

1,3-비스페닐치오 프로판올 배위자로 한 백금 (II) 착체의 선택적 세포독성

노영수* · 윤기주 · 이경태 · 장성구* · 정지창*

경희대학교 약학대학, * 의과대학

(Received March 25, 1999)

Selective Cytotoxicity of New Platinum (II) Complex Containing 1,3-Bis-phenylthiopropene

Young-Soo Rho*, Kee-Joo Yoon, Kyung-Tae Lee,
Sung-Goo Chang* and Jee-Chang Jung*

College of Pharmacy and *Medicine, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Abstract — A new series of highly water soluble platinum(II) complexes {Pt(II)[1,3-bis(phenylthio) propane](trans-*l*-1,2-diaminocyclohexane) (PC-1) and Pt(II)[1,3-bis-(phenylthio)propane] cis-1,2- diaminocyclohexane(PC-2)} were synthesized, and characterized by their elemental analysis and by various spectroscopic techniques[infrared(IR), ¹³C-nuclear magnetic resonance (NMR)]. *In vitro* antitumor activity of new Pt(II) complexes was tested against P-388 and L-1210 mouse lymphocytic leukemia cell lines, PC-14/P, PC-14/ADM and PC-14/CDDP human pulmonary adenocarcinoma, DU-145 human prostate carcinoma, HT-1376 human bladder carcinoma, ZR-75-1 human breast carcinoma, MKN-45/P and MKN-45/CDDP human gastric adenocarcinoma cell lines using colorimetric MTT[3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] assay for cell survival and proliferation. PC-1 showed active against L-1210, P-388 leukemia, human lung, stomach, prostate, bladder and breast cancer cell lines, and the antitumor activity of these compounds were comparable or superior to those of PC-2 and cisplatin. The nephrotoxicities of PC-1 and PC-2 were found quite less than that of cisplatin using MTT and [³H] thymidine uptake in rabbit proximal tubule cells and human kidney cortical cells. Based on these results, this novel platinum (II) complex compound (PC-1) represents a valuable lead in the development of a new anticancer chemotherapeutic agent capable of improving antitumor activity and low nephrotoxicity.

Keywords □ Selective cytotoxicity, platinum (II) complex, thymidine uptake, nephrotoxicity.

Cisplatin(CDDP)은 고환암, 난소암 및 방광암등의 여러 가지 solid tumor에 사용되며 특히 고환종양에 있어서는 치료효과가 우수한 것으로 규명¹⁻⁵⁾되어 있으나 강한 신장독성등의 부작용을 나타내고 신장조직중에 축적작용이 있어 사용에 제한을 받고 있다.⁶⁻⁸⁾

CDDP에 의한 항암화학요법에 있어 신장독성은 현재도 가장 큰 어려움으로 지적되고 있으며, 특히 CDDP의 고용량요법으로 훨씬 효과적인 항암효과를 기

대할 수 있으나 CDDP의 강력한 신독성으로 임상적용에 어려움이 있다. 또한 소화기장애, 골수, 청각장애와 투여후 혈중 단백질과의 높은 결합으로 인한 생체이용율의 저하와 반복투여에 의한 내성 암세포의 출현⁹⁾ 등으로 새로운 항암성 백금착체개발의 필요성이 대두되고 있다.

CDDP를 비롯한 백금착체는 여러 가지 구핵시약에 대해서 치환가능한 배위자(leaving group)와 치환불활성인 배위자(carrier ligand) 중심금속(Pt)으로 구성되는데 carrier ligand는 항암효과의 강도 및 항암 spectrum에 관계하며 leaving group은 수용성, 안정

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-961-0370 (팩스) 02-966-3885

성, 반응성에 영향을 미친다.¹⁰⁾

최근 Rho 등¹¹⁾ 과 Jung 등¹²⁻¹⁴⁾ 은 carrier ligand 로 *trans-l*, *trans-d* 및 *cis-1,2-diaminocyclohexane*(DACH) 을, leaving group 에 diphosphine 류를 도입한 새로운 백금(II)착체를 합성하여 수종의 cancer cell-line에 대한 *in vitro* 항암효과와 토끼 및 인체신장의 일차배양세포에 대한 *in vitro* 세포독작용을 CDDP와 비교검토한 바 항암활성은 CDDP와 유사한 반면에, 정상신장세포에 대한 세포독성은 CDDP에 비하여 현저히 감소된 백금(II) 착체임을 확인한 바 있다.

이에 저자 등은 신독성을 감소시킨 새로운 백금착체를 개발함으로써 항암성 백금착체의 문제점을 극복할 목적으로 carrier ligand로서 DACH의 *trans-l*체와 *cis*체를, leaving group 으로서는 1,3-bis(phenylthio)propane(PTP)을 사용하여 수용성 혼합배위자의 백금(II)착체인 [Pt(*trans-l*-DACH) (PTP)] · (NO₃)₂ 와 [Pt(*cis*-DACH)(PTP)] · (NO₃)₂를 합성하였으며, 이 새로운 백금(II)착체의 *in vitro*에서 수종의 암세포에 대한 항암활성과 인체 및 토끼신장세포와 신조직에 대한 세포독성을 검토한 바 유의한 결과를 얻었다.

