

디포스핀류 배위자를 함유한 백금(II) 착체의 합성과 항암효과

노영수[†] · 노지 마사히데*

경희대학교 약학대학, *나고야시립대학 약학부

(1990년 12월 10일 접수)

Synthesis of pt(II) Complexes Containing Diphosphines and Evaluation of Antitumor Activity

Noh Young Soo[†] and Noji Masahide*

College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul, Korea

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Nagoya, Japan

(Received December 10, 1990)

New antitumor-active pt(II) complexes of trans-1-diamine cyclohexane containing diphosphines as a leaving group were synthesized. The structures of the pt(II) complexes were determined by analyzing the infrared and ³¹P-nuclear magnetic resonance spectra. Antitumor activities of the pt(II) complexes were tested against murine leukemia L₁₂₁₀ according to the protocol of the National Cancer Institute. All the pt(II) complexes synthesized were antitumor-active. In particular, water-soluble [pt(trans-1-dach)(DPPP)](NO₃)₂ exhibited excellent antitumor activity, giving T/C % values of 341 and 356 respectively, each with four cured mice out of six at a dose of 25 mg/kg. These pt(II) complexes are considered to be worthy of further development.

Keywords—platinum(II) complexes, antitumor activity, leukemia L₁₂₁₀, trans-1-diaminecyclohexane, diphosphines.

현재 방광암, 고환종양, 전립선암, 요관종양, 난소암 등의 치료제로 사용되고 있는 cis-diaminedichloro platinum(II)(이하 cis-DDP)가 1969년 Rosenberg 등¹⁾에 의하여 발견된 이래 보다 우수한 제2세대 항암성 백금착체의 개발을 위하여 합성 및 항암성에 관한 연구가 많은 연구자들에 의하여 활발히 진행되고 있는 실정이다.²⁻⁵⁾

그중에서도 Kidani 등^{7,8)}은 1,2-diaminecyclohexane(이하 dach)의 기하 및 광학이성체들을 분리 분할하여 3개의 이성체 백금착체 ptcl₂(dach)을 합성하여 그 제암성을 실험한 결과 cis체 < trans-d체

<trans-1체의 순으로 제암성이 증가함을 확인하고 이들은 carrier ligand로 trans-1-dach을 leaving group으로서 oxalic acid을 가지고 백금(II)착체를 합성하여 cis-DDP보다도 항암효과가 우수한 1-OHP(oxalato(trans-1-olach) platinum(II))의 개발에 성공하였다.⁹⁻¹⁰⁾

한편 Susan¹¹⁾ 등은 1,2-(diphenylphospho)ethane(이하 DPPE)과 1,3-(diphenylphospho)propane(이하 DPPP) 등의 phosphine류를 배위자로 하여 금, 은, 구리의 금속착체를 합성하여 항암실험을 실시한 결과 그 효과를 인정하였다.

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

이에 저자는 carrier ligand로서 *trans-l-dach*를, leaving group로서 DPPE 및 DPPP를 선정하여 수용성 혼합배위자 백금(II) 착체를 합성하여 L₁₂₁₀ leukemia와 P₃₈₈ leukemia 세포에 대한 *in vitro* 및 L₁₂₁₀ leukemia에 대한 *in vivo* 실험을 하여 그 결과를 보고코자 한다.

실험방법

시 약

ligand로서 사용한 1,2-bis(diphenyl phosphino) ethane과 1,3-bis(diphenylphosphino) propane은 東京化成의 것을, *trans-l-diamine cychohexane*은 Aldrich의 *cis, trans* 혼합체를 분리 분할하여 사용하였으며, K₂ptCl₄는 다나카귀금속주식회사의 것을, MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]는 일본 東仁化學연구소 것을 사용하였다.

장 치

IR 스펙트럼의 측정은 Perkin Elmer 1600 FTIR을, ³¹P-NMR 스펙트럼 측정은 JEOL GX-400을 사용하였다. microplate photometer는 Corona Electric(MIT-22)를 사용하였다.

