

## Dihydropyrrolo[3,4-*f*]quinazoline 엽산길항제의 합성 및 *In Vitro* 항암활성

백 두 중<sup>#</sup>

상명대학교 자연과학대학 화학과

(Received August 1, 2006; Revised August 22, 2006)

### Synthesis of Dihydropyrrolo[3,4-*f*]quinazoline Antifolates and Their Antitumor Activity *In Vitro*

Du-Jong Baek<sup>#</sup>

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

**Abstract** — Classical dihydropyrrolo[3,4-*f*]quinazoline antifolates **7**, **8** and **9**, in which the tricyclic ring is structurally similar to the pteridine ring of CH<sub>2</sub>-THF(**1**), the cofactor of thymidylate synthase (TS), were synthesized, and their *in vitro* antitumor activity was evaluated by measuring the cell growth inhibitory activity against cancer cell lines. The target compounds were cytotoxic against CCRF-CEM, human T-cell acute lymphoblastic leukemia, with the cell growth inhibitory activity (IC<sub>50</sub>) of 0.8~8.3 μM. Among the three compounds, 3-amino analog **7** was 10- and 3.5-fold more cytotoxic compared to the 3-methyl analogs **8** and **9**, and its cytotoxicity was similar to that of the reference compound with the IC<sub>50</sub> value of 0.83 μM. This result was supposed as the consequence of the fact that dihydropyrroloquinazolinone ring with amino group was able to bind well in the active site of TS. In the case of 3-methyl analogs, analog **9**, which has two-carbon bridge between the dihydropyrroloquinazolinone ring and benzoyl-L-glutamic acid, was 3-times more potent in cytotoxicity than analog **8** which has one-carbon bridge, and this result indicates that the distance and conformational orientation of the benzoyl-L-glutamic acid moiety with respect to the tricyclic ring may also be a crucial determinant of cell growth inhibitory activity.

**Keywords** □ dihydropyrrolo[3,4-*f*]quinazoline, classical antifolates, *in vitro* antitumor activity

Thymidylate synthase(TS; EC 2.1.1.45)는 2'-deoxyuridine-5'-monophosphate(uridylylate, dUMP)를 2'-deoxythymidine-5'-monophosphate(thymidylate, dTMP)로 methylation시키는 반응에 촉매로 작용하는 중요한 효소이고, 이 때 N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-methylene tetrahydrofolate(CH<sub>2</sub>-THF, **1**)가 cofactor로 작용하면서 methylene 전이와 hydride 환원을 통하여 methyl 기를 공급한다.<sup>1)</sup> 이 효소반응은 세포내 dTMP 합성의 유일한 단계이고, 따라서 TS 활성의 억제에는 "티민결핍 세포괴사(thymineless cell death)"를 유발하는데 그러한 이유로 TS 억제는 항암제 개발을 위한 효과적인 방법임이 오랫동안 증명되었다.<sup>2)</sup>

5-Fluorouracil(5-FU)은 오랫동안 임상에서 사용되어온 항암제로서 이 화합물을 체내에 투여하면 먼저 대사되어 5-fluoro-2'-

deoxyuridine-5'-monophosphate(FdUMP)로 전환되면서 dUMP 유사구조가 되어 TS 억제활성을 나타낸다. 하지만 독성이 강하고 많은 암세포가 5-FU에 반응하지 않거나 저항성을 나타내는 문제가 발생하였고<sup>3)</sup> 최근에는 이를 해결하고자 cofactor인 methylenetetrahydrofolate에 대한 유도체들이 엽산길항제(antifolate)의 작용을 가진 TS 억제제로 연구되고 있다.<sup>4)</sup>

처음 발표된 엽산길항제는 folate의 pteridine ring을 quinazoline ring으로 변환시킨 10-propargyl-5,8-dideazafolate (CB3717, PDDE, **2**)로서 우수한 효소억제활성과 *in vivo* 항암활성을 보였고,<sup>5)</sup> 그 후 임상1상 및 2상에서 항암활성을 나타냈지만 그러나 신장독성과 간독성이 발현되어 3상에서 임상시험이 중단되었다.<sup>6)</sup> 이를 개선한 물질은 raltitrexed(ZD1694, Tomudex®, **3**)<sup>7)</sup>로서 임상시험을 성공적으로 마무리하여 현재 유럽 및 미국에서 항암제로서 허가받아 시판되고 있다. 이어서 pteridine ring을 pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine ring으로 변환시킨 pemetrexed(LY231514, Alimta®, **4**)가 우수한 TS 억제활성과 *in vivo* 활성이 있음이 보고되었으

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-2287-5143 (팩스) 02-394-9585  
(E-mail) djbaek@smu.ac.kr

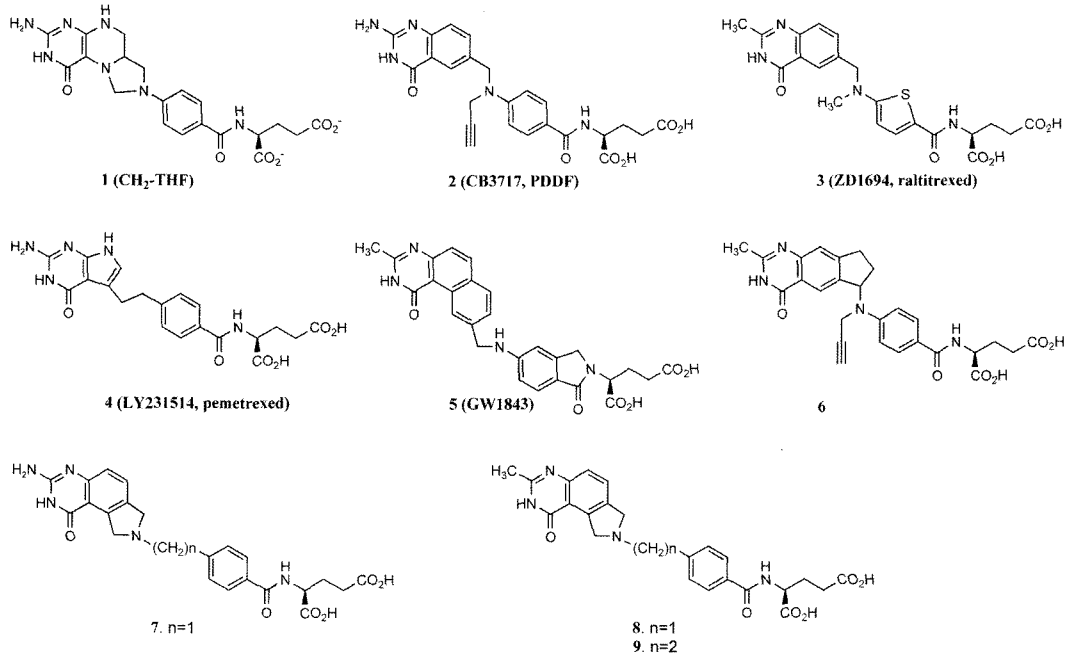


Fig. 1 - Structures of CH<sub>2</sub>-THF and antifolates.

며,<sup>8)</sup> 2004년에 미국 FDA로부터 소세포페암 등에 대한 항암제로 허가받아 상품화되었다.

