Journal of the Korean Chemical Society
1994, Vol. 38, No. 7
Printed in the Republic of Korea

광학 활성 2-Amino-3-Phosphonopropionic Acid의 새로운 합성 방법과 그를 포함하는 펩티드의 합성

金相範* · 趙成基† · 韓貞植‡ · 金容駿 · 洪錫引
고려대학교 공과대학 화학공학과
†인제대학교 공과대학 화학공학과
‡한국화학연구소
(1994. 3. 15 접수)

Synthesis of Peptides Containing Optically Active 2-Amino-3-Phosphonopropionic Acid

Sang Bum Kim*, Sung Ki Cho†, Jeong Sik Han‡, Yong Joon Kim, and Suk-In Hong
Department of Chemical Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea
†Department of Chemical Engineering, Inje University, Kimhae 621-749, Korea
‡Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejeon 136-701, Korea
(Received March 15, 1994)

요 약. L-serine으로부터 광학 활성을 가지는 2-amino-3-phosphonopropionic acid를 새로운 방법으로 합성하였으며 2-amino-3-phosphonopropionic acid methyl ester를 아미노산과 축합시켜 광학 활성을 갖는 새로운 포스포노트리펩티드를 합성하였다.

ABSTRACT. New synthetic method of optically active 2-amino-3-phosphonopropionic acid from L-serine was developed and their phosphonotripeptides, phthalylglycylglycyl-2-amino-3-(diethylphosphono)-propionic acid methyl ester and phthalylglycyl-L-phenylalanyl-2-amino-3-(diethylphosphono)propionic acid methyl ester, were synthesized by coupling reaction of amino acids with 2-amino-3-phosphonopropionic acid methyl ester.

서 론

1959년 Horiguchi 등[1]이 양의 전위에 있는 *ciliated protozoa*에서 2-aminoethylphosphonic acid를 분리하여 생체내의 aminophosphonic acid의 존재를 최초로 확인한 이후 현재까지 약 26종의 탄소-인 화합물이 생체내에서 발견되었다[2].

탄소-인 화합물은 이것을 함유한 지질 혹은 당지질과 조계류막계의 기능, 신경기능관계와 생체막계의 온도, 영양 조건에 대한 적응 관계에 많은 흥미를 불러일으키고 있으나, 그의 생합성과 분해에 관한 메카니즘은 아직까지 확실하게 규명되지 않고 있으며, 현재로는 리피드 또는 아미노산과의 관계로부터 이의 메카니즘과 생체내의 역할을 밝히려는 연구가 진행되고 있다[3].

2-Aminoethylphosphonic acid와 2-amino-3-phosphonopropionic acid의 생합성은 생체에서 phosphonopyruvate의 분자내 재배열을 통해서 이루어지는 것으로 알려져 있으며 최근에는 aminophosphonic acid와 그 유도체들의 합성과 더불어 이들이 가지는 생물학적인 활성에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.

2-Amino-3-phosphonopropionic acid는 박테리아 성장을 촉진하고 L-glutamate의 흡수를 억제하는 강력한 신경흥분제 역할과 강한 제초력을 갖고 있음이 보고되고 있다[5~7].

2-Amino-3-phosphonopropionic acid의 합성 방

법으로는 Isbell 등[8]이 pyruvic acid와 acetamide로부터 50%의 수율로 합성한 이후 trialkylphosphonopyruvate를 sodium cyanohydridoborate와 암모니아로 환원시키는 법[9], catalytic exchange에 의한 방법 등[10]이 있으며 광학 활성을 가지는 2-amino-3-phosphonopropionic acid의 합성은 villanueva 등[11]의 ω-formylalkylphosphonate와 hydrogencyanide, (S)-(−)-α-methylbenzylamine에 의한 방법, Chun 등[12]에 의한 방법 등이 있다.

