

N-Alkyl-N-Nitrosocarbamoyl-3 α -Amino-와 3 β -Amino-5 α -Cholestane 유도체들의 合成 및 抗癌作用 評價

金正均 · 崔舜圭 · 趙仁燮 · 劉同植 · 柳成浩* · 文慶浩*

釜山大學校 化學科 · *韓國科學技術院 生物工學科

(Received April 15, 1985)

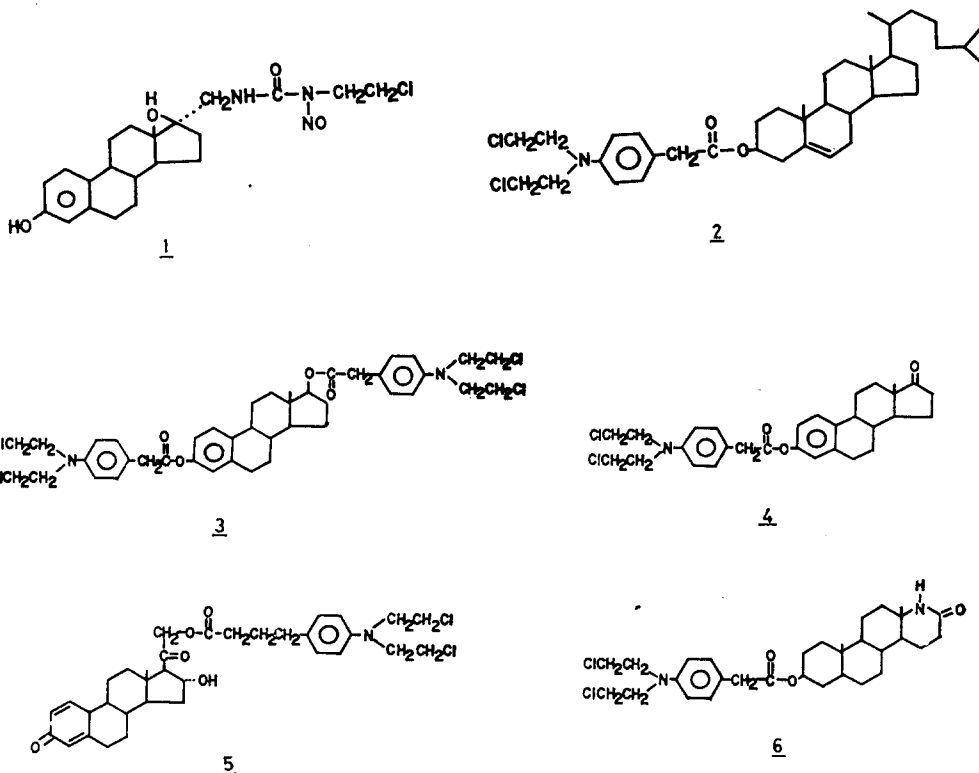
Synthesis and Antitumor Evaluation of N-Alkyl-N-Nitrosocarbamoyl-3 α -Amino-and 3 β -Amino-5 α -Cholestane Derivatives

Jack C. Kim, Soon-Kyu Choi, In-Seop Cho, Dong-Sik Yu,
Sung Ho Ryu* and Kyung Ho Moon*

*Department of Chemistry, Pusan National University, Pusan 607, Korea and
Department of Biological Science and Technology, The Korea Advanced Institute of
Science and Technology, Seoul 132, Korea*