Tricyclic ring을 가진 엽산길항제로는 현재 임상시험 중인 benzo[f]quinazoline 화합물 GW1843(5)<sup>9)</sup>을 비롯하여 cyclopenta[g]quinazoline 화합물 6<sup>10)</sup> 등이 우수한 효소억제활성과 세포독성을 가진 TS 억제제로 보고되었는데, 이러한 화합물들은 cofactor의 tricyclic ring을 모방한 구조로서 TS와 더 강력한 결합을 이루리라고 예상되어 설계되었다.

본 연구에서는 tricyclic ring을 가진 엽산길항제로서 화합물 7, 8, 9를 설계하였는데 이 화합물들은 quinazoline ring에 pyrrolidine을 결합시킨 dihydropyrrolo[3,4-f]quinazoline 화합물로서 cofactor인 CH<sub>2</sub>-THF와 구조적으로 좀더 유사하여 TS와 강력한 결합을 할 수 있으리라 기대되었다. 따라서 이러한 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 용매

는 1급 이상의 시약을 정제하지 않고 사용하였다. 합성된 화합물들은 재결정법으로 정제하거나 Merck silica gel 60(40~63 μm)을 사용한 flash column chromatography<sup>11)</sup>로 정제하였다. Thin-layer chromatography(TLC)는 Merck silica gel 60 F-254 코팅 유리판(0.25 mm)을 사용하였고 자외선, 요오드, phosphomolybdic acid, anisaldehyde로 발색하여 관찰하였다. 용점은 Thomas-Hoover 모세관 용점 측정기로 측정하였고 보정하지 않았다. IR 흡수스펙트럼은 KBr pellet을 사용하여 Perkin-Elmer FTIR 1750 Spectrometer로 측정하였다. <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼은 Bruker AMX-R300 Spectrometer(300 MHz)에서 CDCl<sub>3</sub> 또는 DMSO-d<sub>6</sub>를 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.

### 화합물 7: N-[4-((3-Amino-1-oxo-1,2-dihydro-7H-pyrrolo[3,4-f]quinazolin-8(9H)-yl)methyl)benzoyl]-L-glutamic acid의 합성

2-Acetylisoinoline (11) - Isoindoline(10) 3.00 g(25.2 mmol)과 triethylamine 5.30 ml(38.0 mmol)를 methylene chloride 100 ml에 용해시키고 0°C에서 acetyl chloride 2.37 g(30.2 mmol)을 적가한 후 실온에서 30분간 교반하였다. 반응 용액에

methylene chloride 100 ml를 더 가하고 물로 3회 세척한 다음 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조시키고 감압 농축하였다. 잔사를 flash column chromatography(methylene chloride/methanol=12:1)에 의해 정제하여 미황색 고체 3.40 g(수율 84%)을 얻었다: <sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 2.18(s, 3H), 4.80(s, 2H), 4.83(s, 2H), 7.30(m, 4H).

**2-Acetyl-5-nitroisindoline (12)** – 진한 황산 12.0 ml에 2-acetylisoindoline 3.40 g(21.1 mmol)을 녹이고 0°C에서 진한 황산과 진한 질산 1:1 혼합액 8.0 ml를 적가한 후 0~5°C에서 2시간 교반하였다. 반응 용액을 100 ml의 얼음물에 부은 후 ethyl acetate로 50 ml씩 3번 추출한 다음 식염수로 씻고 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조하였다. 유기용액을 감압 농축시켜 얻은 잔사를 flash column chromatography(methylene chloride/methanol=12:1)에 의해 정제하여 노란색 고체 3.00 g(수율 69%)을 얻었다: <sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 2.21(s, 3H), 4.89(s, 2H), 4.92(s, 2H), 7.46(d, 1H, *J*=8.4 Hz), 8.13(d, 1H, *J*=2.5 Hz), 8.16(dd, 1H, *J*=2.5, 8.3 Hz).

**2-Acetyl-5-aminoisindoline (13)** – 2-Acetyl-5-nitroisindoline 3.00 g(14.5 mmol)을 THF 100 ml와 methanol 20 ml에 녹이고 0.3 g의 Pd/C를 넣은 후 실온에서 수소 풍선 하에 2시간 교반하였다. 반응 혼합액을 Celite를 사용하여 여과한 다음 유기용매를 감압 증류하였다. 얻어진 잔사를 flash column chromatography(methylene chloride/methanol=12:1)에 의해 정제하여 노란색 오일 2.28 g(수율 89%)을 얻었다: <sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 2.16(s, 3H), 3.44(bs, 2H), 4.70(s, 2H), 4.75(s, 2H), 6.64(d, 1H, *J*=2.5 Hz), 6.69(dd, 1H, *J*=2.4, 8.1 Hz), 7.10(d, 1H, *J*=8.0 Hz).

**2-Acetyl-5-amino-6-bromoisindoline (14)** – 2-Acetyl-5-aminoisindoline 1.48 g(8.40 mmol)을 DMF 50 ml에 녹이고 -30°C에서 NBS 1.50 g(8.43 mmol)의 DMF 용액 15 ml를 30분간 적가하고 10분간 더 교반한 다음 진공 증류하여 DMF를 제거하였다. 생성물은 6-bromo 화합물과 4-bromo 화합물의 혼합물로서 TLC(methylene chloride/methanol=10:1)에서의 R<sub>f</sub> 값은 각각 0.48과 0.58이었고, 이 혼합물을 flash column chromatography(ethyl acetate/methylene chloride=2:1)에 의해 분리하였다. 부산물인 4-bromo 화합물은 Pd/C 촉매 하의 수소화 반응에 의해 2-acetyl-5-aminoisindoline(13)으로 환원하였고 bromination 반응을 한 번 더 수행한 다음 상기 분리과정을 반복하였다. 두 번의 반응 생성물을 합하여 2-acetyl-5-amino-6-bromoisindoline 1.07 g(수율 50%)을 얻었다: <sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 2.11(s, 3H), 4.10(bs, 2H), 4.73(s, 2H), 4.76(s, 2H), 6.70(s, 1H), 7.34(s, 1H).

**2-Acetyl-6-bromo-5-( $\alpha$ -isonitrosoacetamido)isindoline (15)** – 2-Acetyl-5-amino-6-bromoisindoline 1.06 g(4.15 mmol), chloral hydrate 0.90 g(5.44 mmol), sodium sulfate 1.30 g(9.15

mmol)을 증류수 20 ml에 혼합하고 진한 염산 0.35 ml, hydroxylamine hydrochloride 1.00 g(14.4 mmol)을 가한 다음 1시간 환류 교반하였다. 반응 혼합물을 0°C로 냉각하여 얻은 침전물을 여과하고 얼음물로 세척한 다음 건조하여 황갈색 고체 1.15 g(수율 85%)을 얻었다: <sup>1</sup>H NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.08(s, 3H), 3.50(s, 1H), 4.67(s, 2H), 4.72(s, 2H), 7.67(s, 1H), 7.87(s, 1H), 10.76(s, 1H), 12.21(bs, 1H).

**2-Acetyl-5-bromo-2,3-dihydropyrrolo[3,4-*e*]indole-7,8(1*H*,6*H*)-dione (16)** – 2-Acetyl-6-bromo-5-( $\alpha$ -isonitrosoacetamido)isindoline 1.03 g(3.16 mmol)을 진한 황산 4 ml에 녹이고 80°C에서 2시간 교반한 다음 실온으로 냉각하였다. 얼음물 40 ml에 반응 혼합물을 가하고 0°C에서 30분 더 교반하였다. 생성된 고체를 여과한 후 얼음물로 세척한 다음 건조하여 붉은색 고체 0.77 g(수율 79%)을 얻었다: <sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 2.16(s, 3H), 4.54(s, 2H), 4.88(s, 2H), 7.19(s, 1H), 11.06(bs, 1H).

