3,480 cm^{-1} (NH stretching), 1,740 cm^{-1} (ester C=O stretching), 1,730 cm^{-1} (urea C=O stretching), 1,580 cm^{-1} (NH bending), 1,520 cm^{-1} (N=O stretching), $^1\text{HNMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): δ 8.95 (br. s,

1H, $\text{NH}-$). 3.63 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.56 (d, 2H, $J=6\text{Hz}$, $-\text{CH}_2$), 3.05 (s, 3H, $-\overset{\text{NO}}{\text{N}}-\text{CH}_3$).

N-(methyl-N'-nitrosocarbamoyl) valine methylester (14b) (75% yield); IR (KBr) 3,500 cm^{-1} (NH stretching), 1,740 cm^{-1} (ester C=O stretching), 1,730 cm^{-1} (urea C=O stretching), 1,520 cm^{-1} (NH bending), 1,490 cm^{-1} (N=O stretching), $^1\text{HNMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): δ 6.4 (d, 1H, $J=8\text{Hz}$, $-\text{NH}$), 4.24 (t, 1H, $J=8\text{Hz}$, α -methine), 3.68 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.10 (s, 3H, $\text{N}-\overset{\text{NO}}{\text{C}}\text{H}_3$), 2.30 (sept, 1H, $J=7\text{Hz}$, isopropylmethine), 0.99 (d, 6H, gem-dimethyl).

(b) **N-(2-Chloroethyl)-N-nitrosoamino Acid Methyl Ester (13a)**의 생성: N-(2-chloroethylcarbomoyl) glycine methyl ester (7a) 1.01g (5.2mmol)을 N-(alkyl-N'-nitroso carbamoyl) amino acid methyl ester의 합성방법과 동일하게 진행, 처리시켰다.

이 생성물의 물리적성질, spectra data 및 항암활성도는 다음과 같다.

N-(2-Chloroethyl)-N-nitroso-glycine Methyl Ester (13a)—(73% yield), mp=6.7~68.5°, IR(KBr): 3,490 cm^{-1} (NH stretching), 1,750 cm^{-1} (ester C=O stretching), 1,710 cm^{-1} (urea C=O stretching), 1,530 cm^{-1} (NH bending), 1,500 cm^{-1} (N=O stretching), $^1\text{HNMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): δ 8.97 (br. s, 1H, $-\text{NH}$), 4.50 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 3.52~3.72 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 3.58 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$). 항암활성도: $\text{ED}_{50}=24\mu\text{g/ml}$.

(4) 생물학적 항암 활성도 실험—합성한 nitrosourea 유도체 (13~15)와 urea유도체 (7~9)에 의한 murine leukemia lymphoblast L1210 세포의 성장 억제 정도를 이미 보고된 방법²¹⁾으로 측정하여 ED_{50} 값을 NCI방식에 따라 계산하였다. 그 ED_{50} 값은 각 화합물의 합성에 대한 실험부의 물리상수 및 spectral data와 함께 기록되어 있다(실험의 합성部 참조).

문 헌

1. S.K. Carter, *Cancer Chemother, Pharmacol.* 1, 15 (1978).
2. S.M. Mikulski, M.A. Chirigos and F.H. Maggia, *Adv. Pharmacol. Chemother.* 15, 1 (1978).
3. G. Renorx, *Pharmacol. Ther.* 2, 397 (1978).

4. T.P. Johnston, G.S. McCaleb, and J.A. Montgomery, *J. Med. Chem.* **6**, 669 (1963).
5. G.P. Wheeler, *Cancer Chemotherapy*, A.C. Sartorell, Ed.; American Chemical Society, Washington D. C., 1976, 988.
6. L.N. Ferguson, *J. Chem. Edu.* **52**, 688 (1975).
7. J.A. Montgomery, R. James, G.S. McCaleb, M.C. Kirk and T.P. Johnston, *J. Med. Chem.* **18**, 568 (1975).
8. R.B. Brundrett, J.W. Cowens, M. Cdvin, and I. Jardin, *J. Med. Chem.* **19**, 58 (1976).
9. J.W. Lown, A.V. Joshua and L.W. McLaughlin, *J. Med. Chem.* **23**, 798 (1980).
10. R.J. Weinkam and H.S. Lin, *J. Med. Chem.* **22**, 1193 (1978).
11. A.M. Crider, C. Lu, H.G. Floss, and J.M. Cassady, *J. Med. Chem.* **22**, 32 (1979).
12. H.Y.P. Lam, A. Begleiter, G.J. Goldenberg and C.H. Wong, *J. Med. Chem.* **20**, 1134 (1977).
13. J. Suami, K.I. Tadano, and W.T. Bradner, *J. Med. Chem.* **22**, 314 (1979).
14. K. Fukushima and S. Toyoshima, *Can. Chemo. Rep.* **57**, 3209 (1975).
15. T. Machinami and T. Snami and T. Snami, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **48**, 1333 (1975).
16. W.J. Zeller et al. *Arzneim, Forsch.* **32**, 484(193).
17. J.A. Montgomery, H.J. Thomas, R.W. Brockman and G.P. Wheeler. *J. Med, Chem.* **24**, 184 (1981).
18. S.R. Koepke, R. Kupper, and C.J. Michejda, *J. Org. Chem.* **44**, 2718 (1979).
19. T.P. Johnston, G.S. McCaleb, S.D. Claytoe, J.L. Frye, C.A. Krauth, and J.A. Hontgomery, *J. Med. Chem.* **22**, 279 (1977).
20. A.M. Crider, R. Lamery, H.G. Floss and J.M. Cassad, *J. Med. Chem.* **23**, 849 (1980).
21. 김정균, 윤이규, 고영심, 윤웅찬, 박무영, 문경호, 약학회지 **27**, 309 (1983).