

KI-60606의 일반약리작용시험

김은주¹ · 김현진¹ · 김동연²

¹대전광역시 유성구 장동 100 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소

²경기도 용인시 기흥읍 보라리 359 일양약품주식회사 중앙연구소

General Pharmacology of KI-60606

Eun Joo KIM¹, Hyun-Jin KIM¹ and Dong Youn KIM²

¹Korea Institute of Toxicology, KRICT, P.O. Box 107, Yusong-Ku, Taejeon 305-606, Korea

²Il-Yang Central Research institute, 359, Bora-Ri, Kiheung-Eup, Yongin City, Kyonggido, Korea

(Received May 1, 2002 ; accepted June 20, 2002)

Abstract – In this study general pharmacological profiles of KI-60606 on the central nervous system, the cardiovascular system and the other organs were investigated. The dosages given were 0, 5, 10 and 25 mg/kg and drugs were administered intravenously. The animals used for this study were mice, rats, cats and guinea pigs. KI-60606 showed no effects on general behavior, motor coordination, spontaneous locomotor activity, hexobarbital-induced hypnosis time, body temperature, analgesic activity, anticonvulsant activity and contraction of nictitating membrane in cats. Furthermore KI-60606 showed no effects on blood pressure, heart rate, LVP (left ventricular peak systolic pressure), LVEDP (left ventricular end diastolic pressure), LVDP (left ventricular developing pressure), DP(double product), CFR(coronary flow rate), smooth muscle contraction using guinea pig ileum and gastric secretion at all dosage tested except the increase of gastrointestinal transport and urinary K⁺ excretion.

Key words □ KI-60606, Mouse, Rat, Cat, Guinea Pig, general pharmacology, central nervous system, cardiovascular and the other organ systems

1965년 미국 Michigan 주립대학의 Rogenberg 박사가 배지에 첨가된 NH₄Cl과 유리된 백금이 반응하여 형성된 시스플라틴(cisplatin)이라는 물질이 박테리아의 분열을 억제한다는 사실을 발견하고(Rogenberg 등, 1969), 쥐를 이용한 항암실험으로부터 시스플라틴이 강력한 항암효과를 나타낸다는 사실을 발표한 이래로 백금착제 항암제에 대한 연구가 널리 이루어지고 있다. 백금착제 항암제는 분자구조 중심에 백금(Pt)원자를 가지고 있으며 암세포의 핵 내에 존재하는 DNA 이중나선 구조에 부착되어 DNA의 복제를 저해하여 암세포 성장 및 증식을 억제하고 암세포를 제거하여 항암효과를 나타낸다.

제 1세대 백금착제 항암제로써 시스플라틴은 현재 임상에서 사용되고 있는 30여종의 항암제 중 가장 유용한 약제의 하나로 고환암, 난소암, 폐암, 두경부암, 방광암, 위암, 자궁경부암 등의 많은 종류의 암에 매우 유효하다 (Anderson 등, 1986 ; Soloway 등, 1974). 그러나 매우 심한 오심과 구토, 신독성 및 신경독성 등의

부작용 발생이 큰 문제가 되고 있으며, 암세포의 내성 획득에 의한 항암효과의 소실도 문제가 된다(Sung 등, 1994). 2세대 항암제로써 시스플라틴의 주된 독성인 오심, 구토, 신장독성이나 신경계 독성이 크게 완화된 카보플라틴이 선보였으며, 카보플라틴은 소화기, 신장 및 청각기 독성들이 감소되었을 뿐만 아니라, 혈중 단백질과의 낮은 결합률로 생체 내 이용율이 개선되었으며, 수용성도 증가되는 등 시스플라틴의 단점을 상당한 수준까지 개선하였다. 그러나 카보플라틴은 부작용의 개선 정도에도 불구하고 골수독성은 시스플라틴보다 강하며, 항암효과도 시스플라틴에 비해 상대적으로 낮고 항암작용의 범위가 좁은 단점으로 인해 신장장애가 있는 난소암과 폐암환자에게만 제한적으로 사용되어지고 있다.

백금착물 항암제는 광범위한 암에 강력한 효과를 나타내지만 일반적으로 독성과 부작용이 심하여 보다 효과적이고 저독성인 제3세대 항암제를 개발하려는 노력이 진행되고 있으며 화학적 조절방출 개념을 도입한 백금착물 항암제로 KI-60606의 전임상시험을 진행하고 있

*To whom correspondence should be addressed.

다. KI-60606은 백금착제 항암제가 DNA에 직접결합하여 cytotoxicity를 나타내는 기전에 기인한 독성 및 부작용을 낮추고 efficacy를 증가시키기 위하여 백금약물을 polymer나 oligomer에 conjugation 시킴으로써 *in vivo*에서 약물방출을 통제하고자 한 것으로 지금까지의 다양한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험결과 약효가 기존의 시스플라틴이나 카보플라틴에 비하여 월등히 우수할 뿐만 아니라 저독성으로 평가되며, 교차내성이 전혀 없고 용해도 등 물성이 뛰어나므로 세계적인 제3세대 항암제 신약물질로 기대되고 있다.

본 연구에서는 신약개발 과정중에 있는 KI-60606에 대한 안전성 평가(safety evaluation)의 일환으로 KI-60606을 생체에 적용할 때 나타날 수 있는 일반약리에 대한 평가를 수행한 것으로 일반약리에 대한 연구는 약물을 임상적으로 적용할 때 인체에 나타날 수 있는 부작용을 예측하고, 이들 약물을 임상에 도입하기 위한 자료확보는 물론 기초약리 연구에도 기여할 수 있다. 시험은 의약품등의 일반약리시험지침(식품의약품안전청 고시 제 97-2호)에 준하여 실험동물인 마우스, 랫드, 고양이 및 기니피그를 이용하여 KI-60606을 임상예정경로인 정맥으로 투여한 후 중추신경계, 호흡 및 심장 순환계에 미치는 영향과 기타 장기에 미치는 영향 등을 살펴 보았다.