**2-Acetyl-5-amino-6-bromoisindoline-4-carboxylic acid (17)** – 2-Acetyl-5-bromo-2,3-dihydropyrrolo[3,4-*e*]indole-7,8(1*H*,6*H*)-dione 0.765 g(2.47 mmol)을 1*N* NaOH 수용액 8 ml에 가하고 80°C로 가열하였다. 여기에 30% 과산화수소 0.6 ml를 적가한 다음 1시간 교반하였다. 반응 용액을 0°C로 냉각하고 진한 염산을 적가하여 pH를 2~3으로 조정하였다. 생성된 고체를 여과한 후 얼음물로 세척한 다음 건조하여 연갈색 고체 0.66 g(수율 89%)을 얻었다: <sup>1</sup>H NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.17(s, 3H), 4.50(s, 2H), 4.81(s, 2H), 4.90(bs, 1H), 6.79(s, 1H), 12.01(bs, 1H).

**2-Acetyl-5-aminoisindoline-4-carboxylic acid (18)** – 2-Acetyl-5-amino-6-bromoisindoline-4-carboxylic acid 0.65 g(2.17 mmol)을 THF 20 ml와 methanol 5 ml에 녹이고 0.05 g의 Pd/C를 넣은 후 실온에서 수소 풍선 하에 2시간 교반하였다. 반응 혼합액을 Celite를 사용하여 여과한 다음 감압 농축하여 연갈색 고체 0.43 g(수율 90%)을 얻었다: <sup>1</sup>H NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.15(s, 3H), 4.53(s, 2H), 4.80(s, 2H), 6.51(d, 1H, *J*=8.0 Hz), 6.78(d, 1H, *J*=8.0 Hz), 8.60(bs, 3H).

**Methyl 2-acetyl-5-aminoisindoline-4-carboxylate (19)** – 2-Acetyl-5-aminoisindoline-4-carboxylic acid 0.20 g(0.91 mmol)을 dry ether 5 ml에 녹이고 Diazald kit을 이용하여 *N*-nitroso-*N*-methylurea<sup>12)</sup>로부터 제조된 diazomethane의 ether 용액(약 0.6 M) 2 ml를 0°C에서 적가한 다음 30분간 교반하였다. 반응 완료 후 acetic acid를 노란색이 사라질 때까지 가하여 과량의 diazomethane을 없애고 반응 용액을 sodium bicarbonate 수용액으로 추출하였다. 유기 층을 포화식염수로 씻고 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조시킨 다음 감압 농축하여 미황색 고체 0.20 g(수율 94%)을 얻었다: <sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 2.11(s, 3H), 3.84(s, 3H), 4.59(s, 2H), 4.88(s, 2H), 5.72(bs, 2H), 6.60(d, 1H, *J*=8.3 Hz), 6.65(d, 1H, *J*=8.4 Hz).

**8-Acetyl-3-amino-8,9-dihydro-2H-pyrrolo[3,4-*f*]quinazolin-1(7H)-one (20)** – Methyl 2-acetyl-5-aminoisindoline-4-carboxylate 0.20 g(0.85 mmol)을 diglyme 2 ml에 녹이고 chloroformamide hydrochloride 0.11 g(0.96 mmol)을 가한 다음 1시간 환류 교반하였다. 반응 용액을 0°C로 냉각하고 ether 1 ml를 가한 다음 교반하였다. 생성된 고체를 여과하고 ether로 여러 번 세척한 다음 건조하여 황갈색 고체 0.16 g(수율 77%)을 얻었다: <sup>1</sup>H NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.17(s, 3H), 4.51(s, 2H), 4.77(s, 2H), 6.27(bs, 2H), 7.05(d, 1H, *J*=8.1 Hz), 7.43(d, 1H, *J*=8.1 Hz), 10.87(bs, 1H).

**3-Amino-8,9-dihydro-2H-pyrrolo[3,4-*f*]quinazolin-1(7H)-one hydrochloride (21)** – 8-Acetyl-3-amino-8,9-dihydro-2H-pyrrolo[3,4-*f*]quinazolin-1(7H)-one 0.16 g(0.66 mmol)을 3N HCl 수용액 6 ml에 녹이고 10시간 환류 교반하였다. 반응 용액을 감압 농축하여 물을 제거한 다음 얻어진 잔사에 ethanol 15 ml를 가하였다. 고체가 생성될 때까지 교반한 다음 여과하여 황갈색 고체 0.11 g(수율 70%)을 얻었다: <sup>1</sup>H NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.39(s, 2H), 4.60(s, 2H), 6.23(bs, 2H), 7.11(d, 1H, *J*=8.1 Hz), 7.48(d, 1H, *J*=8.1 Hz), 10.89(bs, 1H).

**Dimethyl N-(4-(bromomethyl)benzoyl)-L-glutamate (22)** – Dimethyl L-glutamate hydrochloride 0.60 g(2.84 mmol)을 methylene chloride 10 ml에 현탁시키고 0°C에서 triethylamine 0.9 ml(6.46 mmol)을 가하여 30분간 교반한 다음 같은 온도에서 4-(bromomethyl)benzoyl bromide 0.80 g(2.88 mmol)을 소량씩 가하여 1시간 더 교반하였다. 반응 용액에 증류수 20 ml를 가하고 methylene chloride 20 ml로 3회 추출한 다음 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조시키고 감압 농축하였다. 잔사를 flash column chromatography(methylene chloride/ethyl acetate=15:1)에 의해 정제하여 백색 고체 0.61 g(수율 58%)을 얻었다: 융점 94.5~96.5°C; IR 3380, 3080, 2990, 1750, 1640, 1540, 1520 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 2.15~2.56(m, 4H), 3.69(s, 3H), 3.82(s, 3H), 4.64(s, 2H), 4.84(m, 1H), 7.06(d, 1H, *J*=7.5 Hz), 7.51(d, 2H, *J*=8.3 Hz), 7.85(d, 2H, *J*=8.3 Hz).

**Dimethyl N-[4-((3-amino-1-oxo-1,2-dihydro-7H-pyrrolo[3,4-*f*]quinazolin-8(9H)-yl)methyl)benzoyl]-L-glutamate (23)** – 3-Amino-8,9-dihydro-2H-pyrrolo[3,4-*f*]quinazolin-1(7H)-one hydrochloride(21) 77 mg(0.323 mmol)과 triethylamine 0.16 ml(1.15 mmol)를 DMF 5 ml에 녹이고 실온에서 30분간 교반한 다음 dimethyl N-(4-(bromomethyl)benzoyl)-L-glutamate (22) 120 mg(0.322 mmol)을 가하고 실온에서 8시간 교반하였다. 반응 용액을 감압 농축시켜 얻은 잔사를 flash column chromatography(methylene chloride/methanol=9:1)에 의해 정제하여 흰색 고체 45 mg(수율 28%)을 얻었다: 융점 187.5°C(분해); IR 3400, 1750, 1660, 1550, 1490 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>)

δ 2.04~2.16(m, 2H), 2.41(m, 2H), 3.60(s, 3H), 3.67(s, 3H), 3.88(s, 2H), 3.97(s, 2H), 4.24(s, 2H), 4.50(m, 1H), 6.24(bs, 2H), 7.06(d, 1H, *J*=8.2 Hz), 7.41(d, 1H, *J*=8.2 Hz), 7.51(d, 2H, *J*=8.2 Hz), 7.88(d, 2H, *J*=8.2 Hz), 8.73(d, 1H, *J*=7.5 Hz), 10.89(bs, 1H); Mass *m/z* 494(M+1).

