

DW2282의 용매의존성 항암효과 및 약동력학

문은이* · 최청하 · 성승규 · 이진 · 유제만 · 이문선 · 정상현**

정용호 · 이덕근 · 윤성준

동화약품(주) 중앙연구소, **충남대학교 약학대학

In Vivo Antitumor Activities and Pharmacokinetics of DW2282 Depending on Various Vehicles

Eun Yi MOON*, Chung Ha CHOI, Seung Kyo SEONG, Jin LEE, Jei Man RYU, Moonsun LEE, Sang Hun JUNG**, Yong Ho CHUNG, Dug Keun LEE and Sung June YOON

Central Research Laboratories of Dong-Wha Pharm. Ind. Co. Ltd.,
189, Anyang-dong, Anyang City, Kyunggi-do, Korea 430-010.

**College of Pharmacy, Chung-Nam National University, Taejeon, Korea

(Received September 30, 1998; accepted November 2, 1998)

Abstract – DW2282, (S)-(+)-4-phenyl-1-[N-(4-aminobenzoyl)-indolin-5-sulfonyl]-4,5-dihydro-2-imidazolone hydrochloride, is a novel anticancer agent thought to have a unique mechanism of action on the inhibition of tumor growth. In this study, we estimated *in vivo* antitumor activities and pharmacokinetics of DW2282 depending on various vehicles. The inhibition rate of tumor growth was increased by 50, 100 and 200 mg/kg of DW2282 in a dose-dependent manner. When DW2282 dissolved in 4 sorts of vehicles was orally single dosed to rats at 50 mg/kg, C_{max} of DW2282 in 0.5% CMC.Na was a half as high as those in PG, PG+CP and PG+CP+DW. When DW2282 was orally administered to mice for 5 days, antitumor activity of 130 mg/kg suspended in 0.5% CMC.Na was as effective as that of 65 mg/kg dissolved in the rest of vehicles. Taken together, it is thought that antitumor activities of DW2282 are resulted from the absorption extent of it and related to the vehicle used.

Keywords □ DW2282, antitumor activity, pharmacokinetics

암을 치료하기 위한 화학요법제를 개발하기 위하여 합성된 DW2143과 DW2282는 diarylsulfonylurea계 유도체로서 sulofenur의 단점이 개선된 구조를 갖는다. Sulofenur는 우수한 항암효과를 나타냈지만(Houghton *et al.*, 1989; 1990a; 1990b) methemoglobinemia와 anemia같은 심각한 독성을 유발하는 것으로 나타나 개발이 중단된 물질이다(Hande *et al.*, 1990; Howbert, 1991; Taylor *et al.*, 1992). 본 연구진은 sulofenur의 단점을 보완하기 위하여 여러 가지 acyl기를 도입함으로써 4-phenyl-1(N)-arylsulfonyl imidazolidinone을 합성한 결과, benzoyl기로 치환된 화합물이 암세포에 대하여 강력한 세포독성을 나타냄을 알 수 있었다(Jung *et al.*, 1996a; 1996b). 그 중 항암제 후보물질로 선택된 DW2143은 racemic체이며 DW2282는 (S)-configuration을 갖는

DW2143의 enantiomer이다. 여러 가지 조직에서 유래된 사람 암세포주에 대하여 *in vitro* 항암효과를 측정된 결과, DW2143과 DW2282의 IC₅₀는 비교물질로 사용한 doxorubicin보다 몇배 낮은 것으로 나타났다. 한편, (R)-configuration을 가진 DW2143의 enantiomer인 DW2283은 *in vitro* 항암효과를 전혀 나타내지 않았다. 또한 DW2143과 DW2282의 *in vivo* 항암효과를 측정하였을 때도 우수한 생명연장 효과 및 암세포 성장 저해효과를 나타내었다(manuscript preparation).

이상과 같은 우수한 항암효과에도 불구하고 DW2143과 DW2282는 물에 용해되지 않는 성질이 있으므로 용해도를 개선시키기 위하여 보조제를 사용하거나 그 조성을 변화시켜 항암효과를 증가시킬 수 있을 것으로 판단되었다. 따라서 본 연구에서는 선정된 여러 가지 용매를 사용한 경우의 *in vivo* 항암효과와 약동력학 실험을 통한 체내흡수정도와

* To whom correspondence should be addressed.

의 상관성을 비교함으로써 DW2282의 전임상시험시에 적합한 용매를 찾고자 하였다.

