

P2Y₁ 수용체 길항제로서의 옥세타노신 카보 유도체의 설계 및 합성

김 혜 옥*

경인여자대학 산업환경공학부

(Received April 26, 1999)

Design and Synthesis of Carbo Analog of Oxetanocin Bisphosphate Derivative as P2Y₁ Receptor Antagonist

Hea Ok Kim

*Division of Industrial Environment and Environmental Engineering Kyungin Women's College
Incheonsi Gyeyanggu, Gyesandong 548-4, Korea*

Abstract — In order to develop selective and competitive antagonist at the P2Y₁ receptor a carbocyclic oxetanocin bisphosphate derivative (7) was synthesized as a bioisostere of the lead, MRS 2179. The synthesis was started from ketene diethylacetal (1) and completed in 6 steps.

Keywords □ Carbo analog of oxetanocin bisphosphate, P2Y₁ receptor antagonist, anticoagulant, N⁶-methyl-2'-deoxy-3',5'-bisphosphate (MRS 2179).

아데노신이 세포외에서 세포간의 메시지를 전달하는 물질로 작용한다는 것은 이미 오래전부터 알려진 사실이다. 이 물질을 리간드로 하는 퓨린수용체는 크게 P1과 P2의 두 부류로 분류된다. 각각의 리간드로서 P1 수용체는 아데노신이, P2 수용체는 아데노신의 인산염이 작용한다. P1 수용체는 다시 리간드에 대한 친화력, 발현부위등에 따라 A₁, A₂, A₃ 수용체로 나뉘고, P2 수용체는 기능에 따라 이온채널인 P2X 수용체와 G-protein 매개 수용체인 P2Y 수용체로 분류된다. 특히 P_{2Y} 수용체는 리간드의 종류에 따라 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₇ 수용체로 다시 나뉘며 이들은 모두 사람, 양, 쥐등의 DNA로부터 클론되었다.

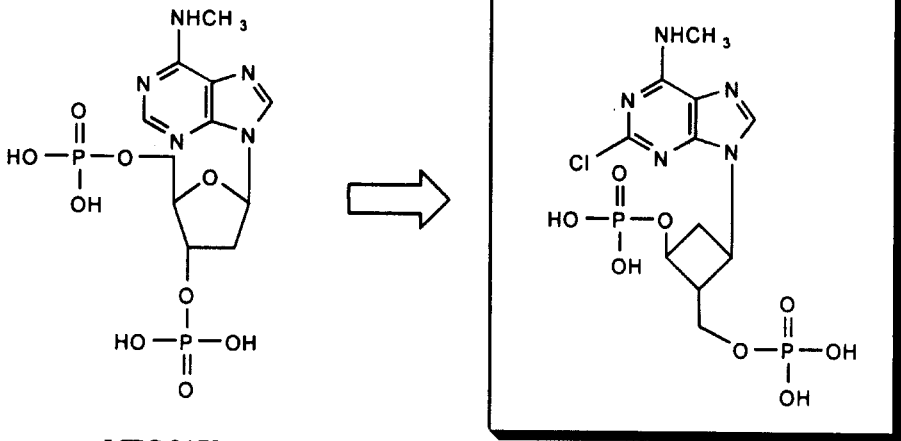
사람의 P2Y₁ 수용체는 사람의 뇌, 전립선, 난소등에서 최근 클론되었고 사람의 크로모솨 3에 P2Y₁ gene 이 위치함이 밝혀졌다.^{1,2)} P2Y₁ 수용체는 심장, 골격근, 다양한 내장근, 혈소판등에 존재한다. P2Y₁ 수용체의 흥분제는 phospholipase C를 활성화시켜 phosphatidyl

inositol 4, 5-bisphosphate를 분해하여 inositol phosphate와 diacylglycerol을 생성한다. 이 수용체가 활성화되면 응집을 일으키므로 선택적인 P2Y₁ 수용체 길항제는 항응혈제로 개발될 가능성이 있다.

