

2-알킬-2,3-다이하이드로-1H-2-아자사이클로펜타[b]안트라센-5,10-디온계 유도체 합성 및 세포독성

곽재환 · 정은경 · 오주훈 · 정재경 · 홍진태 · 이희순[#]
충북대학교 약학대학

(Received January 19, 2009; Revised January 20, 2009; Accepted February 11, 2009)

Synthesis and *In Vitro* Cytotoxic Activities of 2-Alkyl-2,3-dihydro-1H-2-azacyclopenta[b]anthracene-5,10-diones

Jae-Hwan Kwak, Eun-Kyeong Jeong, Ju Hoon Oh, Jae-Kyung Jung, Jin-Tae Hong and Heesoon Lee[#]
College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract — A series of 2-alkyl-2,3-dihydro-1H-2-azacyclopenta[b]anthracene-5,10-diones (**3a-h**) were synthesized and evaluated *in vitro* cytotoxicity against colon cancer cell lines (HCT116 and SW620) and neuroblastoma cell lines (SK-N-SH and SK-N-MC). Among them, compound **3f** showed significant cytotoxic activity (IC₅₀ against SK-N-SH; 14.8 μM, IC₅₀ against SK-N-MC; 11.3 μM).

Keywords □ cytotoxicity, 2-azacyclopenta[b]anthracene-5,10-diones

안트라사이클린계 항생물 질인 doxorubicin(**1**)은 광범위한 활성을 갖고 있어 급성 백혈병, 고형암 등에 폭넓게 이용되고 있다.¹⁾ 심독성(Cardiotoxicity)은 이 계열의 약물 사용을 제한하는 독성으로 투여 후 수 시간 내 저혈압, 빈맥, 부정맥 등이 나타나는 급성형과, 울혈성심부전(CHF)으로 발전되는 만성형으로 구분된다. 만성형은 용량의존적인 독성에 해당하고 치사율이 50% 이상이다.²⁾

저자 등은 안트라사이클린계 항암제의 부작용을 개선할 수 있는 신규 유도체들을 개발하고자 하는 노력으로 다양한 azaanthraquinone 계 화합물들을 합성해왔다.³⁻⁶⁾ 선행연구는 anthraquinone 모핵에 의 질소의 존재 및 다양한 측쇄들이 세포독성에 중요한 역할을 함을 제시하였다. 또한 저자 등은 최근 azaanthraquinone 모핵에 azacyclopentane 고리가 추가로 도입된 2,6,9-triazacyclopenta[b]anthracene-5,10-dione 계 유도체들의 합성과 세포독성에 대해 발표하였다.⁷⁾ 본 연구에서는 triazacyclopenta[b]anthracene-5,10-dione계 유도체들의 anthraquinone 모핵 내 질소를 제거함에 따른 세포독성에 미치는 효과를 검토하고자 2-azacyclopenta[b]anthracene-5,10-dione 유도체

들을 합성하였다. 알킬 측쇄는 구조-활성 관계의 비교 검토를 위해 선행연구에서 도입한 동일한 치환기 및 아릴알킬 그룹을 함유하는 치환기를 도입하였다.

실험 방법

녹는점은 Buchi 510과 Electrothermal IA9100 녹는점 측정기로 측정하였으며 보정하지 않았다. IR 스펙트리는 Jasco FT/IR-300E 분광광도계로 측정하였으며 cm⁻¹로 표시하였다. 핵자기 공명(¹H-NMR) 스펙트리는 Bruker DPS300 분광광도계를 이용하여 tetramethylsilane을 내부표준물질로 하여 측정하였으며, 화학적 이동(chemical shift)은 δ단위로 coupling constant는 Hz로 나타내었다. 박층크로마토그래프(TLC)는 silica gel(Kieselgel 60F254, Merck)을 사용하였고, 칼럼크로마토그래피는 silica gel(Kieselgel 60 230~400 mesh, Merck)를 사용하였다. 세포배양에 필요한 시약 및 fetal bovine serum은 Gibco에서 구입하였으며, 기타 필요한 시약은 Sigma에서 구입하여 사용하였다.

