

Anticancer Agent인 Methotrexate에 대한 새로운 합성 연구

俞義綱* · 柳星列

세종대학교 자연과학대학 화학과
(1992. 7. 21 접수)

A New Synthetic Studies on Anticancer Agent Methotrexate

Euy Kyung Yu* and Seoung Ryuall Ryu

Department of Chemistry, Se-jong University, Seoul 133-150, Korea
(Received July 21, 1992)

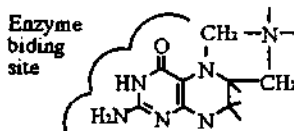
요 약. 새로운 methotrexate 중간체인 diethyl N-[4-[(2,4-diamino-6-yl)methyl]-amino]benzoyl]-L-glutamate(**10**)를 합성하기 위하여 *p*-nitrobenzoic acid를 chlorination한 다음 L-glutamic acid와 coupling하고 이를 esterification한 후, 환원과 methylation시켜 diethyl N-(4-methylaminobenzoyl)-L-glutamate(**7**)를 합성하였다. 이 화합물(**7**)을 DMF 존재하에서 NaH와 allyl chloride를 가하여 allylation한 다음 여기에 IN_3 addition 반응으로 diethyl-*p*-[N-(2-azido-3-iodopropyl)-N-methyl]aminobenzoyl-L-glutamate(**9**)를 합성하였다. 이 화합물(**9**)을 2,4,5,6-tetraaminopyrimidine hydrochloride와 cyclization시켜 methotrexate diethylester를 얻었다.

ABSTRACT. New synthetic method for diethyl N-[4-[(2,4-diamino-6-yl)methyl]-amino]benzoyl]-L-glutamate(**10**) which is an intermediate of methotrexate is described. *p*-Nitrobenzoyl-L-glutamate was obtained via a two-step sequence which involves condensation of *p*-nitrobenzoyl chloride with diethyl-L-glutamate and Fischer esterification reaction with ethanol. Reductive methylation of diethyl-*p*-nitrobenzoyl-L-glutamate were carried out by reaction with formic acid and paraformaldehyde in the presence of PtO_2 catalyst and yielded diethyl N-(4-methylaminobenzoyl)-L-glutamate(**7**). It was followed by allylation and iodoazidozation to give the diethyl-*p*-[N-(2-azido-3-iodopropyl)-N-methyl]aminobenzoyl-L-glutamate(**9**). The cyclization reaction of compound(**9**) with 2,4,5,6-tetraaminopyrimidine was carried out by intermolecular nucleophilic substitution to give the desired methotrexate diethylester.

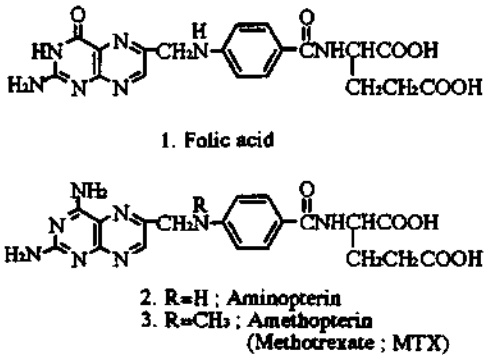
서 론

Folic acid의 antagonist로써 1940년초에 밝혀진 aminopterin과 일명 MTX라고 하는 methotrexate (amethopterin)는 임상에서 항암제로 잘 알려져 있으며 이러한 pteridine 핵을 가지고 있는 화합물들은 항암작용¹ 이외에 항 malaria작용² 등이 있는 것으로 알려졌다. 그 중에서도 특히 methotrexate는 Seeger³와 Montgomery⁴ 등에 의하여 합성되어 S. Faber 등에 의하여 처음으로 항암제로 쓰이기 시작하였으며, Lederle사에서 개발되어 현재 시판되는 methotrexate계 화합물들의 대부분을 차지하고 있다.