실험방법

실험재료 - K₂PtCl₄와 PTP는 Aldrich사의 특급 시약을 사용하였으며, DMEM, soybean trypsin, fetal bovine serum(FBS), penicillin G, streptomycin, Ham's F₁₂ 및 RPMI 1640 배지는 Gibco BRL(Grand island, NY)사의 제품을 3H-thymidine 은 Dupont NEM products(Boston, MA)에서 구입하였다. Insulin, transferrin 및 hydrocortisone, MTT, CDDP, transferrin 및 기타 시약은 Sigma(St Louis, MO)사의 제품을 사용하였다. L-1210과 P-388(mouse leukemia)은 미국의 National Cancer Institute에서 냉각상태로 공급받아 사용하였으며, DU-145(human prostate carcinoma)와 ZR-75-1(human breast carcinoma)세포는 서울의대 암연구소의 세포주 은행으로부터, PC-14(human pulmonary adenocarcinoma), PC-14/ADM(adriamycin-resistant human pulmonary adenocarcinoma), PC-14/CDDP(cisplatin-resistant human pulmonary adenocarcinoma), MKN-45(human gastric adenocarcinoma)와 MKN-45/CDDP(cisplatin-resistant human gastric adenocarcinoma)세포는 한국 원

자력병원 세포생물학연구실로부터 분양받아 사용하였다.

실험동물 - 실험에 사용한 동물은 체중 1.8~2.0 kg의 수 토끼를 삼육실험동물로부터 공급받아 사용하였다. 사료는 삼양유지 사료(株)의 고품사료로 사육하고, 충분한 물을 공급하면서 온도와 습도가 조절된 사육실에서 2주간 실험환경에 순응시킨 후 사용하였으며, 실험은 23 ± 2°C 에서 실시하였다.

백금(II) 착체의 합성

(trans-l-1,2-diaminocyclohexane)dichloroplatinum(II)-[Pt(*trans-l*-DACH)Cl₂] - K₂PtCl₄ 1.8 g 을 증류수 30.0 ml 에 용해한 것에 *trans-l*-DACH 0.5 g 을 증류수 15 ml 에 용해시켜 서서히 가하고, 5% NaOH 용액으로 pH 6.5로 하여 실온에서 3시간 교반하여 반응시켰다. 생성한 황색결정을 흡인여과하고 물로 수회 세척한 후 진공건조하여 황색결정 1.55 g 을 얻었다(수득률 93.4%). 물에 녹지 않으며, ethanol등의 유기용매에도 난용이었다.

(trans-l-1,2-diaminocyclohexane)dinitrateplatinum(II)-[Pt(*trans-l*-DACH)(NO₃)₂] - Pt(*trans-l*-DACH)Cl₂ 3.82 g 을 증류수 10 ml 에 현탁시키고, AgNO₃ 3.4 g 을 증류수 100 ml 에 용해시켜 추가하였다. 실온에서 24시간 동안 교반시킨 후 반응물을 흡인여과하여 생성된 AgCl을 제거하고, 여액을 감압농축 후 동결건조하였다. 생성한 백색결정을 증류수로 재정제하여 백색결정을 3.2 g 을 얻었다(수득률 95.5%). 물에는 녹으나 ethanol등 유기용매에는 난용이었다.

[1,3-Bis(phenylthio)propane](trans-l-1,2-diaminocyclohexane)Pt(II)nitrato-[Pt(*trans-l*-DACH)(PTP)](NO₃)₂ (이하 PC-1) - Pt(*trans-l*-DACH)(NO₃)₂ 2 g 을 증류수 10 ml 에 용해한 용액에 PTP 1.2 g 을 acetone 20 ml 에 용해시킨 용액을 교반하면서 추가하였다. 2시간 반응시킨 후 감압증류하여 용매를 유거하고 동결건조하여 황백색결정을 얻고 물로 재정제하여 백색결정 [Pt(*trans-l*-DACH)(PTP)](NO₃)₂ · H₂O(M.W. 695) 1.2 g 을 얻었다. 물에 녹으며 acetone 및 ethanol등에는 난용이었다.

(cis-1,2-diaminocyclohexane)dichloroplatinum(II)-[Pt(*cis*-DACH)Cl₂] - K₂PtCl₄(M.W. 415.11) 2.5 g 을 증류수 20.0 ml 에 용해시켜 반응용기에 넣고, *cis*-DACH · 2HCl 1.13 g 을 증류수 2.0 ml 에 용해시켜 반응시켰다. 생성된 황색 결정물을 3G4규격의 glass

filter를 통하여 흡인여과하고 증류수로 여러번 재정제하여 [Pt(cis-DACH)Cl₂] (M.W. 380.2) 2.1 g 을 얻었다 (수득률 91.3%). 이 물질은 물에 용해되지 않으며 ethanol 등의 유기용매에도 난용이었다.

(cis-1,2-diaminocyclohexane)dinitrateplatinum (II)-[Pt(cis-DACH)(NO₃)₂] - 위의 단계에서 얻어진 [Pt(cis-DACH)Cl₂] 1.0 g을 차광 반응용기의 증류수 25.0 ml에 현탁시킨 후 AgNO₃ 8.9 g을 증류수 10 ml에 용해시켜 반응용기에 추가하고 실온에서 24시간 동안 교반하여 반응시켰다. 반응물을 차광하에 여과하여 반응중에 생성된 AgCl침전과 미반응물을 제거하고 여액을 감압농축한 후 동결건조하였다. 생성한 백색 결정 물을 증류수로 재정제하여 [Pt(cis-DACH)(NO₃)₂] (M.W. 433.2) 1.98 g을 얻었다. 이 물질은 물에는 녹으나 ethanol 등의 유기용매에는 난용이었다 (수득률 90%).

[1,3-Bis(phenylthio)propane](cis-1,2-diaminocyclohexane)Pt(II)nitrato-[Pt(cis-DACH)(PTP)]·(NO₃)₂·H₂O (이하 PC-2) - 위의 단계에서 얻어진 [Pt(cis-DACH)·(NO₃)₂] 1.5 g을 증류수 15.0 ml에 용해하고 PTP 0.9 g을 acetone 30 ml에 용해시켜 이 용액을 교반하면서 추가하였다. 2시간 반응시킨 후 감압 증류하여 용매를 제거하고 동결건조하였다.

