

새로운 엽산 대사 길항제의 합성 및 약리활성

신관석* · 성선영 · 남재우 · 최상운* · 이정옥*

강원대학교 약학대학, *한국화학연구소

(Received June 24, 1992)

Synthesis and Pharmacological Activities of New Folic Acid Antagonists

Kwan Seog Sin*, Jae Woo Nam, Sun Young Sung,
Sang Un Choi* and Chong Ock Lee*

College of Pharmacy, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea

*Korea Research Institute of Chemical Technology, Taedeogdanji, Daejeon 305-606, Korea

Abstract—A new series of methotrexate analogues was prepared in which the β -position of the glutamic acid moiety is substituted by the aryl groups. The glutamic acid moiety was modified in order to enhance the lipophilic property. Reaction of N-acetylglycine ester[1] with ethyl 3-arylacrylate derivatives[2] produced trans-3-aryl-2-carboxy-5-pyrrolidone derivatives[3], which were hydrolyzed to give β -aryl-glutamic acid derivatives[4]. The compounds[4] were treated with the p-aminobenzoic acid moiety and then with the pteridine ring moiety to give β -arylmethotrexate derivatives[6, 7]. These compounds were tested for antibacterial activity against *Streptococcus faecium* and for antitumor activity against murine leukemias and against human tumor cell lines *in vitro*. Several compounds showed significant antibacterial activity.

Keywords □ Folic acid antagonists, β -arylmethotrexate, lipophilic property, antibacterial activity, antitumor activity, *Streptococcus faecium*, murine leukemias, human tumor cell lines.

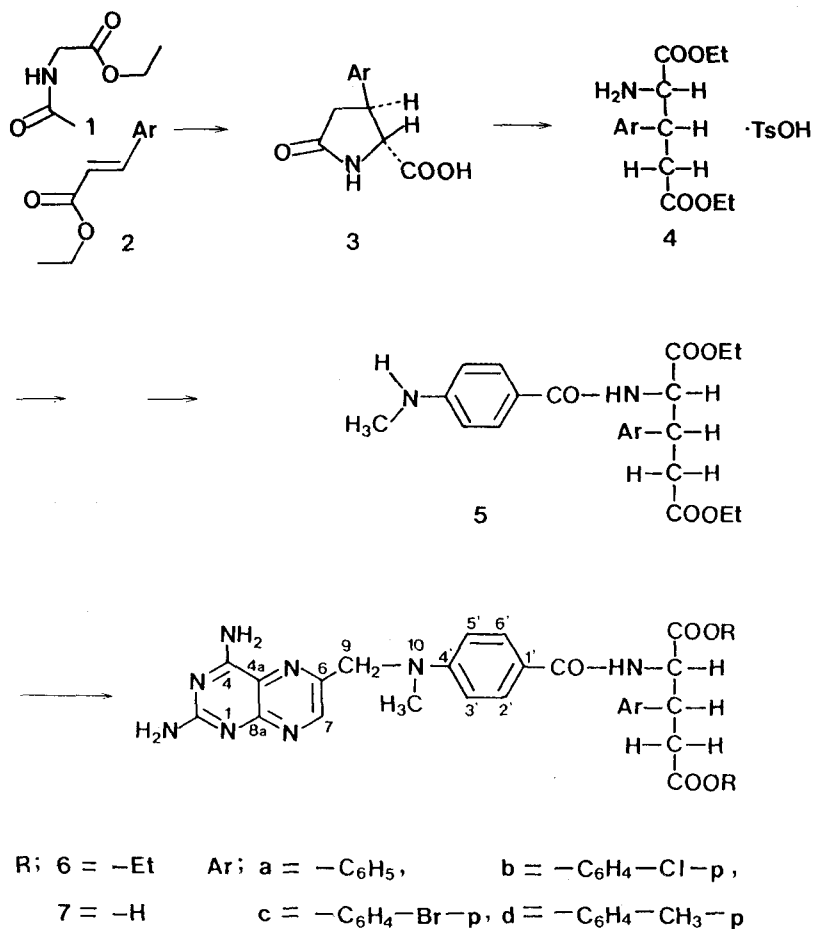
엽산대사길항제(folic acid antagonists)는 생체내에서 one-carbon transfer로 중요한 역할을 담당하는 엽산의 대사과정을 차단하므로써 항암 또는 항균효과를 나타내는 화합물이다.²⁻⁴⁾ 엽산이 one-carbon transfer로 작용하기 위해서는 dihydrofolic acid가 dihydrofolic reductase라는 효소에 의해 tetrahydrofolic acid로 환원되어야 하는데, 엽산대사길항제는 dihydrofolic acid보다 이 효소에 대해서 더 큰 친화력을 갖는다. 이 결과 one-carbon transfer로 작용하는 환원형인 folate들이 생성되지 않으며 이로 인해 folate coenzyme의 급격한 세포내 결핍을 일으켜 세포 대사를 파괴하게 된다.^{2,4)}

엽산대사길항제는 1949년 Seeger 등⁵⁾에 의해 me-

thotrexate가 합성된 후, 지금까지 다양한 구조의 유사체가 합성되었다. 엽산의 구조에서 4번 탄소의 HO-기를 H₂N-기로 치환시키므로 dihydrofolic reductase에 대한 친화력이 10⁵ 배 증가 되어³⁾ 결과적으로 강력한 항암작용을 나타냈으며, 4번 탄소의 HO-기를 HS- 또는 CH₃S-기로 치환시킨 엽산 유사체들은 강력한 항균작용을 나타냈다.^{6,7)} 엽산의 구조에서 p-aminobenzoic acid 부분을 다양하게 변화시킨 유사체로는 10-oxafolic acid, 10-deaza-aminopterin 또는 11-oxa-homo-aminopterin 등이 합성되었다.⁸⁻¹⁰⁾

엽산의 구조에서 glutamic acid 부분을 변화시킨 유사체로는 지금까지 L-glutamic acid를 D-glutamic acid 또는 다른 아미노산으로 치환시킨 연구만이 보고되었다. 다른 아미노산으로 치환시킨 엽산 유사체로는 methotrexate에서 glutamic acid 대신 dimethyl D,L-

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.