실험방법

실험동물 및 사육조건

ICR 계통의 특정 병원균 부재(SPF) 마우스, Sprague-Dawley 계통의 랫드는 한국화학연구원 안전성연구센터 실험동물육종실에서 공급받아 사용하였으며, American shorthair계 고양이와 Hartley 계통의 기니피그는 계통과학 주식회사에서 구입하여 사용하였다. 동물은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 조명시간 12시간(08:00~20:00) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 한국화학연구원 안전성 연구센터 BS-2동의 6호실에서 사육되었으며, 시험기간 중 동물실의 온, 습도는 자동온습도측정기에 의하여 매 시간마다 측정되었고, 환기횟수 및 조도 등의 환경조건은 정기적(3개월마다 1회)으로 측정되었다. 마우스와 랫드는 실험동물용 고형사료((주) 제일사료 : 대전광역시 대덕구 대화동 40-36)를 방사선조사(2.0 Mrad) 멸균하여 자유섭취시켰으며, 고양이는 고양이용 고형사료를 Provisions에서 공급받아 자유섭취시켰다. 또한 기니피그는 기니피그용 고형사료를 퓨리나코리아 주식회사(경기도 평택시 장당동 85-1)에서 공급받아 자유섭취시켰으며, 물은 상수도를 자외선살균기로 소독시킨 후 물병을 이용하여 자유섭취시켰다.

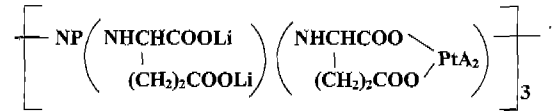


Fig. 1. Molecular structure of KI-60606

시험물질 및 시약

KI-60606의 구조식은 Fig. 1과 같고, 분자량 1969.05인 연한 미색의 화합물로써 물에 녹으며(15 mg/ml), 빛에 민감한 물질이다. 시험에 사용한 시약으로 ketoprofen, codeine phosphate, pentylenetetrazol, strychnine, hexamethonium chloride, urethane, α -chloralose, acetylcholine, histamin, BaCl_2 는 Sigma 제품을 사용하였으며, Hcxobarbital · Na (Bayer, Leverkusen, Germany), chlorpromazine · HCl (Fluka, Buchs, Swiss), diazepam (Shionogie, Osaka, Japan), acetic acid (동양화학, 서울, 한국), electrode cream (기우메디칼, 서울, 한국), diethyl ether (대정, 인천, 한국), 유동파라핀 (삼천, 평택, 한국), heparin (녹십자, 용인, 한국), pentobarbital · Na (한림제약, 서울, 한국) 등을 각각 구매하여 사용하였다. Chlorpromazine · HCl, hexobarbital · Na 등은 증류수에 녹였으며 그 외의 물질은 Tween 80(1%)으로 현탁하여 사용하였다. KI-60606은 0, 5, 10, 25 mg/kg의 용량으로 정맥주사하였다.

사용기기

기기는 motility meter (PAS, San Diego, California, USA), rotarod (Ugo Basile 7600, Comerio-Varese, Italy), thermometer (MGA-III, Tokyo, Japan), hot-plate (Letica, Barcelona, Spain), rodent shocker (HSE, March-Hugstetten, Germany), stimulator (Letica, Barcelona, Spain), amplifier (CyberAmp 380 Programmable Signal Conditioner, Axon, USA), interface (DigiData 1200 Series Interface, Axon, USA), pH meter (Orion 720A, Beverly, USA), plethysmograph (HSE 855, March-Hugstetten, Germany), organ bath (Letica 13206, Barcelona, Spain), isometric transducer (Harvard, USA), polygraph (Biopack MP 100, Biopack Systems Inc., California, USA), Na/K/Cl analyzer (Ciba coming, Halstead, England), Langendorff apparatus (선진, 서울, 한국), Powerlab/800 (ADInstruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia), small animal blood flow meter (Transonic systems Inc., New York, USA), rodent ven-tilator (TSE, Bad Homburg, Germany), circulation water bath (Jeio Tech., 서울, 한국) 등을 사용하였다.

일반행동에 미치는 영향

동물은 ICR 마우스 암컷(체중 22~25 g), 수컷 (체중

27~30 g)을 각 군당 4마리씩 사용하였다. 실험방법은 변형된 Irwin 방법 (Irwin 등, 1964)을 사용하였고, 시험물질 투여 전 및 투여 후 15, 30, 60, 120 및 240분에 실험용 관찰 cage를 이용하여 일반행동을 관찰하였다.

자발운동에 미치는 영향

동물은 수컷 ICR 마우스 (체중 26~28 g)를 각 군당 8마리씩 사용하였다. 각 군별 플라스틱 사육상자 (260W×250L×400H)에 방치한 후 motility meter를 이용하여 5분동안 동물이 움직인 운동량을 시험물질 투여 전 및 투여 후 15, 30, 60, 120 및 240분에 측정하였다 (Svensson과 Thieme, 1969).

Rotarod 시험

동물은 수컷 ICR 마우스 (체중 26~32 g)를 각 군당 8마리씩 사용하였다. 실험전날 동물을 rotarod (16 rpm)에서 3분간 훈련시킨 후, 3분동안 rotarod에서 떨어지지 않았던 동물만 시험에 사용하였다. 각 군별로 시험물질 투여 전 및 투여 후 15, 30, 60, 120 및 240분에 1분동안에 rotarod (16 rpm)에서 떨어진 동물의 숫자를 측정하였다 (Dunham과 Miya, 1957).

Hexobarbital 수면시간에 미치는 영향

동물은 수컷 ICR계 마우스 (체중 26~31 g)를 각 군당 8마리씩 사용하였다. 각 군별로 시험물질을 투여하고 30분후에 hexobarbital·Na (70 mg/kg)을 복강투여하여 동물의 정향반사 소실후부터 깨어나기까지의 시간을 측정하였다.

체온에 미치는 영향

동물은 수컷 ICR 마우스를 각 군당 8마리씩 사용하였다. 시험물질 정맥투여 전 및 투여 후 15, 30, 60, 120 및 240분에 체온계(MGA-III)를 항문에 삽입하여 직장내 온도를 측정하였다.

