

지용성 Benz[cd]indole 엽산길항제의 합성 및 *In Vitro* 항암활성

백 두 중[#]

상명대학교 자연과학대학 화학과

(Received December 9, 2004; Revised January 10, 2005)

Synthesis of Lipophilic Benz[cd]indole Antifolates and Their Antitumor Activity *In Vitro*

Du-Jong Baek[#]

Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Sangmyung University, 7 Hongji-Dong, Chongro-Gu, Seoul 110-743, Korea

Abstract — Nonclassical aminobenz[cd]indole antifolates **4**, **5** and **6**, in which the glutamic acid moiety of the classical antifolates is substituted by 2-phenylglycinamide or 3-aminobenzamide, were synthesized and their *in vitro* antitumor activity was evaluated. The purpose of this substitution is that the lipophilicity is enhanced due to the aromatic ring of the target compounds for the passive transport through lipid membrane of cells while the hydrogen bonding of the amide is retained in the active site of the enzyme, thymidylate synthase, where the glutamate is originally present. The target compounds were highly cytotoxic against tumor cell lines of murine and human origin with micromolar to nanomolar IC₅₀ values. Most effective was compound **4** (*N*⁶-methyl-*N*⁶-[4-[(α (S)-aminocarbonylbenzyl)aminocarbonyl]benzyl]-2,6-diaminobenz[cd]indole) with IC₅₀ of 2 nM against SW480, human colon adenocarcinoma cell line, which is 650-fold more potent than the reference compound **3**.

Keywords □ benz[cd]indole, nonclassical antifolates, *in vitro* antitumor activity

DNA는 염기의 하나로 thymine을 함유하고 있고 따라서 암세포와 같은 빠르게 분열하는 세포는 DNA 합성을 위해 많은 양의 deoxythymidine-5'-monophosphate(dTMP)를 필요로 한다. dTMP(thymidylate)는 thymidylate synthase(TS; EC 2.1.1.45)에 의해 deoxyuridine-5'-monophosphate(dUMP)로부터 합성되는데 이 과정은 세포내 dTMP 합성의 유일한 단계이고, 그러한 이유로 TS 억제제는 암 화학요법 치료를 위한 효과적인 방법임이 오랫동안 증명되었다.¹⁾ 이러한 효소작용에는 *N*⁶,*N*¹⁰-methylene-tetrahydrofolate(CH₂-THF, **1**)가 cofactor로 작용하는데, 이 cofactor와 dUMP가 TS에 결합하여 3분자 복합체(ternary complex)를 형성한 다음 dUMP의 5'-위치에 methylation이 일어나면서 dihydrofolate, dTMP, TS로 분리된다.²⁾

이러한 과정에 대한 억제제로서 dUMP 유사구조로는 5-fluorouracil(5-FU)을 대표로 하여 그동안 많은 유도체들이 개발되어 항암제로 사용되어 왔지만 독성이 강하고 암세포가 저항성

을 나타내는 문제가 있었다.³⁾ 따라서 최근에는 cofactor인 CH₂-THF에 대한 유도체들이 엽산길항제(antifolate)의 작용을 가진 TS 억제제로 연구되고 있고, 그 중 raltitrexed(ZD1694, Tomudex[®], **2**)⁴⁾가 현재 항암제로서 허가를 받아 시판되고 있다. 이러한 고전적 엽산길항제(classical antifolate)의 강한 세포독성은 분자내의 glutamate 부분에 의해 강화되는데 이 부분의 α - 및 γ -COO기가 강한 수소결합으로 TS에 결합한다.²⁾ 이 glutamate는 분자의 세포 내로의 능동수송(active transport)에도 필수적인데, 이 부분은 세포 내에서 poly- γ -glutamates로 전환되고 세포 밖으로 방출이 안 되는 까닭에 세포독성이 더욱 강화된다.⁵⁾

그러나 분자 내의 바로 이러한 glutamate의 존재로 인해 위와 같은 분자가 항암제로 작용하는 데 장애가 나타나고 있는바, 암세포는 면이를 통하여 분자의 세포 내 능동수송을 차단하는 저항성을 키워왔고⁶⁾ 또한 정상세포 내에도 필요 없이 너무 오랫동안 존재하기 때문에 강한 독성을 보이는 문제를 유발하였다. 따라서 최근에는 이러한 문제를 극복하고자 glutamate 부분이 제거된 비고전적 엽산길항제(nonclassical antifolate)가 연구되고 있는데, 한 예로서 *N*⁶-methyl-*N*⁶-[4-(morpholinosulfonyl)benzyl]-2,6-diaminobenz[cd]indole(AG-331, **3**)이 TS 및 암세포에 대해

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-2287-5143 (팩스) 02-396-6133
(E-mail) djbaek@smu.ac.kr

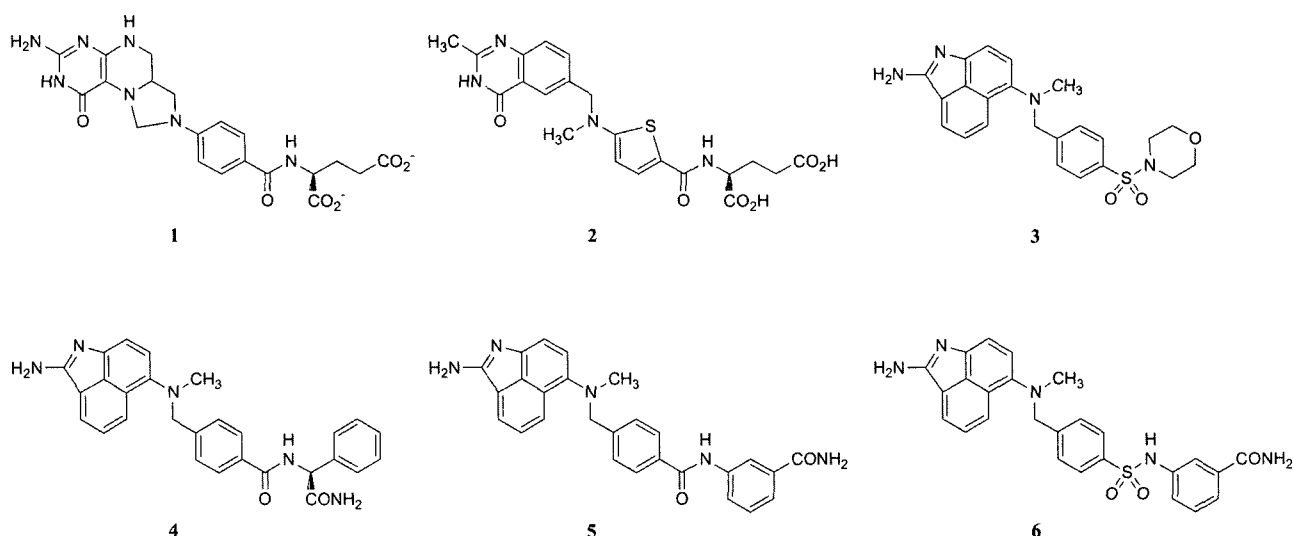


Fig. 1 – Structures of CH₂-THF, and classical and nonclassical antifolates.

