

# 抗肿瘤药物的研究

## III. 含氨基酸的氮芥磷酰胺衍生物的合成

宋維良 侯双洲 赵翰飞 楊靖华 贾效先

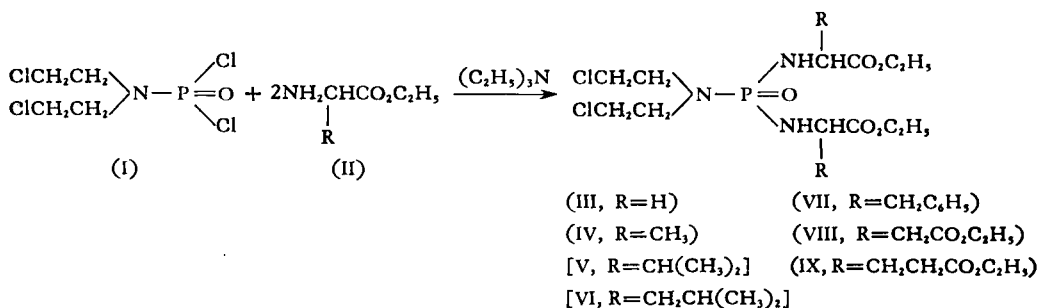
(中国医学科学院药物研究所, 北京)

**提要** 以 N-磷酰氨基酸为载体而形成的氮芥磷酰胺衍生物,可能具有较好的抗肿瘤专属性。双-( $\beta$ -氯乙基)氨基磷酰二氯(I)与二当量的甘、丙、缬、亮、苯丙、天冬及谷氨酸乙酯(II)缩合,生成相应的 N,N-双-( $\beta$ -氯乙基)-N',N''-二-(乙氧羰甲基)磷三酰胺衍生物(III);与当量的丝氨酸乙酯(X)缩合时生成环状衍生物,2-双-( $\beta$ -氯乙基)氨基-4-乙氧羰基-四氢-1,2,3-氧磷氮茂,2-氧化物(XI)。这类化合物经动物实验有显著的抗肿瘤活性。

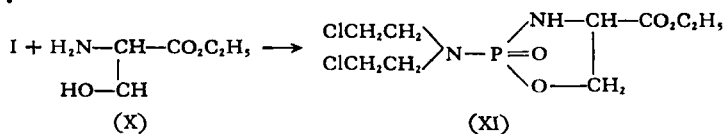
Gomori<sup>[1]</sup> 曾报告恶性肿瘤有较高的磷酰胺酶活性。为证实肿瘤组织与正常组织的这一差异, Friedman 及 Saligman<sup>[2]</sup> 合成了几个磷酰胺酶的底物,并推测如果 Gomori 的观察正确,那么含有细胞毒的适当底物就可能在肿瘤组织中借较高的磷酰胺酶活性进行水解,释放出细胞毒,从而达到肿瘤化学治疗的效果。后来, Arnold 等<sup>[3,4]</sup> 制备了环状氮芥磷酰胺衍生物,找到环磷酰胺(endoxan)在体外活性很低,但经体内代谢后显出很高的抗肿瘤生物活性。关于环磷酰胺的药理作用机制尚未十分确定<sup>[5-7]</sup>,但可以认为它是属于借酶活化的潜伏性药物<sup>[8]</sup>。Arnold<sup>[9]</sup> 根据大量氮芥磷酰胺衍生物的抗肿瘤筛选结果,认为在这类化合物中,磷酰丙醇胺或丙醇胺的磷酰酯环是这类氮芥药物的有效载体。近来 Friedman 等<sup>[10]</sup> 报告的几个对动物肿瘤有效的氮芥磷酰胺衍生物也具有磷酰丙醇胺结构。