실험재료 및 방법

실험동물

청정구역(Charles Liver, Japan)에서 생산된 SPF(특정병원체 부재) 6주령 암컷 BDF1(3LL 세포를 사용할 때)과 BALB/c(Colon 26세포를 사용할 때) 생쥐와 Sprague-Dawley 랫드를 공급받아 온도 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$ 배기 10-18회/시간, 형광등 명암 12시간 간격교대, 조도 300-500 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자에 5-6마리씩 넣어 1주일간의 순화 사육 후에 실험에 사용하였다. 사료는 미국 Pico Lab의 실험동물용 사료를 자유급식하였고, 음료수는 멸균 정제수를 자유로이 공급하였다. 사용한 시약은 특별한 언급이 없는 한 미국 Sigma사의 제품을 사용하였다.

시험물질 및 투여

DW2282는 동화약품(주) 중앙연구소의 유기합성실에서 제조하여 공급한 것으로서 백색분말상이며 상온에서 안정하였다. DW2282는 0.5% carboxymethylcellulose(CMC)에 현탁하거나, propylene glycol(PG), PG와 cremophor RH 60(CP)의 혼합액(PG+CP, PG:CP=6:4) 및 PG와 CP와 증류수(DW)의 혼합액(PG+CP+DW, PG:CP:DW=3:2:5)에 용해하여 사용하였다. 약동력학 실험을 위해서 4종류의 용매를 사용한 경우 모두 50 mg/kg로 단회 경구투여하였다. 항암효과 실험을 위해서 0.5% CMC.Na에 현탁한 경우는 130 mg/kg로 나머지 용매에 녹인 경우는 65 mg/kg로 격일에 5회 경구투여 하였다. 용매대조군으로서 0.5% CMC.Na와 PG+CP+DW는 10 ml/kg로 PG와 PG+CP는 5 ml/kg로 경구투여하였다.

혈액 채취 및 분석

정해진 시간에(투여전, 0.083, 0.5, 1, 1.5과 3시간) 랫드에 테트로 가볍게 마취하여 안와 정맥총으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액을 즉시 원심분리하여 혈장을 얻은 후 사용할 때까지 -40°C 에 보관하였다. DW2282를 HPLC로 분석하기 위하여 혈장을 상온에서 녹인 후 내부 표준 물질로서 50 µg/ml의 SH95037을 포함한 acetonitrile 동량을 가하여 1분간 잘 혼합하였다. 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 HPLC분석에 이용하였다.

약동력학 분석

약동력학 변수인 C_{max} , T_{max} , AUC 및 $t_{1/2}$ 는 WinNonlin (Ver 1.0, Scientific Consulting Inc., USA)을 이용하여 non-compartment 분석방법으로 산출하였다. C_{max} (최고농도)와 T_{max} (최고농도에 도달한 시간)는 그래프에서 관찰된 값으로 나타내었다. $t_{1/2}$ (반감기)는 최종배설상(terminal elimination phase, β phase)에서 linear regression 방법으로 계산하

였다. AUC(total area under the concentration-time curve)는 각 시간에서의 AUC와 최종혈장농도/속도상수의 합으로 구하였다.

단세포 부유액의 조제

*In vivo*로 계대 유지하던 3LL 폐암피와 Colon 26 대장암피를 무균적으로 적출하고 잘게 잘라 놓았다. Collagenase (200 units/ml)와 DNase(270 units/ml)의 혼합액에 자른 암피를 넣어 37°C 를 유지하면서 2시간 정도 부드럽게 stirring 하였다. 만들어진 단세포 부유액을 원심분리하여 세포들을 수거하고 여러번 수세하였다.

항암효과를 보기위한 암세포 이식 및 측정

암세포에 대한 항암효과는 Goldin 등(1980)의 방법에 따라 행하였다. 3LL 세포는 1×10^6 cells/ml로 조절하고 Colon 26 세포는 5×10^6 cells/ml로 조절하여 각각 BDF1 마우스와 BALB/c 마우스의 복부 피내에 0.1 ml씩 이식하였다. 이식 5일 후 종양체적을 측정하여 군분리를 실시하였으며 1군당 동물은 5마리로 하였다. 군분리 다음날부터 DW2282를 이틀간격으로 5회 경구투여하였다.