강한 활성을 보이고 있음이 최근 문헌에 보고되었다.⁷⁾ 이러한 비고전적 엽산길항제는 분자 내에 glutamate 부분이 없기 때문에 능동수송이 아닌 피동수송(passive transport)에 의해 세포 내로 이송되어야 하고 따라서 지질세포막을 투과하기 위하여 분자는 지용성(lipophilicity)이 증가되도록 설계되어 있다.

본 연구실에서는 상기 AG-331의 aminobenz[cd]indole 구조를 기반으로 여기에 방향족고리와 amide 구조를 첨가한 새로운 엽산길항제 4, 5, 6을 설계하였다. 이 과정의 목적은 glutamate의 α - 또는 γ -COO기 위치에 해당하는 amide 하나를 남겨두어서 그 결과 효소 내에서 수소결합이 증가되어 활성을 증진시키고, 또한 그 자리에 방향족고리를 도입하여 분자의 피동수송(passive transport)을 위한 지용성(lipophilicity)이 증가되도록 하는 것이다. 따라서 이러한 구조적 변환은 고전적 엽산길항제와 비고전적 엽산길항제의 장점을 모두 취한 새로운 형태의 엽산길항제의 사례가 될 수 있는 바, 이러한 지용성 엽산길항제 화합물들이 실제로 항암활성을 보이는지 확인하고자 신규 화합물들을 합성하였고 이 합성화합물들이 마우스 및 인체 유래 암세포주에 대한 세포독성 성장억제에 어떤 효과를 보이는지에 대한 평가를 수행하였다.

실험 방법

시약 및 기기

시약은 Aldrich Chemical Co.의 제품을 주로 사용하였고 반응에 사용한 용매 중 무수 tetrahydrofuran(THF)과 dimethylformamide(DMF)는 각각 sodium benzophenone ketyl 및 magnesium sulfate로 건조 증류하여 사용하였으며 기타 시약과 용매는 1급 이상의 시약을 정제하지 않고 사용하였다. 합성된 화합물의 정제는 재결정 및 flash column chromatography⁸⁾로 수행하였으며

Merck silica gel 60(40~63 μ m)을 사용하였다. Thin-layer chromatography(TLC)는 Merck silica gel 60 F-254 코팅유리판(0.25 mm)을 사용하였고 자외선, 요오드, phosphomolybdic acid, anisaldehyde로 발색하여 관찰하였다. 융점은 Thomas-Hoover 모세관 융점 측정기로 측정하였고 보정하지 않았다. IR 흡수스펙트럼은 KBr pellet을 사용하여 Perkin-Elmer FTIR 1750 Spectrometer로 측정하였다. ¹H NMR 스펙트럼은 Bruker AMX-R300 Spectrometer(300 MHz)에서 CDCl₃ 또는 DMSO-d₆를 용매로 사용하여 측정하였으며, chemical shift는 δ 척도로서 ppm으로 표기하였고 중첩피크는 다음과 같이 약자로 표기하였다: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; t, triplet; q, quartet; m, multiplet; bs, broad singlet. Mass 스펙트럼(MS)은 Extrel ELQ-400 Mass Spectrometer에서 암모니아를 carrier gas로 사용하여 electrospray ionization으로 측정하였다. 원소분석은 CE Instrument EA1110을 사용하여 수행하였는데 각 원소에 대해 이론치의 $\pm 0.4\%$ 범위 내를 기준으로 사용하였다.

화합물 4: N⁶-Methyl-N⁶-[4-[(α -(S)-aminocarbonylbenzyl)aminocarbonyl]benzyl]-2,6-diaminobenz[cd]indole

N⁶-(4-Methoxycarbonylbenzyl)-6-aminobenz[cd]indol-2(1H)-one(9)의 합성 – 6-Aminobenz[cd]indol-2(1H)-one(7) 3.0 g(16.29 mmol)과 diisopropylethylamine 6.24 ml(35.83 mmol)를 무수 DMF 100 ml에 용해시키고 4-(bromomethyl)benzoic acid methyl ester(8) 3.73 g(16.29 mmol)을 가한 후 실온에서 6 시간 동안 반응시켰다. 반응 후에 혼합액을 물 800 ml에 가하고 고체가 생성되면 여과하였다. 이 고체를 dichloromethane에 용해시키고 무수 Na₂SO₄로 건조시킨 다음 감압 농축하였다. 잔사를 flash column chromatography(dichloromethane/ethyl acetate

=1:1)에 의해 정제하여 오렌지색 고체 3.73 g(수율 69%)을 얻었다: $^1\text{H NMR}(\text{DMSO}-d_6)$ δ 4.57(d, 2H, $J=5.5$ Hz), 6.12(d, 1H, $J=7.6$ Hz), 6.69(d, 1H, $J=7.6$ Hz), 7.70(d, 2H, $J=8.3$ Hz), 7.80(t, 1H, $J=7.0$ Hz), 7.92~8.00(m, 3H), 8.15(d, 1H, $J=8.2$ Hz), 10.40(s, 1H).

N^6 -Methyl- N^6 -(4-methoxycarbonylbenzyl)-6-aminobenz[cd]indol-2(1H)-one(10)의 합성 - N^6 -(4-Methoxycarbonylbenzyl)-6-aminobenz[cd]indol-2(1H)-one(9) 3.0 g(9.03 mmol)과 diisopropylethylamine 2.36 ml(13.54 mmol)를 무수 DMF 30 ml에 용해시키고 iodomethane 0.67 ml(10.83 mmol)를 가한 후 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 후에 혼합액을 물 750 ml에 가하고 오렌지색 고체가 생성되면 여과하였다. 이 고체를 dichloromethane에 용해시키고 무수 Na_2SO_4 로 건조시킨 다음 감압 농축하였다. 잔사를 flash column chromatography(dichloromethane/ethyl acetate=1:1)에 의해 정제하여 오렌지색 고체 2.0 g(수율 65%)을 얻었다: 용점 162.5~163.0°C; IR 3200, 2950, 1730, 1700, 1480, 1290, 1130 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}(\text{DMSO}-d_6)$ δ 2.78(s, 3H), 3.85(s, 3H), 4.42(s, 2H), 6.85(d, 1H, $J=7.5$ Hz), 6.97(d, 1H, $J=7.6$ Hz), 7.57(d, 2H, $J=8.3$ Hz), 7.79(t, 1H, $J=7.1$ Hz), 7.94~8.01(m, 3H), 8.29(d, 1H, $J=8.2$ Hz), 10.60(s, 1H); Mass m/z 347(M+1).