2,3-Dimethylanthraquinone의 합성(6)⁸⁾

1,4-Naphthoquinone(**4**)(6.0 g, 37.9 mmol)을 무수 toluene 용액(250 ml)에 녹인 용액에 2,3-dimethyl-1,3-butadiene(**5**)(8.58

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 043-261-2811 (팩스) 043-268-2732
(E-mail) medchem@chungbuk.ac.kr

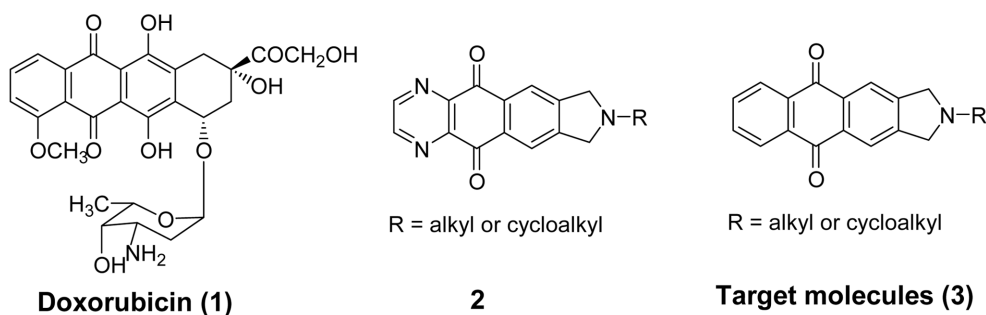


Fig. 1 – Structures of doxorubicin (1), compound 2 and target compounds 3.

ml, 75.8 mmol)을 질소 기류하에 가하였다. 반응 혼합액을 환류 조건에서 16시간 교반하였다. 반응 혼합액은 감압 농축한 후 잔사를 5N KOH(120 ml)과 에탄올(180 ml)에 처리한 후 공기 중에 노출한 채 4시간 동안 가열 교반하였다. 반응 혼합액을 식힌 후 CH_2Cl_2 로(100 ml×3회) 추출하여 농축시키고 flash column chromatography(CH_2Cl_2)로 정제하여 황색 고체 생성물(6.10 g, 68%)을 얻었다: mp 207~208°C(Lit⁸) 209~210°C; IR(KBr) 3059, 2952, 1671, 1648 cm^{-1} ; ¹H-NMR(CDCl_3 , 300 MHz) δ 2.44 (s, 6H), 7.78(dd, $J=6.0$ Hz, $J=3.0$ Hz, 2 H, Ar-H), 8.06(s, 2 H, Ar-H), 8.30(dd, $J=6.0$ Hz, $J=3.0$ Hz, 2 H, Ar-H).

2,3-Bis(bromomethyl)anthraquinone의 합성(7)

2,3-Dimethylantraquinone(6)(1.0 g, 4.3 mmol)을 CCl_4 에 녹이고 NBS(2.26 g, 12.9 mmol)와 benzoylperoxide(20 mg, 0.08 mmol)를 가하고 18시간 환류 하였다. 반응 혼합액을 식히고 여과한 후 여액을 농축하여 flash column chromatography(CH_2Cl_2 : Hexane=1:2)로 정제하여 황색 고체 생성물(504 mg, 10%)을 얻었다: IR(KBr) 2952, 1680, 1652 cm^{-1} ; ¹H-NMR(CDCl_3 , 300 MHz) δ 4.76(s, 4 H, Ar- CH_2 -Br), 7.84(dd, $J=6.0$ Hz, $J=3.0$ Hz, 2 H, Ar-H), 8.31(s, 2 H, Ar-H), 8.33(dd, $J=6.0$ Hz, $J=3.0$ Hz, 2 H, Ar-H).