토끼의 근위세뇨관 상피세포의 배양 - Jung¹⁵⁾의 방법에 준하였으며 요약하면, 체중 2.0 kg 정도의 토끼를 cervical dislocation에 의해 처사시킨 다음, 신장을 적출하고 신동맥을 통하여 인산 완충용액(PBS)을 주입하여 세척하였다. 다시 DME/F₁₂ 배지로 2회 세척한 후 0.5% 산화철용액을 주입하고, 신 피질만을 박리하여 DME/F₁₂ 배지에 넣어 Dounce-homogenizer로 균질화 시켰다. Homogenator를 253 μm mesh filter를 통과시키고, 83 μm mesh filter에 모아진 세뇨관과 사구체를 DME/F₁₂ 배지에 옮기고, 사구체는 magnetic stirring bar를 이용하여 사구체만을 제거하였다. 그 직후 trypsin inhibitor와 collagenase(10 mg/ml)를 넣어 2분간 실온에서 배양한 후 insulin(5 μg/ml), transferrin(5 μg/ml) 및 hydrocortisone(5 × 10⁻⁸ M)를 첨가한 DME/F₁₂ 배지에 부유시켜 일정량씩 배양접시에 접종하고, CO₂ incubator에서 37°C로 2주간 배양하였다.

인체의 정상 신피질 세포의 배양 - Jung 등¹⁵⁾의 방법을 변형하여 실험하였다. 먼저, 신장암 절제수술을 받은 암환자로부터 신장을 적출하여 정상조직부위를 취하

고, penicillin G 및 streptomycin을 함유하는 DME/F₁₂(pH 7.4) 배지로 수회 세척하여 준 다음, renal capsule을 제거하고 mess를 사용하여 신피질만을 얇게 잘라준 다음 무균 상태에서 균질화하여 일정량의 DME/F₁₂(pH 7.4)에 부유시켰었다. Trypsin inhibitor와 collagenase(10 mg/ml)를 0.2 ml씩 넣고 2분간 실온에서 배양한 후, insulin(5 μg/ml), transferrin(5 μg/ml) 및 hydrocortisone(5 × 10⁻⁸ M), prostaglandin E₁(5 × 10⁻⁸ M), triiodothyronine(5 μg/ml) 및 1% FBS을 함유한 동일 배지에 부유시켜 배양접시에 접종하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2주간 배양하였다.

MTT assay - 암세포를 각각 10⁶ cell/ml 농도로 RPMI-1640 medium에 희석하고, 합성한 백금(II)착체를 5 μM에서 500 μM 농도로 RPMI-1640 medium으로 조제하였다. 96 well titer plate에 세포 희석액 0.1 ml 및 각종 농도의 검체 0.1 ml을 가하고 48시간 동안 배양하였다. 배양액 속에 5 μg/ml농도의 MTT용액 50 μl씩을 가하여 4시간 배양한 후 상등액을 제거하고 DMSO 50 μl을 가하여 침전물을 용해시킨 다음 ELISA Reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹⁶⁾ 비교약물로는 cisplatin을 사용하였고, 검체없이 동일한 조건에서 배양된 세포군을 대조군으로 하였으며, 판정은 다음의 산출식에 따라 cytotoxic index(CI, %)를 구하여 CI로부터 평균세포독성(CC₅₀) 농도를 산출하였다.

$$CI(\%) = \left(1 - \frac{\text{검액의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

³H-Thymidine uptake assay - 일차 배양하여 7 일에서 10일이 경과된 토끼 신장의 근위 세뇨관 상피 세포 및 인체의 정상 신피질세포를 24well plate에 각 well당 10⁶개씩 접종하고 1시간 동안 배양하였다. 다시 여기에 각 well당 50 μM이 되도록 백금(II)착체를 가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 동안 배양하였다. 1 μCi/ml농도의 ³H-thymidine을 가한 다음 다시 24시간 동안 배양하고 trypsin처리, 1000 rpm으로 원심분리하여 모은 세포를 10% trichloroacetic acid 및 인산완충용액으로 세척한 다음, 0.5 M-NaOH를 가하여 37°C에서 2시간 동안 용해시키고 0.5 M-HCl로 중화시킨 후 scintillation cocktail 10 ml이 함유된 scintillation vial에 0.1 ml씩 옮겨 β-

counter(Beckman LS, 5000TD)로 측정하였다. 비교 약물로는 CDDP를 사용하였으며 검체없이 동일한 조건으로 배양한 세포를 대조군으로하여 100% thymidine 섭취율로 하였고, 각 검액에 따른 thymidine 섭취율로부터 세포의 생존율을 구하였다.

통계처리 - 모든 실험결과는 평균치±표준오차로 표시하고 각 군간의 비교는 Student's t-test를 사용하였으며, 대조군과 비교하여 $P < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

백금 (II) 착체의 합성 - [PtCl₂(trans-*l*-DACH)] 및 [PtCl₂(cis-DACH)]는 이미 보고되어 있는 방법에 따라 합성하였다. 이 물질은 황색결정성 분말로서 물에 난용성이었다. 따라서 Cl⁻부분을 NO₃⁻로 치환시켜 수용성인 [Pt(trans-*l*-DACH)·2NO₃], [Pt(cis-DACH)·2NO₃]로 하였다. 여기에 PTP를 1:1로 반응시켜 [Pt(trans-*l*-DACH)(PTP)·2NO₃]와 [Pt(cis-DACH)(PTP)·2NO₃]의 혼합배위성 백금 (II) 착체를 합성하였다.