리간드에 관한 연구인 Boyer등의 연구에 의하면 sulfotransferase효소의 조효소인 adenosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate(A3P5PS or PAPS)와 PAPS의 대사물인 adenosine-3',5'-bisphosphate(A3P5P or PAP)는 둘다 칠면조적혈구막상의 P2Y₁ 수용체에 대해 부분적 흥분제였으며 K_B값이 μM 농도에서는 둘다 칠면조와 사람의 P2Y₁ 수용체에 대해 상경적 길항제임이 밝혀졌다.

또한 최근 N⁶-methyl-2'-deoxy-adenosine-3',5'-bisphosphate(Fig. 1, MRS 2179)가 P2Y₁ 수용체에 대해 선택적이며 상경적 길항제(K_B=102 nM)로서 발견됨³⁾에 따라 칠면조의 적혈구세포막을 이용하여 수용체에 대한 친화력과 선택성을 높여 방사성 리간드를 개발하기 위한 목적으로 구조-활성 상관관계가 연구되었다.⁴⁾ 이 연구에 의하면 P2Y₁ 수용체에 대하여 친화력을 갖는 데는 N6위치의 아미노기 대신 메칠아미노 치환기

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 032-540-0173 (팩스) 032-552-4109



MRS 2179

Fig. 1 – Structures of MRS 2179 and the designed compound.

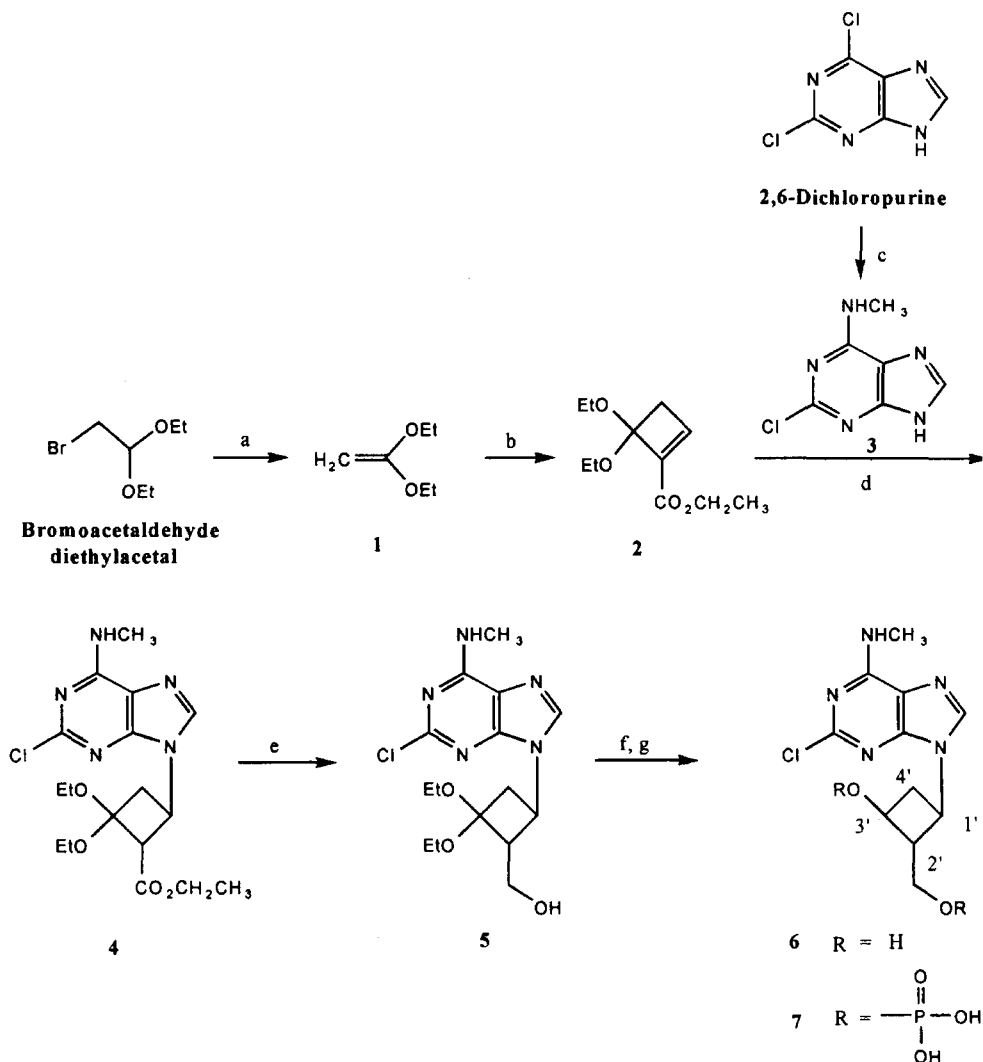
(N⁶-NHCH₃)를 가지고, 아데닌 염기의 2번위치에 Cl 등의 치환기를 도입하여 그 선택성을 높일 수 있음이 밝혀졌다. 또 다른 연구⁵⁾에 의하면 뉴클레오사이드의 당부분의 산소를 탄소로 치환하였더니 수용체에 대해 친화력을 보였으나 길항작용이 없어졌다. 또한 당을 6탄당으로 바꾸었더니 오히려 P2Y₁ 수용체에 대하여 potentiator의 작용을 나타내었으므로 이와같은 실험결과에 바탕을 두어 당의 크기를 줄인 oxetanocin유도체에 산소를 탄소로 치환한 Fig. 1과 같은 옥세타노신 비스포스페이트 유도체의 carbo analog를 설계하고 그 합성을 시도하였다.