2-Butyl-2,3-dihydro-1H-2-azacyclopenta[b]anthracen-5,10-dione(3a)의 합성

무수 THF(1 ml)에 n-butylamine(0.253 mmol)을 녹인 용액을 2,3-bis(bromomethyl)anthraquinone(100 mg, 0.253 mmol)을 THF(4 ml) 용액에 서서히 추가하였다. 60°C에서 30분간 물증탕한 후 무수 Na_2CO_3 (300 mg)를 넣고 4시간 동안 환류 하였다. 반응 혼합액을 감압농축한 후 flash column chromatography(CH_2Cl_2 → 0.5% MeOH in CH_2Cl_2)로 정제하여 주황색 고체 3a(52 mg, 67%)를 얻었다: mp 167~168°C; IR(KBr) 2928, 1671, 1298 cm^{-1} ; ¹H-NMR(CDCl_3 , 300 MHz) δ 8.32(dd, $J=6.0$ Hz, $J=3.0$ Hz, 2H, Ar-H), 8.13(s, 2 H, Ar-H), 7.79(dd, $J=6.0$ Hz, $J=3.0$ Hz, 2H, Ar-H), 4.07(s, 4 H, Ar- CH_2 -N), 2.28(t, $J=7.4$ Hz,

2 H, N- CH_2CH_2), 1.60(m, 2 H, CH_2), 1.43(m, 2 H, CH_2), 0.98(t, $J=7.3$ Hz, 3 H, CH_3); MS m/z FAB 306($\text{M}^+ + 1$).

2-Cyclopropyl-2,3-dihydro-1H-2-azacyclopenta[b]anthracen-5,10-dione(3b)의 합성

화합물 3a의 합성법에 따라 주황색 고체 3b(50 mg, 68%)를 얻었다: mp 187~188°C; IR(KBr) 2925, 1675, 1302 cm^{-1} ; ¹H-NMR(CDCl_3 , 300 MHz) δ 8.32(dd, $J=6.0$ Hz, $J=3.0$ Hz, 2H, Ar-H), 8.14(s, 2 H, Ar-H), 7.80(dd, $J=6.0$ Hz, $J=3.0$ Hz, 2H, Ar-H), 4.20(s, 4 H, Ar- CH_2 -N), 2.07(m, 1 H, N- CH), 0.57(m, 4 H, CH_2); MS m/z FAB 290($\text{M}^+ + 1$).

2-Cyclobutyl-2,3-dihydro-1H-2-azacyclopenta[b]anthracen-5,10-dione(3c)의 합성

화합물 3a의 합성법에 따라 주황색 고체 3c(33 mg, 42%)를 얻었다: mp 225~226°C; IR(KBr) 2966, 1672, 1323 cm^{-1} ; ¹H-NMR(CDCl_3 , 300 MHz) δ 8.31(dd, $J=6.0$ Hz, $J=3.0$ Hz, 2 H, Ar-H), 8.14(s, 2 H, Ar-H), 7.80(dd, $J=6.0$ Hz, $J=3.0$ Hz, 2H, Ar-H), 4.02(s, 4 H, Ar- CH_2 -N), 3.34(m, 1 H, N- CH), 2.17~2.03(m, 6 H, CH_2); MS m/z FAB 304($\text{M}^+ + 1$).

2-Cyclopentyl-2,3-dihydro-1H-2-azacyclopenta[b]anthracen-5,10-dione(3d)의 합성

화합물 3a의 합성법에 따라 주황색 고체 3d(44 mg, 55%)를 얻었다: mp 226~228°C; IR(KBr) 2931, 1669, 1299 cm^{-1} ; ¹H-NMR(CDCl_3 , 300 MHz) δ 8.24(dd, $J=6.0$ Hz, $J=3.0$ Hz, 2 H, Ar-H), 8.13(s, 2 H, Ar-H), 7.75(dd, $J=6.0$ Hz, $J=3.0$ Hz, 2 H, Ar-H), 4.39(s, 4 H, Ar- CH_2 -N), 3.28(m, 1 H, N- CH), 2.09~1.85(m, 8 H, CH_2); ¹³C-NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 183.9, 134.7, 134.2, 133.8, 127.9, 121.8, 67.3, 59.0, 32.7, 24.7; MS m/z FAB 318($\text{M}^+ + 1$).

2-Cyclohexyl-2,3-dihydro-1H-2-azacyclopenta[b]anthracen-5,10-dione(3e)의 합성

화합물 3a의 합성법에 따라 주황색 고체 3e(63 mg, 75%)를

얻었다: mp 191~192°C; IR(KBr) 2926, 1670, 1324 cm⁻¹; ¹H-NMR(CDCl₃, 300 MHz) δ 8.31(dd, *J*=6.0 Hz, *J*=3.0 Hz, 2 H, Ar-H), 8.15(s, 2 H, Ar-H), 7.80(dd, *J*=6.0 Hz, *J*=3.0 Hz, 2 H, Ar-H), 4.12(s, 4 H, Ar-CH₂-N), 2.50(m, 1 H, N-CH), 1.35~1.25(m, 10 H, CH₂); MS *m/z* FAB 332(M⁺+1).