N^6 -Methyl- N^6 -(4-methoxycarbonylbenzyl)-6-aminobenz[cd]indol-2(1H)-thione(11)의 합성 - N^6 -Methyl- N^6 -(4-methoxycarbonylbenzyl)-6-aminobenz[cd]indol-2(1H)-one(10) 1.8 g(5.20 mmol)을 toluene 70 ml에 혼합하고 환류교반한 다음 Lawesson's Reagent(Aldrich 22,743-9) 2.31 g(5.72 mmol)을 넣고 1시간 환류교반하였다. 반응혼합액을 감압 농축하여 용매를 제거하고 flash column chromatography(dichloromethane/ethyl acetate=1:1)에 의해 정제하여 붉은색 고체 1.33 g(수율 71%)을 얻었다: IR 3450, 3200, 2950, 1730, 1450, 1300, 1210 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}(\text{DMSO}-d_6)$ 2.86(s, 3H), 3.85(s, 3H), 4.54(s, 2H), 6.95(d, 1H, $J=7.7$ Hz), 7.08(d, 1H, $J=7.7$ Hz), 7.55(d, 2H, $J=8.2$ Hz), 7.78(t, 1H, $J=8.1$ Hz), 7.98(d, 2H, $J=8.2$ Hz), 8.14(d, 1H, $J=7.1$ Hz), 8.34(d, 1H, $J=8.2$ Hz), 12.61(s, 1H); Mass m/z 363(M+1).

N^6 -Methyl- N^6 -(4-methoxycarbonylbenzyl)-2-methylthio-6-aminobenz[cd]indole(12)의 합성 - N^6 -Methyl- N^6 -(4-methoxycarbonylbenzyl)-6-aminobenz[cd]indol-2(1H)-thione(11) 1.3 g(3.59 mmol)을 ethanol/THF 1:1 혼합액 10 ml에 녹이고 1 N NaOH 수용액 7.8 ml(7.8 mmol)를 실온에서 적가한 뒤 iodomethane 0.25 ml(3.95 mmol)를 가하고 30분간 교반하였다. 물 50 ml를 넣고 ethyl acetate로 70 ml씩 3번 추출한 다음 식염수로 씻고 무수 Na_2SO_4 로 건조하였다. 유기용액을 감압 농축시켜 얻은 잔사를 flash column chromatography(dichloromethane/

ethyl acetate=7:1)에 의해 정제하여 붉은색 고체 1.0 g(수율 75%)을 얻었다: 용점 98.7~100.0°C; IR 3050, 2950, 1730, 1450, 1280, 940 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ 2.80(s, 3H), 2.88(s, 3H), 3.88(s, 3H), 4.57(s, 2H), 6.81(d, 1H, $J=7.7$ Hz), 7.45~7.48(m, 4H), 7.82(d, 1H, $J=7.0$ Hz), 8.03(d, 2H, $J=8.2$ Hz), 8.08(d, 1H, $J=8.2$ Hz); Mass m/z 376(M⁺), 278, 227, 211.

N^6 -Methyl- N^6 -(4-hydroxycarbonylbenzyl)-2-methylthio-6-aminobenz[cd]indole(13)의 합성 - N^6 -Methyl- N^6 -(4-methoxycarbonylbenzyl)-2-methylthio-6-aminobenz[cd]indole(12) 0.95 g(2.52 mmol)을 acetone 12 ml에 녹이고 1 N LiOH 수용액 12.6 ml(12.6 mmol)를 가한 다음 35°C에서 1시간 교반하였다. 반응완료 후 반응액을 반으로 감압 농축하고 진한 염산으로 pH를 7로 맞춘 다음 ethyl acetate로 추출하였다. 유기용액을 식염수로 씻고 무수 Na_2SO_4 로 건조시킨 다음 감압 농축하여 붉은색 고체 0.82 g(수율 95%)을 얻었다: 용점 219~219.5°C; IR 3500(br), 2950, 2500(br), 1720, 1470, 1250, 1140, 950, 830, 780 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}(\text{DMSO}-d_6)$ 2.78(s, 3H), 2.96(s, 3H), 4.68(s, 2H), 6.89(d, 1H, $J=7.8$ Hz), 7.52(d, 3H, $J=7.4$ Hz), 7.67(t, 1H, $J=7.2$ Hz), 7.95~8.01(m, 3H), 8.23(d, 1H, $J=8.2$ Hz).

N^6 -Methyl- N^6 -[4-[(α (S)-methoxycarbonylbenzyl)amino-carbonylbenzyl]-2-methylthio-6-aminobenz[cd]indole(14)의 합성 - N^6 -Methyl- N^6 -(4-hydroxycarbonylbenzyl)-2-methylthio-6-aminobenz[cd]indole(13) 1.0 g(2.76 mmol)을 DMF 10 ml에 녹이고 0°C로 냉각한 다음 아르곤기체 하에서 diisopropylethylamine 0.72 ml(4.14 mmol)와 diphenylphosphoryl azide(DPPA) 0.65 ml(3.03 mmol)를 가하고 30분간 교반하였다. (S)-(+)-2-phenylglycine methyl ester HCl salt 0.55 g(2.76 mmol)을 가한 후 실온에서 12시간 교반하였다. 반응후 혼합액을 물 100 ml에 넣고 고체가 생성되면 여과하였다. 이 고체를 dichloromethane에 녹이고 무수 Na_2SO_4 로 건조한 다음 감압 농축하였다. 얻어진 잔사를 flash column chromatography(dichloromethane/ethyl acetate=1:1)에 의해 정제하여 붉은색 고체 0.80 g(수율 58%)을 얻었다: IR 3450, 2950, 1750, 1650, 1500, 1450, 1240, 940 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ 2.85(s, 3H), 2.92(s, 3H), 3.78(s, 3H), 4.61(s, 2H), 5.81(d, 1H, $J=7.0$ Hz), 6.85(d, 1H, $J=7.6$ Hz), 7.27(s, 1H), 7.37~7.49(m, 3H), 7.50~7.55(m, 6H), 7.84(m, 3H), 8.11(d, 1H, $J=8.2$ Hz); Mass m/z 510(M+1), 433, 307, 229, 205, 180.