백금착체의 합성

(*trans-l-1,2-diaminecyclohexane*) dichloro platinum(II)-[pt(*trans-l-dach*)Cl₂] K₂ptCl₄ 420 mg (1.02 mmol)을 증류수 30 ml에 용해한 것에 *trans-l-dach*·2HCl 190 mg(1.01 mmol)을 증류수 15 ml에 용해하여 서서히 가하였다. 5% 수산화나트륨 용액으로 pH 6.5로 조절한 다음 실온에서 30분간 교반·반응시켰다. 생성한 황색결정물을 흡인 여과하여 증류수로 충분히 세척한 다음 진공건조하여 황색결정 450 mg을 얻었다. 물에 녹지 않으며 EtOH 등 유기용매도 난용이었다. *Anal. calcd. for* C₆H₁₄N₂ptCl₂: C, 18.95; H, 3.68; N, 7.37: mol·wt. 380.2 Found: C, 19.02; H, 3.77; N, 7.33.

(*trans-l-diaminecyclohexane*) dinitrate platinum(II)-[pt(*trans-l-dach*)(NO₃)₂](*trans-l-dach*)ptCl₂ 380 mg(1 mmol)을 증류수 10 ml에 현탁시키고 AgNO₃ 330 mg(0.971 mmol)을 증류수 10 ml에 용해하여 추가하였다. 실온에서 24시간 동안 교반 반응을 시킨 다음 반응물을 흡인 여과하여 생성한

AgCl을 제거하고 여액을 감압농축 후 동결건조하였다. 생성한 백색결정을 증류수로 재정제하여 백색결정 290 mg을 얻었다. 물에 녹으며 EtOH 등 유기용매에 난용이었다. *Anal. calcd. for* C₆H₁₄N₄O₆pt: C, 16.62; H, 3.23; N, 12.93: mol·wt. 433.2 Found: C, 16.83; H, 3.34; N, 12.84.

{1,2-Bis(diphenylphosphino) ethane}(*trans-l-diamine cyclohexane*) platinum(II) nitrate-[pt(*trans-l-dach*)(DPPE)]·(NO₃)₂·2H₂O(*trans-l-dach*)pt(NO₃)₂ 430 mg(1 mmol)을 증류수 10 ml에 용해한 용액에 1,2-bis(diphenylphosphino) ethane 390 mg(0.98 mmol)을 아세톤 20 ml에 용해한 용액을 교반하면서 서서히 추가하였다. 계속 2시간 동안 반응시킨 다음 감압증류하여 용매를 제거하고 동결건조하여 미황색결정을 얻었다. 물로 재결정하여 황백색결정 380 mg을 얻었다. 물에 녹으며 에탄올, 아세톤 등에도 녹았다. *Anal. calcd. for* C₃₂H₄₂N₄ptP₂O₈: C, 44.25; H, 4.84; N, 6.45: mol·wt. 867.7 Found: C, 44.36; H, 4.76; N, 6.75.

{1,3-Bis(diphenylphosphino)propane}(*trans-l-diaminecyclohexane*) platinum(II)-nitrate[pt(*trans-l-dach*)(DPPP)](NO₃)₂·2H₂O(*trans-l-dach*)pt(NO₃)₂ 800 mg(1 mmol)과 1,3-bis(diphenylphosphino) propane 410 mg(1 mmol)와 동일한 방법에 의하여 황백색 결정 650 mg을 얻었다. 이 물질은 물에 녹으며 아세톤, 에탄올 등에도 녹았다. *Anal. calcd. for* C₃₃H₄₄N₄ptP₂O₈: C, 44.91; H, 4.99; N, 6.35 mol·wt. 887.1 Found: C, 44.62; H, 4.61; N, 6.35.

항암효과 실험

살세포실험^{12,13}-microplate의 각 well에 10% fetal calf serum(FCS, Flow Laboratory)을 함유한 Roswell Park Memorial Institutes Medium 1640 (RPMI 1640) 배양액으로 배양한 L₁₂₁₀ leukemia 및 P₃₈₈ leukemia 세포를 2×10⁵ cell/well 되도록 10% FCS와 20 mM HEPES을 포함한 RPMI 1640 용액으로 희석시켜 주고 시료인 pt(II) 착체를 생리식염수로 용해한 후 Millipore filter(pore size 0.22 μm)시켜 농도를 일정하게 조정하여 전체량을 100 μl로 한 다음 5% CO₂ gas하에서 37°에서 48시간 배양하였다. 각 well 10 μl의 MTT 용액(MTT 5 mg을 1 ml의 PBS에 용해하여 여과한 액)을 가하고