生物的天然代谢物可能更适于作为潜伏性药物的具有专属性的载体。Christensen<sup>[11]</sup> 指出,艾氏腹水癌细胞中的甘氨酸浓度可能比细胞间液中的甘氨酸浓度高到 12 倍, Quastel 等<sup>[12]</sup> 报告甘氨酸-1-C<sup>14</sup> 并入肿瘤及胚胎组织的速度远较并入正常组织的速度快。此外,溶肉瘤素(Sarcolysin)<sup>[13,14]</sup> 是以苯丙氨酸为载体的氮芥衍生物。因而本文作者设想以氨基酸作为氮芥磷酰胺衍生物的载体,有可能改进这类化合物对肿瘤组织的专属性,并增高其治疗指数<sup>[15]</sup>。在我们工作进行中, Казьмина 等<sup>[16]</sup> 报告了丝氨酸及其二肽的氮芥磷酰胺衍生物的合成, Vagi 等<sup>[17]</sup> 报告了以糖为载体的氮芥磷酰胺衍生物。这些著者表示了和我们类似的设计思想。

双-( $\beta$ -氯乙基)氨基磷酰二氯(I)与两当量的甘、丙、缬、亮、苯丙、天冬和谷氨酸乙酯(II)在三乙胺存在下于惰性有机溶剂中进行反应,生成相应的 N,N-双-( $\beta$ -氯乙基)-N',N''-二-(乙氧羰甲基)磷三酰胺衍生物(III—IX)。



在反应中也可用过量的氨基酸乙酯代替三乙胺。等当量的 I 和丝氨酸乙酯(X)用上述条件反应时,生成环状衍生物, 2-双-(β-氯乙基)氨基-4-乙氧羰基-四氢-1,2,3-氧磷氮茂, 2-氧化物(XI)。



所制备的缩合产物列于表 I。化合物 III、VII、IX 为性质稳定的白色固体, 化合物 IV—VI、VIII 和 IX 为无色或浅柠檬色油状物, 在室温或冰箱中放置逐渐变色变质。

动物筛选结果, 表明化合物 III、VII—IX 及 XI 均有明显的抗肿瘤作用, 其详细情况由

表 1

代 号	R	熔点, °C 或 折射率	产率 %	分子式	元 素 分 析							
					计 算 值, %				分 析 值, %			
					C	H	N	Cl	C	H	N	Cl
III	H	88—90	80	$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_5\text{P}$	36.75	6.17	10.71	18.11	36.71	6.40	10.80	18.00
IV	CH <sub>3</sub>	$n_D^{20}$ 1.4819	88	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_5\text{P}$	40.01	6.71	10.00	16.88	36.49	6.34	10.57	18.15
V	$\text{CH} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$n_D^{20}$ 1.4800	53	$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_5\text{P}$	45.37	7.64	8.82	14.88	39.30	6.78	9.49	16.42
VI	$\text{CH}_2\text{CH} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$n_D^{20}$ 1.4766	63	$\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_5\text{P}$	47.62	8.00	8.33	14.06	44.96	7.62	8.20	15.50
VII	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	113—115	25	$\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_5\text{P}$	54.55	6.36	7.34	12.39	46.73	8.13	8.28	14.48
VIII	CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	$n_D^{20}$ 1.4800	85	$\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_5\text{P}$	42.56	6.43	7.45	12.56	54.22	6.17	7.04	12.75
IX	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	85—86.5	49	$\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_5\text{P}$	44.59	6.81	7.09	11.97	42.70	6.50	7.35	12.70
									44.49	6.78	7.01	12.36
									44.38	7.03	6.87	12.40
XI		$n_D^{20}$ 1.4971	74	$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$	33.87	5.37	8.78	22.22	34.06	5.74	8.60	22.95
									34.27	5.67	8.32	22.97