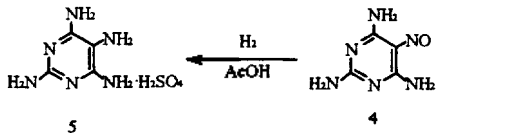
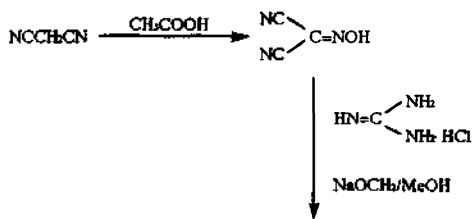
이 MTX는 항암효과와 중증의 천식환자에 효과가 있다고 보고되고 있으며⁵ 또한 최근에 MTX는 미국 암연구소(National Cancer Institute)에서 High Dose Methotrexate Treatment라는 새로운 치료법에 따라 종전의 1회 치료량 30~50 mg을 25 g까지 투여하여 좋은 효과를 거두고 있다. 이와 같이 주요



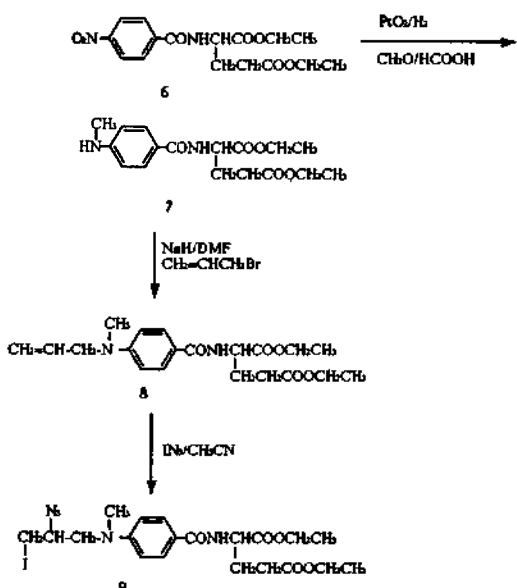
Scheme 1. Enzyme binding of folic acid



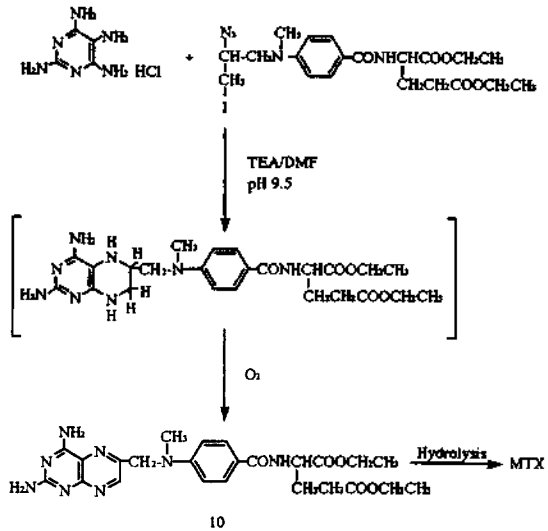
Scheme 2.



Scheme 3. 2,4,5,6-Tetraaminopyrimidine sulfate의 합성경로



Scheme 4. *p*-Nitrobenzoic acid를 이용한 N-Methylation과 Allylation에 따른 중간체 합성경로



Scheme 5. Cycloaddition에 의한 Pteridine의 합성경로.

량이 급증함에 따라 보다 경제적인 새로운 합성 방법이 요구되고 있다. 본 연구에서는 Montgomery 등의 방법과 Hassner⁶ 등의 방법을 이용하였다. 즉 olefine에 iodine azide를 첨가시키는 반응으로 이는 기하학적으로 선택적인 transaddition 반응을 일으켜 iodine은 primary carbon에 붙게 된다는 원리에 착안하여 tetraaminopyrimidine과 cycloaddition 반응을 시도하고자 한다. 본 연구에서 합성하고자 하는 화합물들의 합성경로는 다음과 같다.

실 험

시약 및 기기

시약은 Aldrich 제품을 그대로 사용하였고, 모든 용매는 일반 시판품을 재증류하거나 그대로 사용하였다. 융점 측정은 Thomas Hoover melting point apparatus를 사용하였으며 온도 보정은 하지 않았다. NMR은 Varian T-60과 Bruker AM-400 FT-NMR을 이용하였으며, infrared spectrum은 Bruker Co. IFS 66 FT-IR spectrophotometer을 사용하여 얻었다.

합 성

2,4,5,6-Tetraaminopyrimidine sulfate⁵(5)의 합성.
E. C. Taylor⁷ 등의 방법에 의해서 합성한 2,4,6-triamino-5-nitrosopyrimidine(4) 15.4 g(0.10 mole)을 AcOH 용액 60 ml에 가하여 용해시킨 다음 50 psi의

수소 가압하에 36시간 동안 반응시켰다. 여과하여 회수한 여액에 BaSO₄ 23.3 g(0.10 mole)을 증류수 50 ml에 용해한 수용액을 가하여 냉각하면 노란색 결정의 위의 화합물 11.0 g을 얻었다.