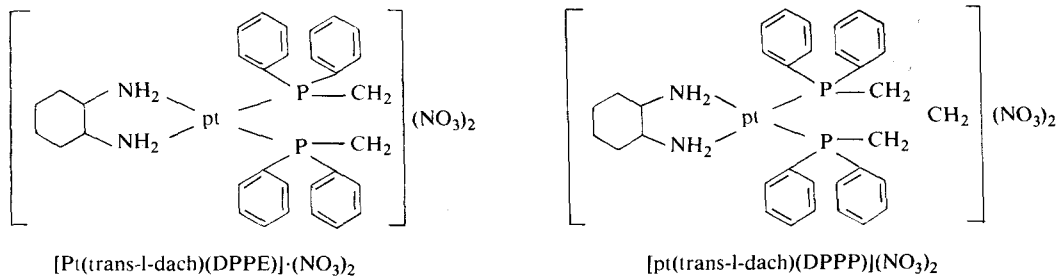


Figure 1—Structure pt(II) complexes.

Table 1. Results of Elemental Analysis of pt(II) complexes.

Complexes	Calcd. (%)			Found (%)		
	H	C	N	H	C	N
$[Pt(trans-1-dach)]_2$	3.68	18.95	7.37	3.77	19.02	7.33
$[Pt(trans-1-dach)(NO_3)_2]$	3.23	16.62	12.93	3.34	16.83	12.84
$[Pt(trans-1-dach)(DPPE)] \cdot (NO_3)_2 \cdot 2H_2O$	4.84	44.25	6.45	4.76	44.36	6.75
$[Pt(trans-1-dach)(DPPP)] \cdot (NO_3)_2 \cdot 2H_2O$	4.99	44.91	6.35	4.61	44.62	6.35

계속하여 동일한 조건에서 6시간 배양시켰다. Isopropanol-HCl(0.04 N) 150 μ l을 가하여 잘 혼합시켜 생성된 흡색침전을 용해시켜 준 다음 즉시 Micro ELISA reader을 사용하여 비색정량하였다. 측정조건은 주파장 570 nm, 부파장 630 nm이며 threshold는 1.99로 하였다. 얻어진 data를 통계처리하여 세포의 증식을 50% 저해하는 농도(IC₅₀)을 산출하였다.

항암실험—미국 National Cancer Institute(NCI)에 준한 pt analog study protocol에 따라 시행하였다. 즉 CDF1 마우스(1군 6마리)에 L₁₂₁₀ leukemia 세포 1×10⁶개를 복강내에 이식하고 1일, 5일 및 9일째에 pt(II)착체를 복강내에 투여하였다. 무처리군의 평균생존일수에 대한 투여군의 평균생존일수의 비(T/C %)을 산출하여 120 이상의 경우를 유효로 판정하였다.

실험결과 및 고찰

pt(II) 착체의 합성 및 구조

Diamine류로서 trans-1-dach와 diphosphine류로는 DPPE와 DPPP를 1 : 1로 반응시켜 $[Pt(trans-1-dach)DPPE](NO_3)_2$ 와 $[Pt(trans-1-dach)DPPP](NO_3)_2$ 의 혼합배위자 pt(II)착체를 합성할 수 있었

고 반응비가 1 : 2인 경우는 $[Pt(DPPE)_2](NO_3)_2$ 와 $[Pt(DPPP)_2](NO_3)_2$ 의 동일배위자 pt(II)착체를 얻었다(Fig. 1).

합성된 혼합배위자 pt(II)착체는 물에 가용성이었으나 동일배위자 pt(II)착체는 물에 녹지 않았다. 일반적으로 항암제 개발의 가장 중요한 요소중의 하나가 물에 가용성이어만 한다는 점을 감안하여 혼합배위자 pt(II)착체의 구조확인을 원소분석과 IR 및 ³¹P-NMR 스펙트럼에 의하여 수행하였다. 합성된 혼합배위자 pt(II)착체의 원소분석치는 Table I과 같으며 IR 스펙트럼 중 중요 관능기에 따른 흡수파수는 Table II와 같다. 전체적으로 착체형성에 따른 현저한 흡수파수의 변화는 없었으나 다만 diphosphine류에서 νP-C(phenyl)에 유래되는 흡수파수 1430 cm⁻¹가 착체형성에 의하여 공통적으로 1436 cm⁻¹의 고파수쪽으로 shift되고 있음을 확인할 수 있었는데 이러한 현상은 Nakamoto¹⁴⁾에 의하여 triphenyl phosphine 금속착체에서도 나타나고 있음이 보고된 바 있다.

