

## Pteridine-C<sub>7</sub> Side Chain에서 2-탈아미노화와 2-Methyl기 치환에 따른 Aminopterin 중간체 합성에 관한 연구

俞義卿\* · 柳聖列

세종대학교 자연과학대학 화학과  
 (1992. 7. 21 접수)

### Studies on the Synthesis of the 2-Desamino and 2-Desamino-2-Methyl Analogues of Aminopterin intermediate at Pteridine-C<sub>7</sub> Side Chain

Euy Kyung Yu\* and Seoung Ryoull Ryu

Department of Chemistry, Se-jong University, Seoul 133-150, Korea

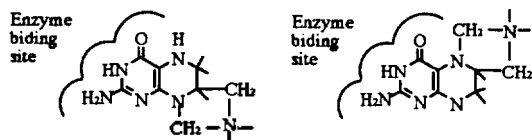
(Received July 21, 1992)

**요 약.** 2-Amino-3-cyano-6-chloromethylpyrazine으로부터 합성한 methotrexate(MTX) 중간 유도체의 모핵인 pteridine ring의 C<sub>2</sub>-amino 대신 H, CH<sub>3</sub>기 또는 nH<sub>2</sub>기로 치환된 화합물 (7a), (7b)와 (7c)를 두 단계에 걸쳐 합성하였다. 출발물질인 dibenzyl 4,4'-dithiobisbenzoate(12)와 2-amino-3-cyano-6-chloromethylpyrazine으로부터 합성한 2-amino-3-cyano-6-[(S-*p*-carbenzyloxyphenyl)thiomethyl]-pyrazine(14)화합물을 formamidine HCl, acetamidine HCl과 guanidine HCl 등과 각각 반응시켜 cyclization시키고, 이 화합물을 ethanol 용매하에서 0.2 N NaOH를 사용한 알칼리 가수분해로 pteric acid 유도체를 합성하였다.

**ABSTRACT.** A new series of 2-desamino, 2-desamino-2-methyl, and 2-amino analogues of aminopterin intermediates (7a), (7b), and (7c) were synthesized from 2-amino-3-cyano-6-chloromethylpyrazine. These derivatives were synthesized via two step sequence. Thus, cyclization of 2-amino-3-cyano-6-[(S-*p*-carbenzyloxyphenyl)thiomethyl]-pyrazine(14) with formamidine HCl, acetamidine HCl or guanidine HCl provided condensed compounds (15a), (15b) which upon base hydrolysis yielded the desired products (7a), (7b) and (7c).

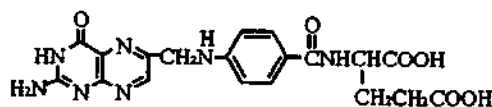
#### 서 론

Pteridine 핵을 가지고 있는 화합물들이 항암작용<sup>1</sup>, 항 malaria 작용<sup>2</sup>과 항균작용<sup>3</sup>이 있다는 것이 잘 알려져 있다. 그 중에서도 folic acid의 antagonist로써 1940년에 화학구조식이 밝혀진 aminopterin과 amethopterin(methotrexate : MTX)는 임상적

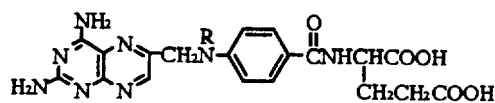


Scheme 1. Enzyme binding site of Folic acid.

으로 잘 알려져 있다.



1. Folic acid

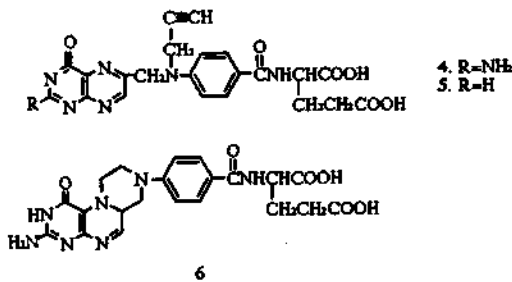


- 2. R=H : Aminopterin
- 3. R=CH<sub>3</sub> : Amethopterin  
(Methotrexate ; MTX)

Scheme 2. Structure of Folic acid and Methotrexate.