Scheme 1.

aspartate, homocysteine-thiolactone 또는 ethyl L-methioninate 등으로 치환시켰으며, 이들 유사체들은 항균 효과 또는 L-1210 murine leukemia에 활성을 나타냈다.¹¹⁾

지금까지 엽산 유사체의 연구에서 glutamic acid 구조의 α-, β- 또는 γ-위치를 다른 기로 치환 시킨 연구는 보고된 바 없다.

본 실험에서는 trans-3-aryl-2-carboxy-5-pyrrolidone(3)를 가수분해하여 erythro-3-arylglutamic acid 을 합성하고¹²⁾ 이것을 이용하여 다양한 β-arylmethotrexate 유사체들(6, 7)을 합성했다. 합성된 유사체들(6, 7)은 methotrexate 구조에서 glutamic acid 부분의 β-위치를 aryl-기로 치환시켰기 때문에 methotrexate에 비해 활성이 증대되리라 예상된다.¹³⁾

Michael reaction을 이용하여 acetylglycine ester(1)

와 ethyl arylacrylate(2)를 반응시켜 trans-3-aryl-2-carboxy-5-pyrrolidone(3)을 선택적으로 합성하고,¹⁴⁾ 이것을 6N HCl로 가수분해하여 (±)-erythro-3-arylglutamic acid의 HCl염을 얻었다.¹²⁾

(±)-erythro-3-arylglutamic acid의 HCl염을 ethyl p-toluenesulfonate와 반응시켜 합성한 diethyl 3-arylglutamate의 TsOH염(4)¹⁵⁾을 4-(N-methyl)aminobenzoylchloride^{16,17)}와 반응시켜 Diethyl N-[4-(N-methyl)aminobenzoyl]-β-arylglutamate(5)를 얻었다. 화합물 (5)을 2,4-diaminobromomethyl-6-bromomethylpteridine^{18,19)}과 N,N-dimethylacetamide 용매하에서 반응시켜 diethyl N-[4-[(2,4-diamino-6-pteridinyl)methyl]methylaminol]benzoyl]-β-arylglutamate(6)을 얻었으며^{18,19)} 이것을 알코올성 NaOH로 가수분해하여 β-arylmethotrexate 유도체(7)을 얻었다(Scheme 1).

Table I—Antibacterial activities against *Streptococcus faecium*

| ID ₅₀ Sample | 6a | 6b | 6c | 6d | 7a | 7b | 7c | 7d | MTX | |
|---|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| ID ₅₀ (*10 ⁻⁴ M) | 1 | 2.0 | 4.4 | 5.3 | 1.6 | 111 | 144 | 156 | 213 | 16 |
| | 2 | 2.4 | 4.9 | 6.0 | 1.8 | 111 | 156 | 159 | 221 | 17 |
| | 3 | 3.0 | 4.9 | 6.8 | 1.9 | 130 | 187 | 183 | 229 | 18 |
| | 4 | 3.4 | 5.7 | 6.8 | 2.0 | 156 | 190 | 185 | 234 | 20 |
| Mean (*10 ⁻⁴ M) | 2.7 | 5.0 | 6.2 | 1.8 | 127 | 169 | 171 | 224 | 18 | |
| Sample(ID ₅₀) MTX(ID ₅₀) | 0.15 | 0.2 | 0.3 | 0.1 | 7 | 9 | 10 | 12 | 1 | |

*folic acid: 17 µg/ml

Table II—Antitumor activities against tumor cell lines

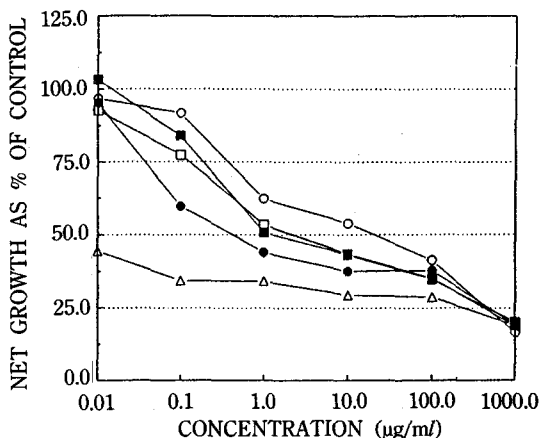
| Sample | ED ₅₀ (µg/ml) | | | | |
|--------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | A-549 | SKOV-3 | XF-498 | HCT-15 | L1210 |
| 6a | 14.1 | 16.6 | 5.2 | 0.3 | 0.0269 |
| 6b | 5.5 | 12.5 | 4.4 | 0.2 | 0.0859 |
| 6c | 2.6 | 8.6 | 6.4 | 0.34 | 0.1221 |
| 6d | 7.4 | 18.8 | 5.0 | 0.2 | 0.0828 |
| 7a | >300 | >300 | >300 | >300 | >20 |
| 7b | >300 | >300 | >300 | >300 | >20 |
| 7c | >300 | >300 | >300 | >300 | >20 |
| 7d | >300 | >300 | >300 | >300 | >20 |
| MTX | 0.0012 | 0.0087 | 0.0035 | 0.0014 | 0.0095 |