실험방법

화합물의 구조는 핵자기공명(¹H-NMR) 스펙트라에 의해 결정되었으며 이는 Varian Gemini-300FT 분광광도계를 이용하였다. 따로 언급이 없는 한 tetramethylsilane을 내부표준물질로 하여 화학적 이동(chemical shift)은 δ단위로 coupling constant는 Hz로 나타내었다. 합성중간체들은 화학적 이온화 질량분석법에 의하여 JEOL SX102질량 분석기로 측정하였다. EI mode는 VG7070F 질량분석기를 이용하였다. 박층 크로마토그래프(TLC)는 silica gel(Kieselgel 60F254, Merck)을 사용하였고, 칼럼 크로마토그래피는 silica gel(Kieselgel 60, 230~400 mesh, Merck)를 사용하였다. 필요한 시약은 Aldrich Chemical Co.에서 구입하였다.

Ketene diethylacetal(1)의 합성 - Ketene diethylacetal은 bromoacetaldehyde diethylacetal과 potassium *tert*-butoxide를 섞은 후 110°C의 욕조에서 증류시켜 얻었다.⁶⁾ 상세히 기술하면, Vigreux column 증류장치가 달린 100 mL two neck 둥근바닥 플라스크에 bromoacetaldehyde diethylacetal(19.71 g, 0.1 mol)과 potassium *tert*-butoxide(11.22 g, 0.1 mol)를 실온에서 질소기류하에 가하였다. 반응으로부터 생성되는 부산물인 *tert*-butanol을 65~70°C/진공(욕조온도 110°C)에서 반응용기로부터 증류하여 내면서 반응을 진행시켰다. *tert*-butanol의 발생이 멈추었을 때 욕조온도를 120~140°C로 올려 반응혼합물로부터 목적물인 ketene diacetal을 85~95°C/20 mmHg에서 얻었다. 이 화합물은 공기중의 수분에 매우 민감하여 흰색고체의 중합체를 형성하므로 질소기류하에서 저온상태로 보관하였다. ¹H NMR(CDCl₃) δ 1.18~1.35(m, 6 H, 2 × CH₃), 3.09(s, 2 H, CH₂=), 3.83(q, 4 H, 2 × CH₂).

3,3-Diethoxy-2-(ethoxycarbonyl)cyclobutene(2)의 합성 - 둥근바닥 플라스크에 화합물 1(3.28 g, 28.2 mmol)과 ethyl propiolate(3 mL, 30.1 mmol)를 무수 디클로로메탄(25 mL) 용매 하에 혼합하여 넣고 이 혼합물을 질소기류하에서 28시간동안 욕조온도 50°C로 가열하였다. 반응후 혼합물을 회전증발기로 농축시켜 그 잔류물을 빠른 증류로 분리하여 화합물 2를 51°C/0.09 torr에서 무색의 액체로 얻었다. ¹H NMR(CDCl₃) δ 1.22(t, J=7.1Hz, 3 H, OCH₂CH₃), 1.29(t, J=7.1Hz, 3 H, OCH₂CH₃), 2.67(d, J=1.3Hz,