한편 pt(II)착체를 형성하고 있는 trans-1-dach의 경우 νNH에 유래되고 있는 흡수대가 3200×3070 cm⁻¹ 부근에서 나타내고 있는데 이는 유리 diamine류보다 저파수로 이동되고 있음을 알았다. 또 diamine류와 diphosphine류는 중성이기 때문에

Table II. IR spectra of the free ligands and their pt(II) complexes.

Compound	ν NH ₂	ν CH (phenyl)	δ NH	ν P-C (phenyl)	ν NO ₃ (/cm ⁻¹)
DPPE		3067 (w)		1432 (vs)	
[Pt(trans- <i>l</i> -dach)(DPPE)](NO ₃) ₂	3192 3074	3053 (w)	1585	1436 (vs)	1384 (vs)
DPPP		3046 (w)		1431 (vs)	
[Pt(trans- <i>l</i> -dach)(DPPP)](NO ₃) ₂	3182 3074	3051 (w)	1572	1436 (vs)	1384 (vs)

Table III. ³¹P-NMR Chemical Shifts of the Free Ligands and Their pt(II) Complexes.

Compounds	δ /ppm	Δ	Solvent
DPPE	-13.0		CD ₂ Cl ₂
DPPP	-17.8		CD ₂ Cl ₂
[Pt(trans- <i>l</i> -dach)(DPPE)](NO ₃) ₂	63.5	76.5	D ₂ O
[Pt(trans- <i>l</i> -dach)(DPPP)](NO ₃) ₂	7.2	25.0	D ₂ O

δ ppm from H₃PO₄

$\Delta = \delta$ complex - δ free ligand.

counter ion인 NO₃'의 강한 흡수대가 1380 cm⁻¹ 부근에서 공통적으로 나타남을 확인할 수 있었다. 이러한 사실들을 종합하여 볼 때 trans-*l*-dach과 DPPE 및 DPPP가 pt(II)와 배위결합하여 질산염으로 존재하고 있음을 확인할 수 있었다. 혼합배위자 착체 [Pt(trans-*l*-dach)(DPPE or DPPP)]⁺²의 D₂O 중에서의 ³¹P-NMR 스펙트럼 데이터는 Table III에 표시하였다. 유리배위자 DPPE 및 DPPP는 CO₂Cl₂ 중에서 각각 -13.0 ppm 및 -17.8 ppm에 ³¹P에 유래되는 공명선이 관측되었고, [Pt(trans-*l*-dach)(DPPE)]⁺²는 63.5 ppm으로서 착체형성에 따라 Δ 값($\Delta = \delta$ complex - δ free)이 76.5인 반면, [Pt(trans-*l*-dach)(DPPP)]⁺²는 공명선이 72 ppm으로서 Δ 값이 25.0이었다. 이는 생성하는 착체의 chelate-ring 수에 따라 Δ 값이 달라진다는 것에 기인함을 알 수 있었다. 즉 Nixon 등¹⁵⁾은 [Pt(CH₃)₂(DPPE)]과 [Pt(CH₃)₂(DPPP)] 착체에서 Δ 값이 67.7 ppm과 20.5 ppm으로, Kolke 등¹⁶⁾은 [CO(acac)₂(DPPE)]와 [CO(acac)₂(DPPP)] 착체에서 Δ 값이 62.1 ppm과 26.5 ppm으로 보고하고 있는 사실과 일치하였다.

따라서 DPPE는 pt(II) 착체를 형성할 때 5원환을, DPPP는 6원환의 chelate환을 형성함을 확인할 수 있었다.