**N-[4-((3-Amino-1-oxo-1,2-dihydro-7H-pyrrolo[3,4-*f*]quinazolin-8(9H)-yl)methyl)benzoyl]-L-glutamic acid (7)** – Dimethyl L-glutamate 유도체(23) 40 mg(0.081 mmol)을 1N NaOH 수용액 2 ml에 가하고 60°C에서 3시간 교반하였다. 증류수 3 ml를 더 가한 다음 반응 용액을 0°C로 냉각하고 진한 염산을 적가하여 pH를 2~3으로 조정하였다. 생성된 고체를 여과한 후 얼음물로 세척한 다음 건조하여 미황색 고체 23 mg(수율 61%)을 얻었다: 융점 247.5°C(분해); IR 3400, 1710, 1650, 1580, 1500, 1400 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.96~2.13(m, 2H), 2.38(m, 2H), 3.91(s, 2H), 4.01(s, 2H), 4.27(s, 2H), 4.43(m, 1H), 6.26(bs, 2H), 7.07(d, 1H, *J*=8.2 Hz), 7.42(d, 1H, *J*=8.2 Hz), 7.51(d, 2H, *J*=8.2 Hz), 7.89(d, 2H, *J*=8.2 Hz), 8.58(d, 1H, *J*=7.6 Hz), 10.93(bs, 1H); Mass *m/z* 466(M+1).

**화합물 8: N-[4-((3-Methyl-1-oxo-1,2-dihydro-7H-pyrrolo[3,4-*f*]quinazolin-8(9H)-yl)methyl)benzoyl]-L-glutamic acid의 합성**

**8-Acetyl-3-methyl-8,9-dihydro-[1,3]oxazino[5,4-*e*]isoindol-1(7H)-one (24)** – 2-Acetyl-5-aminoisindoline-4-carboxylic acid(18) 0.20 g(0.91 mmol)에 acetic anhydride 4.0 ml를 조금씩 적가하고 110°C에서 4시간 교반한 다음 실온으로 냉각하였다. 유기용매를 감압 증류하여 제거하고 소량의 methylene chloride-methanol 혼합용매에 녹인 다음 ethyl acetate를 첨가하여 결정화하면 백색 고체 0.18 g(수율 81%)이 얻어졌다: <sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 2.16(s, 3H), 2.55(s, 3H), 4.54(m, 2H), 4.88(m, 2H), 7.67(d, 1H, *J*=8.2 Hz), 7.76(d, 1H, *J*=8.0 Hz).

**8-Acetyl-3-methyl-8,9-dihydro-2H-pyrrolo[3,4-*f*]quinazolin-1(7H)-one (25)** – 8-Acetyl-3-methyl-8,9-dihydro-[1,3]oxazino[5,4-*e*]isoindol-1(7H)-one 0.18 g(0.74 mmol)을 담은 둥근 바닥 플라스크를 dry ice bath에 담그고 암모니아 기체를 액화시켜 고체가 적당히 잠기도록 한 다음 이 상태에서 3시간 교반하였다. 반응 혼합물을 실온으로 올려 암모니아를 모두 기화시킨 후 여기에 1N NaOH 수용액 3 ml를 가하고 1시간 환류 교반하였다. 반응 용액을 0°C로 냉각하고 진한 염산을 적가하여 pH를 4로 조정하였다. 생성된 고체를 여과한 후 얼음물로 세척한 다음 건조하여 황갈색 고체 0.15 g(수율 84%)을 얻었다: <sup>1</sup>H NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.17(s, 3H), 2.43(s, 3H), 4.48(m, 2H), 4.75(m, 2H), 7.58(d, 1H, *J*=8.3 Hz), 7.75(d, 1H, *J*=8.3 Hz), 12.20(bs, 1H).

**3-Methyl-8,9-dihydro-2H-pyrrolo[3,4-f]quinazolin-1(7H)-one hydrochloride (26)** - 8-Acetyl-3-methyl-8,9-dihydro-2H-pyrrolo[3,4-f]quinazolin-1(7H)-one 0.15 g(0.62 mmol)을 3N HCl 수용액 6 ml에 녹이고 12시간 환류 교반하였다. 반응 용액을 감압 농축하여 물을 제거한 다음 얻어진 잔사에 ethanol 15 ml를 가하였다. 고체가 생성될 때까지 교반한 다음 여과하여 백색 고체 0.11 g(수율 75%)을 얻었다:  $^1\text{H NMR}(\text{DMSO}-d_6)$   $\delta$  2.40(s, 3H), 4.31(m, 2H), 4.61(m, 2H), 7.61(d, 1H,  $J=8.3$  Hz), 7.79(d, 1H,  $J=8.3$  Hz), 12.17(bs, 1H).

**Dimethyl N-[4-(3-methyl-1-oxo-1,2-dihydro-7H-pyrrolo[3,4-f]quinazolin-8(9H)-yl)methyl]benzoyl]-L-glutamate (27)** - 3-Methyl-8,9-dihydro-2H-pyrrolo[3,4-f]quinazolin-1(7H)-one hydrochloride 30 mg(0.126 mmol)과 triethylamine 0.07 ml(0.50 mmol)를 DMF 3 ml에 녹이고 실온에서 30분간 교반한 다음 dimethyl N-(4-(bromomethyl)benzoyl)-L-glutamate(22) 47 mg(0.126 mmol)을 가하고 실온에서 12시간 교반하였다. 반응 용액을 감압 농축시켜 얻은 잔사를 flash column chromatography (methylene chloride/methanol=10:1)에 의해 정제하여 흰색 고체 30 mg(수율 48%)을 얻었다:  $^1\text{H NMR}(\text{DMSO}-d_6)$   $\delta$  1.97~2.17(m, 2H), 2.32(s, 3H), 2.44(m, 2H), 3.62(s, 3H), 3.69(s, 3H), 3.90(s, 2H), 4.02(s, 2H), 4.40(s, 2H), 4.53(m, 1H), 7.10(bs, 1H), 7.50(d, 2H,  $J=8.2$  Hz), 7.60(m, 2H), 7.87(d, 2H,  $J=8.2$  Hz), 12.14(bs, 1H); Mass  $m/z$  493(M+1).

**N-[4-(3-Methyl-1-oxo-1,2-dihydro-7H-pyrrolo[3,4-f]quinazolin-8(9H)-yl)methyl]benzoyl]-L-glutamic acid (8)** - Dimethyl L-glutamate 유도체(27) 30 mg(0.061 mmol)을 methanol 2 ml에 녹이고 여기에 1N NaOH 수용액 2 ml를 가한 다음 60°C에서 3시간 교반하였다. 반응 용액을 감압 증류하여 용매를 모두 제거한 후 얻어진 잔사에 증류수 3 ml를 가하여 녹인 다음 0°C로 냉각하고 진한 염산을 적가하여 pH를 2~3으로 조정하였다. 생성된 고체를 여과한 후 얼음물로 세척한 다음 건조하여 미황색 고체 20 mg(수율 71%)을 얻었다:  $^1\text{H NMR}(\text{DMSO}-d_6)$   $\delta$  1.95~2.15(m, 2H), 2.35(s, 3H), 2.40(m, 2H), 3.92(s, 2H), 4.04(s, 2H), 4.39(s, 2H), 4.46(m, 1H), 7.11(bs, 1H), 7.52(d, 2H,  $J=8.3$  Hz), 7.63(m, 2H), 7.89(d, 2H,  $J=8.2$  Hz), 12.08(bs, 1H); Mass  $m/z$  465(M+1).