药理工作者另文发表。化合物 IV—VI 因性质较不稳定,未进行药理筛选。

## 实 验 部 分\*

### N,N-双-( $\beta$ -氯乙基)-N',N'-二-(乙氧羰基)磷三酰胺(III)

70 克(0.5 克分子)甘氨酸乙酯盐酸盐(142—144°C)悬浮于 500 毫升氯仿中,在 4—6°C 及搅拌下滴加 101 克(1.0 克分子)三乙胺。室温放置 1.5 小时后,在 4—6°C 及搅拌下加入 65 克(0.25 克分子)双-( $\beta$ -氯乙基)氨基磷酸二氯(I)<sup>[2]</sup>溶于 700 毫升无水乙醚的溶液,室温放置 15 小时,薄层层析\*\*表明反应已完全,过滤。固体用 300 毫升冰水溶去其中的三乙胺盐酸盐,得产物 2.76 克,熔点 85—87°C。母液放冰箱中冷却,析出白色结晶 65 克,熔点 84—87°C。过滤后的母液减压浓缩至约 100 毫升,冷却后加入等体积的乙醚,析出 21.0 克结晶,熔点 84—86°C。合并的粗产品用 50% 稀乙醇重结晶得细针状结晶产物 78 克。红外吸收光谱(微米): 3.04 (N—H), 5.70 (C=O, 酯), 7.60 (P=O, 磷三酰胺), 13.17 (C—Cl), 13.37 (P—N)。

### N,N-双-( $\beta$ -氯乙基)-N',N'-二-[ $\alpha$ -(乙氧羰基)乙基]磷三酰胺(IV)

丙氨酸乙酯盐酸盐(86—88°C)悬浮于氯仿中,在冰冷下通氨至饱和,滤去氯化铵。滤液于 40—50°C 减压蒸干,残余物减压蒸馏,收集 42°C/5 毫米馏分,得丙氨酸乙酯。

4.38 克(0.0374 克分子)游离酯,4.86 克(0.0187 克分子)磷酸二氯(I)和 3.80 克(0.0374 克分子)三乙胺在 30 毫升无水乙醚中室温反应 24 小时。滤去三乙胺盐酸盐 5.09 克(理论量为 5.12 克),用无水乙醚洗三次。合并的滤液和洗液在外温 40°C 及氮气流下减压蒸去溶剂。残留的无色油状物 8.03 克通过氧化铝柱纯化\*\*\*,得无色油状产物 7.00 克。

### N,N-双-( $\beta$ -氯乙基)-N',N'-二-[ $\alpha$ -(乙氧羰基)- $\beta$ -甲基丙基]磷三酰胺(V)

2.04 克缬氨酸乙酯盐酸盐(107—108°C)仿化合物(III)的合成条件进行反应 24 小时,滤去三乙胺盐酸盐后的滤液仿化合物(IV)进行处理,得浅柠檬色油状产物 1.42 克。

### N,N-双-( $\beta$ -氯乙基)-N',N'-二-[ $\alpha$ -(乙氧羰基)- $\gamma$ -甲基丁基]磷三酰胺(VI)

2.80 克亮氨酸乙酯盐酸盐(110—112°C)仿化合物(V)的合成条件进行缩合及处理,得浅黄色油状产物 2.26 克。

### N,N-双-( $\beta$ -氯乙基)-N',N'-二-[ $\alpha$ -(乙氧羰基)- $\beta$ -苯基乙基]磷三酰胺(VII)

由苯丙氨酸乙酯盐酸盐(123—125°C)用三乙胺中和所得的游离酯(142°C/9 毫米)4.00 克仿化合物(IV)的合成条件进行反应 36 小时,滤去盐,从冷却的滤液中得白色结晶产物 2.30 克,熔点 111—113°C,用 70% 乙醇重结晶,熔点升为 113—115°C。红外吸收光谱(微米): 3.03、5.71、7.65、13.17、13.38。

### N,N-双-( $\beta$ -氯乙基)-N',N'-二-[ $\alpha,\beta$ -二-(乙氧羰基)乙基]磷三酰胺(VIII)

由天冬氨酸乙酯盐酸盐(88—90°C)用三乙胺中和所得的游离酯(117—119°C/10 毫米)6.17 克仿化合物(IV)的合成条件进行反应,4 天后处理,得浅黄色油状产物 7.85 克。