수율: 45%

mp.: 300°C

IR(KBr)cm⁻¹: 3490~3120(NH₂), 1645(C=C)

UV λ_{max}, nm(ε × 10⁻³), 0.1 N NaOH: 204~205, 270~275

Diethyl-*p*-nitrobenzoyl-L-glutamate(6)의 합성. K. Landsteiner와 E. Fisher 등의 방법⁹⁻¹¹에 의해서 합성한 *p*-nitrobenzoyl-L-glutamic acid 45.9 g(0.16 mole)을 무수 ethanol 150 ml에 용해시키고, ice-bath 하에서 HCl(g)을 1.5시간 동안 bubbling한 다음, 상온에서 5시간 동안 환류시키고 감압 농축하여 ice-bath 냉각하에서 14% NH₄OH 용액으로 pH 7로 조절하여 결정 화합물을 얻었다. 이를 증류수로 세척한 다음 CH₂Cl₂로 재결정하고 건조하여 위의 화합물 45.0 g을 얻었다.

수율: 75%

mp.: 90~92°C

Lit⁹: 91~92°C

IR(KBr)cm⁻¹: 3300(=N-H), 1720~1740(C=O), 1640(C=C), 1540(NO₂)

¹H-NMR(CDCl₃)δ: 1.3(m, 6H, 2-OCH₂CH₃), 2.2~2.4(m, 4H, -CH₂CH₂CO), 4.2(q, 4H, 2-OCH₂CH₃), 4.8(t, 1H, NH-CH=), 8.1(d, 2H, -C₆H₄-), 8.2(d, 2H, -C₆H₄-)

Diethyl N-(4-methylaminobenzoyl)-L-glutamate (7)의 합성. Acetic acid 20 ml에 diethyl-*p*-nitrobenzoyl-L-glutamate 10.0 g(0.03 mole)를 가하여 용해시킨 다음 formic acid 30 ml와 paraformaldehyde 10.0 g을 가하여 교반하면서 PtO₂ 0.6 g을 소량씩 가한 다음 45 psi의 수소 가압하에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응물을 여과하여 감압농축한 후 NH₄OH 용액으로 중화한 다음 냉각하여 결정 화합물을 여과하고 다시 MeOH로 재결정하여 위의 화합물 7.37 g을 얻었다.

수율: 79%

mp.: 139~141°C

IR(KBr)cm⁻¹: 3380(=N-H), 1740, 1722(C=O),

1630(C=C), 1625(CONH), 1500(C=C)

¹H-NMR(CDCl₃)δ: 1.2(m, 5H, 2-OCH₂CH₃), 2.3~2.6(m, 4H, -CH₂CH₂CO), 3.0(s, 3H, N-CH₃), 4.17(q, 4H, 2-OCH₂CH₃), 4.7(t, 1H, -NH-CH=), 6.6(d, 2H, -C₆H₄-), 7.6(d, 2H, -C₆H₄-)

Diethyl-*p*-(N-allyl-N-methyl)aminobenzoyl-L-glutamate(8)의 합성. Dry-DMF 25 ml에 diethyl N-(4-methylaminobenzoyl)-L-glutamate(7) 4.0 g(0.01 mole)을 가하고 NaH 1.2 g(0.05 mole)을 소량씩 20분간 가하였다. 이어서 allylchloride 2.9 ml(0.04 mole)을 가하고 80°C에서 6시간 동안 반응시킨 다음 여과하였다. 회수한 여액을 감압 농축한 후 증류수 100 ml와 CHCl₃ 200 ml를 가하여 층 분리한 다음 MgSO₄로 건조시키고 감압 농축하여 액상 화합물 3.79 g을 얻었다.

수율: 85%

KR(KBr)cm⁻¹: 3380(=N-H), 1740, 1722(C=O), 1630(C=C), 1625(CONH), 1520(C=C)

¹H-NMR(CDCl₃)δ: 1.2(m, 6H, 2-OCH₂CH₃), 2.1~2.6(m, 4H, -CH₂CH₂CO), 2.98(s, 3H, N-CH₃), 4.2(q, 4H, 2-OCH₂CH₃), 4.8~5.7(m, 5H, allyl), 6.5(d, 2H, -C₆H₄-), 7.85(d, 2H, -C₆H₄-).