진통작용: Acetic acid로 유발한 writhing 반응의 억제

동물은 수컷 ICR계 마우스 (체중 26~31 g)를 각 군당 8마리씩 사용하였다. 시험물질을 각 군별 정맥투여하고 30분 후에 1% acetic acid를 10 ml/kg로 하여 복강투여하고 10분 후에 5분간 동물의 전신을 쪽 뺀 동작인 writhing의 숫자를 측정하였다(Koster 등, 1959).

진통작용: Hot-plate로 유발한 licking 반응

동물은 수컷 ICR계 마우스 (체중 25~28 g)를 각 군당 8마리씩 사용하였다. 시험물질을 각 군별 정맥투여하고 30분 후에 동물을 hot-plate (57°C)에 올려놓은 후 동물

이 앞발을 핥는 동작 (licking)을 시작하기까지 소요된 시간을 측정하였다.

항경련작용: pentylenetetrazol 유발경련에 대한 영향

동물은 수컷 ICR계 마우스 (체중 26~31 g)를 각 군당 8마리씩 사용하였다. 시험물질을 각 군별로 정맥투여하고 30분 후에 pentylenetetrazol (100 mg/kg)을 복강투여한 후 동물이 경련을 일으킨 숫자 및 사망동물의 숫자를 측정하였다 (Swinyard 등, 1952).

항경련작용: Strychnine 유발경련에 대한 영향

동물은 수컷 ICR계 마우스 (체중 25~30 g)를 각 군당 8마리씩 사용하였다. 시험물질을 각 군별 정맥투여하고 30분 후에 strychnine (2 mg/kg)을 복강투여한 후 동물이 경련을 일으킨 숫자 및 사망동물의 숫자를 측정하였다.

항경련작용: Electroshock 유발경련에 대한 영향

동물은 수컷 ICR계 마우스 (체중 26~30 g)를 각 군당 8마리씩 사용하였다. 시험물질을 각 군별 정맥투여하고, 30분 후에 동물의 양쪽 귀속에 electroshock (120 mA, 0.3 sec)을 적용한 후 동물이 경련을 일으킨 숫자 및 사망동물의 숫자를 측정하였다 (Woodbury와 Davenport, 1952).

고양이의 순막 수축에 미치는 영향

수컷 고양이 (체중 2.5~4.5 kg)를 각 군당 4마리씩 사용하였다. 고양이를 에테르로 전마취한 후 urethane (250 mg/DW, 5 ml)과 α -chloralose (50 mg/DW, 5 ml)을 5 ml/kg의 용량으로 복강투여하여 본마취를 하였고, 완전 마취상태에 이른 후 경부를 제모하고 피부를 절개한 다음 기관에 cannula를 삽입하였다. 혈압을 측정하기 위해 대퇴동맥에 cannula를 삽입하고 약물투여를 위하여 대퇴정맥에도 cannula를 삽입하였다. 기관을 싸고 있는 근육과 그 바깥 근육 사이의 기관 측면에서 총경동맥의 옆을 달리는 신경을 찾아 주위조직과 분리시킨 후, 교감신경절후 섬유를 미주신경으로부터 분리하고 미부측으로 이중 결찰하여 절단한 후 (절단 전 유동파라핀을 부어 신경이 공기에 노출되지 않도록 하였다) 교감신경을 분리시켰다. 상경부 교감신경절 미측절단 부위에 자극전극을 위치시킨 후 전극위에 교감신경을 올려놓고, 순막의 외연을 결찰한 후 실을 길게 늘어뜨려 isometric transducer에 연결시켰다. 순막 수축은 상경교감신경을 노출한 후 절후신경에 자극용 전기 (20 Hz, 5 msec, 10 V-5 sec)를 가하되 시험물질 투여 전에 1회의 자극을 가하고 약물처치 후 3, 5, 10, 20 및 30분에 각각 동일한 자극을 1회씩 가하여 발생된 순막의 장력을 isometric transducer (2 g 장력)를 이용하여 데이터를 기록하였

다. 이렇게 얻어진 전기자극에 의한 순박수축 peak의 높이를 측정하여 약물 투여 전과 투여 후를 비교하였다.

비마취 흰쥐의 혈압 및 심박수에 대한 영향

체중 255~257 g인 흰쥐를 thiopental (50 mg/kg, i.p.)로 마취시킨 다음 대퇴동맥과 대퇴정맥에 각각 cannula를 삽입하고 cannula의 다른쪽 끝은 피하를 따라 목뒤로 뽑아낸 후 고정하였고 수술후 동물을 하룻밤동안 안정시킨 후 다음날 대퇴동맥에 삽입한 catheter를 pressure transducer 및 physio-graph에 연결해 혈압 및 심박수를 data acquisition system (Biopak, Model MP100)을 이용하여 측정하였다. 약 1시간 혈압이 안정된 것을 확인하고 시험물질을 정맥투여한 후 10, 20, 30분 그리고 1, 1.5, 2, 4, 6시간까지 일정한 간격으로 측정하여 약물투여전의 혈압 및 심박수에 대한 변화를 백분율로 나타내었다.

적출심장에 미치는 영향

체중 293.6~342.0 g인 SD 계통의 랫드를 sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.)로 마취시킨 후 랫드에 heparin (1000 U/kg, i.v.)을 투여하여 혈전 형성을 방지한 후 심장을 적출하였다. 즉, 기관에 cannula (PE 240)을 삽입하여 rodent ventilator를 이용해 인공 호흡시키며 in situ 상태에서 대동맥 cannula를 통한 역행성 관류(Krebs-Henseleit bicarbonate buffer(mmol/L): NaCl; 112, KCl; 5, MgSO₄; 1.2, KH₂PO₄; 1, NaHCO₃; 25, CaCl₂; 1.25, Glucose; 11.5, Pyruvate; 2.0)하에 Langendorff apparatus에 재빨리 매달고 심장에 붙어있는 불필요한 조직을 제거하였다. 생리식염수로 채운 고무풍선 (latex balloon)을 매달은 금속 cannula를 좌심방을 통해 좌심실에 삽입시키고 풍선에 전달되는 좌심실압을 측정하기 위해 압력 변환기 (pressure transducer)에 연결하였다. 이완기말압력 (EDP, end diastolic pressure)은 10 mmHg로 주고 Gottlieb valve를 이용해 정압관류 (75 mmHg)를 하여 10~15분 이내 안정화시킨 후 실험을 시작하였다. 심장을 Langendorff 장치에 고정하는 순간부터 실험 전 과정동안 생리액이 담긴 chamber에 심장이 충분히 잠기게 하여 온도가 37.4~37.6°C로 철저히 유지되도록 하였다. AD instrument 프로그램을 실행시키고 적출해 낸 심장을 Langendorff apparatus에 매달고 Krebs-Henseleit bicarbonate buffer를 대동맥 통하여 역관류시켜 부형제대조군의 data를 측정후 이어서 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵M의 시험물질 혼합액을 일정한 순서대로 흘려보내, 각 농도별로 data를 측정하였다 (Levi 등, 1988). 본 실험에서는 심장기능을 평가하는 parameter로 수축기말 좌심실압 (LVP, left ventricular peak systolic pressure), 이완기말 좌심실압(LVEDP, left ventricular end diastolic pressure),