화합물 6과 7은 *Streptococcus faecium*(ATCC No. 8043)에 대한 억제효과를 측정하여 항균 효과를 검증²⁰⁾하였고(Table I), 화합물 7은 *in vitro*에서 human tumor cell lines에 대한 항암효과^{21,22)} 및 mouse tumor cell lines에 대한 항암효과^{23,24)}를 검증하였다(Table II, Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3).

실험 방법

기기 및 시약—용점측정은 Electrothermal 용점측정기(digital)를 사용하였으며, 온도계는 보정하지 않았다. ¹H-NMR-스펙트럼과 ¹³C-NMR-스펙트럼은 TMS를 내부표준물질로 하여 Bruker AM 300, Bruker WP80SY와 Varian XL 300를 사용하였다. 시약은 주로 Aldrich사와 Sigma사의 제품을 사용하였으며, 용매류는 일반적인 방법으로 정제하여 사용하였다.

Diethyl (±)-erythro-3-arylglutamate·TsOH(4)의 합성—5 mmol trans-3-aryl-2-carboxy-5-pyrrolidone

**Fig. 1**—Effect of compounds against A549 non-small cell lung carcinoma.

[MTX(△); 6a(○); 6b(□); 6c(●); 6d(■)]

(3)에 250 ml 6N HCl를 가하고 12시간 환류시켰다. 이 용액을 냉각, 여과하고 여액을 감압하에 농축한 후, 따뜻한 ethyl acetate를 가해서 녹지 않는 흰 침전을 여과, 건조하여, (±)-erythro-3-arylglutamic acid의 HCl 염을 얻었다. 건조한 HCl 염을 5 mmol ethyl p-toluenesulfonate와 함께 무수 ethanol 용매 하에서 24~30시간 환류시켰다. 이 용액을 냉각한 후 감압 농축하고, 50 ml ether를 가해서 생성된 흰 침전을 여과, 건조하였다.

Diethyl 3-phenylglutamate·TsOH(4a)—52%, mp 135~137°C (acetone/petroleum ether), ¹H-NMR(CF₃COOD, δ=ppm): 1.00(t, 3H, ester-methyl); 1.10(t, 3H, ester-methyl); 2.29(s, 3H); 2.98(d, J=7.5Hz, 2H); 3.60(m, 1H); 4.00(q, 2H, ester-CH₂); 4.10(q, 2H, ester-CH₂); 4.31(d, J=5.7Hz, 1H); 7.22~7.75(m, 9H, aromat.)

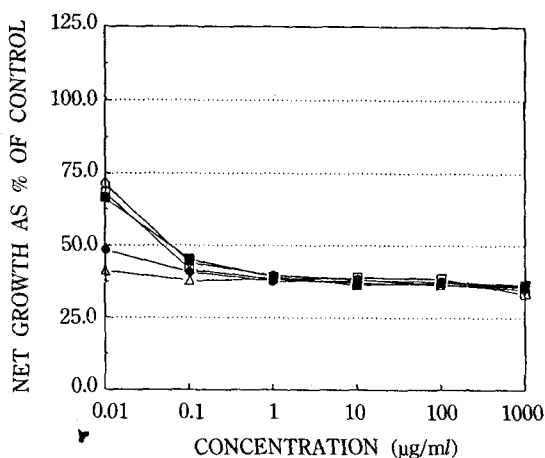


Fig. 2—Effect of compounds against HCT 15 colon carcinoma. [MTX(△); 6a(○); 6b(□); 6c(●); 6d(■)]

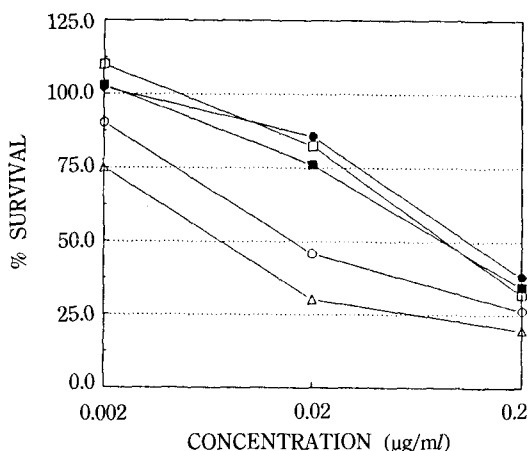


Fig. 3—*In vitro* activities against L1210 mouse leukemia. [MTX(△); 6a(○); 6b(□); 6c(●); 6d(■)]

Diethyl 3-(4-chlorophenyl)glutamate·TsOH(4b)—53% mp 144~145°C (acetone/petroleum ether), ¹H-NMR(CF₃COOD, δ=ppm): 1.00(t, 3H, ester-methyl); 1.10(t, 3H, ester-methyl); 2.35(s, 3H); 3.00(d, J=7.4 Hz, 2H); 3.66(m, 1H); 4.00(q, 2H, ester-CH₂); 4.10(q, 2H, ester-CH₂); 4.30(d, J=6.3Hz, 1H); 7.17~7.67(m, 8H, aromat.)