약물투여 후 정해진 날에 vernier calipers를 이용하여 종양의 장경과 단경을 측정하고 다음의 공식에 따라 종양의 체적을 계산하였다. 실험 최종일에 종양을 적출하여 무게를 측정하여 성장 저해율을 계산하였다.

$$\text{종양체적}(\text{mm}^3) = [\text{장경}(\text{mm}) \times \text{단경}^2(\text{mm}^2)] \times 1/2$$

$$\text{종양성장 저해율}(\%)$$

$$= [1 - (\text{시험군의 종양 무게} / \text{대조군의 종양 무게})] \times 100$$

통계처리

얻어진 모든 데이터는 Dunnett t-test에 의해 통계처리하였다.

실험결과

DW2282의 항암효과

DW2282를 0.5% CMC.Na에 현탁시킨 후 격일로 5회 경구투여하여 Colon 26 생쥐 대장암 세포를 이용한 *in vivo* 항암효과를 알아보았다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 50, 100, 200 mg/kg의 DW2282는 농도의존적으로 항암효과를 증가시켰다. DW2282의 용량별 종양성장 저해율은 Table 1에 요약하였는데, 50, 100 및 200 mg/kg의 DW2282는 각각 25.1, 32.8 및 76.9%의 저해율을 나타냈다. 한편, 200 mg/kg를 투여한 경우 암세포 이식후 16일째에 1 마리의 사망례가 관찰되었다.

DW2282의 용매의존성 약동력학

DW2282가 물에 용해되지 않아 0.5% CMC.Na에 현탁하여 사용해야하는 점을 개선하기 위하여 DW2282를 용해시

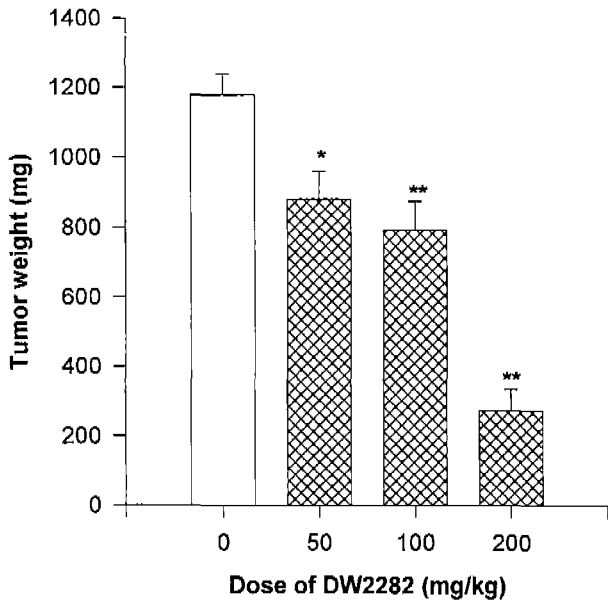


Fig. 1. Antitumor activities of DW2282 dissolved in 0.5% CMC.Na against Colon 26 inoculated mice. BALB/c mice were inoculated i.d. with 5×10^5 Colon 26 cells/0.1 ml. DW 2282 suspended in 0.5% CMC.Na was orally administered to tumor inoculated mice 5 times, on alternate day. Five animals in each group were used for the test of antitumor activity of DW2282. Tumor wet weight of Colon 26 was measured at day 17 after tumor inoculation. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, significantly different from control group.

키는 여러 가지 용매를 선정한 후 경구투여하고 DW2282의 흡수에 대한 변화를 알아보았다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 PG, PG+CP 및 PG+CP+DW는 용량의존적 항암효과를 보였던 용매인 0.5% CMC.Na보다 개선된 흡수를 나타

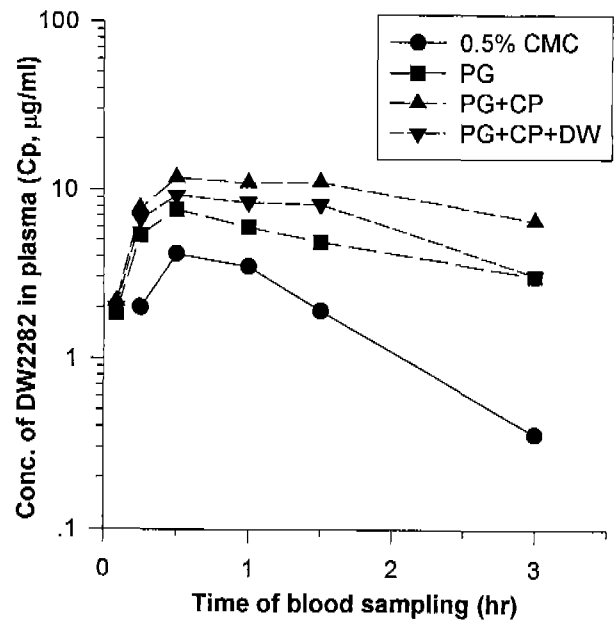


Fig. 2. Pharmacokinetic profiles of DW2282 in rats. DW2282 dissolved in various vehicles was orally single dosed to rats. Blood samples were collected at designated time, treated with acetonitrile for the deproteination and analyzed by HPLC. Five animals were used for each experiment.