2-(2-Diethylamino)ethyl-2,3-dihydro-1H-2-azacyclopenta[b]anthracen-5,10-dione(3f)의 합성

화합물 3a의 합성법에 따라 주황색 고체 3f(52 mg, 67%)를 얻었다: mp 184~185°C; IR(KBr) 2925, 1672, 1301 cm⁻¹; ¹H-NMR(CDCl₃, 300 MHz) δ 8.31(dd, *J*=6.0 Hz, *J*=3.0 Hz, 2 H, Ar-H), 8.14(s, 2 H, Ar-H), 7.80(dd, *J*=6.0 Hz, *J*=3.0 Hz, 2 H, Ar-H), 4.15(s, 4 H, Ar-CH₂-N), 2.96(m, 4 H, CH₂), 2.54(q, *J*=7.0 Hz, 2 H, CH₂), 2.01(m, 2 H, CH₂), 1.30(t, *J*=7.0 Hz, 6 H, CH₃); MS *m/z* FAB 349(M⁺+1).

2-[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethyl]-2,3-dihydro-1H-2-azacyclopenta[b]anthracen-5,10-dione(3g)의 합성

화합물 3a의 합성법에 따라 주황색 고체 3g(78 mg, 74%)를 얻었다: mp 196~197°C; IR(KBr) 2925, 1671, 1461 cm⁻¹; ¹H-NMR(CDCl₃, 300 MHz) δ 8.31(dd, *J*=6.0 Hz, *J*=3.0 Hz, 2 H, Ar-H), 8.14(s, 2 H, Ar-H), 7.81(dd, *J*=6.0 Hz, *J*=3.0 Hz, 2 H, Ar-H), 6.82~6.79(m, 3 H, Ar-H), 4.13(s, 4 H, Ar-CH₂-N), 3.89(s, 6 H, OCH₃), 3.03(m, 2 H, CH₂), 2.96(m, 2 H, CH₂); MS *m/z* FAB 414(M⁺+1).

세포주 및 세포배양⁹⁾

인체대장암 세포주인 HCT116 및 SW620과 사람뇌신경암 세포주인 SK-N-SH 및 SK-N-MC는 2 mM L-glutamine과 10% 송

아지혈청이 함유된 RPMI 1640 Media에서 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