LVDP (left ventricular developing pressure), DP (double product)를, 관상혈관 기능을 평가하는 parameter로 관상혈류량(CFR, coronary flow rate)을, 그 밖에 심박동수 (HR, heart rate) 등을 측정하였다. DP는 working heart와 달리 심박출량(cardiac output)을 측정할 수 없는 적출심장에서 간접적으로 심장의 기능(cardiac performance)을 알아보는 중요한 parameter로서 Watts의 방법에 따라 심박동수에 LVDP를 곱하여 계산하였다 (Bolli, 1991; Watts와 Maiorano, 1987). LVDP는 수축기말 좌심실압에서 이완기말 좌심실압을 감하여 산출하였다. 관상혈류량은 aortic cannula 위에 고정된 coronary flow probe(직경 1.0 mm)를 거쳐 flowmeter로 측정하였다.

기니피크의 적출 회장에 대한 작용

수컷 Hartley계 기니피크 (380~450 g) 6마리를 사용하였다. 회장의 적출을 위해 기니피크 후두부를 강타하여 기절시키고 경동맥을 절단하여 실험시킨 후 소장을 노출하고 맹장과 소장 접합부에서 10~15 cm 되는 곳으로부터 30 cm 가량의 소장(small intestine)을 절단해 내어 Krebs's modified buffer (mmol/L: NaCl; 118.3, KCl; 4.7, MgSO₄; 1.2, KH₂PO₄; 1.2, NaHCO₃; 25, CaCl₂; 1.8, Glucose; 10, EDTA; 0.025)에 담고 syringe를 이용하여 buffer를 관류시켜 장내부의 내용물을 씻어낸 후 longitudinal muscle-myenteric plexus preparation을 제조하였다 (Rang, 1964). 적출 회장을 2.0~2.5 cm 길이로 절단해 95% O₂-5% CO₂ 혼합가스로 포화시킨 Krebs's modified buffer가 담긴 organ bath 내에 현수하고 1시간 정도 안정화시켰다. 적출 회장을 안정화 시킨 후 시험물질 KI-60606 (10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵M)에 대한 직접적인 작용 및 시험물질의 5분간 전처치가 acetylcholine (5×10⁻⁷ M), histamine (2×10⁻⁶ M) 및 BaCl₂ (2×10⁻³ M)의 수축작용에 미치는 효과를 측정하였다. 이 때 나타나는 수축력의 변화는 약물투여 전의 수축력을 0, KCl 30 mM에 의한 수축력을 100으로 놓고 이 값에 대한 백분율로 나타내었다.

호흡계에 미치는 영향

동물은 Hartley 계통 guinea pig (290~380 g)을 각 군당 5마리씩 사용하였다. 동물에 시험물질을 정맥투여한 후 호흡측정용 사육상자에 방치하고 plethysmometer에 연결하여 시험물질이 동물의 호흡수 및 호흡량에 미치는 영향을 시험물질 투여 전 및 투여 후 15, 30, 60, 120분에 측정하였다.

Gastrointestinal transport에 미치는 영향

동물은 ICR계 마우스 (체중 26~28 g)를 각 군당 8마

리씩 사용하였다. 시험물질을 동물에 경구투여하고 30분 후에 charcoal meal (10%의 arabic gum solution에 5% active carbon을 현탁시켜 조제)을 10 ml/kg으로 경구투여 하였다. 30분 후에 장관을 적출하여 전체 소장 길이 및 유문부로부터 charcoal meal의 이동거리를 측정하고 백분율을 계산하였다.

위액분비에 미치는 영향

동물은 Sprague-Dawley (SD)계 SPF 수컷 랫드 (체중 180~230 g)를 각 군당 5마리씩 사용하였다. 사료와 물은 자유섭취시켰으며, 시험개시 24시간 전에 절식시키고 물은 10시간 전에 절수시켰다. 절식된 동물을 ether 마취시킨 후 유문부를 결찰하고 즉시 십이지장으로 시험물질을 투여한 다음 5시간 동안 방치시켜 위액을 채취하였다. 채취된 위액은 3000 rpm에서 15분간 원심분리시켜 상층액을 수집한 후 위액량, pH, 총산도를 측정하였다(Shay 등, 1945).

Urine volulme 및 urinary electrolyte에 미치는 영향

시험은 ICR계 마우스 (체중 25~29 g)를 이용하여 군당 12마리씩 1회 실시하였다. 하룻밤 절식시킨 동물의 몸무게의 2.5%에 해당하는 생리식염수를 1차 투여하고 2시간 후에 시험물질은 정맥투여하고 몸무게의 2.5%에

해당하는 증류수를 경구투여하고, 즉시 동물을 mice용 metabolic cage에 넣고 5시간동안 뇨를 수집하여 pH, 뇨량, Na⁺, K⁺, Cl⁻를 측정하였다.

통계학적 방법

얻어진 자료에 대한 통계분석은 부형제대조건을 기준으로 다중비교 검정법을 실시하였다. 일원배치분산분석을 유의수준 $\alpha=0.05$ 로 검정하여 검정결과 유의한 결과가 나타날 경우에는 부형제대조건과 투여군간에 차이가 있는지를 검사하기 위하여 다중비교법인 Dunnett's test를 실시하였다.