\* (1)熔点未校正。(2)所用氨基酸除甘氨酸,谷氨酸为 L-型外,其余均为 DL-型。

\*\* 薄层层析: 吸附剂为中性氧化铝(160 筛孔以上) IV 级;展开剂为甲醇-苯(5:95);显色剂为 Dragendorff 试剂-Wagner 试剂混液(1:1)。

\*\*\* 柱层析: 吸附剂为中性氧化铝(80—140 目) II—III 级,用量为粗产物的 6—10 倍;柱管内径 2.4 厘米;苯为洗脱剂。合并薄层层析鉴别为一点的洗脱部分,在氮气流下减压蒸干,外温不超过 40°C。

### N,N-双-( $\beta$ -氯乙基)-N',N''-二-[ $\alpha,\gamma$ -二-(乙氧羰基)丙基]磷三酰胺(IX)

谷氨酸二乙酯盐酸盐(115—117°C)在氯仿溶液中通氨中和,用冰水洗去盐,有机溶液干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )后减压蒸干,所得的游离酯直接用于缩合。取 12.2 克游离酯仿化合物(IV)的合成条件进行缩合 36 小时,得到的固体用冰水洗去其中的盐,得白色结晶 2.3 克,滤液中加入石油醚(30—60°C)至混浊,冷后析出白色结晶 7.8 克,母液浓缩及冷却,又得固体 0.5 克。合并产物,用乙醚-石油醚(30—60°C)重结晶,得产物 9.7 克,熔点 83—85°C,再用乙醚重结晶,熔点 85—86.5°C,  $[\alpha]_D^{20} = -5.7^\circ$  ( $c, 2.09$ ; 乙醇)。红外吸收光谱(微米): 3.05, 5.77, 7.68, 13.15, 13.39。

### 2-[双-( $\beta$ -氯乙基)氨基]-4-乙氧羰基-四氢-1,2,3-氧磷氮茂,2-氧化物(XI)

5.10 克(0.03 克分子)丝氨酸乙酯盐酸盐(99—100°C)、7.77 克(0.03 克分子)磷酰二氯(I)和 9.09 克(0.09 克分子)三乙胺的乙醚溶液在室温放置 2 日,滤去盐后的滤液仿化合物(IV)处理,得浅黄色油状产物 7.1 克。