아미노포스폰산이 아미노산과 펩티드 결합을 통하여 생체내에서 단백질 구성 성분으로 존재할 가능성을 Quin[13]이 제안한 이래로, 아미노포스폰산을 포함하는 포스포노펩티드의 발견과 합성 및 생체내에서의 작용에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

포스포노펩티드는 구조적으로 아미노산의 카르복시기와 아미노포스폰산의 아미노기가 축합되어 P-터미널 포스포노펩티드와 아미노포스폰산의 포스폰산과 아미노산의 아미노기가 펩티드 결합을 가지는 C-터미널 포스포노펩티드의 두 가지 형태로 나눌 수 있다. P-터미널 포스포노펩티드는 페니실린, 세파로스포린 항생제와 마찬가지로 박테리아 세포벽 성분인 펩티도글리칸의 생합성을 저해하는 항생작용을 나타낸다[14~16]. C-터미널 포스포노펩티드는 펩티드 가수분해 효소에 대하여 강한 억제제로 작용하는 것으로 보고되어 있다[17].

본 연구에서는 광학 활성을 갖는 2-amino-3-phosphonopropionic acid의 새로운 합성 방법에 대한 연구와 포스포노펩티드의 구조 및 생물학적 활성과의 상관관계를 규명하기 위한 연구의 일환으로 L-serine을 출발 물질로 하여 새로운 방법으로 광학 활성을 갖는 2-amino-3-phosphonopropionic acid를 합성하였으며 아미노산과 축합시켜 광학 활성을 갖는 새로운 포스포노트리펩티드의 합성을 시도하였다.

실 험

시약 및 기기

반응에 사용된 시약중 L-serine(puriss급), triethyl phosphite(purum급), *N,N*-dicyclohexlycarbodiimide(puriss급), glycine(puriss급), L-phenylalanine (puriss급)은 Fluka제이며 diethylphosphite, *p*-toluenesulfonyl chloride는 Tokyo kasei제(G.R.급)이다. 용매는 1급시약을 사용하고 필요에 따라 재증류하였다.

녹는점은 Mettler F61mp apparatus(Orion Res. Inc.), 광학 활성도는 Autopol III automatic polarimeter, 핵자기공명 spectrum은 JNM-PMX 60NMR spectrophotometer, 적외선 분광 spectrum은 beckman acculab T.M.I. spectrophotometer, 원소분석은 Perkin-Elmer model 240을 사용하여 측정하였다.

출발 물질의 합성

L-serine methyl ester는 L-serine의 카르복실기를 메탄올과 염화수소 가스를 사용하여 만들었으며, phthalylglycylglycine과 phthalylglycyl-L-phenylalanine은 phthalic anhydride를 사용하여 아미노기를 보호시킨 후 acid chloride[15]법에 의해 펩티드를 합성하는 방법을 사용하였다.

L-2-Amino-3-chloropropionic acid methyl ester hydrochloriide(2)의 합성

L-serine methyl ester hydrochloride 15.55 g(0.1 mol)을 0℃ 에서 염화수소가스로 포화시킨 acetyl chloride 150 ml에 녹이고 PCl_5 23 g(0.11 mol)을 조금씩 가하고 실온에서 1시간 교반시켰다. 석유 에테르 100 ml를 넣어 침전된 결정을 여과한 다음 석유 에테르로 세척하고 무수 메탄올과 에테르로 재결정하여 흰색의 결정을 15.66 g(90%) 얻었다.

N,O-Ditosyl-L-serine methyl ester(3)의 합성

L-serine methyl ester hydrochloride 5 g(0.032 mol)을 *p*-toluenesulfonyl chloride 12.58 g(0.066 mol)에 혼합한 후 미리 냉각된 pyridine 10.34 ml을 −20~−30℃ 에서 신속하게 섞는다. 기계 교반기로 20분간 교반한 후 물중탕에서 5분간 가열하고 다시 −20℃ 에서 10분간 교반한다. 2 N 황산 50 ml를 첨가하고 약 10분간 교반하여 오일을 녹인 후 메탄올 50 ml를 첨가하여 결정을 만들었고 메탄올과 물로 재결정하여 9.6 g(70%)의 수득률로 얻었다.