Diethyl 3-(4-bromophenyl)glutamate·TsOH(4c)—41% mp 146~148°C (acetone/petroleum ether), ¹H-NMR(CF₃COOD, δ=ppm): 1.00(t, 3H, ester-methyl); 1.10(t, 3H, ester-methyl); 2.36(s, 3H); 3.00(d, J=7.4

Hz, 2H); 3.64(m, 1H); 4.00(q, 2H, ester-CH₂); 4.10(q, 2H, ester-CH₂); 4.29(d, J=6.3Hz, 1H); 7.11~7.67(m, 8H, aromat.)

Diethyl 3-(4-chlorophenyl)glutamate·TsOH(4d)—44% mp 132~134°C (acetone/petroleum ether), ¹H-NMR(CF₃COOD, δ=ppm): 1.00(t, 3H, ester-methyl); 1.10(t, 3H, ester-methyl); 2.29(s, 3H); 2.36(s, 3H); 2.97(d, J=7.5Hz, 2H); 3.66(m, 1H); 4.00(q, 2H, ester-CH₂); 4.10(q, 2H, ester-CH₂); 4.28(d, J=6.0Hz, 1H); 7.13~7.68(m, 8H, aromat.)

Diethyl N-[4-(N-methyl)aminobenzoyl]-β-arylgutamate(5)의 합성—2 mmol 4-(N-methyl-N-tosyl)aminobenzoyl chloride와 2 mmol diethyl erythro-3-arylgutamate·TsOH 염(4)을 16 mmol KHCO₃를 촉매하에서 25 ml dichloromethane과 25 ml 물의 혼합 용매중에서 실온하에 12시간 교반하였다. 유기 용매층을 분리하여 1N HCl과 물로 세척한후, MgSO₄로 수분을 제거한 후 감압 농축하였다. 이렇게 얻은 건조한 화합물을 4 mmol phenol과 10 ml 30% HBr(in acetic acid)와 함께 실온에서 4시간 교반한후, 100 ml ether를 가하자 유상 또는 흰 침전물이 생겼다. 용매를 경사 따르기로 제거한 후, 남아 있는 유상 또는 침전물을 ether로 2회 더 세척했다. 이것을 100 ml dichloromethane에 녹이고, 1N KHCO₃ 용액으로 세척한 후, MgSO₄로 수분을 제거, 감압 농축하고 ethyl acetate/petroleum ether 또는 ethyl acetate를 사용하여 흰색 결정을 얻었다.

Diethyl N-[4-(N-methyl)aminobenzoyl]-β-phenylglutamate(5a)—49%, mp 120~123°C (ethyl acetate/petroleum ether), ¹H-NMR(CDCl₃, δ=ppm): 0.98(t, 3H, ester-methyl); 1.06(t, 3H, ester-methyl); 2.87(m, 2H); 2.87(s, 3H); 3.64(m, 1H); 3.90(s, 1H); 3.94(q, 2H, ester-CH₂); 3.97(q, 2H, ester-CH₂); 5.02(t, J=8.6 Hz, 1H); 6.61(s, 1H); 6.60(d, J=8.9Hz, 2H, aromat.); 7.20(s, 5H, phenyl); 7.60(d, J=8.9Hz, 2H, aromat.)

Diethyl N-[4-(N-methyl)aminobenzoyl]-β-(4-chlorophenyl)glutamate(5b)—66%, mp 135~138°C (ethyl acetate), ¹H-NMR(CDCl₃, δ=ppm): 1.04(t, 3H, ester-methyl); 1.08(t, 3H, ester-methyl); 2.88(m, 2H); 2.88(s, 3H); 3.64(m, 1H); 3.90(s, 1H); 3.99(q, 4H, ester-CH₂); 5.02(t, J=8.6Hz, 1H); 6.57(s, 1H); 6.60(d, J=8.9Hz, 2H, aromat.); 7.20(m, 4H, aromat.); 7.60(d,

$J=8.9\text{Hz}$, 2H, arom.)

Diethyl N-[4-(N-methyl)aminobenzoyl]- β -(4-bromophenyl)glutamate(5c)—74%, mp 126~128°C (ethyl acetate), $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, \delta=\text{ppm})$: 1.04(t, 3H, ester-methyl); 1.08(t, 3H, ester-methyl); 2.87(m, 2H); 2.87(s, 3H); 3.65(m, 1H); 3.90(s, 1H); 3.98(q, 4H, ester- CH_2); 5.00(t, $J=8.7\text{Hz}$, 1H); 6.56(s, 1H); 7.10(d, $J=8.9\text{Hz}$, 2H, arom.); 7.10(s, 4H, arom.); 7.40(d, $J=8.9\text{Hz}$, 2H, arom.)

Diethyl N-[4-(N-methyl)aminobenzoyl]- β -(4-methylphenyl)glutamate(5d)—54%, mp 100~101°C (ethyl acetate/petroleum ether), $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, \delta=\text{ppm})$: 1.00(t, 3H, ester-methyl); 1.08(t, 3H, ester-methyl); 2.29(s, 3H); 2.86(m, 3H); 3.60(m, 1H); 3.90(s, 1H); 3.97(q, 4H, ester- CH_2); 4.99(t, $J=8.7\text{Hz}$, 1H); 6.61(s, 1H); 6.60(d, $J=8.9\text{Hz}$, 2H, arom.); 7.10(m, 4H, arom.); 7.60(d, $J=8.9\text{Hz}$, 2H, arom.)