이 MTX는 one carbon transferring agent로 알려진 folic acid가 dihydrofolate reductase에 의하여 dihydrofolate가 되고 이는 다시 tetrahydrofolate로 환원된다. 이 화합물은 enzyme binding site로 알려진 2-amino-4-oxo(3H)pyrimidine과 구조식이 비슷한 2,4-diaminopyrimidine 구조를 가지고 있어서 경쟁적으로 enzyme active site에 결합하므로 folic acid의 작용을 저해하여 항암작용을 나타낸다고 밝혀졌다<sup>4</sup>.

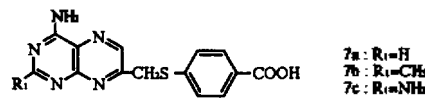
MTX는 Seeger<sup>5</sup>와 Montgomery<sup>6</sup> 등에 의하여 개발되어 S. Farber 등이 처음으로 항암제로 쓰기 시작했다. 그 후 Waller 등이 pteroylglutamic acid를 합성하였지만 이 Waller 반응은 불순물을 정제하는데 많은 어려움이 있었다. 그래서 많은 연구자들이 새로운 MTX의 합성방법을 시도하던 중 Taylor<sup>7</sup>와 Montgomery<sup>6</sup>가 합성법을 더욱 개선시켰다. 특히 Taylor는 6-formylpteridine<sup>8</sup>, 6-hydroxymethylpteridine과<sup>9</sup> pteridine 1-oxide는 중요하게 이용되고 있다. 또한 최근에 pteridine 모핵의 일부인 C<sub>2</sub>, C<sub>5</sub> 등을 변형하여 새로운 유도체들의 개발이 진행중이다<sup>11</sup>. 이러한 화합물 중 pteridine의 C<sub>2</sub>-amino기를 CH<sub>3</sub>기로 치환하였을 때 용해도가 증가되고 그리고 thymidylate synthetase(TS)의 inhibition나 tumor cells culture의 성장억제에 있어서도 MTX와 거의 같은 activity를 나타내고 있다<sup>12</sup>.



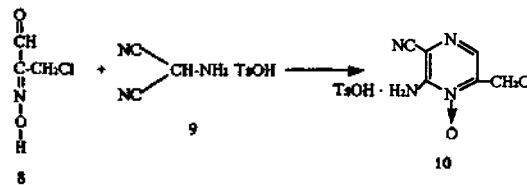
Scheme 3. The structure of N<sup>10</sup>-propargyl-5,8-di-deaza-folic acid.

본 연구에서는 자연계에서 산출되는 folic acid의 pteridine ring C<sub>6</sub>에 위치한 side chain을 C<sub>7</sub> 위치로 바꾸고 이 side chain의 *p*-amino benzoyl-L-glutamic acid 대신에 *p*-thiobenzoyl-L-glutamic acid를 치환시켜서 Methotrexate의 유도체를 합성하고 이들 화합물의 약효를 비교 검토해 보려고 연구를 시도

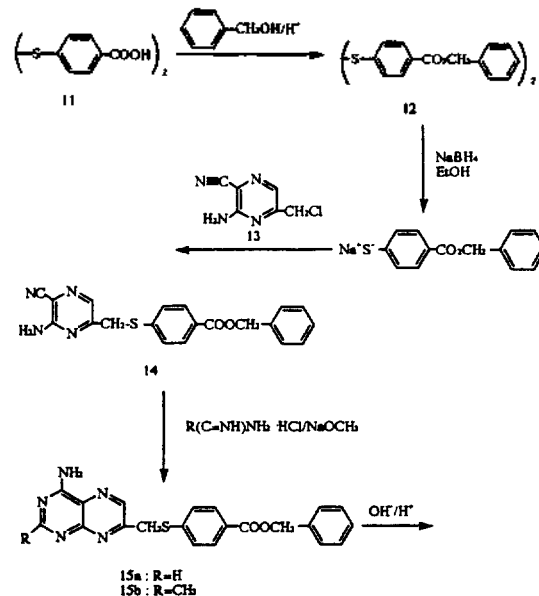
하였다. 즉 enzyme binding site인 2,4-diaminopyrimidine 핵을 가지고 있는 pteridine 모핵에서 C<sub>2</sub>-amino 대신 H로, 그리고 C<sub>2</sub>-amino 대신 화학구조식 및 분자량 크기가 비슷한 CH<sub>3</sub>기로 치환하여 중간 유도체를 합성하고 pteridine의 C<sub>2</sub> 위치에 amino기를 도입하여 이들을 서로 비교 검토하기 위하여



Scheme 4. The structure of designed Methotrexate derivatives.