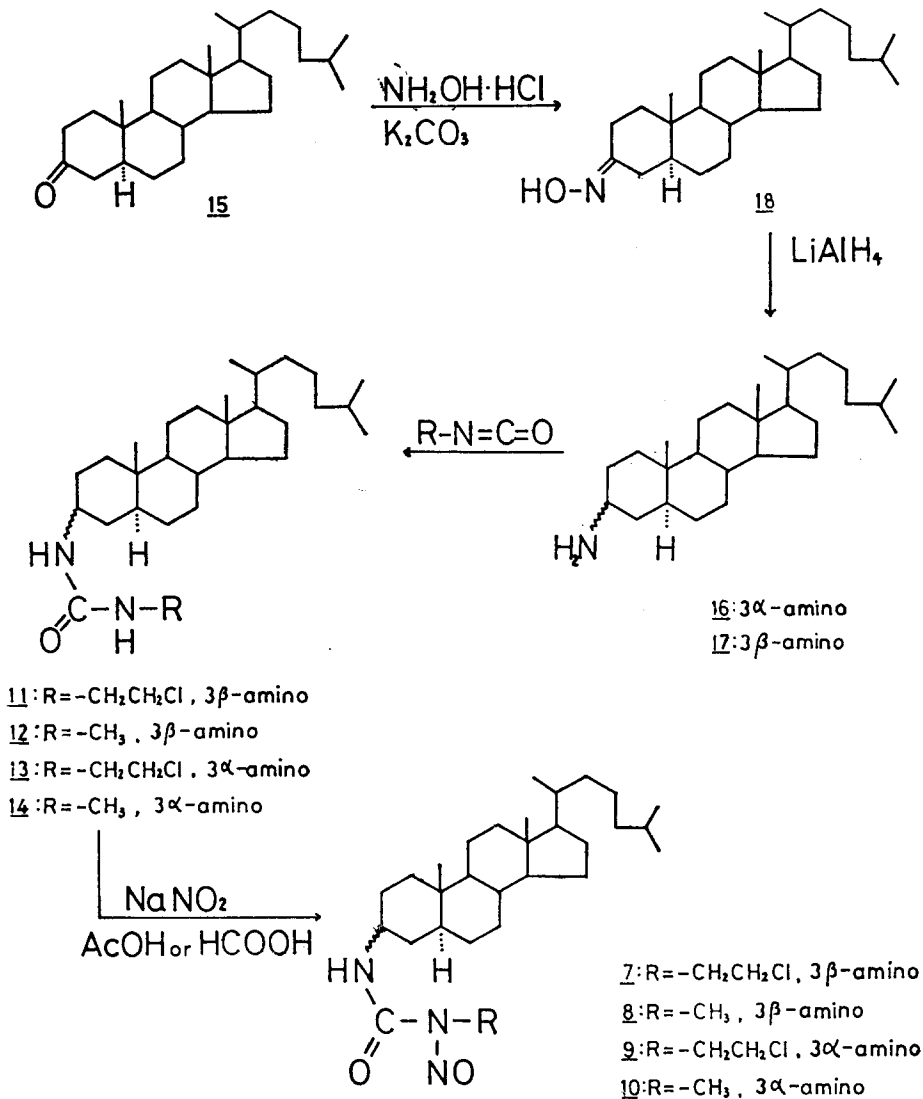
Abstract—The isomeric intermediates, 3 α -and 3 β -amino-5 α -cholestane required for the synthesis of N-nitrosoureas, N-(2-chloroethyl)-N-nitrosocarbamoyl-3 α -amino-5 α -cholestane (9), N-methyl-N-nitrosocarbamoyl-3 α -amino-5 α -cholestane (10), N-(2-chloroethyl)-N-nitrosocarbamoyl-3 β -amino-5 α -cholestane (7), and N-methyl-N-nitrosocarbamoyl-3 β -amino-5 α -cholestane (8) were obtained through the LiAlH₄ reduction of 5 α -cholestan-3-one oxime, followed by the chromatographic separation: the assignment of the stereochemistry of both isomers were based on the shape and chemical shift of C β -proton resonances on their NMR spectra and on the elution mobility on the TLC. The urea intermediates, N-(2-chloroethyl) carbamoyl-3 α -amino-5 α -cholestane (13), N-methylcarbamoyl-3 α -amino-5 α -cholestane (14), N-(2-chloroethyl) carbamoyl-3 β -amino-5 α -cholestane (11) and N-methyl-3 β -amino-5 α -cholestane (12) were prepared by the treatment of each isomers (3 α -amino-and 3 β -amino-5 α -cholestane) with alkyl isocyanates in anhydrous CHCl₃, and the corresponding nitrosoureas, 7~10 were obtained by the nitrosation of the ureas, 11~14, with AcOH (or HCOOH)/NaNO₂ in ice-cold condition. The inhibitory activity of the nitrosoureas, 7~10, and their intermediates, 12~14 towards the growth of L1210 murine leukemia cells, were examined. Among them, the compounds 9 and 10 exhibited high activity having ED₅₀ to be 5.5 g/ml and 6.1g/ml, respectively.

암 치료요법제 가운데 잘 알려진 부류로서 스테로이드호르몬과 알킬화제가 있다. 스테로이드 호르몬으로서 근래 40여년간 부신피질호르몬, 황체호르몬(progestins), 남성호르몬(androgens) 및 여성호르몬(estrogens)은 이른바 호르몬-의존암(hormone-dependent tumors)의 증상을 경감시키기 위하여 사용하여 오고 있다.¹⁾ 알킬화제는 강력한 cytotoxicity에 의하여 악성 암 치료에 효과적인 것으로 알려져 있다. 최근들어 보다 더 특이성이 큰 항암제를 만들기 위하여 스테로이드 호르몬을 알킬화제의 운반제로 사용한 연구가 시도되었다.²⁻⁷⁾ 그러나 아직까지 이러한 연구는 만족할만한 결과를 주지 못했다. 다만 다음에 열거한 화합물들만이 임상학적 연구에 사용할만한 항암활성을 나타낸 것으로 보고되어 있다. N-(2-chloroethyl)-N-(3, 17-dihydroxy estro-1, 3, 5



(10)-triene-17-yl) methyl-nitrosourea (1), Phenesterin (2), Estradiol mustard (3), Estracyt (4), Leo 1031 (5), 그리고 Homoaza steroid ester(6) 등이 그것이다. 이 화합물들은 알킬화제로서 2-chloroethylnitrosoureido group과 bis(2-chloroethyl) amino group이 steroid에 부착되어 있다.