Diethyl N-[4-[(2, 4-diamino-6-pteridinyl)methyl]-N-methylaminobenzoyl]- β -arylglutamate(6)의 합성—1 mmol diethyl N-[4-(N-methyl)aminobenzoyl]- β -arylglutamate(5)와 1 mmol 2, 4-diamino-6-bromomethylpteridine을 5 ml N,N-dimethylacetamide 용매하에 수욕에서 50~55°C를 유지하면서 4시간 동안 교반하고, 25°C에서 17시간 방치한 후 여기에 물 50 ml를 가하자 침전이 생겼다. 이 혼합물을 냉각고에서 하룻밤을 방치한 후, 감압하에 여과, 소량의 물로 세척한 후, 건조하여 0.5 HBr·1.5 H₂O 염을 얻었다. 이것을 100 ml CHCl_3 에 녹인 후 200 ml 0.3N NH_4OH 용액을 가한 후 10분간 교반하였다. CHCl_3 층을 물로 세척, Na_2SO_4 로 수분을 제거한 후 감압 농축하고, 다량의 acetone으로 재결정하여 노란색 결정을 얻었다.

Diethyl N-[4-[(2, 4-diamino-6-pteridinyl)methyl]-N-methylaminobenzoyl]- β -phenylglutamate(6a)—85%, mp 140~142°C (acetone), $^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-}d_6, \delta=\text{ppm})$: 0.83(t, 3H, ester-methyl); 0.96(t, 3H, ester-methyl); 2.83(m, 2H); 3.21(s, 3H); 3.63(m, 1H); 3.78(q, 2H, ester- CH_2); 3.86(q, 2H, ester- CH_2); 4.68(t, $J=8.5\text{Hz}$, 1H); 4.79(s, 2H); 6.55(C-2- NH_2 , s, 2H); 6.83(d, $J=8.9\text{Hz}$, 2H, arom.); 7.27(m, 5H, phenyl); 7.55(C-4- NH_2 , bs, 2H); 7.76(d, $J=8.9\text{Hz}$, 2H, arom.); 8.39(NH, d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H); 8.58(s, 1H, arom.)

mat.), $^{13}\text{C-NMR}(\text{DMSO-}d_6, \delta=\text{ppm})$: 170.95(ester-C=O); 166.46(amide-C=O); 162.74(C-2); 162.61(C-4); 155.09(C-8a); 151.02(C-4''); 149.04(C-7); 145.82(C-6); 139.59(C-1''); 129.00(C-2', C-6'); 128.21(C-3'', C-5''); 127.89(C-2'', C-6''); 126.81(C-4''); 121.30(C-4a); 120.69(C-1') 110.93(C-3', C-5'); 59.84 and 59.49(ester- CH_2); 57.12(C- α); 54.75(C-9); 43.11(C- β); ~40(C-11); 36.60(C- γ); 13.68 and 13.38(ester- CH_3)

Diethyl N-[4-[(2, 4-diamino-6-pteridinyl)methyl]-N-methylaminobenzoyl]- β -(4-chlorophenyl)glutamate(6b)—78%, mp 119~122°C (acetone), $^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-}d_6, \delta=\text{ppm})$: 0.86(t, 3H, ester-methyl); 0.98(t, 3H, ester-methyl); 2.82(m, 2H); 3.21(s, 3H); 3.62(m, 1H); 3.79(q, 2H, ester- CH_2); 3.86(q, 2H, ester- CH_2); 4.68(t, $J=8.5\text{Hz}$, 1H); 4.79(s, 2H); 6.53(C-2- NH_2 , s, 2H); 6.83(d, $J=8.9\text{Hz}$, 2H, arom.); 7.31(m, 4H, arom.); 7.55(C-4- NH_2 , bs, 2H); 7.74(d, $J=8.9\text{Hz}$, 2H, arom.); 8.40(NH, d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H); 8.58(s, 1H, arom.)

Diethyl N-[4-[(2, 4-diamino-6-pteridinyl)methyl]-N-methylaminobenzoyl]- β -(4-bromophenyl)glutamate(6c)—76%, mp 124~122°C (acetone), $^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-}d_6, \delta=\text{ppm})$: 0.87(t, 3H, ester-methyl); 0.98(t, 3H, ester-methyl); 2.82(m, 2H); 3.21(s, 3H); 3.60(m, 1H); 3.79(q, 2H, ester- CH_2); 3.86(q, 2H, ester- CH_2); 4.68(t, $J=8.5\text{Hz}$, 1H); 4.79(s, 2H); 6.53(C-2- NH_2 , s, 2H); 6.83(d, $J=8.9\text{Hz}$, 2H, arom.); 7.23(d, $J=8.5\text{Hz}$, 2H, arom.); 7.46(d, $J=8.5\text{Hz}$, 2H, arom.); 7.55(C-4- NH_2 , bs, 2H); 7.74(d, $J=8.9\text{Hz}$, 2H, arom.); 8.40(NH, d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H); 8.58(s, 1H, arom.)