IR spectra의 중요한 관능기에 따른 흡수파수는 Table I에 표시한 바와 같이 [Pt(DACH)PTP]₂NO₃는 phenyl 기에서 유래되는 νS-C의 흡수파가 1441, 752 cm⁻¹에서, NO₃⁻에서 유래되는 흡수파는 1384 cm⁻¹에 강하게 나타나고 있으며 그외 NH₂의 흡수파는 3434, 3023 cm⁻¹로 확인하였으며 trans-*l*체와 cis체 사이의 차이는 거의 없었다.

¹³C-NMR의 분석은 Table II에 나타낸 바와 같으며 [Pt(trans-*l*-DACH)(PTP)·2NO₃]의 phenyl의 C는

132.8, 127.7, 131.5 ppm에서 bridging CH₂의 S와 결합한 2개의 C는 24.0 나머지는 25.1 ppm에서, 1,2-diaminopropane의 C는 각각 63.2, 38.2, 32.2 ppm에서 확인할 수 있었다. Peak의 해석은 King 등의 문헌을 참고로 결정하였으며 위 사실을 종합할 때 DACH와 sulfur는 Pt(II)와 배위결합을하여 질산염으로 존재함을 확인하였다.

In vitro 항암효과

새로이 합성한 PC-1과 PC-2의 MTT분석에 의하여 P-388, L-1210, DU-145, HT-1376, ZR-75-1, PC-

Table III - *In vitro* antitumor activities for cisplatin and new Pt(II) complexes in various cancer cell-lines

Cell-lines	CC ₅₀ (μM)		
	CDDP	PC-1	PC-2
L-1210	47.3 ± 5.17	62.4 ± 8.24	245.8 ± 21.36
P-388	78.2 ± 9.10	74.5 ± 7.72	277.2 ± 20.28
DU-145	62.5 ± 7.44	60.6 ± 6.56	184.0 ± 29.85
HT-1376	75.1 ± 8.35	79.2 ± 8.71	225.5 ± 25.41
ZR-75-1	51.6 ± 7.22	50.8 ± 6.43	197.4 ± 22.53
MKN-45/P	42.3 ± 5.85	42.7 ± 6.24	180.5 ± 20.27
MKN-45/CDDP	118.7 ± 15.06	51.9 ± 7.25	192.2 ± 21.44
PC-14/P	78.4 ± 7.07	75.6 ± 8.46	285.1 ± 33.66
PC-14/ADM	82.6 ± 9.71	81.0 ± 8.49	279.7 ± 36.50
PC-14/CDDP	194.5 ± 20.75	80.8 ± 10.26	280.4 ± 35.77

* CC₅₀: Mean cytotoxic concentration.

Results are the mean ± S.E. of three independent experiments performed with MTT assay.

** Cell-lines: L-1210/P-388(mouse leukemia), DU-145(human prostate), HT-1376(human bladder), ZR-75-1(human breast), MKN-45/P(human gastric), MKN-45/CDDP(cisplatin resistant human gastric), PC-14/P(human pulmonary), PC-14/ADM(adriamycin resistant human pulmonary), PC-14/CDDP(cisplatin resistant human pulmonary).

Table I - IR Spectra of Pt(II) complexes

Compound	νNH ₂	νCH(phenyl)	νS-C	νNO ₃
[Pt(trans- <i>l</i> -DACH)(PTP)·2NO ₃]	3434, 3023	2934	1441	1384
[Pt(cis-DACH)(PTP)·2NO ₃]	3442, 3055	2935	1440	1385

Table II - ¹³C-NMR Spectra of Pt(II) complexes

Compound	Phenyl group			Bridging CH ₂		Diamine moiety			
	δC ₁	δC _{2,6}	δC _{3,5}	δC ₄	δC ₇	δC ₈	δC _{1,2}	δC _{3,6}	δC _{4,5}
[Pt(trans- <i>l</i> -DACH)(PTP)]		129.0	125.6	128.0	23.6	27.9	0.9	31.9	30.6
[Pt(cis-DACH)(PTP)]		129.0	125.6	128.0	25.4	20.0	57.5	30.6	27.9

δ: ppm from TMS

DACH: diaminocyclohexane

PTP: 1,3-Bis(phenylthio)propane

14 및 MKN-45 등의 암세포주에 대한 *in vitro* 항암 활성은 Table III에 나타내었다.

P-388 과 L-1210 – Mouse lymphocytic leukemia cell-lines인 P-388과 L-1210에 대한 백금착체인 PC-1과 PC-2의 항암효과는 농도의존적으로 세포독성을 나타내었고, PC-1은 비교약물인 cisplatin과 거의 대등한 항암활성을 보이는 반면에 PC-2는 PC-1에 비하여 현저히 낮은 세포독성을 나타내었다.

DU-145 – Human prostate carcinoma cell-line인 DU-145에 대한 PC-1의 항암활성에서도 P-388 및 L-1210과 비슷하게 농도의존적인 양상을 보이었고, 5~25 μM 의 낮은 농도에서는 항암효과를 인정할 수 없었으나 250 μM 농도에서의 cytotoxicity index(CI) 70.2%로서 cisplatin의 CI 18.5%보다 우수한 항암활성을 보이었고, PC-2는 500 μM 의 높은 농도에서만 항암활성을 보이었고, 250 μM 이하의 농도에서는 CI 50% 미만으로 항암효과를 인정할 수 없었다.

HT-1376 – Human bladder carcinoma cell-line인 HT-1376에 대한 PC-1의 항암효과는 250 μM 농도 이상에서 항암활성 대조약물인 cisplatin과 유사한 항암활성을 보이었고, PC-2는 500 μM 의 농도에서도 항암효과가 없었다.

ZR-75-1 – PC-1은 human breast carcinoma cell-line인 ZR-75-1에 대하여 250 μM 농도 이상에서 CI 62.3%로서 cisplatin과 대등한 활성을 나타내는 반면에 PC-2는 500 μM 의 높은 농도에서만 CI 51.8%의 CI값을 나타내었을 뿐 낮은 농도에서의 항암효과는 인정되지 않았다.