Reagents: a) KO^tBu; b) HC≡C-COOEt, CH₂Cl₂, 50°C; c) 40%CH₃NH₂ in H₂O, 100°C; d) DBU, DMF, room temperature; e) LiAlH₄, THF, 0°C; f) acetone, HCl, room temperature; g) NaBH₄, MeOH, 0°C

Scheme 1 - A synthetic route to (±)-2-chloro-9-[(1α,2β,3α)-3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)cyclobutyl]-N⁶-methyl-adenine-2',3'-bisphosphate (7).

2 H, -CH₂-), 3.67-3.78(m, 4 H, 2 × OCH₂CH₃), 4.22 (q, J=7.1Hz, 2 H, COOCH₂CH₃), 7.15(t, J=1.3 Hz, CH=); low resolution mass spectrum(CI) m/e 215 (MH⁺).

2-Chloro-N⁶-methyladenine(3)의 합성⁸⁾ - 압력밀폐 용기에 2,6-dichloropurine(1.38 g, 7.3 mmol)과 40% methylamine 수용액(12 ml)을 가하고 밀폐하여 100°C로 1시간동안 가열하였다. 고체생성물을 여과하고 여과된 고체를 소량의 냉수로 세척하여 건조시켜 화합물 **3**(1.25 g, 94%)을 얻었다. ¹H NMR(DMSO-d₆) δ

2.91(br s, 3 H, CH₃), 7.90(br s, 1 H, NH), 8.09 (s, 1 H, H-8), 13.07(br s, 1 H, NH).

(±)-2-Chloro-9-[(1α,2β)-3,3-diethoxy-2-(ethoxycarbonyl)cyclobutyl]-N⁶-methyladenine(4)의 합성 - 3,3-Diethoxy-2-(ethoxycarbonyl)cyclobutene(**2**, 1.07 g, 5.0 mmol)과 2-chloro-N⁶-methyladenine(**3**, 0.66 g, 3.6 mmol)을 무수DMF(21 ml)에 녹이고 0°C로 한후 질 소기류하에서 DBU(0.536 ml, 3.58 mmol)을 가했다. 반응혼합물을 실온에서 18시간 교반시키고 용매를 회전증발기로 농축, 제거시켰다. 그 잔류물을 클로로포름

(30 mL)에 녹인후 포화 탄산수소나트륨용액을 가하고 세게 흔든 뒤 두층을 분리했다. 아래층을 포화 염화나트륨용액으로 씻고 무수 황산나트륨을 넣어 건조시키고 고체를 여과제거후 여과액을 회전증발기로 농축시켰다. 그 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피(Hx: EtOAc, 5:1 → 3:1 → 1:1 → 1:3)로 분리하여 화합물 4(1.1 g, 77%)를 흰색고체로 얻었다. $R_f=0.24$ (Hx: EtOAc, 1:1), 0.27(CHCl₃:MeOH, 20:1) ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.19(t, $J=6.8$ Hz, 3 H, CH₃), 1.26(t, $J=6.8$ Hz, 3 H, CH₃), 1.28(t, $J=6.8$ Hz, 3 H, CH₃), 2.79(dd, $J=12.4, 8.8$ Hz, 1 H, -CH_{2a}-), 2.96(dd, $J=12.4, 8.8$ Hz, 1 H, -CH_{2b}-), 3.18(br s, 3 H, NHCH₃), 3.50(m, 2 H), 3.67(m, 1 H), 3.82(m, 1 H), 3.98(d, $J=7.8$ Hz, 1 H), 4.20(m, 2 H), 5.15(dt, $J=8.8$ Hz, 1 H), 6.00(br s, 1 H, NH), 7.81(s, 1 H, H-8); low resolution mass(CI) m/e 398 (MH⁺).