^{1}H-NMR($CDCl_3$); δ(ppm) 7.8~7.2(m, 8H, $2\underline{C_6H_4}^-$), 4.1(d, 2H, $-O\underline{CH_2}CH$), 3.4(s, 3H, $-COO\underline{CH_3}$), 2.2(d, 6H, $2C_6H_4\underline{CH_3}$); IR(neat): 3400(N-H), 3010 cm^{-1} (aromatic), 1730 cm^{-1}(C=O); 원소분석: $C_{18}H_{21}NO_7S_2$; 측정치: C, 60.67%; H, 5.03%; N, 3.24%; 계산치:

C, 50.55%; H, 5.09%; N, 3.28%.

(−)-2-Amino-3-(diethylphosphono)propionic acid methyl ester(4)의 합성

Dean-stark trap이 장치된 100 m*l* 플라스크에 화합물(2) 3.4 g(0.02 mol)에 triethylphosphite 10 g(0.06 mol)을 서서히 적하하여 150℃에서 8시간 동안 환류시켰다. 반응이 끝난 액을 감압증발하여 관크로마토그래피(실리카겔, 초산에틸 : 클로로포름=1 : 1, R_f=0.1)로 분리한 후 과잉의 triethyl phosphite를 제거하여 점성이 있는 액체 3.1 g(65%)을 얻었다.

^{1}H-NMR($CDCl_3$); δ(ppm) 4.3~3.9(m, 5H, -CH-CH_2P(O)(OCH_2-)$_2$, 3.8(s, 3H, -COOCH_3), 2.5(d, 2H, -CHCH_2P(O)), 1.4(t, 6H, -P(O)(OCH_2CH_3)$_2$); IR (neat): 3300 cm^{-1} (NH_2), 1730 cm^{-1} (C=O), 1240 cm^{-1}(P=O), 1030 cm^{-1}(P-O); $[\alpha]_D^{20}$+43.4°(c5.3, CH_3Cl). 원소분석: $C_{15}H_{24}NO_7PS$; 측정치: C, 45.97%; H, 6.34%; N, 3.61%; 계산치: C, 45.80%; H, 6.15%; N, 3.56%.

2-(*N*-tosyl)amino-3-(diethylphosphono)propionic acid methyl ester(5)의 합성

질소하에서 20 m*l* 3구 플라스크에 나트륨 0.97 g (0.042 mol)을 무수 THF에 넣고 diethylphosphite 5.8 g(0.042 mol)을 적하한 후 8시간 교반하여 sodium diethylphosphate 용액을 만든 후 (3)번 화합물 5 g(0.0117 mol)을 무수 THF에 녹여 서서히 적하하면서 2시간 교반시킨다. 8시간 환류시킨 후 상온으로 식히고, 생긴 침전을 여과한 후 여과액을 감압증류하여 관크로마토그래피(실리카겔, 초산에틸 : 클로로포름=1 : 1, R_f=0.3)을 사용하여 분리하여 8.2 g(50%)의 수득률로 얻었다.

^{1}H-NMR($CDCl_3$); δ(ppm) 7.8~7.2(m, 4H, C_6H_4-), 4.3~4.0(m, 5H, -CHCH_2P(O)(OCH_2-)$_2$), 2.5(d, 2H, -CHCH_2-P(O)), 2.0(s, 3H, -COOCH_3), 1.4~1.1(t, 6H, -P(O)(OCH_2-CH_3)$_2$); IR(neat): 3400 cm^{-1}(N-H), 1730 cm^{-1}(C=O), 1240 cm^{-1}(P=O), 1030 cm^{-1}(P-O); 원소분석: $C_8H_{18}NO_5P$; 측정치: C, 40.33%; H, 7.31%; N, 5.73%; 계산치: C, 40.16%; H, 7.53%; N, 5.86%.

(−)-2-Amino-3-phosphonopropionic acid의 합성

화합물(4)로부터의 합성. (−)-2-Amino-3-phosphonopropionic acid methyl ester 1.2 g(0.005 mol)에 6 N 염산 20 m*l*를 가하여 24시간 환류시켰다. 이과한 후 다시 감압농축시켰다. 점성이 큰 무색의 잔유물을 에탄올 10 m*l*에 녹인 다음 더 이상 침전이 생기지 않을 때까지 propylene oxide를 가하였다. 침전된 흰색의 결정을 에탄올로 세척한 다음 건조시키고 물과 에탄올로 재결정하여 0.61 g(72%)을 얻었다.