Diethyl-*p*-[N-(2-azido-3-idopropyl)-N-methyl]aminobenzoyl-L-glutamate(9)의 합성. Acetonitrile 30 ml 용액에 sodium azide 4.34 g(0.01 mole)을 가하고 ice-bath 상에서 -5~0°C를 유지하면서 iodine monochloride 3.25 g(0.02 mole)을 가해 20분 동안 교반한다. 그리고 여기에 위에서 합성한 화합물(8) 4.34 g(0.01 mole)을 acetonitrile 30 ml에 용해시킨 용액을 15분 동안 소량씩 dropping한 다음 다시 같은 온도에서 30분 동안 교반하고 실온에서 15시간 동안 교반하였다. 냉각된 증류수 30 ml와 ether 90 ml를 사용하여 추출하고 5% sodium thiosulfate 수용액 40 ml를 가하여 다시 층 분리한 다음 Na₂SO₄로 건조시키고 감압 농축하여 위의 액상 화합물 4.30 g을 얻었다.

수율: 67%

IR(KBr)cm⁻¹: 3380(=N-H), 3030(=C-H), 2980, 2860(C-H), 2120(N₃), 1740, 1700(C=O), 1600, 1500(C=C)

¹H-NMR(CDCl₃)δ: 1.4(m, 6H, 2-OCH₂CH₃), 2.1~

2.9(m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.9(s, 3H, N- CH_3), 2.8~3.1 (d, 2H, $-\text{CH}_2\text{-I}$), 3.0~3.4(quin, 1H, $-\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$), 4.3(q, 4H, 2- OCH_2CH_3), 6.6(d, 2H, $-\text{C}_6\text{H}_4-$), 7.96 (d, 2H, $-\text{C}_6\text{H}_4-$)

2,4,5,6-Tetraaminopyrimidine과 **diethyl-*p*-[N-(2-azido-3-iodopropyl)-N-methyl]aminobenzoyl-L-glutamate(9)**의 cyclization에 의한 **pteridine(10)**의 합성. 2,4,5,6-tetraaminopyrimidine sulfate(5) 1.70 g (0.007 mole)에 증류수 100 ml를 가하고, 여기에 $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.74 g(0.007 mole)을 증류수 30 ml에 용해한 것을 가한 다음 질소기류 하에서 75°C로 1.5 시간동안 교반하였다. 이 용액을 여과하여 barium sulfate를 제거하고 여액을 감압 농축하고 DMF 30 ml를 가하여 다시 감압 농축한 다음 L-dysteine hydrochloride 1.12 g(0.007 mole)을 가하고 triethylamine을 가하여 pH를 9.5 이상으로 조절한다. 여기에 화합물(9) 3.90 g(0.007 mole)을 ether 100 ml에 용해시킨 용액을 소량씩 1시간 이상 dropping한 다음 -5~10°C에서 6시간 교반하였다. 다시 상온에서 24 시간동안 교반하고 40~50°C에서 1시간 반응시킨 다음 O_2 로 6시간 동안 bubbling하여 생성된 고체 화합물을 여과하고 증류수로 세척하여 무기염을 제거시켰다. 그리고 ether 및 ethanol 순으로 세척하고 건조시켜 짙은 노란색 고체 화합물을 얻었다. 이를 DMF 50 ml에 용해하여 불용성 물질을 여과하여 제거한 다음 여액에 황산탄을 가하여 탈색하였다. 여액을 감압 농축한 후 증류수를 가하여 30분간 교반하고 생성된 고체 화합물을 여과한 다음 증류수, ether와 ethanol 순으로 세척하고 P_2O_5 존재하에서 감압 건조하여 노란색 고체 화합물 1.0 g을 얻었다.

수율: 28%

mp: 201°C

IR(KBr) cm^{-1} : 3320~3190(=N-H), 1730(C=O), 1615~1600(C=O, ester C=O), 1620, 1450(C=C)
 ^1H -(CF_3COOD) δ : 0.8(m, 6H, 2- OCH_2CH_3), 1.6~2.0(m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 3.0(s, 3H, N- CH_3), 3.6~3.7(q, 4H, 2- OCH_2CH_3), 4.21(t, 1H, NH-CH=), 4.8 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-N=}$), 7.2~7.4(q, 4H, $-\text{C}_6\text{H}_4-$), 8.3(s, 1H, pteridine ring C₇)

