

3-카바모일옥시메틸-1-아자안트라퀴논 유도체들의 합성 및 세포독성

이희순[#] · 최재영 · 홍승수 · 조정숙* · 김영호**
충북대학교 약학대학, *동국대학교 의과대학 약리학 교실, **충남대학교 약학대학
(Received October 2, 1997)

Synthesis and Cytotoxicity of 3-Carbamoyloxymethyl-1-azaanthraquinones

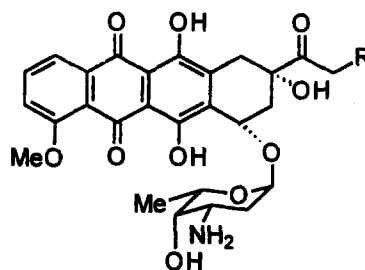
Heesoon Lee[#], Jae-Young Choi, Seoung-Soo Hong,
Jung Sook Cho* and Young-Ho Kim**
College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea
*College of Medicine, Dongguk University, Kyongbuk 780-714, Korea
**College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

Abstract—In the course of developing novel antitumor intercalating agents, we synthesized 3-carbamoyloxymethyl-1-azaanthraquinones **6-12**, incorporating the latent alkylating functionality. These compounds were designed to explore the effect of heteroatom incorporation into anthraquinone chromophore and the effect of the incorporation of the latent alkylating functionality. The derivatives were prepared by hetero Diels-Alder reaction as a key step followed by functionalization of allylic methyl to the desired substituents. Growth inhibitory studies of the azaanthraquinones were conducted *in vitro* against human cancer cell lines (SNU-354: liver and MCF7: breast) and human epidermoid carcinoma cells that are sensitive (KB-3-1) and multidrug-resistant (KB-V-1). The derivatives were 10 to 100-fold less potent than doxorubicin against sensitive cell lines. However, they were marginally cross-resistant with doxorubicin against KB-V-1.

Keywords □ intercalating agent, anthracycline, daunorubicin, doxorubicin, topoisomerase II, azaanthraquinone, and cytotoxic activity.

Daunorubicin(DR)과 doxorubicin(DXR) 등(Fig 1)은 가장 잘 알려진 anthracycline 계 항생물질이고 암 치료에 있어 임상적으로 가장 널리 사용되고 있는 intercalating agents 이다.^{1,2)} 이 계열 약물들의 주요 작용 부위는 DNA임이 세포배양 및 동물실험을 통해 밝혀졌다.³⁾ 또한 여러 연구결과로부터 이 계열 약물들이 DNA에 intercalation에 의해 결합하고 topoisomerase II 촉매 반응의 주요 중간체인 "cleavable complex"를 안정화 함으로써 topoisomerase II를 저해함이 밝혀졌다.⁴⁾ Anthracycline계 항생물질들은 심

장독성 및 저항성의 출현이란 문제점을 안고 있다.^{1,2)} DR 및 DXR에 비해 심장독성이 적고, 보다 우수한 안



Daunomycin (DR) : R = H
Doxorubicin (DXR) : R = OH

Fig 1 — Structures of DR and DXR.

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0431-61-2811 (팩스) 0431-68-2732

전역을 함유하며 모 화합물 항암활성의 광범위성을 유지하는 동시에 강력한 항암활성을 지니는 anthracycline 유도체들을 개발하고자 하는 연구노력이 지속되어왔다.⁵⁻⁸⁾

새로운 intercalating agent 개발의 일환으로 저자들은 doxorubicin을 선도화합물로 이용하여 최근 3-substituted-1-azaanthraquinone 유도체들의 합성 및 세포독성에 대해 발표하였다.⁹⁾ 이 결과로부터 alkylating functionality를 함유하는 구조가 일반 암세포주 뿐만아니라 내성 암세포주에 대해서도 우수한 세포독성을 나타냄을 알 수 있었다. 따라서 저자들은 생체내에서 환원적 활성화되어 알킬화 기능을 수행할 수 있거나 또는 수소결합 주개 및 받개로서의 기능을 수행할 수 있는 카바메이트를 함유하는 유도체들을 합성하여 측쇄에 존재하는 질소의 치환기에 따른 구조활성 관계를 검토하고자 하였다.

