

## DL-2 하이드록시 3-메틸 부틸산을 배위자로 한 새로운 항암성 백금(II) 착체의 위암세포와 정상신장세포에 대한 선택적 세포독성

정지창<sup>1</sup> · 흥언표<sup>3</sup> · 최승기<sup>4</sup> · 잠성구<sup>2</sup> · 육창수<sup>3</sup> · 노영수<sup>3\*</sup>  
경희대학교 의과대학 <sup>1</sup>약리학 교실, <sup>2</sup>비뇨기과학 교실 및 <sup>3</sup>약학대학, <sup>4</sup>포천중문의과대학 약리학교실

## Selective Cytotoxicity of Novel Platinum(II) Coordination Complexes Containing DL-2-Hydroxy 3-Methylbutyric Acid

Jee-Chang JUNG<sup>1</sup>, Eon-Pyo HONG<sup>3</sup>, Seung-Ki CHOI<sup>4</sup>, Sung-Goo CHANG<sup>2</sup>, Chang-Soo YOON<sup>3</sup>, Young-Soo RHO<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology & <sup>2</sup>Urology, School of Medicine,

<sup>3</sup>College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

<sup>4</sup>Department of Pharmacology, Pochon CHA University, Pochon 487-801, Korea

(Received Mar. 11, 2003; Accepted May 15, 2003)

**Abstract**—A new series of highly water soluble platinum(II) complexes [Pt(II)(DL-2-hydroxy-3-methylbutyrate)(*trans*-1,2-diaminocyclohexane)] (PC-1) and [Pt(II)DL-2-hydroxy-3-methylbutyrate] (*cis*-1,2-diaminocyclohexane)] (PC-2) were synthesized and characterized by their elemental analysis and by various spectroscopic techniques [infrared (IR), <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance (NMR)]. *In vitro* antitumor activity of new Pt(II) complexes was tested against MKN-45, MKN/ADM and MKN/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 and PC-2 showed active against MKN-45/P, MKN/ADM and MKN/CDDP human gastric cancer cell lines, and the antitumor activity of these compounds were comparable or superior to that of cisplatin. The nephrotoxicities of PC-1 and PC-2 were found quite less than that of cisplatin using MTT and [<sup>3</sup>H] thymidine uptake tests in rabbit proximal tubule cells, human kidney cortical cells and human renal cortical tissues. Based on these results, these novel platinum(II) complex compounds (PC-1 & PC-2) represent a valuable lead in the development of the new anticancer chemotherapeutic agents capable of improving antitumor activity and low nephrotoxicity.

**Keywords** □ Selective cytotoxicity, Human gastric adenocarcinoma cells, Nephrotoxicity, Platinum coordination complex

Rosenberg 등 (1965, 1967, 1975)에 의하여 백금 전극을 이용하여 *E. coli*의 electric field에서 대장균의 성장을 연구하던 중, *E. coli*의 분열이 지속적으로 억제되는 특이한 현상을 발견하고, 이와 같은 현상은 배양중에 함유된 염화암모늄과 백금전극으로부터 미량 유리된 백금이 반응하여 형성된 *cis*-diaminedichloroplatinum(II) (cisplatin; 이하 CDDP)의 영향임을 보고 한 바 있다 (Reslova, 1971).

CDDP는 고환암, 난소암, 방광암, 전이된 호즈킨병과 악성림프종, 갑상선암 등에 현재까지 직접 임상 적용되고 있으며 특히 고환종양에 있어서는 치료효과가 우수한 것으로 알려지고 있다. 그 외에도 골육종, 식도암, 전립선암 등에서도 효과가 인정되고 있다 (Einhorn과 Donohue,

1977). 그러나 CDDP는 강한 신독성, 오심, 구토, 혈관장애, 내이신경독성 등의 부작용 (Dobyan 1980; Ward 등 1976)을 수반하고 조직내 축적효과가 있는 것으로 알려져 사용에 제한을 받고 있다.

CDDP의 신장세포에 대한 독성기전은 CDDP가 직접 근위세뇨관세포의 DNA에 결합하여 그 독성을 나타낸다는 것과 (Munchausen, 1974; Sorenson, 1988), CDDP 투여시 중금속 중독시와 유사한 oxidative stress가 증가하여 근위세뇨관세포막의 지질과산화물을 유발함으로써 이와 같은 독성을 나타낸다는 두 가지 가능성이 제시되고 있다 (Zhong 등, 1990; Zhang 등, 1992).

백금착체는 여러가지 구핵시약에 대해서 치환가능한 배위자(leaving group)와 치환불활성인 배위자(carrier ligand) 및 중심금속(Pt)으로 구성되는데 carrier ligand는

\*To whom correspondence should be addressed.