(±)-2-Chloro-9-[(1α, 2β)-3,3-diethoxy-2-(hydroxymethyl)cyclobutyl]-N⁶-methyladenine(5)의 합성 - 무수 THF(15 mL)에 화합물 4(1.04 g, 2.5 mmol)를 녹이고, 0°C로 한 후 질소 기류하에서 1.0M LiAlH₄의 THF 용액(4.03 mL, 4.03 mmol)을 가했다. 반응 혼합물을 0°C에서 1시간 20분동안 교반하여 반응시킨 후, 물(0.2 mL), 5M NaOH 용액(0.2 mL), 물(0.2 mL)을 순서대로 가하여 반응을 종결시켰다. 반응 혼합물을 20분간 격렬하게 교반한 후 고체를 여과, 제거시키고 그 여과액을 회전증발기로 농축시켰다. 농축 후 남은 흰색 고체를 물(0.5 mL)과 클로로포름(30 mL)에 녹이고 수층을 클로로포름(3×30 mL)으로 추출하였다. 합한 추출액을 포화 염화나트륨용액으로 씻고 무수황산나트륨으로 건조시킨 뒤 여과, 여액을 회전증발기로 건조될 때까지 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피(CHCl₃:MeOH, 20:1)로 분리하여 화합물 5(833 mg, 90%)를 흰색고체로 얻었다. $R_f=0.21$ (CHCl₃:MeOH, 20:1) ¹H NMR(DMSO-d₆) δ 1.15(t, $J=6.0$ Hz, 3 H), 1.17(t, $J=6.0$ Hz, 3 H), 2.49(m, 1 H), 2.81(dd, $J=11.7, 8.8$ Hz, 1 H), 2.91(d, $J=2.9$ Hz, 3 H, NHCH₃), 3.10(m, 1 H), 3.33~3.61(m, 5 H), 3.72(m, 1 H), 4.34(dt, $J=8.8$ Hz, 1 H), 8.21(br d, $J=2.9$ Hz, 1 H), 8.29(s, 1 H, H-8); ¹H NMR(CDCl₃) δ 1.22(t, $J=7.1$ Hz, 3 H, CH₃), 1.24(t, $J=7.1$ Hz, 3 H, CH₃), 2.57(ddd, $J=12.7, 7.8, 1.5$ Hz, 1 H), 3.01(m, 2 H), 3.20(br s, 3 H, NHCH₃),

3.44~3.61(m, 4 H), 3.74(br s, 1 H), 3.91(m, 1 H) br s, 4.00(m, 1 H), 4.67(dt, $J=8.5, 7.8$ Hz, 1 H), 6.03(br s, 1 H, NH), 7.84(s, 1 H, H-8); low resolution mass (CI) m/e 356 (MH⁺).

(±)-2-Chloro-9-[(1α, 2β, 3α)-3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)cyclobutyl]-N⁶-methyladenine(6)의 합성 - 화합물 5(833 mg, 2.34 mmol)을 아세톤(117 mL)에 녹이고 1N HCl(22 mL)을 천천히 가한후 반응혼합물을 실온에서 2일간 교반했다. 아세톤을 회전증발기로 반응물로부터 제거한 후 5N NaOH로 중화시켰다. 에틸 아세테이트(3×30 mL)로 추출하고 합한 유기층을 포화 염화나트륨용액으로 씻은 후 무수황산나트륨으로 건조, 여과, 농축후 정제되지 않은 케톤을 흰색고체로 얻었다. $R_f=0.15$ (CHCl₃:MeOH, 20:1) ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 2.5(m, 1 H), 2.92(s, 3 H, NHCH₃), 3.46(ddd, $J=17.8, 8.8, 2.2$ Hz, 1 H), 3.61~3.79(m, 2 H), 4.16(m, 1 H), 5.05(t, $J=4.4$ Hz, D₂O로 치환됨, 1 H, OH), 5.20(dt, $J=8.6, 6.8$ Hz, 1 H), 8.30(br s, 1 H, NH), 8.41(s, 1 H, H-8); low resolution mass (CI) m/e 282 (MH⁺).