UV λ_{max} , nm($\epsilon \times 10^{-3}$), 0.1 N NaOH: 257.55, 302, 372

Mass Spectrum: m/e(parent), 510

Analysis, calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_5$ (M. wt.: 510.61)

C, 56.45; H, 6.04; N, 22.39; O, 15.98

Found: C, 54.46; H, 5.95; N, 21.60

결과 및 고찰

합성. Methotrexate의 각 중간체에 대한 합성 경로는 Scheme 3~5에 나타냈다. 출발물질인 diethyl N-(4-methylaminobenzoyl)-L-glutamate(7)로부터 합성한 화합물(8)에 대한 IN_3 첨가반응은 수율이 높았다. Hassner⁶의 보고에 의하면 olefine 화합물의 NMR spectra에서 iodo group이 붙어있는 secondary carbon은 δ 3.9~4.1에서 azido group의 수소는 δ 3.2~3.5에서 나타났고, primary carbon에 붙어 있는 수소는 δ 3.1에서 나타났다. 앞에서 합성한 화합물(9)의 경우 terminal olefine에 IN_3 를 첨가한 반응에서 terminal carbon에 있는 수소는($-\text{CH}_2\text{-I}$) δ 2.9~3.1로 나타났으며 이는 보고된 값과 일치했다. 또한 N_3 group의 수소는 δ 3.0~3.4에 나타났다.

그리고 이 화합물(9)이 2,4,5,6-tetraaminopyrimidine hydrochloride와 반응하였을 때 pH 9.5의 염기성 조건하에서는 2,4,5,6-tetraaminopyrimidine의 더 염기성이 강한 $\text{C}_5\text{-NH}_2$ group이 좋은 이탈기인 N_3 와 결합된 탄소(C- N_3)와 반응하고 $\text{C}_6\text{-NH}_2$ group은 iodine과 결합된 methylene($-\text{CH}_2\text{-I}$)과 반응하여 tetrahydropteridine인 중간체를 생성하며 곧바로 공기중의 산소에 의해 산화되어서 diethyl methotrexate을 생성하게 된다. 그리고 부반응은 pH를 조절함으로 제거할 수 있으며, 염기성 조건하에서 얻어진 순수한 화합물의 NMR spectra를 보면 δ 8.3에서 C₇의 1H가 나타남을 알 수 있다. 만약 C₆의 1H 이라면 그보다 upfield인 δ 7.9 이하에서 나타날 것이다. 그러나, 반응과정중 iodoazidozation 반응후 회수과정시 분해반응으로 어려움이 많았으며 28.2%의 낮은 수득률을 얻었다.

또한 MTX를 합성하는 많은 제법들이 개발되고 있으나 가장 중요한 중간체인 화합물(7)은 methylation 반응에 있어서 dimethyl로 되는 어려움 때문에 여러 단계를 거쳐서 N-methylation을 시켰다. 그러나 본 연구에서는 formic acid와 paraformaldehyde

및 PtO_2 을 사용한 수소화반응으로 쉽게 methylation되는 새로운 방법을 개발하였다. 또한 allyl기에 IN_3 를 첨가하여 cyclization하는 Hassner의 방법을 MTX 합성에 적용하여 좋은 결과를 얻었다. 그러나 이 방법은 Montgomery 등의 방법에 비하여 크게 개선되었다고 보나 cyclization 반응의 수율이 기대에 미치지 못하는 결과이었다. MTX 합성 및 정제의 어려움 때문에 새로운 합성 방법이나 실험 조건이 개선되어야 한다고 생각되며 MTX를 만드는 새로운 실험이 진행중에 있으므로 그 결과도 빠른 시일내에 보고하고자 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. D. R. Seeger, D. B. Cosulich, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 1753 (1949).
4. J. A. Montgomery and Coworkers, International Pteridine Symposium V, Berlin (1975).
5. M. D. Brent and A. Blumenstein, *The New England Journal of Medicine*, **318**, 603 (1988).
6. F. W. Fowler, A. Hassner, and A. Levy, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**(9), 2077 (1967).
7. E. C. Taylor and C. C. Cheng, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 2442 (1959).
8. M. F. Mallette and E. C. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 1814 (1947).
9. K. Landsteiner, *Immunology*, **29**, 371 (1935).
10. David I. Weisblat, Barney Magerlein *et al.*, *U. S. Pat.*, **2**, 629, 733, Feb. 24 (1957).