최근 2-chloroethylurea와 methylnitrosourea 화합물들이 임상학적으로 유용한 항암제 부류로서 인정되어 있다. 이 화합물들의 항암활성은 생체내에서 분해하여 생성되는 2-chloroethyldiazo hydroxide 또는 methyldiazo hydroxide 등과 같은 강력한 친전자체가 암세포에 알킬화하기 때문인 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 이러한 결과를 토대로하여 알킬화제로서 2-chloroethylnitrosoureido group과 methylureido group이 붙은 cholestane 유도체들의 항암활성에 대한 검토와 궁극적으로 보다 더 유용한 새로운 항암제 개발을 위하여 다음에 열거한 4종의 N-nitrosoureido cholestane 유도체인 N-(2-chloroethyl)-N-nitrosocarbamoyl-3 β -amino-5 α -cholestane (7), N-methyl-N-nitrosocarbamoyl-3 β -amino-5 α -cholestane, N-(2-chloroethyl)-N-nitrosocarbamoyl-3 α -amino-5 α -cholestane, N-methyl-N-nitrosocarbamoyl-3 α -amino-5 α -cholestane 화합물들을 합성하여 이들 화합물들의 L1210 leukemia cell에 대한 항암활성을 검토하였다. 아울러 7, 8, 9, 10 합성 중간체인 ureido cholestane 유도체인 N-(2-chloroethyl)-carbamoyl-3 β -amino-5 α -cholestane(11), N-methylcarbamoyl-3-amino-5 α -cholestane(1), N-(2-chloroethyl)-carbamoyl-3 α -amino-5 α -cholestane(13), N-methylcarbamoyl-3 α -amino-5 α -cholestane(14) 등의 항암활성도 검토하였다. 이 화합물들은 5 α -cholestan-3-one (15)을 출발물질로 하여 다음 반응식에서 요약한 순서로 합성하였다.



실험 방법

시약 및 기기—본 실험에서 사용한 시약중에 5 α -cholestan-3-one은 BDH제를, 2-chloroethyl isocyanate와 methyl isocyanate는 동경화성제를, 그리고 LiAlH₄는 Aldrich제를 사용하였다. TLC 판은 silica-gel G (type 60 Merck) 35g을 CHCl₃ : CH₃OH (2 : 1 v/v)의 혼합용매 100ml에 섞고 혼든후 3cm×12cm의 유리판에 두께가 약 0.2mm되게 만들어 사용하였으며 요오드로 발색시켰다. 전개용매는 용매 A(C₆H₆ : CH₃OH=80 : 20 v/v) 용매 B (CHCl₃:CH₃OH:NH₄OH=85:14:1 v/v)와 용매 C (CHCl₃ : CH₃OH=90 : 10 v/v)의 3가지 용매를 사용하였다. Column chromatography

에 사용한 silica-gel은 Merck제 (No 7729 mesh 230)를 사용하였으며 column은 지름이 4cm, 길이가 60cm인 것을 사용하였고 용매 B를 전개용매로 사용하였다. m.p는 Büchi melting point apparatus로 측정하였으며 그 측정치는 보정하지 않았다. IR 스펙트럼은 perkin-Elmer 710 IR spectrophotometer를 사용하여 얻었고 NMR스펙트럼은 CDCl₃을 용매로, TMS를 표준물질로 사용하여 Varian EM-360A H-NMR spectrophotometer를 사용하여 얻었다. 또한 생물학적 실험에서 암세포 murine leukemic lymphoblast L 1210은 Wisconsin 대학 Perman 실험실에서 얻은 것을 screw-capped tubes (20×150mm)에 넣어 37°C에서 배양시켜 사용했으며 Fishers powder medium은 GIBCO 연구실(Grand Island New York, USA)에서 구입한 것을 사용했다. 말혈청은 도살한 후 바로 500ml 원심분리관에 채취한 혈액을 2시간 정도 실온으로 두었다가 응고시킨 뒤 5,000rpm에서 원심분리하여 상정액을 -20°C에 보관시켜 사용했다. 또한 세포수는 Coulter Electronic particle Counter (Electrozone Celloscope, particle Data, Inc, Elmhurst USA)로 측정하였다.