N^6 -Methyl- N^6 -[4-[(α (S)-aminocarbonylbenzyl)amino-carbonylbenzyl]-2,6-diaminobenz[cd]indole(4)의 합성 - N^6 -Methyl- N^6 -[4-[(α (S)-methoxycarbonylbenzyl)amino-carbonylbenzyl]-2-methylthio-6-aminobenz[cd]indole(14) 0.25 g을 ammonia 기체가 포화된 methanol 용액 25 ml에 넣고 sealed tube 내에서 145°C로 5시간 반응시켰다. 반응 후 혼합액을 실온으로

냉각시키고 용매를 감압 농축하였다. 얻어진 잔사를 flash column chromatography(dichloromethane/methanol=5:1)에 의해 정제하여 오렌지색 고체 0.10 g(수율 45%)을 얻었다: IR 3350, 3200, 1650, 1480, 1450, 1260, 1220, 940, 820, 760, 700 cm^{-1} ; ^1H NMR(DMSO- d_6) 2.76(s, 3H), 4.40(s, 2H), 5.64(d, 1H, $J=7.9$ Hz), 6.80(d, 1H, $J=7.5$ Hz), 6.87(d, 1H, $J=7.4$ Hz), 7.29~7.39(m, 3H), 7.46~7.54(m, 4H), 7.62(t, 1H, $J=7.2$ Hz), 7.70(s, 1H), 7.92(d, 2H, $J=8.2$ Hz), 8.04(m, 2H), 8.69(d, 1H, $J=8.2$ Hz); Mass m/z 463(M^+), 335, 266, 223, 196, 169, 147; 원소분석($\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 계산치 C, 69.84; H, 5.65; N, 14.54. 측정치 C, 69.66; H, 5.58; N, 14.58.

화합물 5: N^6 -Methyl- N^6 -[4-[(3-aminocarbonylphenyl)aminocarbonyl]benzyl]-2,6-diaminobenz[cd]indole

N^6 -Methyl- N^6 -[4-[(3-methoxycarbonylphenyl)aminocarbonyl]benzyl]-2-methylthio-6-aminobenz[cd]indole(15)의 합성 - 화합물 14의 합성과 동일한 방법에 의해 N^6 -methyl- N^6 -(4-hydroxycarbonylbenzyl)-2-methylthio-6-aminobenz[cd]indole(13) 0.80 g(2.20 mmol), diisopropylethylamine 0.58 ml(3.30 mmol), diphenylphosphoryl azide(DPPA) 0.57 ml(2.65 mmol), 3-aminobenzoic acid methyl ester 0.33 g(2.20 mmol)을 사용하여 붉은색 고체 0.62 g(수율 63%)을 얻었다: IR 3450, 2950, 1740, 1605, 1450, 1300, 1280, 1050, 940, 750 cm^{-1} ; ^1H NMR(CDCl_3) 2.84(s, 6H), 3.90(s, 3H), 4.54(s, 2H), 6.81(d, 1H, $J=7.0$ Hz), 7.27(s, 1H), 7.37(t, 1H, $J=7.9$ Hz), 7.43~7.51(m, 5H), 7.73(s, 1H), 7.78~7.86(m, 3H), 8.03(d, 1H, $J=8.2$ Hz).

N^6 -Methyl- N^6 -[4-[(3-aminocarbonylphenyl)aminocarbonyl]benzyl]-2,6-diaminobenz[cd]indole(5)의 합성 - 화합물 4의 합성과 동일한 방법에 의해 N^6 -methyl- N^6 -[4-[(3-methoxycarbonylphenyl)aminocarbonyl]benzyl]-2-methylthio-6-aminobenz[cd]indole(15) 0.25 g으로부터 오렌지색 고체 0.068 g(수율 30%)을 얻었다: 융점 181°C(분해); IR 3350, 3200, 1670, 1610, 1450, 1220, 940, 770 cm^{-1} ; ^1H NMR(DMSO- d_6) 2.70(s, 3H), 4.37(s, 2H), 6.79(d, 1H, $J=7.5$ Hz), 6.88(d, 1H, $J=7.5$ Hz), 7.25~7.31(m, 2H), 7.50(s, 1H), 7.53~7.63(m, 5H), 7.75(d, 2H, $J=8.3$ Hz), 8.02(s, 1H), 8.04~8.05(m, 2H); Mass m/z 449(M^+), 331, 285, 240, 211, 197, 179, 83; 원소분석($\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 계산치 C, 69.36; H, 5.39; N, 14.98. 측정치 C, 69.26; H, 5.42; N, 14.67.

화합물 6: N^6 -Methyl- N^6 -[4-[N-(3-aminocarbonylphenyl)aminosulfonyl]benzyl]-2,6-diaminobenz[cd]indole

4-(Bromomethyl)benzenesulfonyl chloride(17)의 합성 - *p*-Toluenesulfonyl chloride(16) 10.0 g(52.5 mmol)을 carbon

tetrachloride 300 ml에 녹인 후 NBS(*N*-bromosuccinimide) 10.3 g(57.9 mmol)과 benzoyl peroxide 1.27 g(5.25 mmol)을 가하고 1시간 환류교반하였다. 반응후 혼합액을 실온으로 냉각시키고 여과한 다음 여액을 감압 농축하였다. 얻어진 잔사를 flash column chromatography(hexane/ethyl acetate=10:1)에 의해 정제하여 무색 액체 12.0 g을 얻었다. 이 액체에 hexane 200 ml를 가하고 영하 30°C에서 강하게 교반하여 생성된 고체를 여과하여 흰색 고체 9.2 g(수율 65%)을 얻었다: 융점 73.8~74.2°C; IR 3100, 1950, 1600, 1420, 1380, 1180, 1080, 850, 670 cm^{-1} ; ^1H NMR(CDCl_3) 4.52(s, 2H), 7.66(d, 2H, $J=8.5$ Hz), 8.03(d, 2H, $J=8.5$ Hz).

***N*-(Benzyloxycarbonyl)-3-aminobenzoic acid methyl ester(18)의 합성** - 3-Aminobenzoic acid methyl ester 10.0 g(66.2 mmol)을 1N NaOH methanol 용액 70 ml(70.0 mmol)에 녹이고 5°C 이하에서 benzyl chloroformate 10.0 ml(70.0 mmol)를 적가한 다음 실온에서 2시간 교반하였다. 반응혼합물을 감압 농축하고 물 100 ml를 가한 다음 1N 염산 수용액으로 pH를 7이 되게 중화하였다. ethyl acetate로 100 ml씩 3번 추출한 다음 식염수로 씻고 무수 MgSO_4 로 건조하였다. 유기용액을 감압 농축시켜 얻은 잔사를 flash column chromatography(dichloromethane)에 의해 정제하여 흰색 고체 17.0 g(수율 90%)을 얻었다: 융점 119.8~120.0°C; ^1H NMR(CDCl_3) 3.90(s, 3H), 5.22(s, 2H), 6.91(s, 1H), 7.37~7.41(m, 6H), 7.73(m, 2H), 7.97(s, 1H).