결과 및 고찰

일반행동에 미치는 영향

KI-60606을 5, 10 및 25 mg/kg으로 정맥투여한 후 15, 30, 60, 120 및 240분에서 일반행동을 관찰한 결과 부형제대조건과 비교하여 아무런 이상 증상이나 행동을 보이지 않았다 (Table I).

자발운동에 미치는 영향

KI-60606을 5, 10 및 25 mg/kg으로 정맥투여한 후 15, 30, 60, 120 및 240분에 자발운동량을 측정한 결과 부

Table I. Effects of KI-60606 on general behavior in mice

SEX: ♂ ♀

Compounds	V. Control							KI-60606 (ml/kg)																
	0							5				10				25								
Dose (ml/kg, i.v.)																								
Time (min)	0	15	30	60	120	240	0	15	30	60	120	240	0	15	30	60	120	240	0	15	30	60	120	240
1. Catalepsy	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
2. Traction	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
3. Tremor	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
4. Convulsion	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
5. Exophthalmos	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
6. Piloerection	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
7. Salivation	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
8. Lacrimation	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
9. Diarrhea	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
10. Skin Coloration	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
11. Pinna reflex	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
12. Righting reflex	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
13. Abdominal tone	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
14. Tail elevation	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
15. Eyelid	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
16. Locomotion	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
17. Respiration rate	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
18. Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Each number represents the number of positive/tested (1-12).
The mean score; max 8 min 0 (13-17) and number of animals (18).

Table II. Effects of KI-60606 on spontaneous locomotor activity in mice

Drug	Dose (ml/kg)	Spontaneous locomotor activity (Counts/5 min)					
		0 min	15 min	30 min	60 min	120 min	240 min
V. Control	0	109.5±36.5	61.1±54.1	49.0±25.5	35.9±23.5	36.9±28.0	33.6±21.0
KI-60606	5	96.3±24.6	90.1±14.5	57.9±31.9	46.3±22.2	55.4±27.7	37.8±33.8
	10	123.1±22.9	71.1±31.4	57.4±30.2	62.1±25.7	51.6±30.4	43.6±26.1
Diazepam	25	132.5±28.5	90.8±48.7	65.1±35.3	58.0±28.8	54.1±23.1	36.6±19.5
	10	88.0±15.7	7.4±7.7*	22.4±16.8	11.5±20.1	11.3±21.9	11.0±11.0

Significant difference from control group (*; $p < 0.05$) and each value represents the mean±S.D.
The test compound was administered intravenously (n=8).

Table III. Effects of KI-60606 on motor coordination

Drugs	Dose (ml/kg)	Incidence of ataxia (number of mice)					
		0 min	15 min	30 min	60 min	120 min	240 min
V. Control	0	0	0	0	0	0	0
KI-60606	5	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0
Diazepam	25	0	0	0	0	0	0
	6	0	7	7	5	2	0

The test compound was administered intravenously (n=8).

Table IV. Effects of KI-60606 on body temperature

Drug	Dose (ml/kg)	Rectal temperature (°C) after administration					
		0 min	15 min	30 min	60 min	120 min	240 min
V. Control	0	37.2±0.6	37.5±0.5	37.5±0.4	37.4±0.3	37.0±0.2	36.9±0.1
	5	37.3±0.6	37.6±0.5	37.6±0.3	37.4±0.4	37.1±0.4	37.1±0.3
KI-60606	10	37.4±0.2	37.5±0.3	37.6±0.3	37.5±0.3	37.1±0.4	37.2±0.3
	25	37.7±0.3	37.7±0.3	37.7±0.2	37.4±0.4	37.3±0.2	37.0±0.4

Each value represents the mean±S.D.

The test compound was administered intravenously (n=8).

형제대조군과 비교하여 아무런 증상도 관찰되지 않았다 (Table II). 양성대조약물인 diazepam을 10 mg/kg의 용량으로 경구투여한 동물군에서는 투여후 15분에 유의성있는 ($p < 0.05$) 자발운동량의 감소를 관찰할 수 있었다.

Rotarod 시험

KI-60606을 5, 10 및 25 mg/kg으로 정맥투여한 후 240까지의 동물의 운동평형감각을 측정된 결과 부형제대조군과 비교하여 아무런 영향도 관찰되지 않았다 (Table III). 양성대조약물인 diazepam을 6 mg/kg의 용량으로 경구투여한 동물군에서는 투여후 15분부터 120분까지 ataxia를 나타냄이 관찰되었다.

체온에 미치는 영향

KI-60606을 5, 10 및 25 mg/kg으로 정맥투여한 후 240까지의 체온을 측정된 결과 부형제대조군과 비교하여 아무런 변화가 나타나지 않았다 (Table IV).

Hexobarbital 수면시간에 미치는 영향

KI-60606을 5, 10 및 25 mg/kg으로 정맥투여했을 때 수면시간은 부형제대조군과 비교하여 유의성있는 변화 보이지 않았으며, 양성대조물질인 chlorpromazine (6 mg/kg, p.o.)에 의한 수면시간은 유의성있게 증가하였다 (Table V).

Table V. Effects of KI-60606 on hexobarbital-induced hypnosis

Drugs	Dose (ml/kg)	Sleeping time (min)	Control ratio (%)
V. Control	0	50.6±4.6	100
KI-60606	5	52.4±5.8	104
	10	51.4±4.9	102
Chlorpromazine	25	53.8±5.3	106
	6	189.4±43.1**	378

Significant difference from control group (**; $p < 0.01$) and each value represents the mean±S.D.

The test compound was administered intravenously (n=8).

Table VI. Effects of KI-60606 on analgesia using acetic acid and hot-plate method

Drugs	Dose (ml/kg)	Wriths (No)	Licking time (sec)
V. Control	0	16.0±1.1	4.5±0.9
KI-60606	5	14.8±2.5	4.7±1.1
	10	14.5±1.9	4.7±1.2
	25	14.5±2.1	4.6±1.3
Ketoprofen	10	6.1±3.6**	-
Codeine	100	-	13.2±6.1**

Significant difference from control group (**; $p < 0.01$) and each value represents the mean±S.D.

The test compound was administered intravenously (n=8).