합성—1. 5 α -cholestan-3-one oxime(18) 10g (0.026 mole)의 5 α -cholestan-3-one을 600ml의 메탄올에 용해시킨 후 7.2g (0.1 mole)의 NH₂OH·HCl, 4g의 K₂CO₃와 H₂O 100ml를 가하여 1시간 30분 동안 환류시켰다. 그리고 나서 흡입 여과하여 9.6g (92%)의 5 α -cholestan-3-one oxime (18)을 얻었다.

Rf; 0.81(A), 0.9(B) m.p; 200~201°C (문헌치¹⁸⁾ 199~201°C

IR; 3270(OH), 2950, 1650 (>C=N), 1470, 1440, 1380, 950, 840, 750, 680.

NMR: δ H (steroid) 0.63~2.33 δ H (C₂orC₄) near 3.0

2. 3 α -amino-5 α -cholestane(16) 5g (0.0124 mole)의 (18)을 500ml의 무수에틸에테르에 녹인 후 1.5g (0.04 mole)의 LiAlH₄를 넣고 30시간 환류시켰다. 그리고 나서 소량의 H₂O로써 미반응의 LiAlH₄를 분해시키고 흡입여과하였다. 분해된 LiAlH₄를 CHCl₃으로 씻고 그 씻은 액을 여액과 합하여 무수 MgSO₄로써 24시간 건조시킨 후 감압농축하였다. 그 잔유물을 아세톤으로 결정화하여 4.25g (84%)의 α , β -isomer 혼합물을 얻었다. 이 혼합물을 용매 B를 사용하여 column chromatography(지름 4cm, 길이 60cm)에 의하여 1.3g (30%)의 (16)을 얻었다. Rf: 0.08(A), 0.5(B). m.p: 69~71°C IR: 3370 (NH) 2930, 1580, 1460, 1380, 1160, 840 NMR: δ H(C₃) 3.2, δ H(steroid) 0.63~2.0, δ NH₂ 1.5

3. 3 β -amino-5 α -cholestane(17) (16)의 합성과정과 동일한 과정을 거쳐서 2.95g(54%)의 17을 얻었다. Rf: 0.05(A), 0.38(B) m.p: 101~103°C IR: 3400(NH), 2930, 1580, 1465, 1380, 1160. NMR: δ H(C₃) 2.6 δ H (steroid) 0.63~2.0, δ NH₂ 1.7

4. N-(2-chloroethyl) carbamoyl-3 α -amino-5 α -cholestane(13) 0.6g (1.5mmole)의 16을 15ml의 CHCl₃에 용해시킨 후 0.26ml (3mmole)의 2-chloroethylisocyanate를 가하여 2시간 30분 동안 반응시켰다. 그리고 나서 감압농축하여 백색 결정을 얻었다. 이 결정을 에탄올로 재결정하여 0.57g (77%)의 13을 얻었다. Rf: 0.27(A) 0.85(B) m.p: 224~226°C IR: 3350(NH), 2930, 1620 (urea >C=O) 1560, 1460, 1380, 1250 NMR: δ H (CH₂CH₂Cl) 3.6~3.9, δ H (steroid) 0.63~2.0 δ NH 4.9

5. N-(2-chloroethyl) nitrosocarbamoyl-3 α -amino-5 α -cholestane(9) 0.5g (1mmole)의 NaNO₂를 입자 단위로 가한 후 실온에서 2시간 30분 동안 반응시켰다. 그리고 나서 이 반응 혼합물을 묽은 NaOH 수용액으로 중화시키고 흡입여과하여 결정을 얻었다. 이 결정을 메탄올로 재결정하여 0.5g (93%)의 9을 얻었다. 0.92(C) m.p: 94~96°C IR: 3420(NH) 2950, 1720 (urea

>C=O 1530, 1495, 1380, 1165, 1080, 960 NMR (COCl_2): $\delta\text{H}(\text{CH}_2\text{-Cl})$, 4.05~4.18, $\delta\text{H}(\text{-N-CH}_2)$ 3.38~3.61 $\delta\text{H}(\text{steroid})$ 0.63~2.0

6. **N-methylcarbamoyl-3 α -amino-5 α -cholestane**(14) 0.5g (1.3mmole)의 16을 15ml의 CHCl_3 에 용해시킨 뒤 0.2ml (3.4mmole)의 methyl isocyanate를 가하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 나서 이 반응 혼합물을 감압 농축하여 결정을 얻었다. 이 결정을 메탄올로 재결정하여 0.5g (86%)의 14를 얻었다. Rf: 0.43(A), 0.9(C) m.p: 274~277°C IR: 3350(NH) 2950, 1640 (urea >C=O), 1580, 1465, 1380, 1265, 1, 170 NMR (CDCl_3): $\delta\text{H}(\text{N-CH}_3)$ 2.8 $\delta\text{H}(\text{steroid})$ 0.65~2.0, $\delta\text{H}(\text{NH})$ 4.7