위에서 얻은 케톤을 무수 메탄올(45 mL)에 녹이고 0°C로 한후 여기에 NaBH₄(177 mg, 4.68 mmol)을 3번에 나누어 가했다. 반응혼합물을 0°C에서 1시간동안 교반하여 반응시켰다. 아세톤(2 mL)을 가하여 반응을 종결시키고 20분간 교반한 후 반응혼합물을 농축시켰다. 그 잔류물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피(CHCl₃:MeOH, 10:1)로 분리하여 화합물 6(350 mg, 53%)을 흰색고체로 얻었다. $R_f=0.23$ (CHCl₃:MeOH, 10:1) ¹H NMR(DMSO-d₆) δ 2.20(m, 1 H, H-4' a), 2.72(dt, $J=10.8, 7.3$ Hz, 1 H, H-1'), 2.82(m, 1 H, H-4' b), 2.90(s, 3 H, NHCH₃), 3.55(m, 2 H, CH₂OH), 3.82(m, 1 H, H-3'), 4.26(dt, $J=8.1, 8.8$ Hz, 1 H, H-2'), 4.69(t, $J=4.0$ Hz, D₂O로 치환됨, 1 H, OH), 5.29(d, $J=6.4$ Hz, D₂O로 치환됨, 1 H, OH), 8.18(br s, D₂O로 치환됨, 1 H, NH), 8.27(s, 1 H, H-8); low resolution mass (CI) m/e 284 (MH⁺). ¹³C NMR(CD₃OD-d₄) δ 28.119, 38.560, 45.535, 57.606, 62.010, 63.319, 141.313, 120.273, 151.228, 155.759, 157.634.

Phosphorylation method of compound 6 - 뉴클레오사이드 화합물 6(0.1mmol)과 proton sponge (0.5 mmol)의 혼합물을 상온에서 진공하에 잘 건조시켜

trimethyl phosphate(2 mL)과 섞는다. 온도를 0°C로 한후 POCl₃(0.3 mmol)을 가하고 1시간 반응시킨다. 반응완결여부는 HPLC(0.1M triethylammonium acetate(TEAA) : CH₃CN=95:5→40:60 gradient, 20분, 유속 1 mL/min; 칼럼은 SMT OD-5-60 RP-C18; 검출기는 UV E_{max}=260~300 nm)를 사용하여 확인한다. triethylammonium bicarbonate(2 mL)와 물(3 mL)을 가하여 반응을 끝내고, 반응혼합물을 동결건조시킨다. Sephadex DEAE A-25 resin의 칼럼(이동상은 0.5M ammonium bicarbonate의 0.01~0.5M linear gradient)으로 bisphosphate를 분리한후 동결건조시켜 약간 불순한 bisphosphate(7)을 얻었다. 이 화합물을 더 순수하게 분리하기 위해 preparative HPLC를 행하였으며 그 조건은 반응완결여부를 확인하기 위한 조건과 같았다. 순수한 fraction을 모아 동결건조시킨후 여러번 반복동결건조로 triethylammonium acetate를 제거하여 순수한 화합물 7을 얻었다.

실험결과 및 고찰

목적하는 화합물(7)의 합성은 scheme 1에 보여지는 것처럼 ketene diethylacetal(1)⁶로부터 시작하여 6 단계를 거쳐 완성되었다. bromoacetaldehyde diethylacetal에 KOH를 가하여 110°C에서 가열하여 얻은 ketene diethylacetal(1)을 습기에 닿지 않도록 주의하여 ethyl propiolate와 [2+2]cycloaddition반응시켜 화합물 2를 얻었다. 이 화합물의 구조는 ¹H NMR로 cyclobutene의 methylene이 triplet으로 나타남으로써 확인하였다. 2, 6-dichloropurine의 6번 위치의 염소 치환기를 메틸아민과 친핵성 치환반응시켜 2-chloro-N⁶-methyladenine⁸을 94%의 높은 수득률로 얻을 수 있었다. 이렇게 얻어진 핵산염기를 화합물 2와 Michael addition 반응시켜 축합된 화합물 4를 77%의 수득률로 얻었다. 이 축합반응에서 1'위치의 핵염기와 2'의 에스테르기가 *trans*체인 원하는 화합물을 입체선택적으로 형성하였다.