진통작용: Acetic acid로 유발한 writhing 반응의 억제

KI-60606을 5, 10 및 25 mg/kg으로 정맥투여했을 때 부형제대조군과 비교하여 진통작용이 관찰되지 않았다 (Table VI). 양성대조물질인 ketoprofen을 10 mg/kg의 용량으로 경구투여한 동물군에서는 유의성있는($p < 0.01$) writhing 반응의 억제를 관찰할 수 있었다.

진통작용: Hot-plate로 유발한 licking 반응

KI-60606을 5, 10 및 25 mg/kg으로 정맥투여했을 때 부형제대조군과 비교하여 진통작용이 관찰되지 않았다 (Table VI). 양성대조물질인 codeine을 100 mg/kg의 용량

으로 경구투여한 동물군에서는 licking 반응이 나타나기까지의 소요시간이 유의성있게($p < 0.01$) 증가됨을 관찰할 수 있었다.

항경련작용: pentylenetetrazol 유발경련에 대한 영향

KI-60606을 5, 10 및 25 mg/kg으로 정맥투여했을 때 부형제대조군과 비교하여 항경련작용이 없음을 알 수 있었다 (Table VII). 양성대조물질인 diazepam을 10 mg/kg의 용량으로 경구투여한 동물군에서는 100%의 항경련작용을 관찰할 수 있었다.

항경련작용: Strychnine 유발경련에 대한 영향

KI-60606을 5, 10 및 25 mg/kg으로 정맥투여했을 때 부형제대조군과 비교하여 항경련작용이 없음을 알 수 있었다 (Table VII). 양성대조물질인 diazepam을 10 mg/kg의 용량으로 경구투여한 동물군에서는 50%의 항경련작용을 관찰할 수 있었다.

항경련작용: Electroshock 유발경련에 대한 영향

KI-60606을 5, 10 및 25 mg/kg으로 정맥투여했을 때 부형제대조군과 비교하여 항경련작용이 없음을 알 수 있었다 (Table VII). 양성대조물질인 diazepam을 20 mg/kg의 용량으로 경구투여한 동물군에서는 37.5%의 항경련작용을 관찰할 수 있었다.

Table VII. Effects of KI-60606 on convulsion induced by pentylentetrazol, strychnine and electroshock

Drugs	Dose (ml/kg)	pentylenetetrazol			strychnine			electroshock	
		Convulsion (No)	TE-time (sec)	Protection (%)	Convulsion (No)	TE-time (sec)	Protection (%)	Convulsion (No)	Protection (%)
	0	8/8 ^a	47.4±14.0 ^b	0	8/8 ^a	173.3±16.8 ^b	0	8/8 ^a	0
V. Control	5	8/8	50.9±19.7	0	8/8	145.9±22.0	0	8/8	0
KI-60606	10	8/8	49.6±12.8	0	8/8	149.1±29.5	0	8/8	0
	25	8/8	55.1±15.1	0	8/8	159.8±23.2	0	8/8	0
Diazepam	10	0/8	-	100	4/8	286.8±32.8**	50.0	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	5/8	37.5

Significantly difference from control group (**; $p < 0.01$)

a) is the number of positive/tested and b) is the mean±S.D.

The test compound was administered intravenously (n=8).

Table VIII. Effects of KI-60606 on nictitating membrane in cats

Drug	Dose (ml/kg)	Mean nictitating membrane contraction (%)					
		0 min	3 min	5 min	10 min	20 min	30 min
	0	100.0±0.0	97.0±10.0	95.8±6.6	106.6±7.9	102.9±8.0	103.3±9.1
V. Control	5	100.0±0.0	106.7±4.5	102.6±14.5	103.2±11.4	100.5±11.2	101.9±16.1
KI-60606	10	100.0±0.0	103.8±13.1	97.5±15.3	104.1±18.9	95.7±14.8	106.6±29.5
	25	100.0±0.0	101.4±9.6	98.9±13.3	104.5±14.0	106.4±20.6	96.3±3.7

Each value represents the mean±S.D.

The test compound was administered intravenously (n=4).

Table IX. Effects of KI-60606 on mean arterial pressure and heart rate in anesthetized rats

Drug	Dose (ml/kg)	Mean blood pressure (%)								
		0 min	10 min	20 min	30 min	60 min	90 min	120 min	240 min	360 min
	0	96.70±5.88	16.81±3.48	20.72±5.68	22.53±5.87	14.73±6.66	14.55±8.92	13.55±9.72	3.27±8.46	4.48±7.93
V. Control	5	98.90±4.99	15.44±3.74	17.60±7.25	21.38±7.64	15.01±5.27	12.53±7.18	14.87±3.45	1.69±2.69	2.68±2.37
KI-60606	10	104.70±5.65	9.21±2.62	10.92±0.34	7.61±3.69	11.21±3.63	7.47±4.41	7.20±5.22	3.92±1.78	2.93±1.74
	25	105.70±6.74	7.03±1.58	5.05±2.45	5.60±3.60	5.92±2.54	3.57±1.50	3.35±1.27	1.32±1.29	1.77±0.46

Drug	Dose (ml/kg)	Heart rate (%)								
		0 min	10 min	20 min	30 min	60 min	90 min	120 min	240 min	360 min
	0	144.30±4.46	-2.57±4.51	-6.06±6.72	-2.42±5.60	-2.19±5.93	-11.47±2.70	-9.55±0.94	-3.91±5.96	2.24±6.23
V. Control	5	144.80±5.40	0.23±7.88	0.51±6.40	2.84±5.40	5.46±4.61	4.93±5.33	-2.50±3.93	-3.65±2.55	-3.40±1.89
KI-60606	10	136.05±2.43	5.59±3.41	4.84±7.59	7.34±7.99	6.11±7.96	2.52±7.17	-2.22±2.98	3.11±3.93	11.49±5.74
	25	143.30±3.96	0.61±3.33	5.30±4.86	2.92±5.90	5.96±6.31	3.70±4.69	1.42±5.25	0.36±5.14	0.71±5.20

Each value represents the mean±S.E.M.

The test compound was administered intravenously (n=4).