7. **N-methylnitrosocarbamoyl-3 α -amino-5 α -cholestane**(10) 0.5g (1.26mmole)의 14를 빙초산에 용해시킨 후 -5°C 에서 0.4g (5.8mmole)의 NaNO_2 를 입자단위로 가한 후 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 나서 이 반응 혼합물을 묽은 NaOH 수용액으로 중화시키고 흡입 여과하여 결정을 얻었다. 이 결정을 메탄올로 재결정하여 0.4g(75%)의 10을 얻었다. Rf: 0.85(A), 0.95(B) m.p: 101~102°C IR: 3350(NH), 2950, 1700 (urea >C=O) 1525, 1480, 1380, 1160, 980 NMR (CDCl_3): $\delta\text{H}(\text{N-CH}_3)$ 3.2 $\delta\text{H}(\text{steroid})$ 0.62~2.0

8. **N-(2-chloroethyl) carbamoyl-3 β -5 α -cholestane**(11) 1g (2.6mmole)의 17을 20ml의 CHCl_3 에 용해시킨 후 0.4ml (5mmole)의 2-chloroethylisocyanate를 가하여 실온에서 2시간 30분 동안 반응시켰다. 그리고 나서 감압농축하여 결정을 얻었으며 이 결정을 메탄올로 재결정하여 0.9g (70%)의 26을 얻었다. Rf: 0.56(A), 0.91(B) m.p: 228~230°C IR: 3350(NH), 2950, 1630 (urea >C=O) 1580, 1470, 1380, 1275, 1030 NMR (CDCl_3): $\delta\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})$ 3.30~3.70, $\delta\text{H}(\text{steroid})$ 0.65~2.0 $\delta\text{H}(\text{NH})$ 5.3

9. **N-(2-chloroethyl) nitrosocarbamoyl-3 β -amino-5 α -cholestane**(7) 0.7g (1.4mmole)의 11을 무수포름산 30ml에 용해시킨 후 -5°C 에서 NaNO_2 0.6g (8.7mmole)을 입자단위로 가한 후 3시간 동안 반응시켰다. 생성된 결정을 흡입 여과한 후 물로 세척하였다. 이 결정을 메탄올로 재결정하여 0.6g (87%)의 7을 얻었다. Rf: 0.87(A), 0.97(C) m.p: 129~130°C IR: 3390 (NH), 2950, 1715 (urea >C=O), 1520, 1480, 1380, 1160, 1080, 980 NMR: $\delta\text{H}(\text{CH}_2\text{-Cl})$ 4.0~4.2, $\delta\text{H}(\text{N-CH}_2)$ 3.3~3.9 $\delta\text{H}(\text{steroid})$ 0.63~2.0

10. **N-methylcarbamoyl-3 β -amino-5 α -cholestane**(12) 1g (2.6mmole)의 17을 15ml의 CHCl_3 에 용해시킨 뒤 0.3ml (5.1mmole)의 methylisocyanate를 가하여 상온에서 2시간 반응시켰다. 그리고 나서 감압농축시켜 생성된 결정을 메탄올로 재결정하여 0.95g(83%)의 12를 얻었다. Rf: 0.7(A), 0.75(B) m.p: 260~263°C IR: 3350(NH), 2950, 1635 (urea >C=O), 1580, 1460, 1380, 1260 NMR (CDCl_3): $\delta\text{H}(\text{N-CH}_3)$ 2.5~2.65, $\delta\text{H}(\text{steroid})$ 0.6~2.0 $\delta\text{H}(\text{NH})$ 4.6~5.0

11. **N-methylnitrosocarbamoyl-3 β -amino-5 α -cholestane**(8) 0.8g (1.8mmole)의 12를 빙초산 40ml에 용해시킨 후 -5°C 에서 0.7g (0.01mole)의 NaNO_2 를 입자단위로 가한 후 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 나서 묽은 NaOH 수용액으로 중화시킨 후 흡입여과하여 결정을 얻었다. 이 결정을 메탄올로 재결정하여 0.79g (82%)의 8을 얻었다. Rf: 0.92(A), 0.96(B) m.p: 139~141°C IR: 3380(NH), 2950, 1725, (urea >C=O) 1540, 1490, 1380, 1330, 1240, 1170, 1050, 1000, 980, 780, NMR (CDCl_3): $\delta\text{H}(\text{N-CH}_3)$ 3.2, $\delta\text{H}(\text{NH})$ 6.7, $\delta\text{H}(\text{steroid})$ 0.6~2.0

생물학적 항암 활성도 실험—合成한 nitrosourea 유도체 (7~10)와 urea유도체 (11~14)에 의한

Table I-Antitumor activities of the synthesized compounds.