Diethyl N-[4-[(2, 4-diamino-6-pteridinyl)methyl]-N-methylaminobenzoyl]- β -(4-methylphenyl)glutamate(6d)—74%, mp 110~112°C (acetone), $^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-}d_6, \delta=\text{ppm})$: 0.85(t, 3H, ester-methyl); 0.97(t, 3H, ester-methyl); 2.25(s, 3H); 3.21(m, 3H); 3.59(m, 1H); 3.78(q, 2H, ester- CH_2); 3.86(q, 2H, ester- CH_2); 4.67(t, $J=8.6\text{Hz}$, 1H); 4.78(s, 2H); 6.53(C-2- NH_2 , s, 2H); 6.82(d, $J=8.9\text{Hz}$, 2H, arom.); 7.07(d, $J=8.2\text{Hz}$, 2H, arom.); 7.13(d, $J=8.2\text{Hz}$, 2H, arom.); 7.55(C-4- NH_2 , bs, 2H); 7.74(d, $J=8.9\text{Hz}$, 2H, arom.); 8.32(NH, d, $J=8.24\text{Hz}$, 1H); 8.58(s, 1H, arom.)

aromat.)

N-{4-[(2, 4-Diamino-6-pteridinyl)methyl]-N-methylaminobenzoyl}-β-arylglutamic acid(7)의 합성—Silica gel column chromatography[eluent; chloroform : MeOH(9 : 1)]로 정제한 0.03 mmol diethyl N-{4-[(2, 4-diamino-6-pteridinyl)methyl]-N-methylaminobenzoyl}-β-arylglutamate(6)의 0.5 HBr·1.5H₂O 염을 5 ml 따뜻한 ethanol에 녹였다. 이 용액을 20°C로 냉각하고 1 ml 1N NaOH를 가하고 실온에서 2~3 시간 동안 교반하였다. 용매를 감압하에 제거한 후, 5 ml 물에 녹이고 여기에 1N NaOH 1 ml를 가하여 pH 4로 했을 때 노란색 침전을 얻었다. 이 혼합물을 냉장고에 하룻밤 방치한 후 여과했다. 노란색 잔사를 소량의 얼음물과 ether로 세척한 후 건조시켰다.

N-{4-[(2, 4-Diamino-6-pteridinyl)methyl]-N-methylaminobenzoyl}-β-phenylglutamic acid(7a)—88%, mp 191~192°C (dec.), ¹H-NMR(DMSO-d₆, δ = ppm): 2.73(H_γ, m, 2H); 3.20(s, 3H); 3.64(H-β, m, 1H); 4.67(H-α, t, J=8.1Hz, 1H); 4.77(s, 2H); 6.63(C-2-NH₂, s, 2H); 6.81(d, J=8.8Hz, 2H, aromat.); 7.23(m, 5H, aromat.); 7.55(C-4-NH₂, bs, 2H); 7.70(d, J=8.8Hz, 2H, aromat.); 8.04(NH, d, J=8.5Hz, 1H); 8.58(s, 1H, aromat.), ¹³C-NMR(DMSO-d₆, δ = ppm): 172.68(γ-COOH); 172.11(α-COOH); 166.23(amide-C=O); 162.60(C-2); 162.42(C-4); 154.64(C-8a); 150.94(C-4'); 149.05(C-7); 146.10(C-6); 140.45(C-1''); 128.88(C-2', C-6'); 128.15(C-3'', C-5''); 127.88(C-2'', C-6''); 126.55(C-4''); 121.32(C-4a); 121.01(C-1'); 110.96(C-3', C-5'); 56.87(C-α); 54.75(C-9); 42.76(C-β); ~40(C-11); 36.34(C-γ)

N-{4-[(2, 4-Diamino-6-pteridinyl)methyl]-N-methylaminobenzoyl}-β-(4-chlorophenyl)-glutamic acid(7b)—91%, mp 194~195°C (dec.), ¹H-NMR(DMSO-d₆, δ = ppm): 2.73(H_γ, m, 2H); 3.20(s, 3H); 3.63(H-β, m, 1H); 4.65(H-α, t, J=8.3Hz, 1H); 4.77(s, 2H); 6.64(C-2-NH₂, s, 2H); 6.81(d, J=8.9Hz, 2H, aromat.); 7.30(m, 4H, aromat.); 7.58(C-4-NH₂, bs, 2H); 7.70(d, J=8.9Hz, 2H, aromat.); 8.15(NH, d, J=8.5Hz, 1H); 8.58(s, 1H, aromat.), ¹³C-NMR(DMSO-d₆, δ = ppm): 172.31(γ-COOH); 171.77(α-COOH); 166.05(amide-C=O); 162.39(C-2); 162.20(C-4); 154.42(C-8a); 150.77(C-4'); 148.86(C-7); 145.93(C-6); 139.37(C-1''); 131.02

(C-4'') 129.91(C-2'', C-6''); 128.75(C-2', C-6'); 127.68(C-3'', C-5''); 121.18(C-4a); 120.79(C-1'); 110.84(C-3', C-5'); 56.66(C-α); 54.72(C-9); 42.24(C-β); ~40(C-11); 36.21(C-γ) * 순서변동