Table X. Effects of KI-60606 on isolated perfused heart in rats

Drugs	Log[M]	% of pretreatment				
		LVDP	HR	DP	LVEDP	CFR
	0	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0
V. Control	-7	101.5±4.3	100.3±2.1	101.7±3.8	102.2±6.2	105.8±7.3
KI-60606	-6	101.1±7.0	100.9±2.6	102.1±7.1	108.3±8.1	102.8±4.6
	-5	100.6±8.7	101.5±1.3	102.1±8.8	108.1±8.6	101.3±8.4

Each value represents the mean±S.D. (n=5).

Table XI. Effects of KI-60606 on isolated guinea pig ileum

Drugs	Log [M]	Contractile responses (% of pre-drug response)			
		Alone	Acetylcholine	Histamin	BaCl ₂
		Mean	Mean	Mean	Mean
	0	0.00±0.0	148.7±12.2	122.5±13.4	121.3±4.8
V. Control	-7	0.00±0.0	147.3±11.9	117.5±13.6	120.3±3.1
KI-60606	-6	0.00±0.0	147.4±11.8	124.1±12.2	121.5±8.7
	-5	0.00±0.0	146.9±13.0	126.5±12.6	118.6±4.0

Each value represents the mean±S.D.

고양이의 순막 수축에 미치는 영향

고양이를 이용한 순막수축반응 시험에서 KI-60606을 5, 10 및 25 mg/kg으로 정맥투여에 의한 영향은 부형제 대조군과 비교하여 아무런 변화도 관찰되지 않았다 (Table VIII).

비마취 흰쥐의 혈압 및 심박수에 대한 영향

KI-60606을 5, 10 및 25 mg/kg으로 비마취 흰쥐에 정맥투여했을 때 본 시험물질은 부형제대조군과 비교하여 유의성있는 변화를 주지 않았다 (Table IX).

적출심장에 미치는 영향

KI-60606을 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵M의 농도로 적출된 심장에 처치한 후 수축기말 좌심실압(LVP), 이완기말 좌심

실압(LVEDP), LVDP(left ventricular developing pressure), DP(double product), 관상혈류량(CFR) 및 심박동수(HR)을 측정된 결과 본 시험물질은 심장기능 및 관상혈관기능에 아무런 영향을 주지 않음을 알 수 있었다 (Table X).

기니픽의 적출 회장에 대한 작용

기니픽 적출 회장의 longitudinal musculmysenteric plexus preparation에 대해 KI-60606 (10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵M)은 어떠한 유의성 있는 직접적인 수축, 이완작용을 나타내지 않았으며, KI-60606을 5분간 전처리하였을 때 acetylcholine (5×10⁻⁷M), histamine (2×10⁻⁶M), BaCl₂ (2×10⁻³M)에 의해 유발된 수축에 대하여도 아무런 영향을 주지 않았다 (Table XI).

Table XII. Effects of KI-60606 on respiration in guineapigs

Drugs	Dose (ml/kg)	Respiration (rate/min)					Tidal volume (ml)				
		0	15	30	60	120	0	15	30	60	120
V. Control	0	103.6±19.5	124.5±19.3	105.5±14.9	105.5±13.5	110.3±27.5	2.8±1.2	2.4±0.3	2.9±0.3	2.4±0.4	2.5±0.3
	5	113.8±5.3	111.7±5.1	101.7±1.6	97.7±5.9	104.3±7.8	2.7±0.6	2.8±0.2	2.4±0.2	2.4±0.2	2.6±0.3
KI-60606	10	99.3±11.3	100.6±8.6	100.8±6.5	93.9±7.7	93.1±4.9	2.3±0.4	2.6±0.5	2.8±0.5	2.6±0.5	2.2±0.2
	25	103.8±5.0	108.6±4.3	102.2±10.0	94.7±4.4	99.2±6.3	2.7±0.5	2.8±0.1	2.8±0.3	2.3±0.1	2.0±0.2

Each value represents the mean±S.D.

The test compound was administered intravenously (n=5).

Table XIII. Effects of KI-60606 on intestinal transport in mice

Drugs	Dose (ml/kg)	Licking time (sec)
V. Control	0	52.63±5.88
	5	55.51±6.60
KI-60606	10	62.16±7.93**
	25	67.70±9.51**
Hyoscyamine	200	42.20±5.60**

Significant difference from control group (**; p<0.01) and each value represents the mean±S.D.

The test compound was administered intravenously (n=8).

호흡계에 미치는 영향

KI-60606을 5, 10 및 25 mg/kg으로 기니픽에 정맥투여했을 때 부형제대조군과 비교하여 호흡에 아무런 영향도 주지 않았다 (Table XII).

Gastrointestinal transport에 미치는 영향

KI-60606을 5, 10 및 25 mg/kg으로 정맥투여한 후

charcoal 수송능을 측정한 결과 10 및 25 mg/kg군에서 유의성있는 장관운동의 촉진에 관찰되었다 (Table XIII). 또한 양성대조약물인 hyoscyamine (200 mg/kg p.o.)을 투여한 동물에서는 charcoal 이동율이 유의성있게 감소함을 관찰할 수 있었다.

위액분비에 미치는 영향

KI-60606을 5, 10 및 25 mg/kg으로 정맥투여한 후 위액분비량, pH, 총산도를 측정했을 때 부형제대조군과 비교하여 아무런 변화도 관찰되지 않았다 (Table XIV).

Urine volume 및 urinary electrolyte에 미치는 영향

KI-60606을 5, 10 및 25 mg/kg으로 정맥투여한 후 urine pH, 뇨량, 뇨 전해질 (Na⁺, K⁺, Cl⁻) 배설량을 측정 한 결과, K⁺의 배설량은 5, 10, 25 mg/kg에서 유의한 증가를 나타내었으며, Na⁺는 최고용량인 25 mg/kg 투여군에서 유의성있는 감소를 보였다 (Table XV). 또한 양성대조군인 furosemide (15 mg/kg p.o.) 투여군에서는 뇨량

Table XIV. Effects of KI-60606 on gastric secretion in rats

Drugs	Dose (ml/kg)	Volume (ml)	pH	Total acidity (iEq)
V. Control	0	11.5±1.4	1.3±0.1	1002.4±128.0
	5	7.6±2.1	1.5±0.1	553.3±198.3*
KI-60606	10	8.6±2.6	1.5±0.2	650.2±367.4
	25	9.3±2.1	1.6±0.3	718.7±266.0
Atropine	1	2.4±0.4**	2.6±1.0	123.3±63.0**

Significant difference from control group (*; p<0.05, **; p<0.01) and each value represents the mean±S.D.