Nitrosourea compound	ED ₅₀ (μ g/ml)	urea compound	ED ₅₀ (μ g/ml)
7	8.7	11	20.2
8	9.5	12	17.4
9	5.5	13	12.7
10	6.1	14	10.9

murine leukemia lymphoblast L1210 세포의 성장 억제 정도를 이미 보고된 방법¹¹⁾으로 측정하여 ED₅₀값을 NCI 방식에 따라 계산하였다. (Table I)

실험 결과 및 고찰

5 α -cholestan-3-one (15)과 NH₂OH·HCl 그리고 K₂CO₃를 메탄올과 물의 혼합용매에서 환류시켜 oximation 시켜서 5 α -cholestan-3-one oxime 18을 얻었다. IR 스펙트럼에서 출발물질 (15)에 있었던 카보닐 피이크(1,712cm⁻¹)가 없어지고 oxime의 >C=N 피이크와 OH피이크가 각각 1,650cm⁻¹와 3,270cm⁻¹에서 나타났다. oxime 18의 LiAlH₄ 환원은 입체적으로 장애를 적게받는 hydride 공격이 β -face (axial방향)로 공격하여 β -isomer (equatorial)가 지배적으로 많이 생성되었다. 그 이유는 첫째 hydride reduction의 입체화학이 속도론적으로 지배를 받으므로 안정한 전이상태를 가지는 β -isomer가 지배적으로 생성된다. 둘째로 β -amino기를 생성하는 경우는 전이상태에서 oxime의 -O-Al salt는 인접한 equatorial수소로부터 멀리 떨어져 있으므로 torsional strain이 작아지고 α -amino기의 경우는 전이상태에서 eclipsed conformation을 가지므로 torsional strain이 커져서 불안정하다.^{12,13)} 따라서 생성된 3 α -와 3 β -amino-5 α -cholestane의 생성비에 영향을 주게된다. 본 실험에서 3 β -amino isomer (17)와 3 α -amino isomer (16)의 생성비는 약 2:1이었다. IR 스펙트럼에서 출발물질에 있었던 oxime의 >C=N 피이크(1,650cm⁻¹)와 OH피이크(3,270cm⁻¹)가 각각 없어지고 3,400cm⁻¹에 NH피이크가 나타났다. 그러나 α -amino isomer와 β -amino isomer의 구별은 IR스펙트럼으로서는 거의 불가능하였고 NMR 스펙트럼으로써 α -와 β -isomer의 구조를 확인하였다. NMR 스펙트럼에서 NH₂ 피이크의 확인은 어려웠으므로 C₃의 proton의 피이크의 모양과 chemical shift로서 그 구조를 확인하였고 TLC의 Rf값으로써 간접적인 확인이 가능하였다. 첫째, 피이크의 모양으로서 α -와 β -isomer를 구별하였다. α -isomer He는 4개의 H와 vicinal의 관계에 있으며 각각의 dihedral angle은 60°이며 β -isomer에서 Ha는 4개의 H와 vicinal 관계에 있고 2개와는 180°, 다른 2개와는 60°의 dihedral angle을 가지고 있다. 따라서 β -isomer는 α -isomer 보다 큰 coupling constant를 가지므로 β -isomer의 C₃의 Ha는 α -isomer의 C₃의 He보다 더 broad한 피이크를 나타낼 것이므로 α -amino isomer와 β -amino isomer를 구별할 수 있었다. 둘째로, α -amino isomer와 β -amino isomer의 C₃의 proton의 chemical shift는 δ 3.2와 δ 2.6에서 각각의 피이크가 나타났다. 이러한 0.6ppm 정도의 chemical shift의 차이는 rigid한 six membered ring에서 equatorial proton이 axial proton보다 더 deshielding된다는 데에서 기인된다.¹⁴⁾ 왜냐하면 C₁~C₂와 C₁~C₆에서의 equatorial proton과 axial proton은 동일한 관계에 있지만 C₂~C₃ 결합 혹은 C₅~C₆ 결합의 cone에 있어서는 equatorial proton이 deshielding zone에 들어가기 때문이다. 본 실험에서도 C₃-axial proton이 δ 2.6에서 나타났고 C₃-equatorial proton이 δ 3.2인 0.6ppm

정도의 down field에서 나타남을 볼 수 있었다. 세제로, α -와 β -isomer는 TLC상에서 그 극성의 차이로서 구별할 수 있었다. TLC상에서 α -와 β -isomer는 항상 Rf 값이 크고 작은 두 개의 점으로 나타났다. 값이 큰 쪽이 α -amino isomer인데 그것은 α -amino기가 axial 위치에 있으므로 인접한 axial 수소에 의하여 입체장애를 많이 받으므로 SiO_2 와 수소결합을 형성하기가 β -isomer보다 더 어렵다. 그러므로 elution 과정에서 보다 빠른 속도로 elution 하게 되므로 큰 Rf값을 가지게 된다. 이와 반대의 이유로 β -isomer는 α -isomer보다 작은 Rf값을 가지게 된다.