MKN-45/P 와 MKN-45/CDDP – Human gastric adenocarcinoma cell-line인 MKN-45세포의 감수성형(MKN-45/P)에 대한 PC-1의 항암효과는 50 μM 농도에서부터 CI 61.5%로서 대조약물인 cisplatin과 대등한 항암효과를 나타낸 반면에 PC-2는 250 μM 에서 55.4%와 500 μM 에서 64.3%의 CI로서 PC-1에 비하여 현저히 낮은 세포독성을 보였다.

Cisplatin에 내성을 나타내는 MKN-45/CDDP 세포의 경우는 cisplatin의 모든 농도에서 항암활성이 감수성형에서 보다 저하되어 있었으나 새로 합성된 백금착체류에는 별다른 내성을 보이지 않고 감수성 세포에서와 유사한 항암활성을 유지하였다.

PC-14/B, PC-14/ADM 와 PC-14/CDDP – Human

pulmonary adenocarcinoma cell의 감수성형(PC-14/P), adriamycin 내성형(PC-14/ADM)과 cisplatin 내성형(PC-14/CDDP)에 대하여 항암효과를 검토한 바 PC-14/P에 대하여 PC-1은 대체적으로 cisplatin과 유사한 세포독성을 나타내었으나, PC-2는 PC-1에 비하여 현저히 낮은 활성을 보였다. PC-14/ADM에 대한 항암활성은 감수성 세포주에서와 유사하였으며, PC-14/CDDP에 대해서도 cisplatin은 전 농도에서 감수성 세포주보다 그 항암활성이 현저히 저하되어 있었으며 250 μM 에서도 50% 정도의 CI를 나타낸 반면, PC-1은 감수성 세포주(PC-14/P)에서와 비슷한 결과를 나타내었다.

신장 세포독성

토끼의 근위세뇨관 상피세포에 대한 독성 – MTT assay방법에 의한 토끼의 근위세뇨관에 대한 세포독성은 Table IV에 제시한 바와 같이 PC-1과 PC-2의 토끼 근위세뇨관 상피세포에 대한 평균세포독성 농도(CC₅₀)는 285.9 μM 과 456.7 μM 로서 cisplatin의 42.19 μM 에 비하여 유의하게(p<0.001) 낮은 독성을 보였다.

Table IV – Comparison of cytotoxic activity for cisplatin and new Pt(II) complexes in proximal tubular cells of rabbit kidney and renal cortical cells of human kidney

Species	CC ₅₀ (μM)		
	CDDP	PC-1	PC-2
Rabbit-kidney	42.19 ± 2.98	285.91 ± 25.64*	456.73 ± 28.93*
Human-kidney	44.92 ± 2.79	238.83 ± 12.70*	454.14 ± 28.17*

CC₅₀: Mean cytotoxic concentration Results are the mean ± S.E. of three independent experiments performed with MTT assay. CDDP: Cisplatin, PC-1: [Pt(II)(trans-*l*-DACH)(PTP)] · 2NO₃, PC-2: [Pt(II)(cis-DACH)(PTP)] · 2NO₃.

* Significantly different from CDDP-control(*P<0.001).

Table V – Effect of Platinum(II) complexes on ³H-thymidine incorporation into primary cultured proximal tubular cells of rabbit kidney

Group	³ H-thymidine uptake (cpm/10 ⁵ cells)	Uptake rate (%)
Control	598.3 ± 75.15	100.0
Cisplatin	9.0 ± 3.46	1.5
PC-1	272.5 ± 41.72	45.5
PC-2	364.7 ± 47.45	61.0

Concentration of Pt(II)-complexes in culture medium: 5 × 10⁻⁴ M, PC-1: [Pt(II)(trans-*l*-DACH)(PTP)] · 2NO₃, PC-2: [Pt(II)(cis-DACH)(PTP)] · 2NO₃. Values are means ± S.E., All the incorporations were determined in triplicate.

Table VI – Effect of Pt(II) complexes on ^3H -thymidine incorporation into primary cultured renal cortical cells of human kidney.

Group	^3H -thymidine uptake (cpm/ 10^5 cells)	Uptake rate (%)
Control	621.3 \pm 56.01	100.0
Cisplatin	8.7 \pm 5.14	1.4
PC-1	235.4 \pm 21.38	37.9
PC-2	352.5 \pm 34.75	56.7

Concentration of Pt(II)-complexes in culture medium: 5×10^{-4} M. PC-1: [Pt(II)(*trans*-*ls*-DACH) (PTP)] \cdot 2NO₃, PC-2: [Pt(II)(*cis*-DACH)(PTP)] \cdot 2NO₃. Values are means \pm S.E., All the incorporations were determined in triplicate.

^3H -Thymidine incorporation 실험에 의한 토끼의 근위세뇨관 세포에 대한 독성은 Table V에 나타난 바와 같이 cisplatin의 세포내 uptake rate(1.5%)에 비하여 PC-1과 PC-2의 세포내 uptake rate는 각각 45.5%와 61.0%를 나타내는 등 검체의 세포내 uptake rate가 월등히 높아, 새로운 백금착체는 토끼신장세포에 대한 세포독성이 현저히 낮았다.

인체의 정상신피질세포에 대한 독성 – MTT assay방법에 의한 인체의 정상 신피질세포에 대한 독성은 cisplatin 대비 1/5.32(PC-1)과 1/10.11(PC-2)을 나타냄으로써 cisplatin의 세포독성 보다 현저히 낮았다 (Table IV).