***N*-(Benzyloxycarbonyl)-*N*-4-(bromomethyl)benzenesulfonyl-3-aminobenzoic acid methyl ester(19)의 합성** - *N*-(Benzyloxycarbonyl)-3-aminobenzoic acid methyl ester(18) 15.0 g(52.5 mmol)을 THF 300 ml에 녹이고 NaH 1.5 g(63.1 mmol)을 조금씩 넣어준 후 30분간 교반하였다. 여기에 다시 4-(bromomethyl)benzenesulfonyl chloride 14.2 g(52.7 mmol)을 가하여 실온에서 2시간 교반하였다. 반응혼합물을 감압 농축하고 dichloromethane 400 ml를 가한 다음 물 50 ml씩 3회와 식염수로 한번 씻고 무수 MgSO_4 로 건조하였다. 유기용액을 감압 농축시켜 얻은 잔사를 flash column chromatography(dichloromethane/ethyl acetate=10:1)에 의해 정제하여 흰색 고체 16.5 g(수율 60%)을 얻었다: 융점 152.7~153.5°C; IR 3050, 2950, 1750, 1730, 1600, 1450, 1370, 1310, 1270, 1090, 850, 760 cm^{-1} ; ^1H NMR(CDCl_3) 3.94(s, 3H), 4.50(s, 2H), 5.10(s, 2H), 7.13(m, 2H), 7.30~7.32(m, 3H), 7.49~7.55(m, 4H), 7.92(m, 3H), 8.15(s, 1H).

N^6 -[4-[*N*-(3-Methoxycarbonylphenyl)-*N*-(benzyloxycarbonyl)aminosulfonyl]benzyl]-6-aminobenz[cd]indol-2(1H)-one(20)의 합성 - 화합물 9의 합성과 동일한 방법에 의해 6-aminobenz[cd]indol-2(1H)-one(7) 2.96 g(16.1 mmol), diisopropylethylamine 6.16 ml(35.3 mmol), *N*-(benzyloxycarbonyl)-*N*-4-

(bromomethyl)benzenesulfonyl-3-aminobenzoic acid methyl ester(**19**) 10.0 g(19.3 mmol)을 사용하여 반응을 진행시키고 flash column chromatography(dichloromethane/ethyl acetate=2:1)에 의해 정제하여 오렌지색 고체 7.2 g(수율 72%)을 얻었다: 융점 177.5~178.2°C; $^1\text{H NMR}(\text{DMSO}-d_6)$ 3.93(s, 3H), 4.68(d, 2H, $J=5.6$ Hz), 5.14(s, 2H), 6.22(d, 1H, $J=7.8$ Hz), 6.76(d, 1H, $J=7.6$ Hz), 7.17(m, 2H), 7.32(m, 4H), 7.74(m, 4H), 7.88(t, 1H, $J=8.3$ Hz), 7.96(d, 2H, $J=8.4$ Hz), 8.07(d, 1H, $J=7.0$ Hz), 8.14(d, 1H, $J=7.2$ Hz), 8.61(d, 1H, $J=8.2$ Hz), 10.47(s, 1H).

N^6 -Methyl- N^6 -[4-[N -(3-methoxycarbonylphenyl)- N -(benzyloxycarbonyl)aminosulfonyl]benzyl]-6-aminobenz[cd]indol-2(1H)-one(21**)의 합성** - 화합물 **10**의 합성과 동일한 방법에 의해 N^6 -[4-[N -(3-methoxycarbonylphenyl)- N -(benzyloxycarbonyl)aminosulfonyl]benzyl]-6-aminobenz[cd]indol-2(1H)-one(**20**) 5.0 g(8.04 mmol), diisopropylethylamine 2.1 ml (12.06 mmol), iodomethane 0.60 ml(9.70 mmol)를 사용하여 오렌지색 고체 3.16 g(수율 62%)을 얻었다: IR 3450, 3200, 1750, 1700, 1450, 1300, 1170, 750 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3+\text{DMSO}-d_6)$ 2.85(s, 3H), 3.94(s, 3H), 4.45(s, 2H), 5.10(s, 2H), 6.87(d, 1H, $J=7.5$ Hz), 6.94(d, 1H, $J=7.6$ Hz), 7.14(dd, 2H, $J=4.0$ Hz), 7.28(m, 3H), 7.50~7.62(m, 4H), 7.73(t, 1H, $J=7.3$ Hz), 7.89(m, 3H), 8.04(d, 1H, $J=6.9$ Hz), 8.14(d, 1H, $J=7.2$ Hz), 8.25(d, 1H, $J=8.2$ Hz); Mass m/z 635(M^+).

N^6 -Methyl- N^6 -[4-[N -(3-methoxycarbonylphenyl)- N -(benzyloxycarbonyl)aminosulfonyl]benzyl]-6-aminobenz[cd]indol-2(1H)-thione(22**)의 합성** - N^6 -Methyl- N^6 -[4-[N -(3-methoxycarbonylphenyl)- N -(benzyloxycarbonyl)aminosulfonyl]benzyl]-6-aminobenz[cd]indol-2(1H)-one(**21**) 3.0 g(4.72 mmol)을 toluene 100 ml에 혼합하고 120°C로 가열한 다음 Lawesson's Reagent 2.1 g(5.19 mmol)을 넣고 1시간 교반하였다. 반응혼합액을 감압 농축하여 용매를 제거하고 flash column chromatography(dichloromethane/ethyl acetate=3:1)에 의해 정제하여 붉은색 고체 1.54 g(수율 51%)을 얻었다: $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3+\text{DMSO}-d_6)$ 2.93(s, 3H), 3.94(s, 3H), 4.57(s, 2H), 5.14(s, 2H), 6.97(d, 1H, $J=7.7$ Hz), 7.05(d, 1H, $J=7.7$ Hz), 7.17(dd, 2H, $J=4.0$ Hz), 7.32(m, 3H), 7.64(m, 4H), 7.72(t, 1H, $J=8.3$ Hz), 7.99(m, 3H), 8.07(d, 1H, $J=7.0$ Hz), 8.14(d, 1H, $J=7.2$ Hz), 8.28(d, 1H, $J=8.3$ Hz).

N^6 -Methyl- N^6 -[4-[N -(3-methoxycarbonylphenyl)aminosulfonyl]benzyl]-2-methylthio-6-aminobenz[cd]indole(23**)의 합성** - 화합물 **12**의 합성과 동일한 방법에 의해 N^6 -methyl- N^6 -[4-[N -(3-methoxycarbonylphenyl)- N -(benzyloxycarbonyl)aminosulfonyl]benzyl]-6-aminobenz[cd]indol-2(1H)-thione(**22**) 1.5 g

(2.30 mmol)과 iodomethane 0.16 ml(2.54 mmol)를 사용하여 반응을 진행시키고 flash column chromatography(dichloromethane/ethyl acetate=1:1)에 의해 정제하여 붉은색 고체 0.85 g(수율 70%)을 얻었다: IR 3450, 3300, 2950, 1730, 1600, 1500, 1460, 1300, 1150, 1020, 940, 760 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ 2.83(s, 3H), 2.85(s, 3H), 3.85(s, 3H), 4.53(s, 2H), 6.82(d, 1H, $J=7.7$ Hz), 6.93(s, 1H), 7.36(t, 1H, $J=7.8$ Hz), 7.42~7.55(m, 5H), 7.69(t, 1H, $J=3.5$ Hz), 7.78~7.83(m, 3H), 7.87(d, 1H, $J=7.0$ Hz), 8.04(d, 1H, $J=8.2$ Hz); Mass m/z 531(M^+).