α -amino isomer의 $-\text{NH}_2$ proton은 $\delta 1.5$ 에서 나타났으며 β -amino isomer의 $-\text{NH}_2$ proton은 약간 down field로 shift된 $\delta 1.7$ 에서 나타남을 볼 수 있었다. 이것은 앞에서 설명한 Ha와 He와의 관계와 동일하게 볼 수 있으므로 equatorial $-\text{NH}_2$ 가 axial $-\text{NH}_2$ 보다 약간 down field로 shift되었다고 생각되며 이러한 amino기의 proton 위치는 중수소교환으로써 확인할 수 있었다. 3α -amino-와 3β -amino- 5α -cholestane들은 무수 상태의 CHCl_3 용액에서 isocyanate ($\text{R}-\text{N}=\text{C}=\text{O}$, $\text{R}=\text{CH}_3$ 및 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$)와 반응시켜 별 부반응의 관찰 없이 합성 중간체인 N-alkylcarbamoyl- 3α -amino- 및 N-alkylcarbamoyl- 3β -amino- 5α -cholestane (11~14) 들을 좋은 수율로 얻었다. 이들 중간체들의 구조 결정은 IR과 proton NMR의 spectral data에 의거하여 완전히 결정할 수 있었다. 이들은 IR spectra에서 $1620\sim 1640\text{cm}^{-1}$ 사이에서 urea의 $\text{>C}=\text{O}$ stretching band가 관찰되고 $3350\sim 3420\text{cm}^{-1}$ 에서 NH stretching band가 특징적으로 관찰되므로 이들의 중요 작용기의 존재가 확인 되었다. 그리고 이들의 proton NMR은 이들 화합물의 구조와 완전히 일치하는 수소의 수와 coupling pattern을 보여주고 있다(실험부 참조). 이들의 특징을 보면 함유된 urea기의 2개의 NH수소들이 $\delta 5.98\sim 6.41$ 사이에 예상되는 splitting pattern으로 나타났으며 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ 의 2개의 methylene기는 예상되는 바와 같이 $\text{A}_2\text{B}_2\times$ type의 splitting pattern의 peak로 관찰 되었다. 그리고 2개의 NH peak는 D_2O 처리시 교환에 의해 사라졌다.

이들 합성된 urea 유도체 11~14들은 우리들이 목적하는 N-alkyl-N-nitrosocarbamoyl- 3α -amino- 및 N-alkyl-N-nitrosocarbamoyl- 3β -amino- 5α -cholestane (7~10)을 얻기위해 CH_3COOH 중에서 NaNO_2 를 조금씩 적가 하면서 nitrosation시켰다. nitrosation은 N-1과 N-3위치에 가능하므로 두 regioisomer의 생성이 예상되나 여기서는 N-3 위치에 nitrosation된 화합물 7~10만을 얻었다. 이는 N-1에 입체적으로 큰 cholestane moiety가 붙어있으므로 입체적으로 작은 N-3 위치에만 nitrosation이 이루어졌다고 보아진다. 최종생성물 N-nitrosourea유도체 7~10의 IR spectra를 중간체인 urea 유도체 11~14의 IR spectra와 비교 해 볼때 urea 유도체 11~14에서의 urea $\text{>C}=\text{O}$ peak가 양쪽 amine기에 의한 공명 효과에 의해서 $1620\sim 1640\text{cm}^{-1}$ 에서 관측된 반면 nitrosation후 그 peak가 $1700\sim 1725\text{cm}^{-1}$ 로 $80\sim 85\text{cm}^{-1}$ 정도 higher frequency쪽으로 shift됨을 관측하였다. 이는 NO기의 강력한 inductive 효과에 의하여 한쪽 amine 기의 공명 효과가 감소하기 때문인 것으로 설명된다. 그리고 이들의 proton NMR spectral data에서 중간체인 urea유도체 11~14의 것과 그에 해당하는 N-nitrosourea 유도체 7~10등과 비교하면 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ group에 의해 나타나는 2개의 methylene기의 peak는 NH와의 coupling으로 $\text{A}_2\text{B}_2\times$ type의 splitting pattern을 가진 반면 nitrosation후의 peak는 A_2B_2 type의 splitting pattern^{16,17)}을 가지고 chemical shift도 N에 치환된 NO기의 inductive 효과로 인해 $\text{NO}-\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Cl}$ 의 $-\text{N}-\text{CH}_2-$ 은 $\delta 3.33\sim 3.90$ 영역에서 약간 저자장에서 triplet으로 나타나며 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 도 다소 저자장 쪽으로 이동하여 $\delta 4.00\sim 4.20$ 에서 triplet으로 나타났다. 이러한 $\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Cl}$ 의 2개의 methylene peak의 coupling pattern의 변화 ($\text{A}_2\text{B}_2\text{X} \rightarrow \text{A}_2\text{B}_2$)와 chemical shift의 저자장 쪽으로의 이동은 nitrosation 반응에 있어서의 N-3 자리에