항암효과의 강도 및 항암 스펙트럼에 관계하며 leaving group은 수용성, 안정성, 반응성에 영향을 미친다 (Tashiro, 1988).

Carrier ligand의 아민은 항암활성에 중요한 요소가 된다. 즉, 백금착체가 DNA사슬과 결합할 때 아민배위자의 구조에 의해 DNA사슬과 상호작용을 하며 (Adrie 등, 1984) DNA가 광학활성을 가지고 있으므로 배위자의 활성에도 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 (Clear 등, 1973; Connors 등, 1972; Ridgway, 1977).

Leaving group도 항암활성에 중요한 영향을 미치는 요인으로 작용하고 있으며 생체내에 투여된 백금착체는 세포막을 투과한 후 leaving group이 가수분해를 받아 이탈되고 이 배위부위가 DNA와 결합하여 복제를 억제함으로써 항암활성을 나타내게 되어 결국, 백금착체의 항암활성은 생체내에서 leaving group의 치환속도에 관계된다고 할 수 있다.  $Cl_2$ ,  $Br_2$ ,  $(NO_3)_2$  등의 monodentate leaving group은 치환되기 용이하므로 신속히 가수분해를 받으나 oxalate, malonate 등의 bidentate leaving group은 킬레이트 구조를 가지는 백금착체를 이루기 때문에 안정하다.

따라서 항암성이 뛰어난 백금 착체의 개발에는 적절한 이탈률을 가지는 leaving group의 선택을 필요로 하게 된다. 유효한 leaving group으로 주목되고 있는 diphosphine 배위자인 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane(DPPE)과 1,3-bis(diphenylphosphino)propane(DPPP)은 Susan 등 (1987)이 Au, Ag, Cu 등의 금속착체를 합성하여 그 활성을 검색한 결과 유효한 leaving group으로 보고 된 바 있다.

한편, DACH를 carrier ligand로 한 백금착체의 항암성에 대하여 Connors (1972), Clear (1973), 등은 dichloro체의 백금착체를 합성하여 그들의 항암성에 대하여 연구한 바 있으며, Kidani 등 (1985)은 trans-*l*체, trans-*d*체, cis체의 각 이성체 중 trans-*l*-DACH만을 선택하여 leaving group으로서 oxalic acid와 malonic acid등을 반응시켜 각각 Pt(oxalato)(trans-*l*-DACH)[*l*-OHP]와 Pt(malonato)(trans-*l*-DACH)[*l*-PHM]을 합성(Kidani 등, 1986; Inagaki 와 Kidani, 1986)하였으며, 이 중 임상시험 중에 있는 *l*-OHP는 독성이 적고 안정한 것으로 알려져 있다.

최근 Rho 등 (1996; 2002)과 Jung 등 (1995; 1996 ; 2000)은 carrier ligand로 trans-*l*, trans-*d* 및 cis-DACH를 leaving group에 diphosphine류와 glycolic acid를 도입한 새로운 백금(II) 착체를 합성하여 수종의 암세포주에 대한 *in vitro* 항암효과와 토끼 및 인체신장의 일차배양세

포에 대한 *in vitro* 세포독작용을 CDDP와 비교검토한 바 항암활성은 CDDP와 유사한 반면에, 정상 신장세포독성은 CDDP에 비하여 현저히 감소된 백금(II)착체임을 확인한 바 있다.

Baek 등 (1997)은 trans-*l*-DACH와 DPPE를 배위자로 한 새로운 백금(II)착체  $[Pt(trans-*l*-DACH)(DPPE)]_2NO_3$ 가 *in vitro* 및 *in vivo* 항암활성을 나타내는 반면에 신장독성은 CDDP에 비하여 현저히 저하됨을 관찰한 바 있다.

이에 본 연구자는 신독성을 감소시킨 새로운 백금착체를 개발함으로써 항암성 백금착체의 문제점을 극복할 목적으로 carrier ligand로서 DACH의 trans-*l*체와 cis체를, leaving group으로서 DL-2-hydroxy-3-methylbutyric acid (HMB)을 사용하여 수용성 혼합배위자의 백금(II)착체인  $[Pt(trans-*l*-DACH)(HMB)]$ 와  $[Pt(cis-DACH)(HMB)]$ 를 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

### 시약

염화백금산칼륨( $K_2PtCl_4$ )와 trans-*l*-diaminocyclohexane (trans-*l*-DACH) 및 cisdiaminocyclohexane (cis-DACH) 그리고 DL-2-hydroxy-3-methylbutyric acid (이하 HMB로 함)은 Aldrich사의 것을 사용하였다.