실험방법

녹는점은 Buchi 510과 Electrothermal IA9100 녹는점 측정기로 측정하였으며 보정하지 않았다. IR 스펙트라는 Perkin-Elmer 783 분광광도계로 측정하였으며 cm^{-1} 로 표시하였다. 핵자기 공명(¹H-NMR) 스펙트라는 Gemini-200 또는 Bruker DPS300 분광광도계를 이용하여 tetramethylsilane을 내부표준물질로 하여 측정하였으며, 화학적 이동(chemical shift)은 δ 단위로 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.

3-Methyl-1-azaanthracene-9,10-dione의 합성(3) - 1,4-Naphthoquinone(**1**) (2 g, 17.84 mmol)을 무수 dichloromethane(40 ml)에 녹인 용액에 1-(N,N-dimethylamino)-3-methyl-1-aza-1,3-butadiene(**2**) (1.410 g, 8.92 mmol)을 질소 기류하에 가하였다. 반응 혼합액은 상온에서 24 시간 교반후 SiO₂ (2 g)을 가하고 공기접촉하에 4 일간 교반하였다. 반응 혼합물은 감압하에 농축시키고 flash column chromatography(EtOAc-CH₂Cl₂, 1:9)로 정제하여 황색 고체

생성물(1.699 g, 85%)을 얻었다. MeOH로 재결정하여 황색 침상결정(1.446 g, 72%)을 얻었다: mp 230~231°C; IR(KBr) 2952, 1670 cm^{-1} ; ¹H-NMR(CDCl₃/TMS) δ 2.60(s, 3H), 7.87(m, 2H), 8.33(m, 1H), 8.45(m, 2H), 8.95(d, *J*=2Hz, 1H).

3-Bromomethyl-1-azaanthracene-9,10-dione의 합성

(4) - 3-Methyl-1-azaanthracene-9,10-dione(**3**) (500 mg, 2.24 mmol)을 dichloroethane(125 ml)에 용해시킨후 그 용액에 N-bromosuccinimide (NBS) (1.595 g, 9.00 mmol)와 benzoylperoxide(40 mg)을 현탁시킨 후 질소기류하에서 48시간 환류하였다. 반응 혼합물을 감압하에 농축하여 용매를 제거한후 CH₂Cl₂에 용해시켜 flash column chromatography(EtOAc-CH₂Cl₂, 1:19)로 정제하여 황색 고체 생성물(382 mg, 56%)을 얻었다: mp 207°C; IR(KBr) 2945, 1680 cm^{-1} ; ¹H-NMR(CDCl₃/TMS) δ 5.20(s, 2H), 7.85(m, 3H), 8.37(m, 2H), 8.62(m, 2H), 9.09 (s, 1H).

출발물질(134 mg, 27%)은 회수하여 재 사용하였다.

3-Hydroxymethyl-1-azaanthracene-9,10-dione의 합성

(5) - 3-Bromomethyl-1-aza-anthracene-9,10-dione(**4**) (356 mg, 1.21 mmol)의 무수 DMF(10 ml) 용액에 NaOAc(199 mg, 2.42 mmol)를 질소기류하에 현탁시키고 반응혼합물을 상온에서 20시간 교반하였다. 반응 혼합물을 증류수(300 ml)에 희석시키고 CH₂Cl₂ (3×50 ml)로 추출하였다. 유기층을 무수 Na₂SO₄로 건조하여 여과후 여액을 감압하에 농축하여 crude 생성물을 얻었다. Crude 생성물을 80% aqueous EtOH (30 ml)용액에 녹인후 LiOH(102 mg, 2.42 mmol)를 현탁시키고 반응 혼합물을 상온에서 18 시간 교반하였다. 반응 혼합물을 묽은 HCl로 산성화 한후 SiO₂를 소량 넣고 감압하에 용매를 제거하였다. Vacuum desiccator에서 8시간 건조후 flash column chromatography(5% MeOH in CH₂Cl₂)로 정제하여 백색 고체 생성물(246 mg, 85%)을 얻었다: mp 231~232°C; IR (KBr) 3435, 1680, 1665, 1584, 1300 cm^{-1} ; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.86(d, *d*=6Hz, 2H), 5.78(t, *J*=6Hz, OH), 8.05(m, 2H), 8.31 (m, 2H), 8.58 (s, 1H).