N^6 -Methyl- N^6 -[4-[N -(3-aminocarbonylphenyl)aminosulfonyl]benzyl]-2,6-diaminobenz[cd]indole(6**)의 합성** - 화합물 **4**의 합성과 동일한 방법에 의해 N^6 -methyl- N^6 -[4-[N -(3-methoxycarbonylphenyl)aminosulfonyl]benzyl]-2-methylthio-6-aminobenz[cd]indole(**23**) 0.25 g으로부터 오렌지색 고체 0.070 g(수율 32%)을 얻었다: IR 3400, 3250, 1680, 1540, 1480, 1240, 1090, 710 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}(\text{DMSO}-d_6)$ 2.74(s, 3H), 4.36(s, 2H), 6.78(d, 1H, $J=7.5$ Hz), 6.88(d, 1H, $J=7.5$ Hz), 7.25~7.30(m, 2H), 7.51(s, 1H), 7.54~7.64(m, 5H), 7.77(d, 2H, $J=8.4$ Hz), 7.87(s, 1H), 8.06(m 2H); Mass m/z 485(M^+), 310, 282, 256, 224, 196, 169; 원소분석($\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_3\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$) 계산치 C, 62.01; H, 5.00; N, 13.91; S, 6.37; O, 12.71. 측정치 C, 62.40; H, 4.94; N, 13.62; S, 6.57; O, 12.47.

***In vitro* 암세포증식 억제효과 측정⁹⁾**

합성된 화합물들의 항암활성은 *in vitro* 세포증식 억제효과를 측정함으로써 검증하였다. 본 실험에서는 마우스 유래의 림프성 백혈병세포 L1210(ATCC CCL-219), 인체 유래의 T-세포 급성 림프성 백혈병세포 CCRF-CEM(ATCC CRL-8436), 결장 선암 세포 SW480(ATCC CCL-228), 유방 선암세포 MCF7(ATCC HTB-22), 악성 흑색종(피부암)세포 SK-MEL-2(ATCC HTB-68)의 암세포주들을 사용하였다. 세포배양에 필요한 배지로는 5% 송아지 혈청과 dimethylsulfoxide(DMSO)를 함유하는 RPMI-1640 배지를 사용하였으며 37°C의 항온항습 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 세포의 계대는 3~4일에 1회씩 시행하였다. 항암활성의 측정을 위해서는 세포성장이 무처치군의 50%로 억제되는 농도(IC_{50})를 MTT^{10} 분광법을 이용하여 결정하였다. 이 실험에서는 먼저 세포를 6,000(L1210, MCF7), 8,000(SW480), 10,000(CCRF-CEM, SK-MEL-2) 세포씩 96-well plate의 각 well에 분주한 다음 시험화합물을 여섯 농도의 log dose로 넣어 주고 배양하면서 세포의 성장정도를 관찰하였다. 화합물들을 용해시키는 데는 필요에 따라 DMSO를 사용하였으며 이때 세포배양액에 가해지는 DMSO의 농도는 0.5% 이하가 되도록 하였다. 배양시간은 2일(L1210, SK-MEL-2), 3일(CCRF-CEM, SW480), 4일(MCF7)이었고, 배양완료 후 MTT 로 4시간 처리하고 세포를

수집하였다. 세포수는 분광학적 방법으로 결정하였는데 MTT로부터 세포에 의해 생성되어 침전된 formazan을 DMSO에 용해시킨 다음 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. IC₅₀ 값을 얻기 위해서는 화합물농도 대수값 대 세포성장 백분율의 그래프로부터 50% 억제율을 일으키는 농도를 계산하였다. 이러한 IC₅₀ 값은 3회 반복시행하여 평균값을 취하였다.