致谢 元素分析系本所微量元素分析室所作,特此致谢。

### 参 考 文 献

- [1] Gomori, G.: Histochemical Demonstration of sites of Phosphamidase Activity, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1948, **69**, 407.
- [2] Friedman, O. M., Seligman, A. M.: Preparation of N-Phosphorylated Derivatives of Bis- $\beta$ -chloroethylamine, *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, **76**, 655.
- [3] Arnold, H., Bourseaux, F., Brock, N.: Neuartige Krebs-Chemotherapeutika aus der Gruppe der zyklischen N-Lost-Phosphamidester, *Naturwissenschaften*, 1958, **45**, 64.
- [4] Arnold, H., Bourseaux, F.: Synthese und Abbau cytotostatisch wirksamer cyclischer N-Phosphamidester des Bis-( $\beta$ -chloräthyl)amins, *Angew. Chem.*, 1958, **70**, 539.
- [5] Arnold, H., Klose, H.: Über den hydrolytischen Abbau des hexacyclischen N-Lost-phosphamidesters B 518 under physiologischen Bedingungen, *Arzneimittel-Forschung*, 1961, **11**, 159.
- [6] Schweer, K. H.: Die Darstellung von im Esteramidring mit  $^{14}\text{C}$  und  $^{32}\text{P}$  markliertem Bis-( $\beta$ -chloräthyl)-amido-phosphorsäure-N, O-trimethylenesteramid (Endoxan), *Chem. Ber.*, 1962, **95**, 1799.
- [7] Brock, N., Hohorst, H.-J.: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro, *Arzneimittel-Forschung*, 1963, **13**, 1021.
- [8] Harper, N. J.: Drug Latentiation, *J. Med. Pharm. Chem.*, 1959, **1**, 467.
- [9] Arnold, H., Bourseaux, F., Brock, N.: Über Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und cancerotoxischer Wirkung in der Reihe der Phosphamidester des Bis-( $\beta$ -chloräthyl)-amins, *Arzneimittel-Forschung*, 1961, **11**, 143.
- [10] Friedman, O. M., Boger, E., Grubliauskas, V., Sommer, H.: Synthesis of N-Phosphorylated Derivatives of Nitrogen Mustards with Latent Cytotoxicity, *J. Med. Chem.*, 1963, **6**, 50.
- [11] Christensen, H. N., Riggs, T. R., Fischer, H., Palatine, I. M.: Intense Concentration of  $\alpha,\gamma$ -Diaminobutyric Acid by Cells, *J. Biol. Chem.*, 1952, **198**, 17.
- [12] Quastel, J. H., Bickis, I. J.: Metabolism of Normal Tissue and Neoplasms in vitro, *Nature*, 1959, **183**, 281.
- [13] Bergel, F., Stock, J. A.: Cyto-active Amino-acid and Peptide Derivatives. Part I. Substituted Phenylalanines, *J. Chem. Soc.*, 1954, 2409.
- [14] Larionov, L. F., Khokhov, A. S., Shkodinskaja, E. N., Vasina, O. S., Troosheikina, V. I., Novikova, M. A.: Studies on the Anti-tumour Activity of *p*-DL-bis(2-chloroethyl)aminophenylalanine (Sarcosine), *Lancet*, 1955, **269**, 169.
- [15] Brock, N.: Intern. Symp. Chemotherapy, 2nd., 1961, Naples, 1963, **3**, 45—68; *C. A.*, 1964, **60**, 2199c.
- [16] Казьмина, Н. Б., Кильдишева, О. В., Кнунянц, И. Л.: Канцеролитические пептиды направленного действия. сообщение 5. Некоторые аминокислоты и пептиды, содержащие N-ди-( $\beta$ -хлорэтил)аминофосфорильную группу, *Изв. АН СССР сер. хим.*, 1964, **1**, 117.

- [17] Vagi, K. M., Adamkiewicz, V. W., Nogrady, T.: Potential Cytostatic Carbohydrate Derivatives. II. N-Mustard Phosphates, *Canad. J. Chem.*, 1962, 40, 1049.

## Potential Anticancer Agents

### III. Preparation of Amino Acid Derivatives of Bis( $\beta$ -chloroethyl)-Phosphoramidic Dichloride

SUNG WEI-LIANG, HOU SHUANG-ZHOU, ZHAO HAN-FEI

YANG JING-HUA AND JA XAO-XAN

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking*)

#### ABSTRACT

In order to examine the feasibility that whether N-phosphorylated amino acid moiety would function as a carrier of the transport form of nitrogen mustard derivatives with the desired specificity in cancer chemotherapy, a number of amino acid derivatives of bis ( $\beta$ -chloroethyl)-phosphoramidic dichloride were prepared.

Treatment of bis ( $\beta$ -chloroethyl)-phosphoramidic dichloride (I) with two equivalents of the ethyl ester (II) of glycine, alanine, valine, leucine, phenylalanine, aspartic acid, and glutamic acid in an inert solvent in the presence of triethylamine afforded the corresponding derivatives of N,N-bis( $\beta$ -chloroethyl)-N', N''-di-(carboethoxymethyl)-phosphorotriamide (III—IX). Similarly, reaction of the dichlorophosphoramidic dichloride (I) with equivalent ethyl ester of serine (X) yielded a cyclic derivative, 2-bis( $\beta$ -chloroethyl)amino-4-carboethoxy-1,3,2-oxazophospholidine, 2-oxide (XI). The compounds derived from glycine, phenylalanine and glutamic acid were crystalline solids, while those from the remaining amino acids were less stable oily substances.

The results of screening tests of the above compounds against transplanted tumours will be published in a separate paper.