3-(N-Isopropyl)carbamoyloxymethyl-1-azaanthracene-9,10-dione의 합성(6) - 3-Hydroxymethyl-1-azaanthracene-9,10-dione(**5**) (50 mg, 0.21 mmol)과 triethylamine(25 mg, 0.25 mmol)을 무수 CH₂Cl₂에

녹이고 isopropylisocyanate(36 mg, 0.42 mmol)과 dibutyltin diacetate 2 drops을 질소기류하에 가하였다. 반응혼합물은 상온에서 20 시간 교반후 감압하에 농축하고 falsh column chromatography(10% EtOAc in CH₂Cl₂)로 정제하여 미색 고체 생성물(59 mg, 87%)을 얻었다: mp 199°C; IR(KBr) 3350, 2980, 1725, 1695, 1680, 1530, 1250 cm⁻¹; ¹H-NMR(CDCl₃/TMS) δ 1.22(d, J=6Hz, 6H), 3.87(m, 1H), 4.77(brs, NH), 5.24(s, 2H), 7.89(t, J=3Hz, 2H), 8.36(dd, J=6Hz, J=2Hz, 1H), 8.45(t, J=4Hz, 1H), 8.62(s, 1H), 9.09(s, 2H).

3-(N-Phenyl)carbamoyloxymethyl-1-azaanthracene-9,10-dione의 합성(7) - 3-Hydroxymethyl-1-azaanthracene-9,10-dione(5)(50 mg, 0.21 mmol), triethylamine(25 mg, 0.25 mmol), phenylisocyanate(50 mg, 0.42 mmol) 및 dibutyltin diacetate 2 drops을 사용하여 화합물(6)의 제법에 따라 처리후 falsh column chromatography (3% EtOAc in CH₂Cl₂→5% EtOAc in CH₂Cl₂)로 정제하여 황색 고체 생성물(64 mg, 85%)을 얻었다: mp 242°C; IR (KBr) 3220, 3030, 2980, 1720, 1682, 1672, 1600, 1590, 1535 cm⁻¹; ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 5.25(s, 2H), 5.45(brs, NH), 7.03(m, 5H), 7.90(m, 2H), 8.20(m, 2H), 8.55(s, 1H), 9.05(s, 1H).

3-(N-Ethyl)carbamoyloxymethyl-1-azaanthracene-9,10-dione의 합성(8) - 3-Hydroxymethyl-1-azaanthracene-9,10-dione(5)(50 mg, 0.21 mmol), triethylamine(25 mg, 0.25 mmol), ethylisocyanate(60 mg, 0.84 mmol) 및 dibutyltin diacetate 4 drops을 사용하여 화합물(6)의 제법에 따라 처리후 falsh column chromatography(10% EtOAc in CH₂Cl₂→25% EtOAc in CH₂Cl₂)로 정제하여 미색 고체 생성물(20 mg, 31%)을 얻었다: mp 194~195°C; IR KBr) 3233, 2965, 1730, 1684, 1672, 1590, 1545 cm⁻¹; ¹H-NMR(CDCl₃/TMS) δ 1.18(t, J=7Hz, 3H), 3.27(q, J=8Hz, 2H), 5.31(s, 2H), 7.50(brs, NH), 7.87(m, 2H), 8.33(t, J=4Hz, 1H), 8.42(t, J=5Hz, 1H), 8.61(s, 1H), 9.07(s, 1H).

3-(N-t-Butyl)carbamoyloxymethyl-1-azaanthracene-9,10-dione의 합성(9) - 3-Hydroxymethyl-1-azaanthracene-9,10-dione(5)(50 mg, 0.21 mmol),

triethylamine(25 mg, 0.25 mmol), *t*-butylisocyanate(42 mg, 0.42 mmol) 및 dibutyltin diacetate 2 drops을 사용하여 화합물(6)의 제법에 따라 처리후 falsh column chromatography(10% EtOAc in CH₂Cl₂)로 정제하여 미색 고체 생성물(56 mg, 79%)을 얻었다: mp 186°C; IR(KBr) 3330, 2970, 1727, 1708, 1683, 1668, 1590, 1530 cm⁻¹; ¹H-NMR(CDCl₃/TMS) δ 1.36(s, 9H), 4.88(brs, NH), 5.27(s, 2H), 7.87(t, J=4Hz, 2H), 8.33(t, J=5Hz, 1H), 8.43(t, J=5Hz, 1H), 8.56(s, 1H), 9.07(s, 1H).