**화합물 9: N-[4-(2-(3-Methyl-1-oxo-1,2-dihydro-7H-pyrrolo[3,4-f]quinazolin-8(9H)-yl)ethyl)benzoyl]-L-glutamic acid의 합성**

**Dimethyl N-(4-(2-hydroxyethyl)benzoyl)-L-glutamate (28)** - 4-Bromophenethyl alcohol 1.00 g(4.97 mmol)과 diisopropylethylamine 1.2 ml(6.89 mmol)를 THF 20 ml에 녹이고 chloromethyl methyl ether 0.42 g(5.22 mmol)을 가한 다음 4시

간 환류 교반하였다. 반응 용액에 ammonium chloride 포화 수용액 20 ml를 가하고 유기 층을 분리한 다음 물 층을 THF 20 ml로 두 번 추출하였다. 유기 층을 모두 합하고 무수  $\text{MgSO}_4$ 로 건조한 다음 감압 농축하여 1-bromo-4-(2-(methoxymethoxy)ethyl)benzene 0.98 g(수율 80%)을 얻었다. 이 화합물의 THF 용액 10 ml를 질소 조건 하에서 마그네슘 분말 0.11 g과 THF 10 ml를 함유한 플라스크에 적가하고 30분간 환류 교반한 다음 냉각하였다. 이 반응 용액을 분말 드라이아이스 5 g을 함유한 비이커에 저어주면서 조금씩 가하고 드라이아이스가 모두 기화할 때까지 교반하였다. 반응 용액을 감압 증류하여 용매를 모두 제거한 후 얻어진 잔사에 증류수 20 ml를 가하여 녹인 다음 0°C로 냉각하고 진한 염산을 적가하여 pH를 2~3으로 조정하였다. 생성된 고체를 여과한 후 얼음물로 세척한 다음 건조하여 4-(2-(methoxymethoxy)ethyl)benzoic acid 0.55 g(수율 65%)을 얻었다. 이 화합물 0.5 g(2.38 mmol)과 triethylamine 1.0 ml(7.17 mmol)를 methylene chloride 15 ml에 녹이고 0~5°C에서 methanesulfonyl chloride 0.22 ml(2.84 mmol)를 천천히 가한 다음 10분간 더 교반하였다. 이 용액에 dimethyl L-glutamate 0.45 g(2.57 mmol)을 가하고 실온에서 1시간 교반하였다. 반응 용액을 물,  $\text{NaHCO}_3$  수용액, 포화식염수로 차례로 세척하고 무수  $\text{MgSO}_4$ 로 건조한 다음 감압 농축하여 백색 고체 0.45 g(수율 52%)을 얻었다. 이 백색 고체를 methylene chloride 3 ml에 녹이고 trifluoroacetic acid 2.5 ml를 가한 다음 실온에서 12시간 교반하였다. 반응 용액에 증류수 20 ml를 가하고 methylene chloride 20 ml로 2회 추출한 다음 무수  $\text{MgSO}_4$ 로 건조시키고 감압 농축하였다. 잔사를 flash column chromatography(methylene chloride/ethyl acetate=15:1)에 의해 정제하여 백색 고체 0.32 g(수율 81%)을 얻었다:  $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$  2.17(m, 1H), 2.32(m, 1H), 2.50(m, 2H), 2.93(t, 2H,  $J=6.5$  Hz), 3.67(s, 3H), 3.80(s, 3H), 3.90(t, 2H,  $J=6.5$  Hz), 4.82(m, 1H), 7.05(d, 1H,  $J=7.5$  Hz), 7.33(d, 2H,  $J=8.3$  Hz), 7.76(d, 2H,  $J=8.3$  Hz).

**Dimethyl N-[4-(2-(3-methyl-1-oxo-1,2-dihydro-7H-pyrrolo[3,4-f]quinazolin-8(9H)-yl)ethyl)benzoyl]-L-glutamate (29)** - Dimethyl N-(4-(2-hydroxyethyl)benzoyl)-L-glutamate(28) 55 mg(0.170 mmol)과 diisopropylethylamine 0.07 ml(0.40 mmol)를 acetonitrile 5 ml에 녹이고 -30°C에서 trifluoromethanesulfonic anhydride 0.034 ml(0.20 mmol)를 가한 다음 5분간 교반하였다. 같은 온도에서 3-methyl-8,9-dihydro-2H-pyrrolo[3,4-f]quinazolin-1(7H)-one hydrochloride(26) 40 mg(0.168 mmol)을 가하고 온도를 서서히 실온으로 올려 3시간 더 교반하였다. 반응 용액을 감압 농축시켜 얻은 잔사를 flash column chromatography(methylene chloride/methanol=10:1)에 의해 정제하여 흰색 고체 28 mg(수율 33%)을 얻었다:  $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$  1.97(m, 1H), 2.06(m, 1H), 2.33(s, 3H), 2.35(m, 2H), 2.72(m, 2H), 3.05(m, 2H),

3.58(s, 3H), 3.65(s, 3H), 4.01(s, 2H), 4.41(s, 2H), 5.70(m, 1H), 7.10(bs, 1H), 7.34(d, 2H,  $J=8.3$  Hz), 7.60(d, 1H,  $J=8.1$  Hz), 7.78(d, 2H,  $J=8.3$  Hz), 7.79(d, 1H,  $J=8.0$  Hz), 12.22(bs, 1H); Mass  $m/z$  507(M+1).

***N*-[4-(2-(3-Methyl-1-oxo-1,2-dihydro-7H-pyrrolo[3,4-f]quinazolin-8(9H)-yl)ethyl)benzoyl]-L-glutamic acid (9) – Dimethyl L-glutamate** 유도체(29) 25 mg(0.049 mmol)을 methanol 2 ml에 녹이고 여기에 1N NaOH 수용액 2 ml를 가한 다음 60°C에서 3시간 교반하였다. 반응 용액을 감압 증류하여 용매를 모두 제거한 후 얻어진 잔사에 증류수 3 ml를 가하여 녹인 다음 0°C로 냉각하고 진한 염산을 적가하여 pH를 2~3으로 조정하였다. 생성된 고체를 여과한 후 얼음물로 세척한 다음 건조하여 미황색 고체 14 mg(수율 59%)을 얻었다.  $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$  1.93 (m, 1H), 2.09(m, 1H), 2.34(s, 3H), 2.37(m, 2H), 2.71(m, 2H), 3.03(m, 2H), 4.40(m, 1H), 4.60(m, 1H), 4.87(m, 1H), 4.94(m, 1H), 5.27(m, 1H), 7.45(d, 2H,  $J=8.3$  Hz), 7.61(d, 1H,  $J=8.1$  Hz), 7.79(d, 1H,  $J=8.1$  Hz), 7.90(d, 2H,  $J=8.3$  Hz), 8.62(bs, 1H), 12.09(bs, 1H), 12.57(bs, 2H); Mass  $m/z$  479(M+1).