인체의 정상 신피질세포에 대한 각 검체의 ^3H -thymidine uptake 정도가 PC-1에서 37.9%, PC-2는 56.7%로서 cisplatin uptake rate 1.4%에 비하여 유의하게($p < 0.001$)높게 나타나 인체의 신장세포에 대한 독성이 cisplatin에 비하여 유의하게 낮았다(Table VI).

고 찰

백금(II)착체의 하나인 CDDP는 Rosenberg등^{17,18)}이 *in vitro* 항암효과를 규명한 후 고환암과 난소암 등의 고형암에 효과적으로 쓰여져 오고 있으나 상대적으로 심한 신장독성 등이 하나의 문제점으로 지적되고 있다. 따라서 CDDP의 단점을 보완하기 위한 연구가 활발하게 진행되어, CDDP에 대한 교차내성을 일으키지 않고, 보다 우수한 항암효과와 광범위한 항암 spectrum을 가지면서 부작용이 경감되고 수용성 및 안정성을 높인 여러 백금착체가 개발되어 왔다.

백금(II)착체는 항암활성의 강도와 항암 spectrum을 결정짓는 carrier ligand와 수용성, 안정성, 반응성에

영향을 주는 leaving group 및 중심 금속인 Pt로 구성되어 있는데, 이들 carrier ligand와 leaving group을 여러 물질로 바꿔줌으로써 많은 백금화합물을 얻을 수 있다.

Carrier ligand의 amine은 항암활성에 중요한 요소가 된다. 즉, 백금착체가 DNA의 사슬과 결합할 때 amine 배위자의 구조에 의해 DNA사슬과 상호작용을 하며¹⁹⁾ DNA가 광학활성을 가지고 있으므로 배위자의 활성화도 영향을 받을 것으로 추측된다. 따라서 carrier ligand의 광학활성에 따라 DNA와 결합할 때 상호작용이 달라지게 되고 서로간에 저항이 작은 것이 항암활성에 효과적으로 보인다. 유효한 carrier ligand로서 1,2-diaminocyclohexane(이하 DACH)을 배위자로 하는 백금착체가 항암활성이 있는 것으로 보고 되어 있다.²⁰⁻²²⁾

유효한 carrier ligand의 하나로써 DACH는 *cis*, *trans*-*l* 및 *trans*-*d*체로 분리될 수 있고, 이들로부터 합성된 백금착체 중에서 *trans*-*l*-DACH의 항암활성이 가장 높으며 *cis*-DACH의 신독성이 가장 낮은 것으로 알려져 있다.²³⁾

또한, 항암활성에 중요한 영향을 미치는 인자로 leaving group의 영향을 고려하지 않을 수 없다. 생체내에 투여된 백금(II)착체는 세포막을 통과한 후 leaving group이 가수분해를 받아 떨어져 나오며, 이 부위가 DNA에 결합함으로써 DNA의 복제를 억제하여 세포독성을 일으키게 된다. 따라서 백금(II)착체의 항암활성은 carrier ligand와 leaving group을 변화시킴에 따라 항암활성, 수용성 및 안정성에 큰 영향을 주게 된다.¹⁰⁾

백금(II)착화합물에서 leaving group이 떨어진 후 세포안의 DNA염기외에 thiol기를 가지고 있는 정상세포와도 쉽게 결합할 수 있고²⁴⁻²⁷⁾ 이와같은 작용은 항암활성과는 관계없이 독성만을 나타내게 되는 것으로 알려져 있다.²⁸⁾ 이런점으로 보아 leaving group의 이탈능력이 항암활성을 나타내는데 있어서 중요한 요인으로 작용함을 알 수 있다. 그러나 이탈이 너무 큰 경우에는 암세포의 DNA와 cross-link하기 전에 다른 정상 단백질과 결합하여 독성을 일으킬 수 있고, 반대로 leaving group의 이탈율이 적다면 항암효과를 발휘하지 못할 뿐 아니라, 표적장기에 도달되기전에 체외로 배설됨으로 항암효과를 기대할 수 없게 된다. 따라서 항암성이 뛰어난 백금 착체의 개발에는 적절한 이탈물을 가지는 leaving group의 선택을 필요로 하게 된다.

한편, DACH를 carrier ligand로 한 백금착체의 항

암성에 대하여 Connors,²¹⁾ Clear,²⁰⁾ Gale등²²⁾은 dichloro체의 백금착체를 합성하여 그들의 항암성에 대하여 연구한 바 있으며, Kidani²⁹⁾는 trans-*l* 체, trans-*d* 체, cis 체의 각 이성체중 trans-*l*-DACH 만을 선택하여 leaving group 으로서 oxalic acid 와 malonic acid 등을 반응시켜 각각 Pt(oxalato)(trans-*l*-DACH)[oxaliplatin] 와 Pt(malonato) (trans-*l*-DACH)[1-PHM] 을 합성^{23,29)} 하였으며, 이중 oxaliplatin은 독성이 적고 안정한 백금(II) 착체인 것으로 알려져 있다.

이 연구에서는 carrier ligand로서 trans-*l*-DACH와 cis-DACH 를, leaving group 에는 1,3-bis(phenylthio)propane(PTP) 를 각각 반응시켜 [Pt(trans-*l*-DACH)(PTP)] · (NO₃)₂ 와 [Pt(cis-DACH)(PTP)] · (NO₃)₂ 를 합성하였으며, 이들 백금(II)착체에 대한 항암활성, 토끼와 인체의 세포단위에서의 독성 및 인체의 정상 신조직에 대한 신독성을 놓고 CDDP와 비교 검토하였다. *In vitro*에서의 항암효과 판정은 일반적으로 암세포주에 대한 cytotoxicity index(CI)로서 표현하며, CI 50% 이상을 항암효과의 양성으로 판정하고 있다.¹⁶⁾

이 실험에 사용된 백금(II)착체는 P-388 및 L-1210 mouse lymphocytic leukemia cells에 대하여 고농도에서는 CDDP와 유사한 항암활성을 나타내었으나, 저농도에서는 CDDP에 미치지 못하였다.