The test compound was administered intravenously (n=5).

Table XV. Effects of KI-60606 on renal function

Drugs	Dose (ml/kg)	pH	Urine volume (ml)	Na ⁺ (mmol/l)	Cl ⁻ (mmol/l)	K ⁺ (mmol/l)
V. Control	0	7.0±0.0	3.3±0.7	96.0±1.0	56.0±2.0	28.7±0.6
	5	7.0±0.0	3.1±0.2	87.7±6.8	69.0±12.3	43.0±1.0**
KI-60606	10	7.0±0.0	3.6±0.1	93.0±3.5	69.0±2.6	52.3±5.5**
	25	7.0±0.0	3.4±0.2	85.3±6.0*	52.3±9.6	50.3±4.0**
Furosemide	15	7.5±0.0	5.7±0.3**	135.7±2.3**	110.3±7.6**	25.3±1.2

Significant difference from control group (*; p<0.05, **; p<0.01) and each value represents the mean±S.D.

The test compound was administered intravenously (n=12).

및 Na⁺, Cl⁻의 배설량이 유의성있게 증가함을 관찰할 수 있었다.

시험물질인 KI-60606의 일반약리작용인 중추신경계에 미치는 영향, 호흡계, 심장순환계에 미치는 영향 및 기타 장기에 미치는 영향을 검색하기 위하여 시험동물인 마우스, 랫드, 고양이 및 기니픽을 이용하여 시험하였고, 예정임상용량의 약 6배인 25 mg/kg을 최고용량으로 하여 정맥투여하여 시험한 결과, KI-60606은 일반행동, 자발운동, motor coordination, hexobarbital 유도 수면시간, 체온, 진통작용, 항경련작용 및 고양이의 순막수축 등의 중추신경계에는 직접적인 영향을 주지 않았으며, 심장순환계 및 호흡계에 직접적인 영향을 주지 않았다. 기니픽 회장을 이용한 시험에서도 직접적인 수축, 이완작용은 나타나지 않았고, acetylcholine, histamine, BaCl₂로 유발된 수축작용에 대해서도 영향을 주지 않았으며 위액분비시험에서도 위액분비량, pH, 총산도에서 부형제 대조군과 비교하여 아무런 변화도 보이지 않았다. 그러나 장관수송능 시험에서 10 및 25 mg/kg군에서 유의성 있는 장관운동의 증가를 관찰할 수 있었으며 urine 배설시험에서는 K⁺의 배설량이 전투여군에서 유의성있게 증가함을 알 수 있었다.

따라서 본 시험물질은 중추신경계, 심장순환계, 호흡기계 및 기타 장기에 영향을 미치지 않는 물질로 판단되며 다만 장관운동의 촉진 및 뇨중 K⁺ 배설량에 영향을 주는 물질로 추정되었다.

참고문헌

- Anderson, W. K., Quagliato, D. A., Hauwitz, R. D., Marayanan, V. L. and Wolpert-DeFilippes, M. K. (1986): "Synthesis, physical properties and antitumor activity of tetraplatin and related tetrachloroplatinum (IV) stereoisomers of 1,2-diaminocyclohexane." *Cancer Treat. Rep.*, **70**, 997-1003.
- Bolli, R. (1991). Oxygen-derived free radicals and myocardial reperfusion injury: an overview. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **5**, 249-268.
- Dunham, W. W. and Miya, T. S. (1957). A note on a simple apparatus of detecting neurological deficit in rats and mice. *J. Amer. Pharm. Ass.*, **10**, 208-209.
- Irwin, S. In., Nodine, J. H. and Siegler, P. E. (1964). Animal and clinical pharmacologic techniques in drug evaluation. Yearbook medical publishers, *Chicago*, 36-54.
- Koster, R., Anderson, M. and de Beer, E. J. (1959). Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.*, **18**, 412-418.
- Levi, Y., Hershfield, M. S., Fernandez-Mejia, C., Polmer, S. H., Scudieri, D., Berger, M. and Sorensen, R. U. (1988). Adenosine deaminase deficiency with late onset of recurrent infections: Response to treatment with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase. *J. Pediatr.*, **113**, 312.
- Rang, H. P. (1964). Stimulant actions of volatile anaesthetics on smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **27**, 256-375.
- Rogenberg, B., Van Camp, I., Trosko, J. E. and Mansour, V. H. (1969). Platinum compounds: A new class of antitumor agents. *Nature*, **222**, 385-387.
- Shay, H., Komarov S.A., Fels S.S., Merange D., Gruenstein M., and Siplet H. (1945). A simple method for the uniform production of gastric ulceration in rats. *Gastroenterology*, **5**, 43-61.
- Soloway, M.S., Rose, D. and Weldon, T. (1974). Single and combination chemotherapy for primary murine bladder cancer. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **15**, 7-15.
- Sung H. J., Lee C. U., Lee M. H., Lee Y. J. (1994). Studies on the Cisplatin Nephrotoxicity ; 2. Effects of cisplatin on the renal proximal tubular glucose transport and alleviating effects of some drugs on the renal toxicity of cisplatin. *Environmental Mutagens & Carcinogens*, **14-1**, 13-25.
- Svensson, T. H. and Thieme, G. (1969). An investigation of a new instrument to measure motor activity of small animals. *Psychopharmacologia (Berl.)*, **14**, 157-163.
- Swinyard, E. A., Brow, W. C. and Goodman, L. S. (1952). Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **106**, 319-330.
- Watts, J. and Maiorano, L. (1987). Effect of diltiazem upon globally ischemic rat hearts. *Eur. J. Pharmacol.*, **138**, 335-342.
- Woodbury, L. A. and Davenport, V. D. (1952). Design and use of a new electroshock seizure apparatus, and analysis of factors altering seizure threshold and pattern. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **92**, 97-107