nitrosation되어 생성된 regioisomer의 구조 결정에 결정적인 뒷받침이 된다. 그리고 N=O로 치환 되지않은 N-H의 peak는 D₂O 처리시 교환으로 사라졌다. 합성한 urea유도체 11~14들과 N-nitroso urea 유도체 7~10 들의 항암활성도를 알아보기 위하여 이 화합물들에 의한 murine leukemia lymphoblast, L1210 암세포의 성장억제 정도를 측정하였다. 그 결과는 Table I에 요약하였다. N-nitroso urea 유도체의 항암활성도는 그 중간체인 urea 유도체보다 훨씬 크다. N-nitroso urea 유도체중 N-(2-chloroethyl)-N-nitrosocarbamoyl-3 α -amino-5 α -cholestane (9)과 N-methyl-N-nitrosocarbamoyl-3 α -amino-5 α -cholestane(10)의 ED₅₀ 값은 NCI 품질관리 한계인 1.7~7.7 (μ g/ml) 범위내에 들어가는 것으로 앞으로 상세한 항암효과를 검토해 볼 가치가 있는 것으로 고려된다.

문 헌

1. J.C. Kim & M.S. Kim, *Progr. Chem. Chem. Ind.* **23**, 460 (1983).
2. L.N. Owens, M.H. Benn and A.M. Creighton, *Cancer Res. Campaign. Annu. Rep.* **32**, 417 (1954).
3. T. Nogrady, K.M. Vagi and V.W. Adankiewicz, *Can. J. Chem.* **40**, 2126 (1962).
4. I. Niculescu-Duvaz, A. Chabbanis, and E. Tannauceanu, *J. Med. Chem.* **10**, 172 (1967).
5. M.E. Wall, G.S. Abernethy, Jr., F.I. Carroll and D.J. Taylor, *J. Med. Chem.* **12**, 810 (1969).
6. F.I. Carroll, A. Phillip, J.T. Blackwell, D.J. Taylor and M.E. Wall, *J. Med. Chem.* **15**, 1158 (1972).
7. H.Y.P. Lam, A. Begleiter, G.T. Goldenberg and C.M. Wong, *J. Med. Chem.* **22**, 200 (1979).
8. A.H. Eimasry, V.C. Braun, C.J. Nielson and W.B. Pratt, *J. Med. Chem.* **20**, 1134 (1977).
9. E.P. Vollmer, D.J. Taylor, I.J. Masnyk, D. Cooney, B. Levin, C. Piczak and L. Trench. *Cancer Chemother. Rep.* **4**, 103 (1973).
10. T. Suami, K. Takamo and W.T. Brander, *J. Med. Chem.* **22**, 314 (1979).
11. J.C. Kim, M.T. Park, Y.S. Koh, U.C. Yoon, S.H. Ryu, K.H. Moon and M.S. Kim, *Yakhak Hoeji*, **28**, 197 (1984).
12. M. Cherest, H. Felkin and N. Prudent, *Tetrahedron Lett.* 2199 (1968).
13. I. Klein, *Tetrahedron Lett.* 4307 (1973).
14. R.M. Silverstein, G. Clayton Bossler and T.C. Morrill, "Spectrometric Identification of Organic Compounds", 3rd ed. (New York, John Wiley and Sons, 1974), p. 168.
15. S.R. Koepke, R. Kupper and C.J. Micheida, *J. Org. Chem.* **44**, 2718 (1979).
16. T.P. Johnston, G.S. McCaleb, S.D. Clayton, J.L. Frye, C.A. Krauth and J.A. Montgomery, *J. Med. Chem.* **22**, 279 (1977).
17. A.M. Crider, R. Lamey, H.G. Floss and J.M. Cassady, *J. Med. Chem.* **23**, 849 (1980).
18. J.C. Craig, *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 3410 (1962).