냈다. DW2282의 용매별 약동력학 인자는 Table 2에 요약하였다. 선정한 용매들은 0.5% CMC.Na보다 약 2배정도 높은 Cmax값을 보였으며, Tmax는 30분으로 모두 같았고 반감기는 2-3배정도 길어짐을 알 수 있었다. Total AUC도 크게 증가하여 0.5% CMC.Na에 비해 약 4-6배의 값을 나타냈다.

DW2282의 용매의존성 항암효과

DW2282의 계속적인 연구에 적절한 용매를 선택하기 위

Table 1. Dose-dependent tumor growth inhibition rate of DW2282

Sample	Tumor cell	Dose (mg/kg)	Vehicle	Route	Inhibition rate of tumor growth (%)
DW2282	Colon 26	50	0.5% CMC.Na	p.o.	25.10±6.64
		100	0.5% CMC.Na	p.o.	32.80±7.05
		200	0.5% CMC.Na	p.o.	76.90±5.25

^{a)}DW2282 was suspended in 0.5% CMC.Na and dosed orally to tumor-bearing mice 5 times every 2 days.

Table 2. Pharmacokinetic parameters^{b)} of DW2282 dissolved in various vehicles

Sample	Dose (mg/kg)	Vehicle	Route	Cmax (µg/ml)	Tmax (hr)	t _{1/2} (hr)	Total AUC (µg · hr/mL)
DW2282 ^{a)}	50	0.5% CMC.Na	p.o.	4.16±2.253	0.5	0.61	6.035
		PG	p.o.	7.66±3.742	0.5	2.07	23.570
		PG+CP	p.o.	11.81±8.152	0.5	1.34	39.884
		PG+CP+DW	p.o.	9.31±7.087	0.5	1.42	27.092

^{a)}DW2282 was dissolved in 4 sorts of vehicles and single dosed orally to rats.

^{b)}Pharmacokinetic parameters were analyzed by the method described as materials and methods.

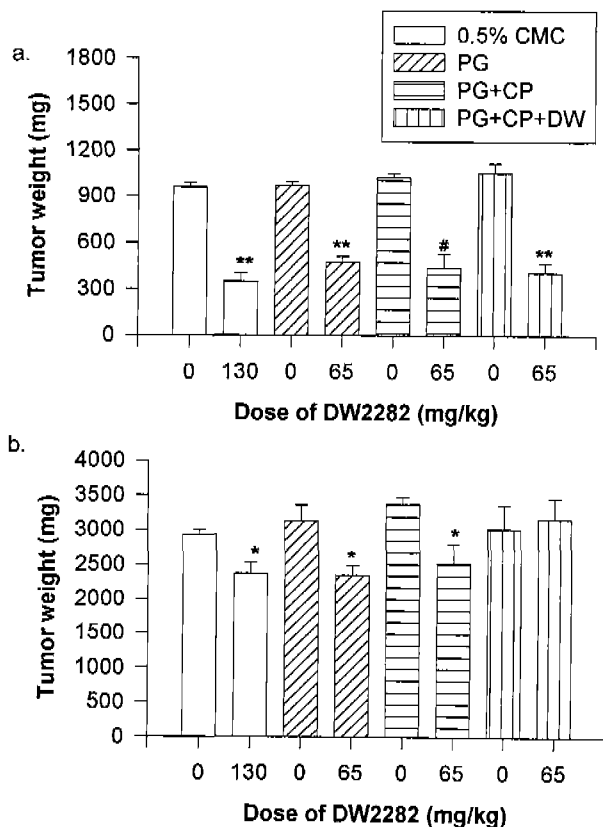


Fig. 3. Antitumor activities of DW2282 dissolved in various vehicles against Colon 26 (a) or 3LL (b) inoculated mice. BDF1 and BALB/c mice were inoculated i.d. with 1×10^5 3LL cells/0.1 ml and 5×10^5 Colon 26 cells/0.1 ml, respectively. DW2282 dissolved in various vehicles was orally administered to tumor inoculated animals 5 times, on alternate day. Five animals in each group were used for testing antitumor activity of DW2282. Tumor wet weight of Colon 26 or 3LL was measured at day 16 and 21 after tumor inoculation, respectively. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, significantly different from control group. #, We could not analyze significance because two out of five mice died at day 15.