화합물 4의 에스테르를 LAH로 환원시켜 1급알콜 화합물인 5를 얻었다(90%). 이때 반응온도를 0°C로 함으로써 핵산염기의 2번 염소 치환기가 보존된 화합물을 대부분 얻었으며, 극미량의 염소치환기가 환원된 화합물도 검출되었다. 화합물 5의 ethyl ketal을 아세트론으로 산촉매하에서 *trans*ketalization시켜 ketone화합

물을 얻고, 이 ketone화합물에 NaBH₄를 반응시켜 2급알콜 화합물인 6을 입체선택적으로 얻었다. 이 화합물의 stereochemistry는 hydride ion이 2-chloro-N⁶-methyladenine 때문에 화합물의 아래쪽 방향에서 carbonyl group을 공격하여 결정되었다.

화합물 6의 구조를 확인하기 위하여 ¹H NMR study를 하였다. DEPT 135를 통하여 탄소의 위치를 확인하고, homoCOSY 결과로부터 proton의 커플링을 통하여 수소의 위치와 개수를 확인하고 cyclobutyl ring치환기의 상대적인 stereochemistry를 확인하였다.

위에서 합성된 carbocyclic nucleoside의 diol 6은 POCl₃ 방법으로 phosphorylation시켜³⁾ bisphosphate(7)을 합성하였으며 현재 P2Y₁ 수용체에 대한 친화력 등 생물학적 작용을 검색중에 있다.

Phosphorylation반응의 확인은 P³¹-NMR로 하였으며 bisphosphate의 형성여부는 두 개의 P의 peak가 0근 처임으로 확인하였다. bisphosphate의 형성은 diphosphate형성에 비해 용이하였다.

감사의 말씀

이 논문의 완성을 위해 많은 조언을 해주신 Dr. Kenneth A. Jacobson(NIDDK, NIH, USA)에게 깊은 감사를 드리며, 또한 화합물 6의 구조확인을 위해 협조해주신 건국대학교 응용생물화학과의 임용호 박사님에게 감사드립니다.

문헌

- 1) Janssens, R., Communi, D., Piroton, S., Samson, M., Parmentier and M., Boeynaems, J. M. Cloning and tissue distribution of the human P2Y₁ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **221**(3), 588 (1996).
- 2) Ayyanathan, K., Webbs, T. E., Sandhu, A. K., Athwal, R. S., Barnard, E. A. and Kunapuli, S. P. Cloning and chromosomal localization of the human P2Y₁ purinoceptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**(3), 783 (1996).
- 3) Camaioni, E., Boyer, J. L., Mohanram, A., Harden, T. K. and Jacobson, K. A. Deoxyadenosine bisphosphate derivatives as potent antagonists at P2Y₁ receptors. *J. Med. Chem.* **41**, 183 (1998).
- 4) Nandan, E., Camaioni, E., Jang, S.-Y., Kim, Y.-C.,

- Cristalli, G., Herdewijin, Tiwari, K. N., Mohanram, A., Harden, T. K., Boyer, J. and Jacobson, K. A. Structure-activity relationships of bis-phosphate nucleotide derivatives as P2Y₁ receptor antagonists and partial agonist. *J. Med. Chem.* in press.
- 5) Boyer, J. L., Mohanram, A., Camaioni, E., Jacobson, K. A. and Harden, T. K. Competitive and selective antagonism of P2Y₁ receptors by N⁶-methyl-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate. *British J. Pharmacol.* **124**, 1 (1998).
- 6) Ketene Diethylacetal, *Org. Synth.* Vol 3, p506. b) Beyerstedt, F. and McElvain, S. M. The Preparation and Properties of Ketene Diethylacetal. *J. Am. Chem. Soc.* **58**, 529 (1936).
- 7) Semmelhack, M. F., Tomoda, S., Nagaoka, H., Boettger, S. D. and Hurst, K. M. Synthesis of Racemic Fomannosin and illudol using a Biosynthetically Patterned Common Intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 747 (1982).
- 8) Montgomery, J. A. and Holum, L. B. Synthesis of Potential Anticancer Agents. XI. N^{2,6}-Alkyl Derivatives of 2,6-Diaminopurine. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 404 (1958).