Table IV—IC₅₀ Values of pt Complexes

Complexes	IC ₅₀ (uM)	
	L ₁₂₁₀	P ₃₈₈
[Pt(trans- <i>l</i> -dach)(DPPE)](NO ₃) ₂	18	20
[Pt(trans- <i>l</i> -dach)(DPPP)](NO ₃) ₂	7	9
[Pt(DPPE) ₂](NO ₃) ₂	60	65
[Pt(DPPP) ₂](NO ₃) ₂	50	53

P₃₈₈ and L₁₂₁₀ leukemia (2 × 10⁵ cells) were implanted such microplate well

Table V. Antitumor Activity of pt(II) Complexes Against L₁₂₁₀ Leukemia.

Complexes	(T/C %)			
	dose (mg/kg)	50	25	12.5
[Pt(trans- <i>l</i> -dach)(DPPE)](NO ₃) ₂	150	160	131	
[Pt(trans- <i>l</i> -dach)(DPPP)](NO ₃) ₂	341(4/6)	356(4/6)	246(1/6)	

L₁₂₁₀ leukemia (1 × 10⁶ cells) were implanted in mice. Treatment was given *i.p.* twice on day 1.5 and 9.

() : cured mice number.

항암효과

새로이 합성한 pt(II) 착체에 대한 L₁₂₁₀ leukemia 및 P₃₈₈ leukemia 세포를 대상으로한 살세포효과 시험을 MTT법에 의하여 실험한 결과는 Table IV와 같으며 수치는 세포의 증식을 50% 저해하는 농도 (IC₅₀ 값)을 지표로 하였으며 참고로 [Pt(DPPE)₂ or (DPPP)₂](NO₃)₂는 물에 녹지 않으므로 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해하여 실시하였다.

전반적으로 종양의 종류에 따른 감수성의 차이는 없었으며 혼합배위자 [Pt(trans-*l*-dach)(DPPE) or (DPPP)](NO₃)₂의 경우가 동일배위자 [Pt(DPPE)₂ or (DPPP)₂](NO₃)₂보다 강한 살세포효과가 나타났다. 특히 혼합배위자 [Pt(trans-*l*-dach)(DPPP)](NO₃)₂ 높은 IC₅₀(μ M) 7 μ M(C₁₂₁₀) 및 9 μ M(P₃₈₈)

로서 높은 살세포효과를 나타내었다. 동일배위자의 경우는 용매로 사용한 DMSO의 영향을 고려한다면 별로 효과가 없는 것으로 단정하였다.

따라서 혼합배위자 pt(II) 착체만을 마우스 L₁₂₁₀ leukemia에 대한 *in vivo* 항암효과시험을 실시하였으며 그 결과를 연명률(T/C%)을 지표로 하여 Table V에 표시하였다. 시료인 [pt(trans-*l*-dach)(DPPE)](NO₃)₂ 및 [pt(trans-*l*-dach)(DPPP)](NO₃)₂ 모두 T/C%값이 120 이상으로 항암효과를 나타내었다. 특히 *in vitro* 시험에서 높은 살세포효과를 나타내었던 [pt(trans-*l*-dach)(DPPP)](NO₃)₂는 T/C%값이 246(12.5 mg/kg), 356(25 mg/kg), 341(50 mg/kg)로서 매우 높은 항암효과를 나타내었다. 따라서 이 물질은 앞으로도 계속 추시하여 불만한 가치가 있다고 판단되었다.

결 론

일련의 diphosphine류 DPPE 및 DPPP을 함유하는 수용성 혼합배위자 백금(II) 착체를 합성하여 *in vitro*서 살세포효과와 *in vivo* 항암효과시험을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 새로이 합성한 혼합배위자착체 [pt(trans-*l*-dach)(DPPE)](NO₃)₂와 [pt(trans-*l*-dach)(DPPP)](NO₃)₂의 구조는 원소분석과 IR 및 ³¹P-NMR spectra에 의하여 확인하였다.

*in vitro*에서 살세포효과는 diphosphine에 따라 [pt(trans-*l*-dach)(DPPP)](NO₃)₂, [pt(trans-*l*-dach)(DPPE)](NO₃)₂순으로 나타났다.

3) L₁₂₁₀ leukemia에 대한 *in vivo*에서의 항암효과는 *in vitro*와 동일한 결과가 나타났으며 특히 [pt(trans-*l*-dach)(DPPP)](NO₃)₂는 매우 높은 효과가 나타났다.