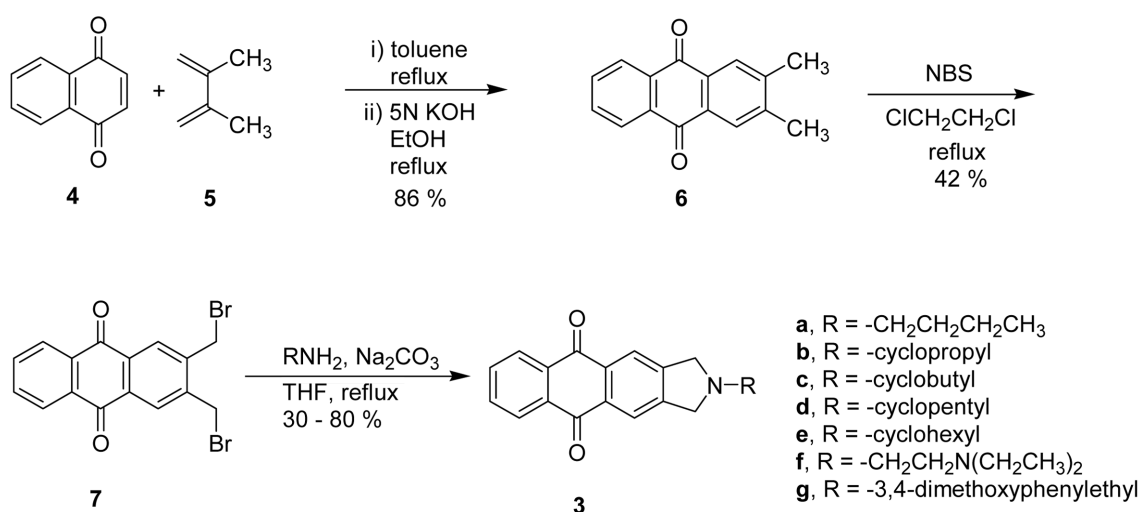
In vitro 항암활성(세포독성)검색⁹⁾

각 세포주를 96 well plate의 한 well당 세포수가 10,000 cells/well이 되도록 분주하여 24시간 배양한 후, 단계별로 희석한 시료와 대조약물로 doxorubicin을 처리하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 측정하였으며, control에 대비한 % 값으로 나타내었다. 이 측정 방법은 2 mg/ml MTT dye 50 μl를 culture media에 직접 넣어 준 후, 4시간 후에 media를 버리고 dimethyl sulfoxide 150 μl로 용해하여 microplate reader로 540 nm에서 측정 하였다.

실험결과 및 고찰

아자사이클로펜타안트라퀴논 모핵의 질소에 다양한 치환기를 함유하는 목적화합물들은 Diels-Alder 반응을 이용하여 2,3-dimethylantraquinone 모핵을 합성하고 benzylicbromination 등 일련의 반응을 거쳐 7종의 유도체들을 합성하였다. 목적화합물들은 저자 등이 2,6,9-triazacyclopenta[b]anthracene-5,10-dione계 유도체들 합성시 확립한 경로⁷⁾를 활용하여 합성하였고 Scheme 1에 요약하였다.

2,3-Dimethylantraquinone(6)의 합성은 Allen 등이 보고한 방법⁸⁾에 따라 1,4-Naphthoquinone(4)와 2당량의 2,3-dimethyl-1,3-butadiene(5)를 톨루엔에서 질소기류아래 환류조건에서 반응시켜 얻은 1:1 cycloaddition 중간체를 에탄올성 5N-KOH 용액에서 공기접촉과 함께 환류조건에서 처리하여 산화 생성물 6을 68%의 수율로 얻었다. 2,3-Dimethylantraquinone(6)의 메틸 그룹은



Scheme 1 – Synthesis of 2-Azacyclopenta[b]anthracene-5,10-diones.

Table I – *In vitro* cytotoxic activity of 2-azacyclopenta[*b*]anthracene-5,10-diones

Compound	IC ₅₀ ^a of Cell Lines ^b			
	HCT116	SW620	SK-N-SH	SK-N-MC
6	>20	>20	>20	>20
3a	>20	>20	>20	>20
3b	>20	>20	>20	>20
3c	>20	>20	>20	>20
3d	>20	>20	>20	>20
3e	>20	>20	>20	>20
3f	>20	>20	14.8	11.3
3g	>20	>20	>20	>20
Doxorubicin (1)	<2.5	3.1	<2.5	<2.5

^aIC₅₀=concentration of compound (μM) required to inhibit the cellular growth by 50% after 72 h of drug exposure, as determined by the MTT assay. Each experiment was run at least three times, and the results are presented as an average value.

^bHuman cancer cell lines: HCT116 (colon), SW620 (colon), SK-N-SH (brain) and SK-N-MC (brain).

NBS(3당량), benzoylperoxide(0.08당량)와 CCl₄ 용매 환류조건하에서 30% 수율로 화합물 **7**을 얻었다. 이 반응에서 회수 되는 출발물 질은 재사용하였다. 2,3-Bisbromomethylanthraquinone(**7**)은 무수 THF에서 무수 Na₂CO₃ 및 대응하는 alkylamine들을 처리하여 목적하는 2-alkyl-2-azacyclopenta[*b*]anthracene-5,10-dione 유도체들 2-n-butyl-**3a**(67%), 2-cyclopropyl-**3b**(68%), 2-cyclobutyl-**3c**(42%), 2-cyclopentyl-**3d**(55%), 2-cyclohexyl-**3e**(75%), 2-{2-(N,N-diethylamino)ethyl}-**3f**(67%)과 2-{2(2,3-dimethoxyphenyl)ethyl}-**3g**(74%)를 각각 얻었다.