^{1}H-NMR(D_2O); δ(ppm) 1.9~2.7(m, 2H, P-CH_2), 4.1~4.7(m, 1H, CH-COOH); IR(KBr): 3200~2000 cm^{-1}(OH, NH_3), 1730 cm^{-1}(C=O), 1240 cm^{-1}(P=O), 1030 cm^{-1}(P-O); $[\alpha]_D^{20}$ −24.8° (c1, 1N NaOH).

화합물(5)로부터의 합성. 화합물(5) 3.9 g(0.01 mol)에 브롬산 20 m*l*와 초산 1 m*l*를 가하여 12시간 환류시킨 후 위와 같은 방법으로 반응하여 0.38 g(45%)의 수득률로 얻었다.

^{1}H-NMR(D_2O); δ(ppm) 1.9~2.7(m, 2H, P-CH_2), 4.1~4.7(m, 1H, CH-COOH); IR(KBr): 3200~2000 cm^{-1}(OH, NH_3), 1730 cm^{-1}(C=O), 1240 cm^{-1}(P=O), 1030 cm^{-1}(P-O); $[\alpha]_D^{20}$ −22.4° (c1, 1N NaOH).

광학 활성을 가지는 2-amino-3-(diethylphosphono) propionic acid를 포함하는 tripeptide의 합성

Phthalylglycylglycyl-2-amino-3-(diethylphosphono)propionic acid methyl ester(7a)의 합성. 화합물(4) 0.13 g(0.54 mmol)과 phthalylglycylglycine 0.14 g(0.54 mmol)과 DCC 0.123 g(0.6 mmol)을 무수 THF 13 m*l*에 넣고 triethylamine 0.1 m*l*를 첨가한 후 실온에서 20시간 교반하였다. 40% 초산 수용액 1.8 m*l*를 첨가하여 다시 2시간 교반시킨 후 3회 여과하였다. 여액을 감압농축하고 클로로포름 40 m*l*에 녹여 포화 중탄산 칼슘수용액 60 m*l*로 2회, 물로 2회 각각 세척한 후 $MgSO_4$로 건조시키고 감압농축하여 0.11 g(42%)을 얻었다.

^{1}H-NMR($CDCl_3$); δ(ppm) 7.8(s, 4H, phthalyl기의 방향족 수소), 4.3~4.0(m, 5H, -CH_2P(O)(OCH_2-)$_2$), 2.5(d, 2H, -CHCH_2P(O)), 2.0(s, 3H, -COOCH_3), 1.4~1.1(t, 6H, -P(O)(OCH_2CH_3)$_2$); IR(KBr); 3400 cm^{-1}(N-H), 1730 cm^{-1}(C=O), 1240 cm^{-1}(P=O), 1030 cm^{-1}(P-O); $[\alpha]_D^{20}$ +45.5°(c3, $CHCl_3$); 원소분석: $C_{20}H_{26}N_3O_9P$; 측정치: C, 49.85%; H, 5.36%; N, 8.33%; 계산치: C, 49.60%; H, 5.41%; N, 8.68%.

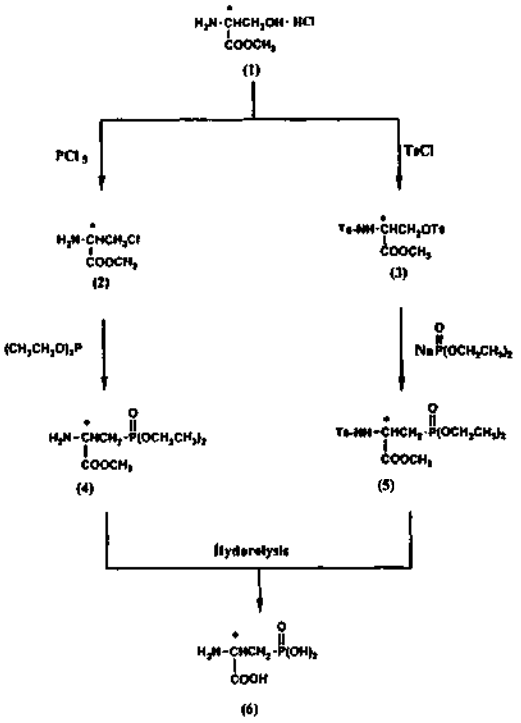
Phthalylglycyl-L-phenylalanyl-2-amino-3-(di-