3-[N-(2-Chloroethyl)]carbamoyloxymethyl-1-azaanthracene-9,10-dione의 합성(10) - 3-Hydroxymethyl-1-azaanthracene-9,10-dione(5)(50 mg, 0.21 mmol), triethylamine(25 mg, 0.25 mmol), 2-chloroethylisocyanate(42 mg, 0.42 mmol) 및 dibutyltin diacetate 2 drops을 사용하여 화합물(6)의 제법에 따라 처리후 falsh column chromatography(10% EtOAc in CH₂Cl₂)로 정제하여 황색 고체 생성물(69 mg, 95%)을 얻었다: mp 191°C; IR (KBr) 3240, 3047, 1733, 1682, 1673, 1590, 1540 cm⁻¹; ¹H-NMR(CDCl₃/TMS) δ 3.54(m, 4H), 5.21(s, NH), 5.23(s, 2H), 7.81(m, 2H), 8.27(t, J=5Hz, 1H), 8.36(t, J=5Hz, 1H), 8.56(s, 1H), 9.03(s, 1H).

3-(N-Chloroacetyl)carbamoyloxymethyl-1-azaanthracene-9,10-dione의 합성(12) - 3-Hydroxymethyl-1-azaanthracene-9,10-dione(5)(50 mg, 0.21 mmol), triethylamine(25 mg, 0.25 mmol), Chloroacetylisocyanate(86 mg, 0.84 mmol) 및 dibutyltin diacetate 4 drops을 사용하여 화합물(6)의 제법에 따라 처리후 falsh column chromatography(25% EtOAc in CH₂Cl₂)로 정제하여 황색 고체 생성물(13 mg, 17%)을 얻었다: mp 214°C; IR(KBr) 3300, 1760, 1720, 1670; 1590 cm⁻¹; ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 4.51(s, 2H), 5.44(s, 2H), 7.96(t, J=5Hz, 2H), 8.24(m, 2H), 8.59(d, J=2Hz, 1H), 9.11(d, J=2Hz, 1H), 11.24(s, NH).

3-(N-Chloromethyl)carbamoyloxymethyl-1-azaanthracene-9,10-dione의 합성(11) - 3-Hydroxymethyl-1-azaanthracene-9,10-dione(5)(50 mg, 0.21 mmol), triethylamine(25 mg, 0.25 mmol), Chloromethylisocyanate(76 mg, 0.84 mmol) 및 dibu-

tyltin diacetate 8 drops을 사용하여 화합물(6)의 제법에 따라 처리한후 flash column chromatography (25% EtOAc in CH_2Cl_2)로 정제하여 황색 고체 생성물(21 mg, 30%)을 얻었다: mp 165~166°C; IR (KBr) 3372, 1730, 1680, 1669, 1590, 1550 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3/\text{TMS}) \delta$ 4.26(m, 2H), 4.77(brs, NH), 5.34(m, 2H), 7.85(t, $J=4\text{Hz}$, 2H), 8.32(dd, $J=5\text{Hz}$, $J=2\text{Hz}$, 1H), 8.41(t, $J=3\text{Hz}$, 1H), 8.59(s, 1H), 9.07(s, 1H).

세포주 및 세포배양 - 인체간암세포주인 SNU 354과 인체유방암세포주인 MCF7은 2 mM L-glutamine과 10% fetal calf serum이 함유된 RPMI 1640 Media에서, 인체구강암 세포주인 KB-3-1과 그 내성세포주인 KB-V-1세포는 Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM)을 사용하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하여 실험에 사용하였다.

In vitro 항암활성(세포독성)검색 - 배양 세포주에 따라 RPMI와 DMEM 배지를 적절히 사용하여 96 well plate의 한 well당 대수증식기에 있는 각 cell line의 세포수가 2,500~10,000 cells/well이 되도록 접종하여 24시간 배양한 후, 단계별로 희석한 시료와 대조약물로 doxorubicin을 처리하여 최종 volume이 200 μl 가 되도록 하였다. 이를 다시 48시간 동안 CO_2 배양기에서 배양한 후 세포를 고정시키기 위하여 cold 50% trichloroacetic acid 50 μl 를 가하고 4°C에서 1시간 동안 방치하였다. 고정된 세포는 물로 세척한 후에 0.4% sulforhodamine B(SRB) 용액 100 μl 를 가하여 30분