Scheme 5. 2-Amino-3-cyano-6-chloromethylpyrazine 1-oxide의 합성경로.



Scheme 6. 4,4'-Dithiobisbenzoic acid을 이용한 2-desamino와 2-desamino-2-methyl pteric acid 유도체의 합성경로.

우선적으로 pterotic acid 유도체를 합성하였다.

본 연구에서 합성하고자 하는 화합물의 구조식을 살펴보면 Scheme 4와 같다.

## 실 험

**시약 및 기기.** 합성한 화합물을 확인하는데 사용한 기기로 적외선 분광기는 Perkin-Elmer 599B를 사용하였고, 핵자기 공명 분광기는 Varian Model T-60과 Bruker AM-400 FT-NMR를 사용하였다. 녹는점 측정은 Thomas Hoover model을 사용하였으며, 온도 보정은 하지 않았다. *p*-aminobenzoic acid는 Aldrich사의 제품을 사용하였다. acetamide HCl, formamide HCl 및 guanidine HCl 그리고 sodium ethoxide와 dimethyl formamide 등의 시약은 Tokyo Kasei사와 Aldrich사의 제품을 사용하였으며, 용매는 필요에 따라서 정제하여 사용하였다. 그리고  $\alpha$ -chloromethylaldehyde는 E. C. Taylor 등의 방법<sup>13</sup>으로 합성하였다.

### 합 성

**2-Amino-3-cyano-6-chloromethylpyrazine 1-oxidesolate의 (10) 합성.** J. P. Ferris 등의 방법<sup>14</sup>에 의해서 합성한 aminomalonalonitrile tosylate 화합물 (9) 10.7 g(0.04 mole)과  $\alpha$ -chloromethylaldehyde(8) 50.0 g을 ethanol 100 ml에 가하여 24시간 교반한 다음 생성되는 짙은 갈색용액을 감압 농축하였다. 여기에 물 100 ml를 가하고 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(50 ml × 3)로 추출한 다음 추출액을 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조하고 감압 농축하여 isopropyl ether을 가하여 생성된 결정화합물을 여과한 후 증류수, ethanol과 ether 순으로 씻어준 다음 건조하여 미세한 결정화합물 3.95 g을 얻었다.

수율: 26%

mp.: 236°C

IR(KBr)cm<sup>-1</sup>: 3440~3100(NH<sub>2</sub>), 2240(CN)

<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>) $\delta$ : 1.45(s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 4.36(s, 2H, -CH<sub>2</sub>Cl), 6.48(d, 2H, -C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-), 6.8(d, 2H, -C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-), 8.12(brs, 2H, NH<sub>2</sub>), 8.6(s, 1H, pyrazine C<sub>5</sub>-H)

**Dibenzyl 4,4'-dithiobisbenzoate(12)의 합성.** Campaigne과 Mayer방법<sup>15</sup>에 의해서 합성한 4,4'-dithiobisbenzoic acid(11) 1.53 g(0.005 mole)을 benzylalcohol 100 ml에 가하고 HCl(g)로 1.5시간 동안 ice-

bath 하에서 포화시키고 95~100°C에서 6시간 동안 가온 교반한 다음 냉각시켰다. 여기에 NaHCO<sub>3</sub> 포화용액을 가하여 pH 8로 조절한 다음 냉각하여 결정화합물을 석출시키고, 이를 감압여과하여 H<sub>2</sub>O로 씻어준 다음 건조하여 위의 화합물 1.62 g을 얻었다.