ethylphosphono)propionic acid methyl ester(7b)의 합성. 화합물(4) 0.13 g(0.54 mmol)과 phthalylglycyl-L-phenylalanine 0.16 g(0.54 mmol)과 DCC 0.123 g(0.6 mmol)을 무수 THF 14 ml에 넣고 triethylamine 0.1 ml를 첨가한 후 위와 같은 방법으로 반응하여 0.1 g(35%)의 수득률로 얻었다.

^{1}H-NMR($CDCl_3$); δ(ppm) 7.8~7.2(m, 8H, phthalyl기의 방향족 수소, C_6H_4-), 4.3~4.0(m, 5H, -CH $CH_2P(O)(OCH_2-)_2$), 2.5(d, 2H, $-CHCH_2P(O)$), 2.0(s, 3H, $-COOCH_3$), 1.4~1.1(t, 6H, $-P(O)(OCH_2CH_3)_2$); IR(KBr): 3400 cm^{-1}(N-H), 1730 cm^{-1}(C=O), 1240 cm^{-1}(P=O), 1030 cm^{-1}(P-O); $[\alpha]_D^{20}$ +12.5°(c2.1, $CHCl_3$); 원소분석: $C_{27}H_{32}N_3O_9P$; 측정치: C, 56.73%; H, 5.75%; N, 7.31%; 계산치: C, 56.54%; H, 5.62%; N, 7.33%.

결과 및 고찰

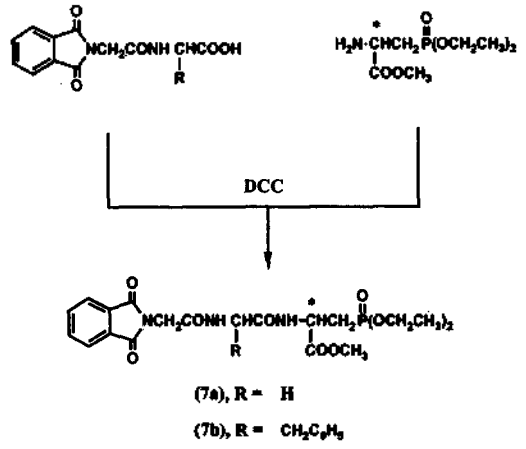
광학 활성을 가지는 2-amino-3-phosphonopropionic acid(6)는 다음의 *Scheme* 1과 같이 합성하였다.



Scheme 1. Synthesis of (−)-2-amino-3-phosphonopropionic acid.

L-serine methyl ester(1)로부터 phosphorous 화합물을 도입하기 위하여 알코올을 할로겐화시켜 alkylhalide로 만든 다음 triethylphosphite를 약 160℃에서 phospholylation시키는 방법과 알코올과 아민을 tosylate로 각각 보호한 후 sodium diethylphosphite와 반응시켜 phospholylation시키는 방법을 사용하였다. 화합물(2)는 화합물(1)을 오염화인으로 염소화시켜 얻었으며 아민과 알코올이 tosyl기로 보호된 화합물(3)은 출발 물질(1)을 유기 염기로 피리딘을 사용하여 *p*-toluenesulfonyl chloride와 −20℃에서 반응시켜 얻은 오일상의 생성물을 메탄올로 결정화하고 메탄올과 물로 재결정하여 65%의 수득율로 얻었다. Phospholylation에서 aminophosphonate(4)는 염소화 화합물(2)를 Arbuzov 반응으로 triethylphosphite와 반응시켜 생성되는 ethyl chloride를 제거하고 미반응의 triethylphosphite는 감압증류시켜 얻었다. Sodium diethylphosphite를 tosylate 화합물(3)과 반응시켜 침전으로 나온 sodium tosylate를 제거하고 tosylaminophosphonate(5)를 얻었다.