MKN-45 human gastric adenocarcinoma cell의 경우에는 검체의 모든 농도에서 CDDP와 대등한 항암활성을 보였으며, 특히 CDDP에 저항성이 형성된 MKN-45/CDDP cell에 대하여 항암활성이 우수하였다. 한편 PC-14 human pulmonary adenocarcinoma cell의 경우 PC-14 parent cell과 cisplatin resistant PC-14/CDDP cell에 있어서는 CDDP와 거의 유사한 항암효과를 나타내는 점으로 미루어 CDDP에 저항이 생긴 MKN-45와 PC-14에 대한 cytotoxicity는 그대로 유지되는 것으로 생각된다.

새로이 합성한 백금(II)착체는 CDDP에 비하여 현저히 낮은 신독성을 나타내었다. 이것은 CDDP의 carrier ligand인 diamine을 DACH로 치환시켰고, leaving group을 2분자의 Cl대신에 PTP로 치환시킴으로써 보다 우수한 항암효과와 아울러, 신독성의 감소를 보이는 것이 아닌가 여겨진다.

실험동물(토끼)에서 proximal tubule 상피 세포의 primary culture는 Chung³⁰⁾에 의하여 처음으로 보고되었는데 본 연구에서도 동일한 방법으로 실험동물 및

인체신장 세포의 primary culture를 실행하여 세포독성을 측정하였다. 이 실험방법의 장점은 hormonally defined medium을 사용하기 때문에 섬유아세포의 증식을 방지할 수 있는 것이다.

*In vitro*에서의 신독성을 측정하는데 Mortine과 Borch³¹⁾는 pig의 proximal epithelial cell line인 LLC-PK₁을 cisplatin에 의한 신독성을 측정하는데 좋은 model이 된다고 한 바 있으나, 이 실험에서는 primary culture cell을 이용함으로써 cell line에 비하여 보다 좋은 data를 얻을 수 있었으며, 앞으로 신독성의 index를 결정하는데 있어서 rabbit kidney proximal tubule cell과 human renal cortical cell의 primary culture cell을 활용하는 것이 바람직 할 것으로 생각된다.

결 론

기존의 항암성 백금착체에 비하여 항암효과가 우수하고, 반면에 신독성 등의 독성이 저하된 새로운 수용성 백금착체를 개발하고자 carrier ligand로서 diaminocyclohexane(DACH)의 trans-*l*과 cis체를, leaving group 으로서 1,3-bis(phenylthio)propane(PTP)를 도입하여 수용성 혼합배위자 백금착체로서 [(trans-*l*-DACH)(PTP)] · (NO₃)₂ (PC-1)과 [Pt(cis-DACH)(PTP)] · (NO₃)₂ (PC-2)를 합성하였다.

PC-1과 PC-2는 IR spectra 및 ¹³C-NMR 분석을 통하여 위의 물질질을 확인하였으며, MTT assay방법에 의하여 L-1210 및 P-388 mouse lymphocytic leukemia cells과 PC-14 human pulmonary adenocarcinoma 및 MKN-45 human gastric adenocarcinoma cell의 parent, adriamycin resistant cells에 대한 항암활성이 떨어지지 않았으며, 특히 CDDP 내성세포에 대한 항암활성이 현저하였다. 인체 암세포종인 DU-145 prostate, HT-1376 bladder와 ZR-75-1 breast carcinoma cells에 대하여 PC-1은 PC-2에 비하여 우수한 항암활성을 나타내었다.

MTT assay와 ³H-thymidine uptake 실험을 통한 토끼와 인체의 신피질 세포에 대한 독성실험 결과 CDDP에 비하여 신독성이 유의하게 저하되었음을 확인하였다.

이상의 결과로 보아 trans-*l*-DACH와 PTP를 함유하는 항암성 백금(II)착체는 CDDP와 비슷한 항암활성을

보인 반면, 토끼와 인체의 신피질 세포와 인체의 신피질 조직에 미치는 독성이 현저히 저하되었다는 점을 미루어, 새로운 백금(II)착체인 PC-1은 앞으로 다각적인 연구를 계속할 필요성이 있으며, 향후 새로운 항암화학요법제로 개발될 가능성이 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 1999년도 경희대학교 연구비 및 보건복지부 연구비지원으로 수행되었기에 이에 감사를 드립니다.