N-{4-[(2, 4-Diamino-6-pteridinyl)methyl]-N-methylaminobenzoyl}-β-(4-bromophenyl)-glutamic acid(7c)—92%, mp 195~196°C (dec.), ¹H-NMR(DMSO-d₆, δ = ppm): 2.73(H_γ, m, 2H); 3.20(s, 3H); 3.62(H-β, m, 1H); 4.66(H-α, t, J=8.3Hz, 1H); 4.78(s, 2H); 6.66(C-2-NH₂, s, 2H); 6.81(d, J=8.9Hz, 2H, aromat.); 7.22(d, J=8.4Hz, 2H, aromat.); 7.44(d, J=8.4Hz, 2H, aromat.); 7.58(C-4-NH₂, bs, 2H); 7.71(d, J=8.9Hz, 2H, aromat.); 8.15(NH, d, J=8.2Hz, 1H); 8.58(s, 1H, aromat.), ¹³C-NMR(DMSO-d₆, δ = ppm): 172.31(γ-COOH); 171.77(α-COOH); 166.05(amide-C=O); 162.39(C-2); 162.15(C-4); 154.35(C-8a); 150.77(C-4'); 148.86(C-7); 145.97(C-6); 139.81(C-1''); 130.60(C-3', C-5'); 130.30(C-2'', C-6''); 128.76(C-2', C-6'); 121.19(C-4''); 120.79(C-4a); 119.56(C-1'); 110.84(C-3', C-5'); 56.61(C-α); 54.72(C-9); 42.30(C-β); ~40(C-11); 36.14(C-γ)

N-{4-[(2, 4-Diamino-6-pteridinyl)methyl]-N-methylaminobenzoyl}-β-(4-methylphenyl)-glutamic acid(7d)—91%, mp 190~191°C (dec.), ¹H-NMR(DMSO-d₆, δ = ppm): 2.23(s, 3H); 2.70(H_γ, m, 2H); 3.20(s, 3H); 3.60(H-β, m, 1H); 4.65(H-α, t, J=8.3Hz, 1H); 4.78(s, 2H); 6.61(C-2-NH₂, s, 2H); 6.81(d, J=8.9Hz, 2H, aromat.); 7.05(d, J=8.1Hz, 4H, aromat.); 7.14(d, J=8.1, 2H, aromat.); 7.57(C-4-NH₂, bs, 2H); 7.70(d, J=8.9Hz, 2H, aromat.); 8.06(NH, d, J=8.5Hz, 1H); 8.58(s, 1H, aromat.), ¹³C-NMR(DMSO-d₆, δ = ppm): 172.47(γ-COOH); 172.90(α-COOH); 165.98(amide-C=O); 162.39(C-2); 162.28(C-4); 154.54(C-8a); 150.74(C-4'); 148.86(C-7); 145.87(C-6); 137.17(C-1''); 135.35(C-4'); 128.72(C-3'', C-5''); 128.34(C-2', C-6'); 127.86(C-2'', C-6''); 121.18(C-4a); 120.88(C-1'); 110.84(C-3', C-5'); 56.87(C-α); 54.72(C-9); 42.37(C-β); ~40(C-11); 36.43(C-γ); 20.49(4'-CH₃)

항균효과검정—새로운 화합물(6, 7)에 대하여 Foley 등의 방법²⁰⁾을 이용하여 *Streptococcus faecium*(ATCC No. 8043)에 대한 항균효과를 검정하였다. *S. faecium* (ATCC No. 8043, 한국과학기술원 부설유전공학센터

에서 구입), 엽산 및 배지(Bacto folic acid assay medium)가 들어있는 cap tubes에 sample 농도를 늘려가며 주입하고 일정시간 배양한 후, 균의 성장이 Lag phase에 도달하였을 때 660 nm에서 %T를 측정하여 기준물질인 methotrexate(MTX)와 항균력을 비교했다.

항암효과검정—새로운 화합물들(6, 7)의 인체암 세포주(human tumor cell lines) 및 mouse leukemia L1210에 대한 *in vitro* 항암효과를 검색하였다. 인체암 세포주 A-549(non-small cell lung), HCT-15(colon), SK-OV-3(ovarian), XF-498(CNS) 등은 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 각 세포들은 96 well plate의 각 well에 $5 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ cells를 가하여 24시간 배양한 후 각 농도의 약물을 가하여 48시간 배양하였다. 배양 후 SRB assay 방법에 준하여 TCA에 의한 세포 고정, 0.4% SRB 용액으로 염색, 1% acetic acid로서 세척한 후 10 mM Tris 용액으로 dye를 녹여낸 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 값으로부터 Net growth as % of control을 계산하여 항암효과를 평가하였다.

mouse leukemia L1210은 1×10^5 cells/ml이 되도록 조절한 후 각 농도의 약물을 가하여 배양 후 48시간에 trypan blue dye exclusion test를 실시하여 측정된 세포수로부터 대조군과 비교하여 growth inhibition(%)를 산출하였다.

실험결과 및 고찰

Streptococcus faecium(ATCC NO. 8043)에 대한 항균력—ester form인 화합물(6)은 기준 물질인 methotrexate 보다 3~10배 강한 억제효과를 $6d > 6a > 6b > 6c$ 순으로 나타냈다. acid form인 화합물(7)은 methotrexate에 비해 5~15배 약한 억제효과를 나타냈는데, 이는 화합물(7)의 난용성에 기인되었다고 사료된다.