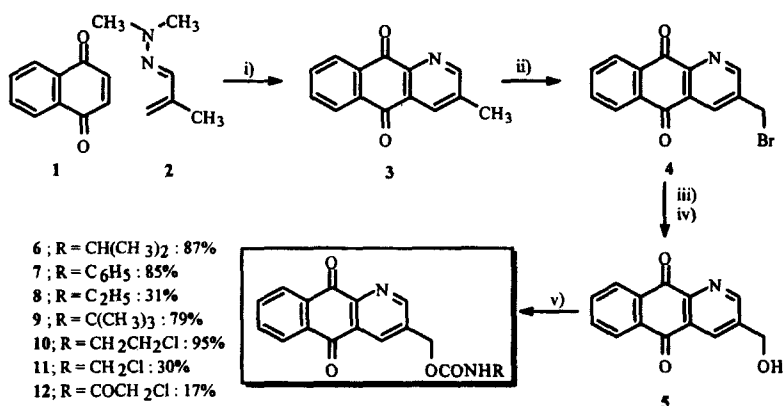
동안 반응시킨 후 1% acetic acid 용액으로 세척하여 건조하였다. 착색된 세포는 10 mM Tris 용액(pH 10.5)으로 용해시켜 540 nm에서 microtiter plate reader를 이용하여 흡광도를 측정하고, control에 대한 세포성장 저지효과를 측정하여 각 시료의 ED_{50} 을 구하였다.

결과 및 고찰

카바메이트를 함유하는 목적화합물들은 hetero Diels-Alder 반응을 이용하여 1-아자안트라퀴논 모핵을 합성하고 일련의 반응을 거쳐 7종의 유도체들을 합성하였다. 목적화합물들은 저자 등이 기 확립한 경로⁹⁾를 약간 변형하여 합성하였고 Scheme I에 요약하였다.

3-Methyl-1-azaanthraquinone의 합성에 있어 Ghosez 등은 2 당량의 naphthoquinone 과 1 당량의 diene을 반응시켰을때 1:1 cycloaddition 후 산화까지 동시에 된 생성물 7이 얻어짐을 보고 하였으나¹⁰⁾ 이는 과량의 dienophile를 사용해야 하는 결점이 있어 본 연구에서는 diene을 과량으로 사용하면서 동시에 산화제의 사용 또는 공기접촉에 의한 산화의 진행을 매개로 원하는 생성물을 얻을 수 있는 방법을 검토하였다. Cycloaddition을 수행한후 silica gel(1 g)을 가한다음 3일간 공기중에 노출시킨채로 교반하여 3-methyl-1-azaanthraquinone을 51%의 수율로 얻었다. 산화제인 MnO_2 존재하의 반응으로는 생성물을 43%의 수율로 얻었다.

목적화합물들의 합성에 있어 중요한 단계인 benzylic



i) CH_2Cl_2 , rt; ii) NBS, BzooBz, w-lamp, $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, reflux,
 iii) NaOAc, DMF, iv) LiOH, EtOH, v) RNCO, $\text{Bu}_2\text{Sn}(\text{OAc})_2$,

Scheme I— Synthesis of 3-Carbamoyloxymethyl-1-azaanthraquinones.

Table I—*In vitro* Cytotoxic Activity of 3-Carbamoyloxymethyl-1-azanthraquinones

	SNU-354	MCF7	KB-3-1	KB-V-1	RI ^c
6	48.6	>100	33.6	38.8	1.15
7	42.4	12.4	>100	>100	—
8	35.5	99.0	51.8	>100	—
9	56.2	58.3	35.8	>100	—
10	61.6	91.6	45.9	14.7	0.32
11	26.1	25.4	18.6	24.2	1.30
12	19.5	48.2	47.5	4.8	0.1
Doxoru-bicin	1.10	0.8	0.16	8.3	52

IC₅₀^a=concentration of compound (μM) required to inhibit the cellular growth by 50% after 72 h of drug exposure, as determined by the SRB assay. Each experiment was run at least three times, and the results are presented as an average value. ^bHuman cancer cell lines: SNU-354 (liver cancer cell), MCF7 (human breast cancer cell), KB-3-1 (human epidermoid carcinoma cell), KB-V-1 (human epidermoid carcinoma multidrug-resistant cell) ^cResistance index: IC₅₀ of resistance cell line/IC₅₀ of sensitive cell line.