#### *In vitro* 암세포증식 억제효과 측정<sup>13)</sup>

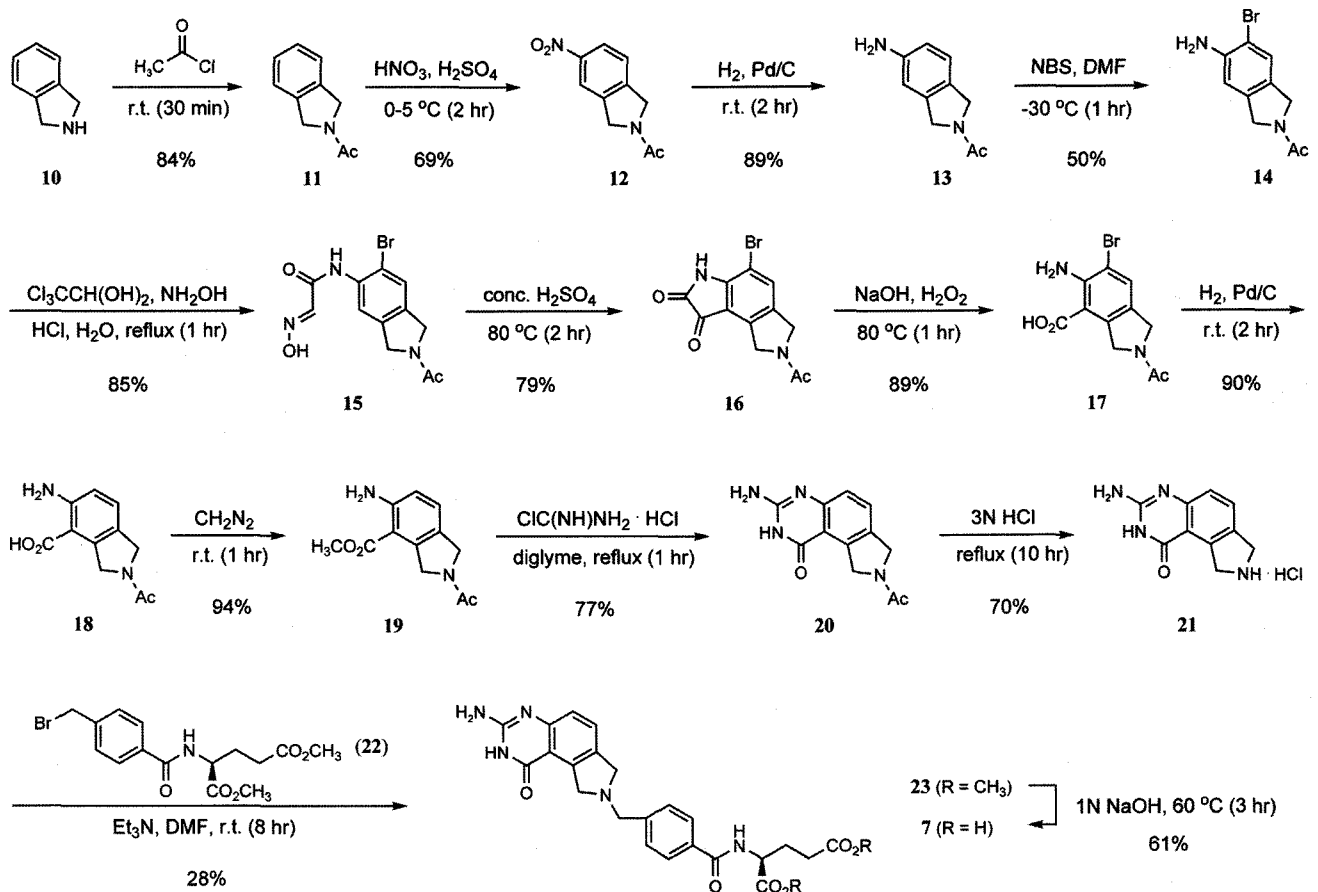
합성된 화합물들의 항암활성은 *in vitro* 세포증식 억제효과를 측정함으로써 검증하였다. 본 실험에서는 마우스 유래 림프성 백혈병세포 L1210, 인체 유래 T-세포 급성림프성 백혈병세포 CCRF-CEM, 인체 유래 결장 선암세포 HT-29의 암세포주들을 사용하였다. 세포배양에 필요한 배지로는 5% 송아지 혈청과 dimethylsulfoxide(DMSO)를 함유하는 RPMI-1640 배지를 사용하였으며 37°C의 항온항습 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 세포의 계대는 3~4일에 1회씩 시행하였다. 항암활성의 측정을 위해서는 세포성장이 무처치군의 50%로 억제되는 농도(IC<sub>50</sub>)를 MTT<sup>14)</sup> 분광법을 이용하여 결정하였다. 이 실험에서는 먼저 세포를 6,000(HT-29) 또는 10,000(L1210, CCRF-CEM) 세포씩 96-well plate의 각 well에 분주한 다음 시험화합물을 여섯 농도의 log dose로 넣어주고 배양하면서 세포의 성장정도를 관찰하였다. 화합물들을 용해시키는 데는 필요에 따라 DMSO를 사용하였으며 이때 세포배양액에 가해지는 DMSO의 농도는 0.5% 이하가 되도록 하였다. 배양시간은 3일(L1210) 또는 4일(CCRF-CEM, HT-29)이었고, 배양완료 후 MTT로 4시간 처리하고 세포를 수집하였다. 세포수는 분광학적 방법으로 결정하였는데 MTT로부터 세포에 의해 생성되어 침전된 formazan을 DMSO에 용해시킨 다음 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. IC<sub>50</sub> 값을 얻기 위해서는 화합물농도 대수값 대 세포성장 백분율의 그래프로부터 50% 억제를 일으키는 농도를 계산하였다. 이러한 IC<sub>50</sub> 값은 3회 반복 시행하여 평균값을 취하였다.

## 결과 및 고찰

### 합성

목적 화합물 중 3-aminopyrroloquinazolinone 유도체 7은 Scheme 1에 따라 합성하였다. 목적 화합물에서 tricyclic ring을 형성하기 위해서는 isoindoline으로부터 출발하여 여기에 pyrimidine ring을 추가하고자 하였다. 먼저 isoindoline 10의 N을 acetyl group으로 보호한 다음 nitration과 hydrogenation 반응을 수행하여 amino group을 5번 위치에 도입한 화합물 13을 합성하였고, 이어서 아래와 같은 단단계 반응에 의해 carboxylic acid를 4번 위치에 도입하였다. 우선 carboxylic acid가 6번 위치에 도입되는 것을 차단하기 위해 이 자리를 먼저 Br로 치환시켜 보호하였는데 NBS를 사용한 radical bromination 반응의 결과 6-bromo 화합물 외에 4-bromo 화합물도 비슷한 비율로 생성되었다. 따라서 이 두 화합물을 flash column chromatography에 의해 분리한 후 4-bromo 화합물은 hydrogenation 반응에 의한 debromination을 유발시켜 amino 화합물 13으로 환원시킨 다음 bromination 반응과 chromatography 분리를 한 번 더 수행하여 6-bromo 화합물 14를 50% 수율로 얻었다. 이 화합물을 chloral hydrate 및 hydroxylamine과 반응시켜 hydroxyiminoacetamide 유도체 15를 합성한 다음 진한 황산 용매에서 imino group을 benzene ring에 coupling시켜 isatin 유도체 16을 얻었다. 이어서 염기조건의 과산화수소와 반응시켜 isatin ring의 oxidative cleavage를 유발하고 6-bromo group을 hydrogenation 반응에 의해 debromination시키면 5-aminoisoindoline-4-carboxylic acid 유도체 18이 높은 수율로 얻어졌다. tricyclic ring 합성의 다음 단계인 pyrimidine ring의 형성을 위해서는 먼저 화합물 18을 diazomethane과 반응시켜서 methyl ester 19를 합성하였고 이 화합물을 chloroformamide와 반응시켜서 pyrimidinone ring이 추가된 isoindoline, 즉 dihydropyrrolo[3,4-f]quinazolinone tricyclic ring을 합성할 수 있었으며 이 화합물 20을 염산 수용액에서 10시간 환류 교반하여 *N*-acetyl 보호기를 탈보호하여 중요 중간체 21을 합성하였다. 이 중간체를 dimethyl *N*-(4-(bromomethyl)benzoyl)-L-glutamate 22와 *N*-alkylation 반응을 수행하여 dimethyl ester 23을 합성한 다음 가수분해하여서 목적 화합물 7을 성공적으로 합성하였다.