종양세포에 대한 작용—ester form인 화합물(6)은 인체 암세포주에 대한 작용에 있어서 A-549, SKOV-3, XF-498 및 HCT-15 세포주들에 대하여 MTX 보다는 약하지만 우수한 항암효과를 나타냈다. 그리고 HCT-15 colon carcinoma에 대하여 가장 강력한 효과를 나타냈다. 화합물(6)은 mouse leukemia L1210에

대해서도 MTX보다는 약간 약하지만 우수한 항암효과를 나타냈다. 그러나 acid form인 화합물(7)은 모두 용해도가 좋지 않았으며, 인체 암세포주들 및 L1210 세포주에서 전혀 효과가 없었다.

감사의 말씀

본 연구는 1989년 학술진흥재단의 연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) 본 논문은 1989년 학술진흥재단 연구결과보고서인 "강력한 엽산대사길항제의 합성 및 약리학적 연구"와 동일한 내용임.
- 2) Delgado, J.N. and Remers, W.A.: *Wilson and Gisvold's Textbook of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 9th ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, p. 191, p. 324, p. 856 (1991).
- 3) Wolff, M.E.: *Burger's Medicinal Chemistry*, part II, John Wiley & Sons, New York, p. 598, p. 612 (1984).
- 4) Gilman, A.G.: *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Macmillan Publishing Co., New York, p. 1262, p. 1323 (1985).
- 5) Seeger, D.R., Cosulich, D.B., Smith, J.M. Jr. and Hultquist, M.E.: Analogs of pteroylglutamic acid, III. 4-amino derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, 1753 (1949).
- 6) Elliott, R.D., Temlie, C. Jr., Frye, J.L. and Montgomery, J.A.: Synthesis of N¹⁰-methyl-4-thiofolic acid and related compounds. *J. Med. Chem.*, 18, 492 (1974).
- 7) Driscoll, J.S.: Antineoplastic Agents in *Annual Reports in Medicinal Chemistry II*, Academic Press, New York and London, p. 110 (1976).
- 8) Nair, M.G. and Campbell, P.T.: Folate analogues altered in C⁹-N¹⁰ bridge region, 10-oxafolic acid and 10-oxaaminopterin. *J. Med. Chem.*, 19, 825 (1976).
- 9) Sirotnal, F.M., DeGraw, J.I., Moccio, D.M. and Dorrick, D.M.: Antitumor properties of a new folate analog, 10-deazaaminopterin, in mice. *Cancer Treat. Rep.*, 62, 1047 (1978).

- 10) Nair, M.G., Bridges, T.W. and Henkel, T.J.: Folate analogues altered in the C⁹-N¹⁰ bridge region. Synthesis and antitumor evaluation of 11-oxa-homo-aminopterin and related compounds. *J. Med. Chem.*, **24**, 1068 (1981).
- 11) Chaykovsky, M., Brown, B.L. and Modest, E.J.: Methotrexate Analogs. Replacement of glutamic acid by various amino acid esters and amines. *J. Med. Chem.*, **18**, 909 (1975).
- 12) Pachaly, P.: Die Darstellung von Threo- und erythro-3-Arylglutaminsäuren. *Arch. Pharm.*, **305**, 176 (1972).
- 13) Chaykovsky, M., Rosowsky, A., Papathanasopoulos, N., Chen, K.K.N. and Modest, E.J.: Methotrexate analogs. Synthesis and biological properties some side-chain altered analogs. *J. Med. Chem.*, **17**, 1212 (1974).
- 14) Pachaly, P., Daskalakis, S. and Sin, K.S.: Trans-3-aryl-2-hydroxymethylpyrrolidone-5 als synthone fuer azaanaloge pharmaka. *Arch. Pharm.*, **317**, 588 (1984).
- 15) Ueda, K.: A convenient method of preparing p-toluenesulfonates of ethylesters of amino acids using ethyl p-toluenesulfonate. *Bull. Chem. Soc.*, **52**, 1879 (1979).
- 16) Scheifele, H.J. jr. and Detar, D.F.: 2-Aminobenzophenone. *Organic Synthesis VI*, John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, p. 34(1963).
- 17) Santi, D.V.: Syntheses of some analogs of a possible intermediate formed in the thymidylate synthetase reaction(1). *J. Heterocycl. Chem.*, **4**, 475 (1967).
- 18) Piper, J.R. and Montgomery, J.A.: A convenient synthesis of aminopterin and homologs via 6-(bromomethyl)-2,4-diaminopteridine hydrobromide (I). *J. Heterocycl. Chem.*, **11**, 279 (1974).
- 19) Piepr, J.R. and Montgomery, J.A.: Preparation of 6-(bromomethyl)-2, 4-pteridine diamine hydrobromide and its use in improved synthesis of methotrexate and related compounds. *J. Org. Chem.*, **42**, 208 (1977).
- 20) Foley, G.E., McCarthy, R.E., Binns, V.M., Snell, E.E., Guirard, B.M., Kidder, G.W., Dewey, V.C. and Thayer, P.S.: A comparative study of potential antitumor agents. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **76**, 413 (1958).
- 21) Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M.R.: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 1107 (1990).
- 22) Rubinstein, L.V., Paul, K.D. and Shoemaker, R.H.: Correlation of screening data generated with a tetrazolium assay(MTT) versus a protein assay(SRB) against a broad panel of human tumor cell lines. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **30**, 607 (1989).
- 23) Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H. and Boyd, M.R.: Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.*, **48**, 589 (1988).
- 24) Weisenthal, L.M., Marsden, J.A., Dill, P.L. and Macaluso, C.K.: A novel dye exculsoin method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. *Cancer Res.*, **43**, 749 (1983).