수율: 47%

mp.: 102~104°C

IR(KBr)cm<sup>-1</sup>: 3400(NH<sub>2</sub>), 3020(=C-H), 2220

(CN), 1750(C=O), 1636, 1457(C=C)

<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>) $\delta$ : 4.9(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 6.9(s, 5H, -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.1(d, 2H, S-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-), 7.5(d, 2H, S-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-), 7.5(d, 2H, S-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-)

**2-Amino-3-cyano-6-[(S-*p*-carbenzyloxyphenyl)thiomethyl]-pyrazine(14)의 합성.** Dibenzyl-4,4'-dithiobisbenzoate(12) 화합물 0.91 g(0.001 mole)을 ethanol 30 ml에 가하고 NaBH<sub>4</sub> 0.07 g(0.002 mol)을 소량씩 가한 다음 실온에서 환원하였다. 이어서 화합물(10)를 J. P. Ferris<sup>14</sup> 방법에 의해 deoxidation한 2-amino-3-cyano-6-chloromethylpyrazine(13) 0.31 g(0.002 mol)을 소량씩 가하고 실온에서 2시간동안 교반하여 생성된 고체 생성물을 여과한 후 증류수 및 ethanol과 ether 순으로 씻어준 다음 건조하여 위의 화합물 0.45 g을 얻었다.

수율: 90%

mp.: 168~170°C

IR(KBr)cm<sup>-1</sup>: 3420~3320(NH<sub>2</sub>), 2220(CN), 1710(C=O), 1625, 1585(C=C)

<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 4.2(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5.3(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-S), 7.29(s, 5H, CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.32(d, 2H, S-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-), 8.0(d, 2H, S-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-), 8.2(s, 1H, pyrazine C<sub>5</sub>-H)

**4-[[4-Aminopteridin-7-yl)methyl]thio]benzoic acid benzylester (15a)의 합성.** 화합물(14) 1.50 g(0.004 mole)과 formamide HCl 0.48 g(0.006 mole)을 DMF 15 ml에 가하여 용해한 다음 무수 ethanol 100 ml를 가하고 NaOEt 0.40 g(0.006 mole)을 가하였다. 이를 20시간동안 환류시킨 다음 감압 여과하여 감압농축시켰다. 그리고 증류수 50 ml를 가하여 생성된 고체 화합물을 여과하여 증류수 및 ether, ethanol 순으로 씻어준 다음 건조하여 위의 화합물 1.20 g을 얻었다.

수율 : 75%

mp. : 145~148°C

IR(KBr)cm<sup>-1</sup> : 3450~3310(NH<sub>2</sub>), 1710(C=O), 1620, 1540(C=C)

<sup>1</sup>H-NMR(CF<sub>3</sub>COOD)δ : 3.4(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-S), 4.3(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 6.4(s, 5H, -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 6.5(d, 2H, S-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-), 7.0(d, 2H, S-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-), 7.9(s, 1H, pteridine ring C<sub>2</sub>-H), 8.2(s, 1H, pteridine ring C<sub>6</sub>-H)

4-[[[(4-Amino-2-methylpteridin-7-yl)methyl]thio]benzoic acid benzylester(15b)의 합성. 화합물(14) 1.42 g(0.004 mole)과 acetamide HCl 2.95 g(0.003 mole)을 DMF 12 ml에 용해시키고 무수 ethanol 300 ml를 가하고, NaOEt 0.40 g(0.006 mole)을 가하여 화합물(15a)의 합성방법과 동일한 방법으로 위의 화합물 1.01 g을 얻었다.