하여 위에서 선정된 약동력학 인자가 개선된 용매인 PG, PG+CP 및 PG+CP+DW와 0.5% CMC.Na의 Colon 26 생쥐

대장암 세포주와 3LL 생쥐 폐암 세포주에 대한 *in vivo* 항암효과를 비교해 보았다. 이때 C_{max} 값을 고려하여 0.5% CMC.Na를 용매로 사용할 경우 130 mg/kg를 투여하였고 나머지 용매에 대해서는 65 mg/kg를 투여하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 모든 용매에서 Colon 26 생쥐 대장암에 대하여 50% 이상의 종양성장 저해율을 보였으며, 0.5% CMC.Na를 사용한 경우에 비해 나머지 선정된 용매를 사용한 경우의 항암효과가 크게 달라지지 않는 것으로 판단되었다. PG+CP를 사용한 경우 암세포 이식 후 15일째에 2마리의 사망례가 관찰되었다. 또, 3LL 생쥐 폐암에 대한 항암효과를 알아본 결과, PG와 PG+CP를 사용한 경우 25%의 종양성장 저해율을 나타내 19%의 종양성장 저해율을 보인 0.5% CMC.Na를 사용한 경우 보다 약간 증가된 결과를 나타냈으나 유의성은 없었으며, PG+CP+DW를 사용한 경우는 항암효과를 전혀 나타내지 않았다. 이상의 결과를 Table 3에 정리하여 나타냈다.

고 찰

본 연구는 (S)-configuration을 가진 DW2143의 enantiomer인 DW2282의 용매에 따른 항암효과와 약동력학의 차이를 알아보기 위한 것이다. DW2282는 diarylsulfonylurea계의 새로운 항암제로서 0.5% CMC.Na에 현탁 상태로 투여하였을 경우 항암효과가 농도의존적으로 증가함을 알 수 있었다(Fig. 1, Table 1). DW2282의 생체 흡수율이 증가하면 더욱 개선된 항암효과를 보일 것이라 생각되어 우선 용해도를 높이기 위한 노력을 하였다. 여러 가지 용매에 대한 DW2282의 용해도를 시험한 결과 PG, PG+CP 및 PG+CP+DW를 선정하고 이들 용매에 대한 항암효과와 체내흡수성을 알아보았다. 선정된 용매들은 0.5% CMC.Na에 비하여 DW2282의 C_{max} 와 total AUC를 증가시켰으며, 반감기를 길게해 주었다(Fig. 2, Table 2). 특히 반감기의 증가는 선정된 용매에 의하여 DW2282의 위내저류시간이 증가하고 흡수를 지속시킨데 기인한 것으로 사료된다. 이로써 선정된

Table 3. The inhibition rate of Colon 26 and 3LL tumor growth by DW2282

sample	tumor cell	Dose (mg/kg)	vehicle	route	Inhibition rate of tumor growth (%)
DW2282 ^{a)}	Colon 26	130	0.5% CMC.Na	p.o.	64.07±5.89
		65	PG	p.o.	51.55±4.19
		65	PG+CP	p.o.	57.18±8.94 ^{b)}
		65	PG+CP+DW	p.o.	61.68±5.93
	3LL	130	0.5% CMC.Na	p.o.	19.00±5.44
		65	PG	p.o.	25.00±4.52
		65	PG+CP	p.o.	25.10±8.19
		65	PG+CP+DW	p.o.	- ^{c)}

^{a)}DW2282 was dissolved in 4 sorts of vehicles and dosed orally to tumor-bearing mice 5 times every 2 days. ^{b)}Two mice died at day 15. ^{c)}DW2282 dissolved in PG+CP+DW did not inhibit tumor growth.

용매들은 DW2282의 생체 이용율을 높여 줄 것이라 생각되었다.