목적 화합물 중 3-amino group 대신 3-methyl group을 가진 화합물 8과 9는 Scheme 2에 따라 합성하였다. 먼저 5-aminoisoindoline-4-carboxylic acid 유도체 18을 acetic anhydride와 반응시켜 oxazinone 유도체 24를 합성한 다음 액체 암모니아와의 반응에 의해 benzamide 유도체를 만들고 이 화합물을 sodium hydroxide와 반응시켜 다시 ring을 형성하여 3-methyl-dihydropyrrolo[3,4-f]quinazolinone tricyclic ring을 합성할 수 있었으며 이 화합물 25를 염산 수용액에서 12시간 환류 교반하여



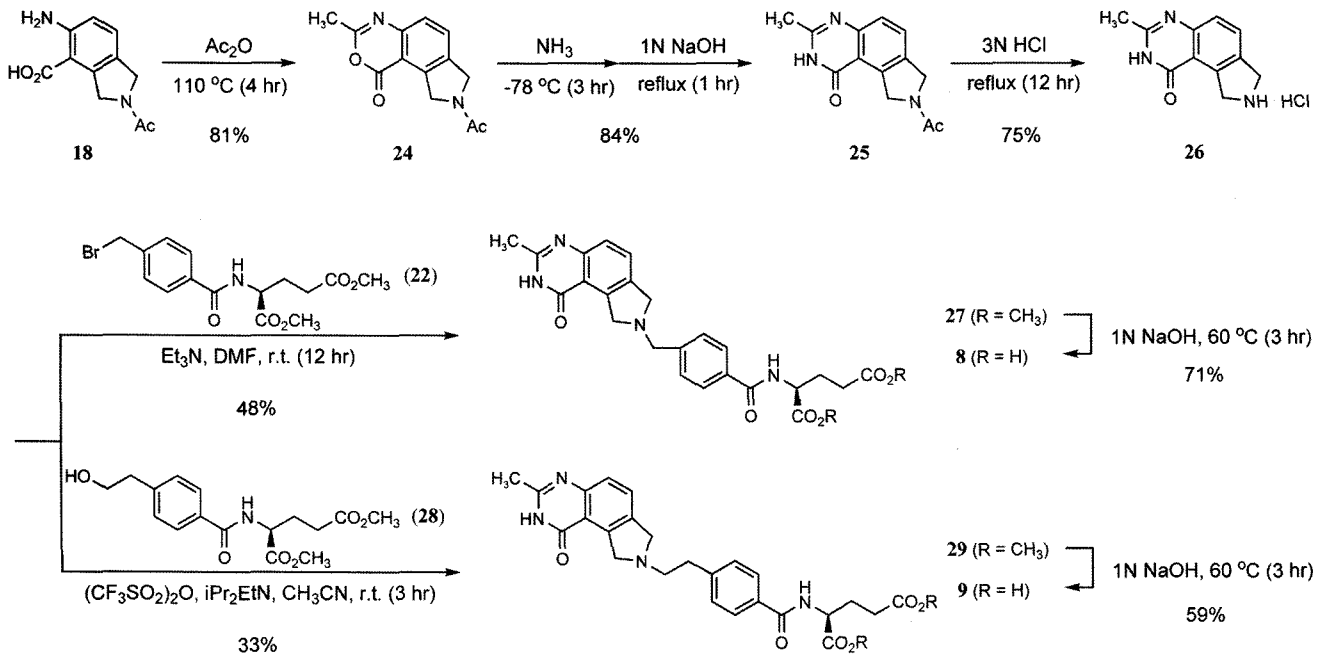
Scheme 1 - Synthesis of the target compound 7.

*N*-acetyl 보호기를 탈보호하여 중간체 **26**을 합성하였다. 이 중간체를 *para* 위치가 적당히 활성화된 benzoyl-L-glutamic acid dimethyl ester와 반응시켰는데 목적 화합물 **7**의 합성과 마찬가지로 bromomethyl 화합물 **22**와 직접 반응시키거나 또는 hydroxyethyl 화합물 **28**을 triflic anhydride로 활성화시켜서 *N*-alkylation 반응을 수행하여 dimethyl ester **27**과 **29**를 합성하였고 이들을 각각 가수분해하여서 목적 화합물 **8**과 **9**를 성공적으로 합성하였다.

### In vitro 항암활성

합성된 화합물들의 항암활성은 *in vitro* 세포증식 억제효과를 측정함으로써 검증하였고 그 결과를 Table I에 나타내었다. 문헌에 나타난 TS 억제제로서의 엽산길항제들은 세포증식 억제활성이  $\mu\text{M}$  단위의 IC<sub>50</sub> 값이면 대체로 우수하다고 판단되고 있고<sup>5,7-10</sup> 본 연구에서는 지용성 엽산길항제인 AG337<sup>15,16</sup>을 대조물질로 사용하여 활성을 비교하였다. 목적화합물들은 3종의 암세포주 중 L1210과 HT-29에 대해서는 활성이 미약하거나 거의 나타나지 않았고 CCRF-CEM에 대해서는 0.8~8.3  $\mu\text{M}$ 의 세포증식 억제활성을 보였다. 이러한 활성은 목적화합물 중 3-aminodihydropyr-

rolo[3,4-*f*]quinazolinone 유도체 **7**이 3-methyl 유도체 **8**과 **9**에 비해 10배 및 3.5배 우수하다는 것을 보이고 있고 그 세포독성이 대조물질과 유사한 정도로 우수함을 나타내고 있다. 또한 이러한 amino 유도체는 HT-29에 대해서도 IC<sub>50</sub> 값이 18.8  $\mu\text{M}$ 로 미약하나마 활성을 보이고 있다. 이는 desamino 유도체 또는 methyl 유도체가 수용성이 증가하여서 TS 억제활성이 증가하게 된다는 여러 보고<sup>17,18</sup>에도 불구하고, 일반적으로 CH<sub>2</sub>-THF cofactor의 pteridine ring 또는 엽산길항제의 quinazolinone ring에 결합된 amino group이 TS 내 active site에서 더 강한 결합을 유도한다는 결과<sup>19</sup>와 더 잘 부합하고 있다고 판단된다. 3-methyl 유도체 **8**과 **9**의 경우, 유도체 **9**의 세포독성이 약 3배 더 강하였는데 이는 dihydropyrroloquinazolinone ring과 benzoyl-L-glutamic acid 사이의 간격을 탄소 하나에서 탄소 두개로 늘렸을 때 세포독성이 증가한다는 것을 나타내고, 이러한 결과는 tricyclic ring을 가진 엽산길항제로서 비슷한 길이의 간격을 가진 GW1843(**5**)이 우수한 활성을 보이고 있다는 보고<sup>9</sup>와 유사한 결과이다. 또한 pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine bicyclic ring에 탄소 네 개 bridge가 연결된 엽산길항제가 우수한 활성을 보인다는 최근의 보고<sup>20</sup>도 본 실험결과와 유사한 예에 해당하는 바, 이러한 탄



Scheme 2 – Synthesis of the target compounds 8 and 9.