수율 : 64%

mp. : 105~107°C

IR(KBr)cm<sup>-1</sup> : 3450~3310(NH<sub>2</sub>), 3100~3200(C=C-H), 2990~2989(C-H), 1710(C=O), 1620, 1550(C=O)

<sup>1</sup>H-NMR(CF<sub>3</sub>COOD)δ : 2.7(s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 4.3(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-S), 5.3(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.25(s, 5H, -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.3(d, 2H, S-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-), 7.8(d, 2H, S-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-), 8.9(s, 1H, pteridine C<sub>6</sub>-H)

4-[[[(4-Aminopteridin-7-yl)thio]benzoic acid(7a)의 합성. 화합물(15a) 1.10 g(0.003 mole)을 1.5 N NaOH-ethanol 혼합용액 100 ml에 가하고 질소기류하에서 5시간 동안 환류시켰다. 혼합용액에 활성탄을 가하여 약 15분간 교반한 다음 여과하였다. 여액을 냉각시킨 후 1 N HCl를 소량씩 가하여 pH 3.5로 조절하고 생성된 결정화합물을 원심분리하여 여과하였다. 이 용액을 2회에 걸쳐 증류수, CH<sub>3</sub>CN과 ether 순으로 씻어준 다음 건조하여 노란색 결정화합물 0.50 g을 얻었다.

수율 : 59%

mp. : 220°C

IR(KBr)cm<sup>-1</sup> : 3400(NH<sub>2</sub>), 2620(C-H), 1682(C=O), 1591(C=C)

<sup>1</sup>H-NMR(CF<sub>3</sub>COOD)δ : 4.4(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-S), 7.5(d, 2H, S-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-), 8.1(d, 2H, S-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-), 8.9(s, 1H, pteridine ring C<sub>2</sub>-H), 9.1(s, pteridine ring C<sub>6</sub>-H)

4-[[[(4-Amino-2-methylpteridin-7-yl)methyl]thio]benzoic acid(7b)의 합성. 화합물(15b) 1.0 g(0.003 mole)을 2 N NaOH-ethanol 혼합용액 100 ml에 가하고 질소기류하에서 6시간 동안 환류한 다음 화합물(7a)의 회수방법과 동일한 과정으로 위의 화합물 0.27 g을 얻었다.

수율 : 33%

mp. : 192°C

IR(KBr)cm<sup>-1</sup> : 3400(NH<sub>2</sub>), 2910, 2850(C-H), 1690(C=O), 1640, 1585(C=C)

<sup>1</sup>H-NMR(CF<sub>3</sub>COOD)δ : 2.7(s, 3H, pteridine ring C<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4.82(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-S), 7.4(d, 2H, -C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-), 8.1(d, 2H, -C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-), 8.8(s, 1H, pteridine ring C<sub>6</sub>-H)

4-[[[(2,4-Diaminopteridin-7-yl)methyl]thio]benzoic acid (7c)의 합성. 화합물(14) 1.42 g(0.004 mole)을 guanidine HCl 2.95 g(0.03 mole)을 무수 ethanol 300 ml에 가하고 NaOEt 0.40 g(0.006 mole)을 가하여 화합물(15a) 합성방법과 동일한 방법으로 합성한 다음 여과하여 불용물을 제거한 후 여액을 감압 농축하였다. 이어서 증류수 20 ml를 가하고 실온으로 냉각하여 0.1 N HCl 용액으로 중화하였다. 이 용액에 2 N NaOH-ethanol 100 ml를 가하여 질소기류하에서 5시간 동안 환류시키고 1 N HCl를 소량씩 가하여 pH 3.5로 맞춘다. 이 용액을 냉각한 다음 생성된 고체 화합물을 원심분리하여 여과하였다. 이 화합물을 2회에 걸쳐 증류수 및 CH<sub>3</sub>CN과 ether 순으로 씻어준 다음 건조하여 노란색 고체 화합물(7c) 0.35 g을 얻었다.

수율 : 28%

mp. : 240°C

IR(KBr)cm<sup>-1</sup> : 3560~3310(NH<sub>2</sub>), 1640(C=O), 1630, 1583(C=C)

<sup>1</sup>H-NMR(CF<sub>3</sub>COOD)δ : 3.6(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-S), 6.7(d, 2H, -C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-) (d, 2H, -C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-), (s, 1H, pteridine ring C<sub>6</sub>-H)

## 결과 및 고찰

합성. 각각의 신규 pteridine계 항암제 중간 유도체의 합성경로는 Scheme 5, 6에 나타내었다. 즉 pteridine계 항암제의 새로운 물질을 합성하기 위

하여 출발물질인 dibenzyl 4,4'-dithiobisbenzoate (12)를 2-amino-3-cyano-6-chloromethylpyrazine(13)과 coupling하여 중간체 화합물인 2-amino-3-cyano-6-[(S-*p*-carbenzyloxyphenyl)thiomethyl]pyrazine (14)를 합성하는 방법은 NaBH<sub>4</sub>에 의한 환원 반응으로 90%의 높은 수율로 합성하였다.