각각의 용매에 용해된 DW2282의 Colon26에 대한 *in vivo* 항암효과를 알아본 결과, 선정된 용매를 이용한 결과와 0.5% CMC.Na를 이용한 결과는 크게 다르지 않음을 알 수 있었다(Fig. 3 (a), Table 3). 그러나 0.5% CMC.Na에 현탁시킨 DW2282의 항암효과가 농도의존적으로 증가하는 (Table 1) 결과로부터, 0.5% CMC.Na와 나머지 용매에 동량의 DW2282를 현탁 또는 용해시킨 경우의 항암효과를 추론해볼 때 0.5% CMC.Na보다 나머지 용매를 사용하였을 경우의 항암효과가 개선될 것이라 판단되었다. 이때 투여량은 예비실험을 통하여 DW2282를 PG에 녹인 경우 최대 항암효과를 나타내는 65 mg/kg으로 설정하였으며(데이터를 따로 기재하지는 않았다), DW2282를 PG에 녹인 경우의 Cmax가 0.5% CMC.Na에 현탁시킨 경우의 약 2배이므로 DW2282를 0.5% CMC.Na에 현탁한 경우 130 mg/kg로 하였으며, 나머지 용매(PG+CP와 PG+CD+DW)의 경우에는 65 mg/kg로 용해하여 경구투여 하였다. 또, 3LL에 대한 항암효과를 알아본 결과 PG와 PG+CP는 0.5% CMC.Na보다 개선된 결과를 보여주었으나(대조군과 비교시 유의성은 보이지 않았음) PG+CP+DW는 영향이 없었다(Fig. 3 (b), Table 3). 이상의 결과로부터 PG와 PG+CP가 DW2282의 용매로서 유용할 것으로 판단되었다. 한편, Colon 26에 대한 항암효과를 알아 보기 위하여 PG+CP를 사용한 시험군에서 사망례가 발견되었으므로 DW2282의 항암효과와 체내흡수를 개선시키기 위한 용매로서 PG를 선택하는 것이 바람직하다고 사료되었다.

종합하면, DW2282를 PG에 용해하여 투여하면 약동력학적 변수들에서 알 수 있는 것과 같이 체내흡수가 개선되어 같은 용량을 0.5% CMC.Na에 현탁하여 투여한 경우 보다 항암효과가 증가하는 것이라 결론지을 수 있다.

참고문헌

Goldin, A., Venditti, J. M., Macdonald, J. S., Muggia, F. M.,

- Henney, J. E. and Devita Jr. V. T. 1980. Current results of the screening program at the division of cancer treatment. *J. Natl. Cancer Inst.* **17**: 129-142.
- Hande, K. R., Kuttesch, J., Hamilton, M., Satterlee, W., Jackson, L., Grindey, G. and Hainsworth, J. D. 1990. Kinetics of N-[(4-chlorophenyl)amino]carbonyl-2,3-dihydro-1H-indene-5-sulfonamide (LY186641) in humans. *Cancer Res.* **50**: 3910-3914.
- Houghton, P. J., Houghton, J. A., Myers, L., Cheshire, P., Howbert, J. J. and Grindey, G. B. 1989. Evaluation of N-(5-indanylsulfonyl)-N'-(4-chlorophenyl)-urea against xenografts of pediatric rhabdomyosarcoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **25**: 84-88.
- Houghton, P. J., Bailey, F. C., Germain, G. S., Grindey, G. B., Witt, B. C. and Houghton, J. A. 1990a. N-(5-indanylsulfonyl)-N'-(4-chlorophenyl)-urea, a novel agent equally cytotoxic nonproliferating human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* **50**: 318-322.
- Houghton, P. J., Bailey, F. C., Houghton, J. A., Murti, K. G., Howbert, J. J. and Grindey, G. B. 1990b. Evidence for mitochondrial localization of N-(4-methylphenylsulfonyl)-N'-(4-chlorophenyl)-urea in human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* **50**: 664-668.
- Howbert, J. J. 1991. Sulofenur. *Drug of the future* **16**: 517-520.
- Jung, S. H., Song, J. S., Lee, H. S., Choi, S. U. and Lee, J. O. 1996a. Synthesis and evaluation of cytotoxicity of novel arylsulfonylimidazolidinones containing sulfonylurea pharmacophore. *Arch. Pharm. Res.* **19**: 570-580.
- Jung, S. H., Song, J. S., Lee, H. S., Choi, S. U. and Lee, J. O. 1996b. Synthesis and evaluation of cytotoxic activity of novel arylsulfonylimidazolidinones. *Bioorg. Med. Chem. Letters* **6**: 2533-2558.
- Taylor, C. W., Alberts, D. S., Peng, Y. M., McClosky, T. M., Matzner, M., Roe, D. J., Plezia, P. M., Grindey, G. B., Hamilton, M. and Seitz, D. 1992. Antitumor activity and clinical pharmacology of sulofenur in ovarian cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **84**: 1798-1802.