bromination은 기존에 알려진 조건을 사용하였을 때 수율이 낮은 결점이 있어 이를 해결하기 위해 다양한 반응 조건을 검토하여 NBS(4 equiv), W-lamp, benzoylperoxide(0.08 equiv)와 1,2-dichloroethane용매 환류 조건하에서 58% 수율로 화합물 **4**를 얻었다. 이 반응에서 회수 되는 출발물질은 재 사용하였다. 화합물 **5**는 기보고한 방법¹⁰⁾과는 달리 화합물 **4**에 무수 DMF에서 무수 NaOAc와 상온에서 처리하여 중간체를 얻은 후 crude 생성물을 LiOH로 가수분해하여 85%의 수율로 얻었다. 화합물 **5**에 촉매량의 dibutyltindiacetate 존재하에 triethylamine 및 대응하는 isocyanate들을 처리하여 목적하는 carbamate를 함유하는 유도체들 **6**(87%), **7**(85%), **8**(31%), **9**(79%), **10**(95%), **11**(30%), 과 **12**(17%)를 각각 얻었다.

합성한 목적화합물들은 4종의 암세포주(SNU-354, MCF7, KB-3-1 및 KB-V-1)에 대한 세포독성을 NCI에서 확립된 방법에 따라 검토하였다.¹¹⁾ 대조화합물로는 doxorubicin을 사용하였고 그 결과는 Table I에 수록하였다.

Carbamate를 함유하는 유도체들은 질소에 존재하는 치환기들의 세포독성에 대한 효과를 검토하고자 설계되었고, 화합물 **12**는 DNA와 intercalative 결합 후에 공유결합을 형성할 수 있을 것으로 기대하여 설계하였다. 합성된 화합물들 중 가장 우수한 활성을 보이는 화합물은 **12**이었다. 유도체들은 전체적으로 대조화합

물에 비해 10~100배 적은 활성을 나타내었고 질소에 존재하는 알킬 또는 아릴치환기에 따른 세포독성의 차이는 뚜렷하게 나타나지 않았다. 화합물 **6**, **10**, **11** 및 **12** 등은 다제약물내성 암세포주에 대한 세포독성이 일반 암세포주에 대한 세포독성과 유사하거나 10배 우수한 세포독성을 보이고 있다.

감사의 말씀

본 연구는 96년도 한국과학재단 핵심전문연구비(KOSEF 961-0718-108-2)에 의해서 수행되었고 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Priebe, W. Ed. : Anthracycline Antibiotics, ACS symposium series 574, Am. Chem. Soc., Washington, DC, (1995) and references cited therein.
- 2) Surato, A., Angelucci, F. and Gargiotti, A. : Antitumor Anthracyclines, *Chimicaoggi*, 9-19, (1990) and references cited therein.
- 3) Neidle, S. : The molecular basis for the action of some DNA-binding drugs. *Prog. Med. Chem.* **16**, 151 (1979).
- 4) Tewey, K. M., Rowe, T. C., Yang, L., Halligan, B. C. and Liu, F. : Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* **226**, 466 (1984).
- 5) Acamone F., Cassazza, A., Cassinelli, G., Di-Marco, A. and Penco, S. : Doxorubicin and related compounds. II. Structure-activity considerations. In: Anthracycline antibiotics in cancer therapy. Muggia F. M., Young, C. W. and Carter, S. K., (Eds): Martinus Nijhoff Publishers, Boston pp. 179 (1982).
- 6) Mathe G., Maral, R. : Second-generation anthracyclines. In: Anthracycline antibiotics in cancer therapy. Muggia F. M., Young, C. W., Carter, S. K., (Eds): Martinus Nijhoff Publishers, Boston, pp. 190 (1982).
- 7) Oki, T. : Microbial transformation of anthracycline antibiotics and development of new anthracyclines. In: Anthracycline antibiotics. El Khadem HS (Ed): Academic Press, New York,

- pp. 75 (1982).
- 8) Acamone F. : The development of new antitumor anthracyclines. In: Anticancer agents based on natural product models. Cassady J. M., Douros, J. D. (Eds): Academic Press, New York, pp. 1 (1984).
- 9) Lee, H., Hong, S.-S. and Kim, Y.-H. Synthesis and in vitro Evaluation of 3-Substituted-1-azaanthraquinones, *BioMed. Chem. Lett.* **6**, 933 (1996).
- 10) Poncin, B. S. : Frisque, A.-M. and Ghosez, L. : 1-Aza-1,3-dienes. Diels-Alder Reactions with α , β -unsaturatedhydrazones, *Tetrahedron Lett.* **23**, 3261 (1982).
- 11) 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 (1990).