Pteridine 모핵의 C<sub>7</sub> 위치에 치환기를 갖는 pteric acid 유도체를 합성하기 위하여 화합물(4)를 formamide HCl, acetamide HCl과 반응시켜 pteridine의 C<sub>7</sub>에 side chain을 갖는 S<sup>10</sup>의 pteric acid benzyloxyester의 중간체인 (15a), (15b)를 합성하고, 이들 화합물을 가수분해하여 pteric acid 유도체 (7a), (7b)를 각각 59%, 33%로 얻었으며, 또한 화합물 (14)를 guanidine HCl과 결합시켜 pteric acid benzyloxyester를 만들고 이를 가수분해하여 pteric acid (7c)를 28%의 수율로 얻었다. 위와 같이 합성한 화합물은 pteridine 모핵의 C<sub>6</sub> 위치에 side chain을 갖는 pteridine계 항암제와의 약효상관관계를 고찰하기 위하여 합성하였다.

그리고 folic acid의 enzyme binding site인 2-amino-4-oxo(3H)인 pyrimidine 대신에 구조식이 비슷한 2-desamino와 2-desamino-2-methylpyrimidine의 pteridine 핵을 갖는 새로운 화합물 (7a), (7b)를 (7c)와 비교하기 위하여 이들 화합물들을 합성하였다. 또한 화합물 (7a), (7b), 그리고 (7c)에 L-glutamic acid를 결합시켜 MTX와 유사한 물질을 만드는 실험이 진행중에 있으므로 그 결과는 밀지 않는 시일내에 보고하려고 한다.

#### 인 용 문 헌

1. R. J. Schnitzer and F. Hawking, Ed., "Experimental Chemistry", Vol. IV, Part. I. Academic press, N. Y., 1966.
2. R. M. Prinder in "Medicinal Chemistry", 3rd ed., Part I, A. Brugere, Ed., Wiley Interscience, New York, pp. 492~521.
3. Maryam Ghazala, M. G. Nair, Y. Gaumont, and T. I. Kalam, *Med. Chem.*, **29**(7), 1263 (1986).
4. J. Jolivet, K. H. Cowan, G. A. Curt, N. J. Clendenium, and B. A. Chabner, *N. Engl. J. Med.*, **309**, 1094 (1983).
5. D. R. Seeger, J. M. Smith, and M. Hulquist, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2569 (1947).
6. J. R. Piper and J. A. Montgomery, *J. Het. Chem.*, **11**, 279 (1974).
7. E. C. Taylor, "Chemistry and biology of pteridine", proceeding of the forth International symposium on pteridine, Toba, 1969, International academic printing Co., Ltd., Tokyo, p. 70 (1979).
8. E. C. Taylor and K. Lenard, *Ann. Chem.*, **726**, 100 (1979).
9. E. C. Taylor and R. C. Rortnoy, *J. Org. Chem.*, **40**, 2347 (1975).
10. E. C. Taylor and P. A. Jacobi, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 4455 (1973).
11. M. G. Nair and Donna M. Edwards, *J. Med. Chem.*, **34**, 2746~2754 (1991).
12. L. R. Hughes, P. R. Marsham, J. Oldfield, and A. L. Jackman, *Proc. Am. Assoc. Cancer. Res.*, **29**, 286 (1988).
13. E. C. Taylor in "CHEMISTRY AND BIOLOGY OF PTERIDINE", p. 79. International Academic Printing Co., 1970.
14. J. P. Ferris, R. A. Sanchez, and R. W. Mancuso, *Org. Syn. Collectt.*, Vol. V, p. 32.
15. E. Campaigne and W. W. Mayler, *J. Org. Chem.*, **27**, 2835 (1962).