합성한 목적화합물들은 2종의 사람대장암세포주(HCT116 및 SW620)와 2종의 사람뇌신경암 세포주(SK-N-SH 및 SK-N-MC)에 대한 세포독성을 NCI에서 확립된 방법에 따라 검토하였다.⁹⁾ 대조화합물로는 doxorubicin을 사용하였고 그 결과는 Table I에 수록하였다.

2-Azacyclopenta[*b*]anthracene-5,10-dione 유도체들은 선행 연구에서 확보한 2,6,9-triazacyclopenta[*b*]anthracene-5,10-dione 계 유도체들의 anthraquinone 모핵 내 질소를 제거함에 따른 세포독성에 미치는 효과를 검토하고자 설계하였고, 알킬 측쇄는 구조-활성 관계의 검토하기 위해 동일한 치환기 및 아릴알킬을 함유하는 치환기를 도입하였다. Diethylaminoethyl 측쇄를 함유하는 화합물 **3f**를 제외하고 대부분의 화합물은 검토한 4종의 인체 암세포 주 모두에 대해서 IC₅₀ 값이 20 μM 이상으로 세포독성을 나타내지 않았다. 화합물 **3f**는 2종의 뇌신경암 세포주(SK-N-SH 및 SK-N-MC)에 대해서 각각 14.8 μM 및 11.3 μM의 IC₅₀ 값으로 대조화합물에 비해 낮은 세포독성을 나타내었다. 이는 모

핵 내에 존재하는 질소가 세포독성 발현에 중요한 역할을 함을 제시하고 있다.

감사의 말씀

이 논문은 2007년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었고 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Wakelin, L. P. G. and Waring, M. J. : DNA Intercalating Agents, In *Comprehensive Medicinal Chemistry*, Vol 2, 703-724; Hansch, C. Sammes, P. G., Taylor, J. B., Eds.; Pergamon Press: New York (1990).
- 2) Alfred, G. G., Joel, G. H. and Lee, E. L. : *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed., McGraw-Hill, 1381-1445 (2001).
- 3) Lee, H., Lee, S.-I., Cho, J., Choi, S.-U. and Yang, S.-I. : Synthesis and in vitro evaluation of 1,8-diazaanthraquinones bearing 3-dialkylaminomethyl or 3-(N-alkyl- or N-aryl)carbamoyloxy methyl substituent. *Eur. J. Med. Chem.* **38**, 695 (2003).
- 4) Lee, H., Cho, S., Namgoong, K., Jung, J.-K., Cho, J. and Yang, S.-I. : Synthesis and *In vitro* evaluation of 7-dialkylaminomethylbenzo-[g]quinoxaline-5,10-diones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 1235 (2004).
- 5) Lee, H., Cho, S., Choi, B., Namgoong, K. and Jung, J.-K. : Synthesis of 2,3,8-Trisubstituted-7H-isoindolo[5,6-g]quinoxaline-5,7,9,11(8H)-tetraones. *Heterocycles* **64**, 819 (2004).
- 6) Jung, J.-K., Jung, E.-K., Namgoong, K., Cho, J., Kim, H.-M., Park, S.-G., Yoo, Y.-A., Kwon, J.-H. and Lee, H. : Synthesis and cytotoxic activities of 8-alkyl or 8-aryl-8,9-dihydro-7H-isoindolo[5,6-g]quinoxaline-7,9-diones. *Arch. Pharm. Res.* **29**, 276 (2006).
- 7) Kwak, J.-H., Namgoong, K., Jung, J.-K., Cho, J., Kim, H.-M., Park, S.-G., Yoo, Y.-A., Kwon, J.-H. and Lee, H. : Synthesis and cytotoxic activities of 2-alkyl-2,3-dihydro-1H-2,6,9-triazacyclopenta[*b*]anthracene-5,10-diones. *Arch. Pharm. Res.* **31**, 995 (2008).
- 8) Allen, C. F. H. and Bell, A. : 2,3-Dimethylanthraquinone, *Org. Syn. Coll. Vol.* 3, p.310 (1955); Vol. 22, p.37 (1942).
- 9) Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenny, S. and Boyd, M. R. : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107-12 (1990).