Table I – *In vitro* cell growth inhibition, IC<sub>50</sub> (μM), of dihydropyrrolo[3,4-f]quinazolinone antifolates

Compound	L1210	CCRF-CEM	HT-29
AG 337	1.1	0.81	3.7
7	>15	0.83	18.8
8	>15	8.3	>20
9	>15	2.9	>20

소 수의 변화를 통한 bridge 길이의 변화가 엽산길항제의 세포 증식 억제활성에 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구가 추가적으로 진행될 필요가 있다고 사료된다.

결 론

TS의 cofactor인 CH<sub>2</sub>-THF(1)와 구조적으로 좀더 유사한 형태의 엽산길항제로서 dihydropyrrolo[3,4-f]quinazoline ring을 가진 화합물 7, 8, 9를 합성하였고 *in vitro* 항암활성을 암세포주에 대한 세포증식 억제효과를 측정함으로써 검증하였다. 그 결과 실험에 사용한 3종의 암세포주 중 인체 유래 T-세포 급성림프성 백혈병세포 CCRF-CEM에 대해서 0.8~8.3 μM의 세포증식 억제 활성을 보였다. 세 화합물 중 3-amino 유도체 7이 3-methyl 유도체 8과 9에 비해 세포독성이 10배 및 3.5배 우수하였고 IC<sub>50</sub> 값이 0.83 μM로 대조물질과 유사하였는데, 이는 amino group을 포함하는 dihydropyrroloquinazolinone ring이 TS 내 active site에서 더 강한 결합을 형성한 결과에 기인한다고 추정하였다. 3-methyl 유도체 8과 9의 경우, dihydropyrroloquinazolinone ring

과 benzoyl-L-glutamic acid 사이에 탄소 두개의 bridge를 가진 유도체 9의 세포독성이 탄소 하나 bridge를 가진 유도체 8보다 약 3배 더 강하였는데, 이는 benzoyl-L-glutamic acid side chain의 tricyclic ring으로부터의 거리와 입체적 배향이 암세포 증식 억제활성에 중요한 변수가 될 수 있음을 나타낸다고 하겠다.

감사의 말씀

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

문 헌

- Santi, D. V. : Perspectives on the design and biochemical pharmacology of inhibitors of thymidylate synthetase. *J. Med. Chem.* **23**, 103 (1980).
- Berman, E. M. and Werbel, L. M. : The renewed potential for folate antagonists in contemporary cancer chemotherapy. *J. Med. Chem.* **34**, 479 (1991).
- Myers, C. E. : The pharmacology of the fluoropyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **33**, 1 (1981).
- Gangjee, A., Elzein, E., Kothare, M. and Vasudevan, A. : Classical and nonclassical antifolates as potential antitumor, antipneumocytes and antitoxoplasma agents. *Curr. Pharm. Design* **2**, 263 (1996).
- Jones, T. R., Calvert, A. H., Jackman, A. L., Brown, S. J., Jones, M. and Harrap, K. R. : A potent antitumor quinazoline inhibitor



- of thymidylate synthetase: synthesis, biological properties, and therapeutic results in mice. *Eur. J. Cancer* **17**, 11 (1981).
- 6) Newell, D. R., Alison, D. L., Calvert, A. H., Harrap, K. R., Jarman, M., Jones, T. R., Manteuffel-Cymborowska, M. and O'Connor, P. : Pharmacokinetics of the thymidylate synthase inhibitor N10-propargyl-5,8-dideazafofolic acid (CB3717) in the mouse. *Cancer Treat. Rep.* **70**, 971 (1986).
  - 7) 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).
  - 8) Taylor, E. C., Kuhnt, D., Shih, C., Rinzel, S. M., Grindey, G. B., Barredo, J., Jannatipour, M. and Moran, R. G. : A dideaza-tetrahydrofolate analogue lacking a chiral center at C6, N-[4-[2-(2-amino-3,4-dihydro-4-oxo-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-5-yl)ethyl]benzoyl]-L-glutamic acid, is an inhibitor of thymidylate synthase. *J. Med. Chem.* **35**, 4450 (1992).
  - 9) Pendergast, W., Dickerson, S. H., Dev, I. K., Ferone, R., Duch, D. S. and Smith, G. K. : Benzof[quinazoline inhibitors of thymidylate synthase: methyleneamino-linked aroylglutamate derivatives. *J. Med. Chem.* **37**, 838 (1994).
  - 10) Bavetsias, V., Marriott, J. H., Melin, C., Kimbell, R., Matusiak, Z. S., Boyle, F. T. and Jackman, A. L. : Design and synthesis of cyclopenta[g]quinazoline-based antifolates as inhibitors of thymidylate synthase and potential antitumor agents. *J. Med. Chem.* **43**, 1910 (2000).
  - 11) Still, W. C., Kahn, M. and Mitra, A. : Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.* **43**, 2923 (1978).
  - 12) Arndt, F. : Diazomethane. *Org. Synth.*, Coll. Vol. **II**, 165 (1943).
  - 13) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55 (1983).
  - 14) MTT is 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide.
  - 15) Webber, S. E., Bleckman, T. M., Attard, J., Deal, J. G., Kathardekar, V., Welsh, K. M., Webber, S., Janson, C. A., Matthews, D. A., Smith, W. W., Freer, S. T., Jordan, S. R., Bacquet, R. J., Howland, E. F., Booth, C. L. J., Ward, R. W., Hermann, S. M., White, J., Morse, C. A., Hilliard, J. A. and Bartlett, C. A. : Design of thymidylate synthase inhibitors using protein crystal structures: The synthesis and biological evaluation of a novel class of 5-substituted quinazolinones. *J. Med. Chem.* **36**, 733 (1993).
  - 16) 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).
  - 17) Jones, T. R., Thornton, T. J., Flinn, A., Jackman, A. L., Newell, D. R. and Calvert, A. H. : Quinazoline antifolates inhibiting thymidylate synthase: 2-Desamino derivatives with enhanced solubility and potency. *J. Med. Chem.* **32**, 847 (1989).
  - 18) Hughes, L. R., Jackman, A. L., Oldfield, J., Smith, R. C., Burrows, K. D., Marsham, P. R., Bishop, J. A. M., Jones, T. R., O'Connor, B. M. and Calvert, A. H. : Quinazoline antifolate thymidylate synthase inhibitors: alkyl, substituted alkyl, and aryl substituents in the C2 position. *J. Med. Chem.* **33**, 3060 (1990).
  - 19) Finer-Moore, J. S., Santi, D. V. and Stroud, R. M. : Lessons and conclusions from dissecting the mechanism of a bisubstrate enzyme: thymidylate synthase mutagenesis, function, and structure. *Biochemistry* **42**, 248 (2003).
  - 20) Gangjee, A., Zeng, Y., McGuire, J. J. and Kisliuk, R. L. : Synthesis of classical, four-carbon bridged 5-substituted furo [2,3-d]pyrimidine and 6-substituted pyrrolo[2,3-d]pyrimidine analogues as antifolates. *J. Med. Chem.* **48**, 5329 (2005).