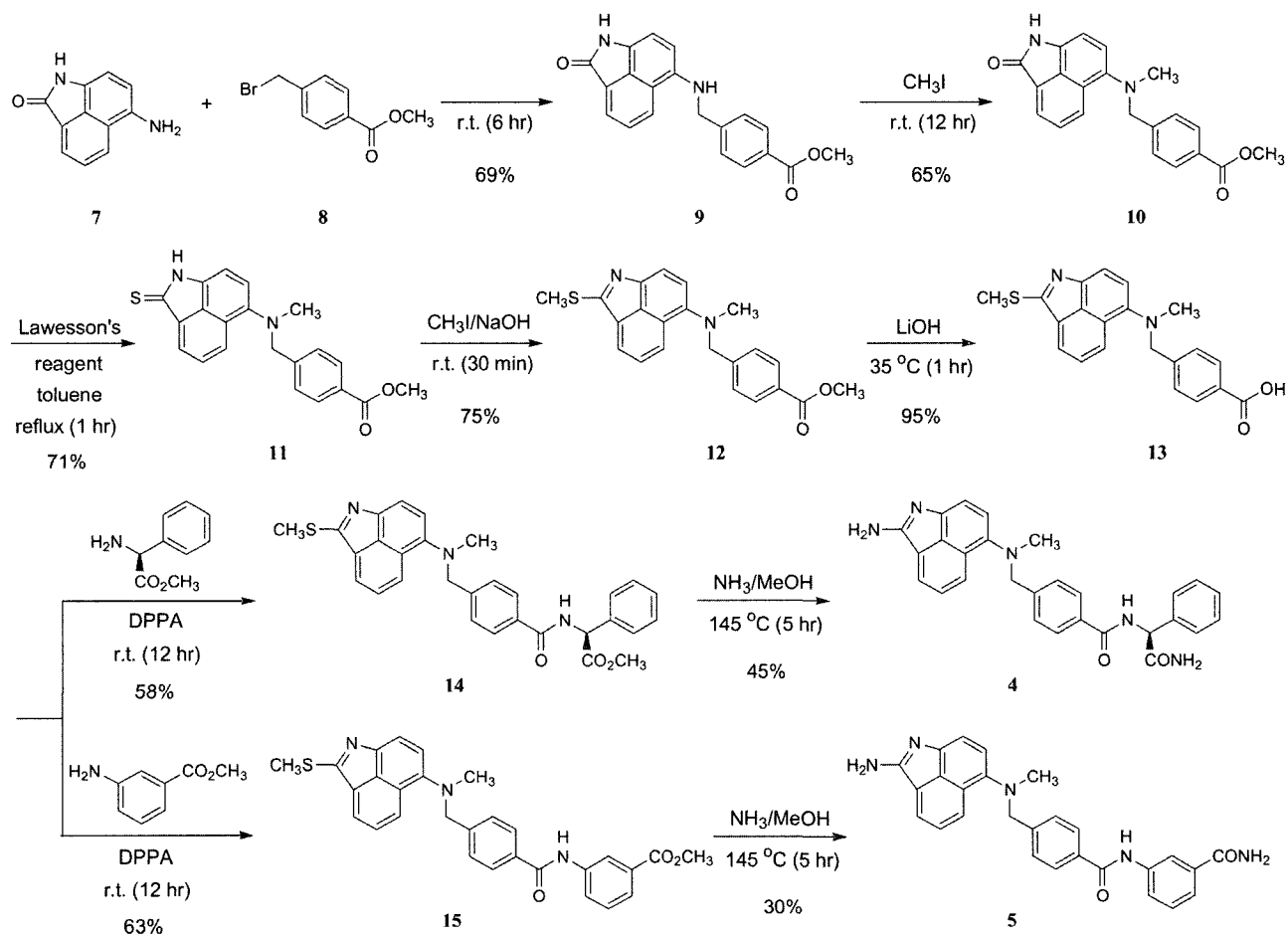
결과 및 고찰

합성

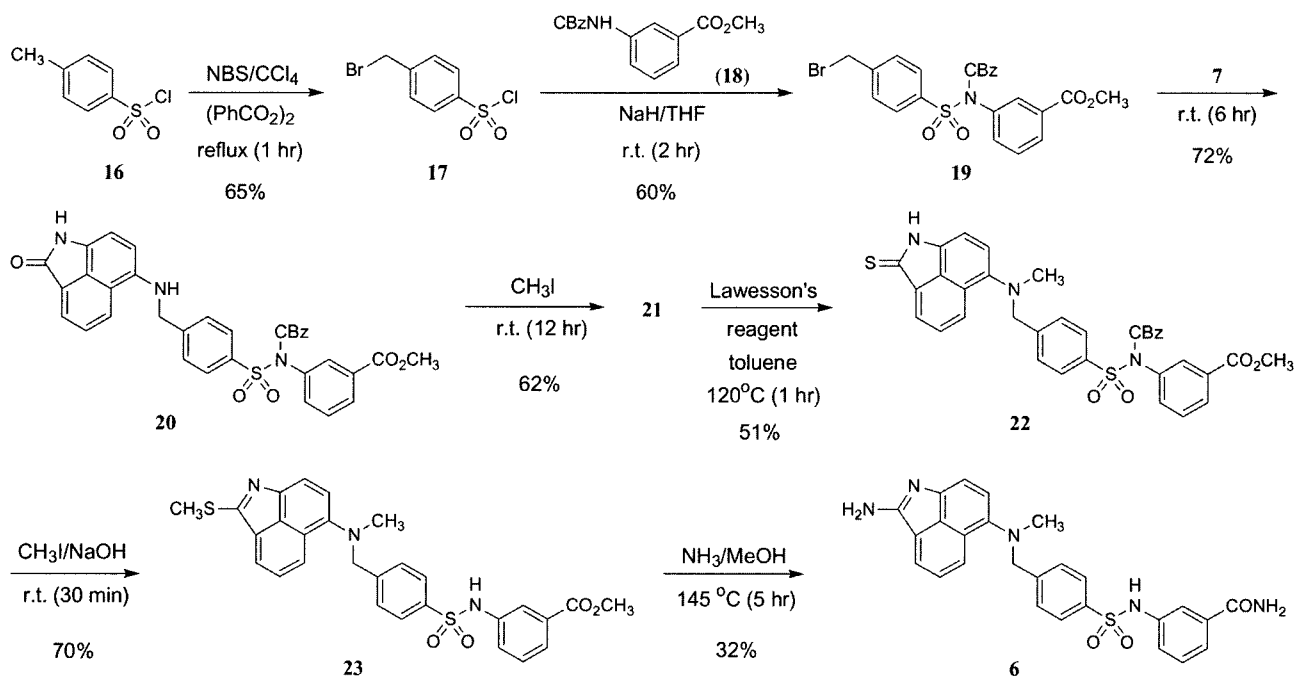
목적 화합물 4와 5는 Scheme 1에 따라 합성하였다. 먼저 diisopropylethylamine 존재 하에 6-aminobenz[*cd*]indol-2(1*H*)-one 7⁷⁾을 bromide 8과 반응시킨 다음 *N*-methylation시켜서 aminobenzindolone 유도체 10을 합성하였다. 이어서 Lawesson's reagent¹¹⁾를 사용하여 lactam 작용기를 thiolactam으로 바꾸고 여기에 염기조건 하에서 methylation¹²⁾시켜서 methylthiobenzindole 유도체 12를 만든 다음 ester를 가수분해하여 주요 중간체 13을 합성하였다. 이 중간체를 diphenylphosphoryl azide

(DPPA)¹³⁾ 존재 하에 (*S*)-(+)-2-phenylglycine methyl ester 또는 3-aminobenzoic acid methyl ester와 상온에서 12시간 반응시켜 각각 중간체 14와 15를 합성하였다. 각 중간체를 sealed tube 내에서 methanol에 포화된 ammonia와 145°C에서 5시간 반응시켜 thiomethyl group을 amino group으로 치환하였으며 이 과정에서 methyl ester도 동시에 amide group으로 변환된 목적 화합물 4와 5를 합성하였다.

Amide대신 sulfonamide 작용기를 가진 목적 화합물 6도 유사하게 합성하였는데 이 경우는 sulfonamide를 먼저 형성한 다음 여기에 aminobenzindolone을 결합하였고 이를 Scheme 2에 나타내었다. 먼저 toluenesulfonyl chloride를 radical bromination시켜서 *p*-bromomethylbenzenesulfonyl chloride 17을 합성한 다음 carbobenzyloxy(CBz)로 보호된 3-aminobenzoic acid methyl ester 18과 반응시켜 sulfonamide 19를 합성하였다. 이 화합물의 bromide를 6-aminobenz[*cd*]indol-2(1*H*)-one 7과 결합시켜 중간체 20을 합성한 다음 앞서와 같이 *N*-methylation, Lawesson's reagent에 의한 thiolactam 형성, 염기조건 하의 methylation에 의한 methylthiobenzindole 합성을 수행하였고 이 단계에서 CBz



Scheme 1 – Synthesis of the target compounds 4 and 5.



Scheme 2 – Synthesis of the target compound 6.

보호기도 동시에 떨어졌다. 이어서 sealed tube 내에서의 ammonolysis를 행하여 목적 화합물 6을 합성하였다.