따라서 [pt(trans-*l*-dach)(DPPP)](NO₃)₂는 앞으로 구체적인 항암효과시험을 통하여 새로운 항암제로서의 개발가치가 있다고 판단된다.

감사의 말씀

이 논문의 내용중 항암효과실험을 지도하여 주신 나고야시립대학 의학부 분자의학연구소 생체제어부 분 加藤泰治 교수에 감사하며 논문의 경비는 1989

년도 문교부 학술연구조성기금으로 충당되었습니다.

문 헌

- 1) B. Rosenberg, L. Van Camp, J.E. Trosko and V.H. Mansour, Platinum compound; a new class of potent antitumor agents, *Nature* (London), **222**, 385 (1969).
- 2) P.D. Braddock, T.A., Connors, M. Jones, A.R. Khokhar, D.H., Melzack and M.L. Tobe, Structure and activity relationships of platinum complexes with anti-tumor activity, *Chem. Biol. Interactions*, **1**, 145 (1975).
- 3) W.C. Rose, J.E. Schurig, J.B. Huftalen and W.T. Bradner, Antitumor activity and toxicity of cis-platin analogs, *Cancer Treat. Rep.*, **66**, 135 (1982).
- 4) P. Schwartz, S.J. Meischen, G.R. Gale, L.M. Atkines, A.B. Smith and E.M. Walker, Preparation and antitumor evaluation of water-soluble derivatives of dichloro (1,2-diaminocyclohexane) platinum(II) *Cancer Treat. Rep.*, **61**, 1519 (1977).
- 5) M. Noji, M. Hanai, T. Ohmori, T. Tashiro, K. Suzuki and Y. Kidani, Synthesis of pt(II) complexes containing D-glucuronate, D-gluconate or their acetyl derivatives and evaluation of antitumor activity against murine leukemia L₁₂₁₀, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3439 (1988).
- 6) C.F.J. Barnard, M.J. Cleare and P.C. Hydes: Second generation anticancer platinum compounds, *Chemistry in Britain*, November, (1986).
- 7) M. Noji, K. Okamoto and Y. Kidani, Relation of conformation to antitumor activity of platinum(II) complexes of 1,2-cyclohexanediamine and 2-(Aminomethyl) cyclohexylamine isomers against leukemia P388, *J. Med. Chem.*, **24**, 508 (1987).
- 8) M. Noji, M. Sumi, T. Ohmori, M. Mizuno, K. Suzuki, T. Tashiro and Y. Kidani, Antitumor activity and property of platinum complexes containing 1,2-cyclohexanediamine and 2-(amino methyl)cyclohexylamine isomers. *The Chemical Society of Japan*, **4**, 575 (1988).

- 9) T. Tashiro, Y. Kawada, Y. Sakurai and Y. Kidani, Antitumor activity of a new platinum complex oxalato (*trans*-1,2-diamino cyclohexane)platinum(II): new experimental data, *Biomed. Pharmacother*, **43**, 251 (1989).
- 10) J.M. Extra, F. Calvo, C. Ferme, L. Mignot and M. Marty, Phase I study of oxaliplatin in patients with advanced cancer, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **25**, 299 (1990).
- 11) J. Susan and J. Salder: Phosphines in medicine, *Chemistry in Britain*, June, 541 (1987).
- 12) 葛西 正考, 疋田 一郎, 徳永 徴, MTTアッセイを用いたT細胞増殖の測定: *Medical Immunology*, **12**, 411(1986),
- 13) 本郷 輝明, 水野 義仁, 原口 一, 吉田 考人
: マイクロプレート培養, 生存細胞染色法による簡便な制癌剤感受性試験の開発: 癌と化学療法, **13**, 247(1986).
- 14) K. Nakamoto, "Infrared spectra of inorganic and coordination compound", p. 205, Wiley-Interscience, New York (1970).
- 15) J.F. Nixon and A. Pidcock, "Phosphorus-31 NMR spectra of coordination compounds, Annual Review of NMR spectroscopy", Vol. 12, Academic press (1969).
- 16) Y. Koike, T. Takayama and M. Watabe, The phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectra of bis(acetylacetonato)cobalt(IV) complexes containing bidentate diphosphines, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **57**, 3595 (1984).