문헌

- 1) Harstrick, A., Casper, H., Guba, R., Wilke, H., Poliwooda, H., and Schmoll, H. J. : Comparison of the antitumor activity of cisplatin, carboplatin and iproplatin against established human testicular cancer cell lines *in vivo* and *in vitro*. *Cancer (Philadelphia)* **63**, 1079 (1989).
- 2) Hill, J. M., Loeb, E., and MacLellan, A. : Clinical studies of platinum coordination compounds in the treatment of various malignant disease. *Cancer Chemother Rep* **59**, 647 (1975).
- 3) Kociba, R. J., Sleight, S. D., and Rosenberg, B. : Inhibition of Dunning ascitic leukemia and Walker 256 carcinosarcoma with cis-diaminedichloro platinum (NSC-119875). *Cancer Chemother Rep* **54**, 325 (1970).
- 4) Soloway, M. S., Rose, D., and Weldon, T. : Single and combination chemotherapy for primary murine bladder cancer. *Proc Am Assoc Cancer Res* **15**, 7 (1974).
- 5) Wiltshaw, E., and Carr, B. : cis-platinumdiammine-dichloride. In : Connors, T. A. and Roberts, J. J. eds. *Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy*. Heidelberg : Springer-Verlag 178 (1974).
- 6) Dobyhan, D. C., Levi, J., and Jacobs, C. : Mechanism of cisplatin nephrotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* **213**(3), 551 (1980).
- 7) Ward, J. M., and Fauvie, K. A. : The nephrotoxic effects of cis-diamine dichloroplatinum(II) (NSC-119875) in male F344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **38**, 535 (1976).
- 8) Ward, J. M., Young, D. M., Fauvie, K. A., Wolpert, M. K., Davis, R., and Guarino, A. M. : Comparative nephrotoxicity of platinum cancer chemotherapeutic agent. *Cancer Chemother Rep* **60**, 1675 (1976).
- 9) Burchenal, J. H., Kalaher, K., O'Toole, T., and Chisholm, J. : Lack of cross-resistance between certain platinum coordination compounds in mouse leukemia. *Cancer Res* **37**, 455 (1977).
- 10) Tashiro, T. : 白金錯體の抗腫瘍活性と作用機序. *日本化学會誌* **4**, 684 (1988).
- 11) Rho, Y. S., Lee, K. T., Jung, J. C., and Chang, S. G. : *In vitro* cytotoxicity of Pt(II) complexes containing ethylenediamine in rabbit kidney proximal tubular and human renal cortical cell. *Yakhak Hoeji* **40**, 218 (1996).
- 12) Jung, J. C., Lee, J. H., and Rho, Y. S. : Antitumor activity and nephrotoxicity of new platinum(II) complexes. *J Korean Society for Chemotherapy* **12**, 1, 106 (1994).
- 13) Jung, J. C., Lee, M. H., Chang, S. G., and Rho, Y. S. : Antitumor activity and nephrotoxicity of the novel platinum(II) complex. *Korean J Pharmacology* **31**, 1, 103 (1995).
- 14) Jung, J. C., Yim, S. V., Park, S. J., Chang, J. H., Ko, K. C., Chang, S. G., and Rho, Y. S. : *In vitro* antitumor activity and nephrotoxicity of the novel platinum(II) coordination complex containing cis-DACH/diphosphine. *The Korean J Pharmal* **32**, 93 (1996).
- 15) Jung, J. C., Lee, S. M., Kadakia, N., and Taub, M. : Growth and function of primary rabbit kidney proximal tubule cells in glucose-free serum-free medium. *J. Cellular Physiol* **150**, 243 (1992).
- 16) Mossman, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application and cytotoxic assays. *J Immunol Methods* **65**, 55 (1973).
- 17) Rosenberg, B., Van Camp, L., Trosko, J. E., and Mansour, V. H. : Platinum compounds; A new class of potent antitumor agents. *Nature* **222**, 385 (1969).
- 18) Rosenberg, B. : Possible mechanism for the antitumor activity of platinum coordination complexes. *Cancer Chemother Rep* **59**, 589 (1975).
- 19) Adrie, C. M., Dijk, M., and Lohman, H. M. : Induction and repair of DNA cross-links in chinese hamster ovary cells treated with various platinum coordination compounds in relation to platinum binding to DNA, cytotoxicity mutagenicity, and

- antitumor activity. *Cancer Res* **44**, 2043 (1984).
- 20) Clear, M. J. and Hoeschele, J. D. : Antitumor platinum compound : Relationship between structure and activity. *Platinum metals review* **17**, 2 (1973).
- 21) Connors, T. A., Jones, M., and Ross, W. C. J. : New platinum complexes with antitumor activity. *Chem Biol. Interact* **5**, 415 (1972).
- 22) Gale, G. R., Walker, E. M., and Atkins, L. M. : Antileukemic properties of dichloro(1,2-diaminocyclohexane) platinum(II). *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **7**, 529 (1974).
- 23) Inagaki, K. and Kidani, Y. : Differences in binding of 1,2-diaminocyclohexane platinum(II) isomers with d(GPG). *Inorg Chem* **25**, 1 (1986).
- 24) Harder, H. C. and Rosenberg, B. : Inhibitory effects of antitumor platinum compounds on DNA, RNA and protein synthesis in mammalian cells *in vitro*. *Int J Cancer* **6**, 207 (1970).
- 25) Pascoe, J. M. and Roberts, J. J. : Interactions between mammalian cell DNA interstrand crosslinking and cytotoxic properties of platinum(II) compounds. *Biochem Pharmacol* **23**, 1345 (1974).
- 26) Royer-Pokora, B., Gordon, L. K., and Haseltine, W. A. : Use of endonuclease III to determine the site of stable lesions in defined sequences of DNA : the cyclobutane dimer and cis-and trans-dichlorodiamineplatinum(II) examples. *Nucleic acids Res* **9**, 4595 (1981).
- 27) Stone, P. J., Kelman, A. D., and Sinex, F. M. : Specific binding of antitumor drug cis-Pt(NH₃)₂Cl₂ to DNA rich in guanine and cytosine. *Nature* **251**, 736 (1974).
- 28) Alden, M. W., Repta, A. J. : Exacerbation of cisplatin-induced nephrotoxicity by methionine. *Chem Biol Interact* **48**, 121 (1984).
- 29) Kidani, Y. : Development of antitumor platinum complexes. *Yakugaku Zasshi* **105**(10), 909 (1985).
- 30) Chung, S. D., Alavi, N., Sivingston, D., Hiller, S., and Taub, M. : Characterization of primary rabbit kidney cultures that express proximal tubule functions in a homonally defined medium. *J Cell Biol* **95**, 118 (1982).
- 31) Mortine, T. J., Borch, R. F. : Quiescent LLC-PK1 cells as a model for cis-diaminedichloro platinum(II) nephrotoxicity and modulation by thio sescue by thio sescue agents. *Cancer Res* **48**, 6017 (1988).