In vitro 항암활성

합성된 화합물들의 항암활성은 *in vitro* 세포증식 억제효과를 측정함으로써 검증하였고 그 결과를 Table I에 나타내었다. 화합물 4와 5는 IC_{50} 값이 micromole 단위에서 nanomole 단위까지의 우수한 세포독성을 보이고 있으며 대조물질인 화합물 3(AG-331)과 비교하여 5종의 암세포주 중에서 3종(L1210, SW480, SK-MEL-2)에 대하여는 더 우수한 활성을 보였고 2종(CCRF-CEM, MCF-7)에 대하여는 효과가 감소하였다. 하지만 효과가 2.0~2.6 배 감소한 2종의 경우도 0.47~1.9 μM 의 IC_{50} 값을 보이고 있어서 여전히 높은 항암활성을 유지하고 있다고 할 수 있다. 이 두 화합물 중 화합물 4가 화합물 5에 비해 모든 암세포주에서 더 우수한 세포독성을 보이고 있으며 특히 인체유래 결장 선암세포주인 SW480에서 대조물질보다 650배 높은 활성인 2 nM의 IC_{50} 값을 보이고 있어서 세포독성이 아주 우수함을 알 수 있다. 이러

Table I – *In vitro* cell growth inhibition of benz[cd]indole antifolates. IC_{50} , μM

Entry	L1210	CCRF-CEM	SW480	MCF-7	SK-MEL-2
3	7.1	0.24	1.3	0.85	9.9
4	2.7	0.47	0.002	1.8	2.8
5	3.9	0.63	0.54	1.9	7.4
6	15.3	5.5	8.6	nd	13.2

nd, not determined.

한 화합물 4와 5의 높은 활성은 염산에 있는 glutamate의 α - 또는 γ -COO기에 해당하는 위치에 amide가 존재하여 효소 내에서 수소결합이 가능하고 또한 그 자리에 있는 방향족 고리의 지용성으로 인하여 분자가 지질세포막을 통과하는 피동수송(passive transport)이 가능하도록 유도된 결과일 것이라고 추정하였다. 이러한 실험결과는 본 연구실에서 최근 발표한 결과로서 지용성이 증가하고 효소와 강한 수소결합이 가능한 비고전적 엽산길항제가 높은 *in vitro* 세포증식 억제효과를 보이고 있다는 결과^{14,15}와도 일치하는 것이다.

반면, amide 대신 sulfonamide 작용기를 가진 화합물 6은 대조물질 3과 좀더 유사한 구조임에도 불구하고 활성은 1.3배에서 20배까지 낮았는데 이는 morpholine ring에 비해 더 큰 구조의 aminobenzamide가 효소와 결합할 때 더 큰 저항을 받기 때문일 것이라고 추정하였다.

결 론

비고전적 엽산길항제로서 aminobenz[cd]indole ring을 가지고 glutamate 대신 2-phenylglycinamide 또는 3-aminobenzamide가 결합된 화합물 4, 5, 6을 합성하였고 그의 *in vitro* 항암활성을 측정하였다. 이 과정의 목적은 glutamate의 α - 또는 γ -COO기에 해당하는 위치의 amide가 효소 내에서 수소결합을 통하여 강한 결합을 하도록 유도하면서 동시에 그 자리에 있는 방향족 고리의 지용성으로 인하여 분자가 지질세포막을 통과하는 피동수송(passive transport)이 가능하도록 유도하여 세포독성이 증가하도

록 하는 것이었다. 이 화합물들은 마우스 및 인체 유래 암세포주에 대하여 micromole 단위에서 nanomole 단위까지의 우수한 세포독성 성장억제효과를 보였고 대조물질과 비교하여 유사하거나 높은 활성을 보이고 있다. 특히 화합물 4의 경우 인체유래 결장 선암세포주인 SW480에서 대조물질보다 650배 높은 활성인 2 nM의 IC₅₀ 값을 보이고 있어서 세포독성이 아주 우수함을 알 수 있다.

감사의 말씀

상기 화합물의 항암활성 측정은 중외제약 중앙연구소에서 수행되었기에 이에 감사의 말씀을 드립니다.

문헌

- 1) Jackman, A. L., Kimbell, R., Brown, M., Brunton, L., Harrap, K. R., Wardelworth, J. M. and Boyle, F. T. : The antitumour activity of ZD9331, a non-polyglutamatable quinazoline thymidylate synthase inhibitor. *Adv. Exp. Med. Biol.* **370**, 185 (1994).
- 2) Santi, D. V. : Perspectives on the design and biochemical pharmacology of inhibitors of thymidylate synthetase. *J. Med. Chem.* **23**, 103 (1980).
- 3) Myers, C. E. : The pharmacology of the fluoropyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **33**, 1 (1981).
- 4) Marsham, P. R., Hughes, L. R., Jackman, A. L., Hayter, A. J., Oldfield, J., Wardleworth, J. M., Bishop, J. A. M., O'Connor, B. M. and Calvert, A. H. : Quinazoline antifolate thymidylate synthase inhibitors: heterocyclic benzoyl ring modifications. *J. Med. Chem.* **34**, 1594 (1991).
- 5) Sikora, E., Jackman, A. L., Newell, D. R. and Calvert, A. H. : Formation and retention and biological activity of N¹⁰-propargyl-5,8-dideazafolic acid (CB3717) polyglutamates in L1210 cells *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 4047 (1988).
- 6) Fry, D. W. and Jackson, R. C. : Membrane transport alterations as a mechanism of resistance to anticancer agents. *Cancer Surv.* **5**, 47 (1986).
- 7) Varney, M. D., Marzoni, G. P., Palmer, C. L., Deal, J. G., Webber, S., Welsh, K. M., Bacquet, R. J., Bartlett, C. A., Morse, C. A., Booth, C. L. J., Herrmann, S. M., Howland, E. F., Ward, R. W. and White, J. : Crystal-structure-based design and synthesis of benz[cd]indole-containing inhibitors of thymidylate synthase. *J. Med. Chem.* **35**, 663 (1992).
- 8) Still, W. C., Kahn, M. and Mitra, A. : Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.* **43**, 2923 (1978).
- 9) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55 (1983).
- 10) MTT is 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide.
- 11) Pedersen, B. S., Scheibye, S., Nilsson, N. H. and Lawesson, S.-O. : Studies on organophosphorus compounds. XX. Synthesis of thioketones. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **87**, 223 (1978).
- 12) Ficken, G. E. and Kendall, J. D. : The reactivity of the alkylthio-group in nitrogen ring compounds. Part III. 2-Methylthio-benz[cd]indole and its methiodide. *J. Chem. Soc.* 1537 (1960).
- 13) Shioiri, T., Ninomiya, K. and Yamada, S. : Diphenylphosphoryl azide. New convenient reagent for a modified Curtius reaction and for peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 6203 (1972).
- 14) Baek, D.-J., Park, Y.-K., Heo, H. I., Lee, M., Yang, Z. and Choi, M. : Synthesis of 5-substituted quinazoline derivatives and their inhibitory activity *in vitro*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 3287 (1998).
- 15) Baek, D.-J., Kang, T.-B. and Kim, H. J. : Synthesis of nonclassical quinazolinone antifolates as thymidylate synthase inhibitors and their antitumor activity *in vitro*. *Bull. Korean Chem. Soc.* **25**, 1898 (2004).