위와 같이 얻어진 aminophosphonate(4)는 아민을 제외한 나머지 작용기는 모두 보호되어 있기 때문에 아민으로의 펩티드 결합이 가능하고 아민이 tosyl기로 보호되어 있는 화합물(5)는 염기를 사용하여 카



Scheme 2. Synthesis of optically active phosphonotripeptides.

르복실의 보호기를 선택적으로 제거하여 카르복실 쪽으로의 펩티드 결합이 가능하다. 화합물(4), (5)는 가수분해하여 각각 광학 활성도가 $[\alpha]_D^{20}$ −24.8°(c1, 1N, NaOH), $[\alpha]_D^{20}$ −22.4° (c2, 1N, NaOH)인 2-amino-3-phosphonopropionic acid를 합성하였다.

포스포노펩티드를 합성하기 위하여 *Scheme* 2에서 보는 바와 같이 축합제로 DCC를 사용하여 phthalylglycylglycine, phthalylglycyl-L-phenylalanine과 aminophosphonate(4)를 반응시켜 **7a**와 **7b**를 각각 42%, 35%의 수득률로 얻었다.

결 론

L-serine methyl ester를 출발 물질로 하여 광학 활성을 가지는 2-amino-3-phosphonopropionic acid를 두 가지의 새로운 방법으로 합성하였으며, 2-amino-3-phosphonopropionic acid methyl ester와 phthalylglycylglycine, phthalylglycyl-L-phenylalanine을 축합제로서 DCC를 사용하여 광학 활성의 2-amino-3-phosphonopropionic acid 부분을 가지고 있는 phthalylglycylglycyl-2-amino-3-(diethylphosphono)propionic acid methyl ester, phthalylglycyl-L-phenylalanyl-2-amino-3-(diethylphosphono) propionic acid methyl ester를 합성하였다.

인 용 문 헌

1. Horiguchi, M.; Kandatsu, M. *Nature* **1959**, *184*, 901.
2. Alhadeff, J. A.; Davies, G. D. *J. Biochem.* **1970**, *9*, 4866.
3. Hoigychi, M. *Biochem. Biophys. Acter.* **1967**, *261*, 102.
4. Trebst, A.; Geike, F. *Z. Natureberschy* **1967**, *22*, 989.
5. Tamari, H.; Horiguchi, M.; Kandatsu, M. *J. Gen. Appl. Microbiol* **1977**, *23*, 49.
6. Vincent, S. R.; McGeor, E. G. *J. Pharm. Pharmacols.* **1979**, *31*, 703.
7. Bernard Bioulac, *Gen. Pharmaceu* **1979**, *10*, 121.
8. Chambers, J. R.; Isbell, A. F. *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 832.
9. Varlet, J. M.; Collignon, N. *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 3216.
10. Holden, J. T.; Van Balgooy, J. N. A.; Kittredge, J. S. *J. Bacteriol.* **1968**, *96*, 950.
11. Villanueva, J. M.; Ni Collignon; Guy, A. Ph. Savignac, *Tetrahedron* **1983**, *39*, 1299.
12. Chun, Y. J.; Oh, G. M.; Cho, S. K.; Kim, Y. J. *J. Kor. Chem. Soc.* **1990**, *34*, 646.
13. Quin, *Science* **1964**, *144*, 1133.
14. Allen, J. S.; Atherton, F. R.; Hall, M. J.; Hassall, C. H.; Holmes, S. W.; Lambert, R. W.; Nisbert, N. J.; Ringos, P. S. *Nature* **1978**, *272*, 56.
15. Nida, T.; Tsuruoka, T.; Shomura, T.; Kondo, Y.; Ogawa,; Watanabe, Y. H.; Kanagawa, S.; Watanabe, T.; Igarashi, H. *Ger. Offen* **1973**, 22, 36, 599.
16. Bayer, E.; Gugal, K. H.; Hagele, H.; Hagenmaier, H.; Jessipow, S.; Konig, W. A.; Zahner, H. *Helv. Chim. Acta* **1972**, *55*, 224.
17. Elliot, R. L.; Marks, N.; Berg, M. J.; Portoghese, P. S. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1208.