Insulin, transferrin, hydrocortisone, prostaglandin E1, triiodothyronine 및 기타 시약은 Sigma사의 제품을 사용하였으며, DMEM과 RPMI medium, soybean trypsin inhibitor는 Life Technology (Grand Island, NY)로부터, collagenase IV는 Worthington (Freehold, NY)의 제품을 사용하였다. Iron oxide는 Cook과 Pickering (1958)의 방법에 따라 제조한 iron oxide 표준용액을 사용하기 전에 phosphate buffered saline (PBS)으로 희석하여 실험에 사용하였다.

### 실험동물 및 암세포주

실험에 사용한 동물은 체중 1.8-2.0 kg의 가토를 사용하였다. 사료는 삼양유지사료(주)의 고형사료로 사육하고, 충분한 물을 공급하면서 온도와 습도가 조절된 사육실에서 2주간 실험환경에 순응시킨 후 사용하였으며, 실험은  $23 \pm 2^\circ C$ 에서 실시하였다. MKN-45 인체위암세포주 (MKN-45/P, MKN-45/ADM와 MKN-45/CDDP)는 원자력병원 세포생물학연구실로부터 분양 받아 사용하였다.

### 백금(II)착체의 합성

(trans-*l*-1,2-diaminocyclohexane)(dichloroplatinum(II))- $[Pt(trans-*l*-DACH)Cl_2]$ :  $K_2PtCl_4$  1.8 g 을 증류수 30.0 ml에

용해한것에 trans-*l*-DACH 0.5 g을 증류수 15 ml에 용해시켜 서서히 가하고, 5% NaOH용액으로 pH 6.5로 하여 실온에서 3시간 교반하여 반응시켰다. 생성한 황색결정을 흡인여과하고 물로 수회 세척한 후 진공건조하여 황색결정 1.55 g을 얻었다(수득률 93.4%). 물에 녹지 않으며 에탄올 등의 유기용매에도 난용이었다.

(*trans-l-1,2-diaminocyclohexane*)dinitrateplatinum(II)-[Pt(*trans-l*-DACH)(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] : Pt(*trans-l*-DACH)Cl<sub>2</sub> 3.82 g을 증류수 10 ml에 현탁시키고, AgNO<sub>3</sub> 3.4 g을 증류수 100 ml에 용해시켜 추가하였다. 실온에서 24시간 동안 교반시킨 후 반응물을 흡인여과하여 생성된 AgCl을 제거하고, 여액을 감압농축 후 동결건조하였다. 생성한 백색결정을 증류수로 재정제하여 백색결정을 3.2 g을 얻었다 (수득률 95.5%). 물에는 녹으나 에탄올 등 유기용매에는 난용이었다.

[*DL-2-hydroxy-3-methylbutyrate*](*trans-l-1,2-diaminocyclohexane*)Pt(II),[Pt(*trans-l*-DACH)(HMB)(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (이하 PC-1) : Pt(*trans-l*-DACH)(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 2 g을 증류수 10 ml에 용해한 용액에 HMB 166 mg을 아세톤 20 ml에 용해시킨 용액을 교반하면서 추가하였다. 2시간 반응시킨 후 감압증류하여 용매를 제거하고 동결건조하여 황백색결정을 얻고 물로 재정제하여 백색결정 [Pt(*trans-l*-DACH)(HMB)] (M.W. 428) 1.2 g 을 얻었다. 물에 녹으며 아세톤 및 에탄올 등에도 난용이었다.

(*cis-1,2-diaminocyclohexane*)dichloroplatinum(II)-[Pt(*cis*-DACH)Cl<sub>2</sub>] : K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub>(M.W. 415.11) 2.5 g을 증류수 20.0 ml에 용해시켜 반응용기에 넣고, cis-DACH 2HCl 1.13 g을 증류수 2.0 ml에 용해시켜 반응시켰다. 생성된 황색 결정물을 3G4규격의 glass filter를 통하여 흡인여과하고 증류수로 여러 번 재정제하여 [Pt(*cis*-DACH)Cl<sub>2</sub>] (M.W. 380.2) 2.1 g을 얻었다(수득률 91.3%). 이 물질은 물에 용해되지 않으며 에탄올 등의 유기용매에도 난용이었다.

(*cis-1,2-diaminocyclohexane*)dinitrateplatinum(II)-[Pt(*cis*-DACH)(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] : 위의 단계에서 얻어진 [Pt(*cis*-DACH)Cl<sub>2</sub>] 1.0 g을 차광 반응용기의 증류수 25.0 ml에 현탁시킨 후 AgNO<sub>3</sub> 8.9 g을 증류수 10 ml에 용해시켜 반응용기에 추가하고 실온에서 24시간동안 교반하여 반응시켰다. 반응물을 차광 하에 여과하여 반응 중에 생성된 AgCl 침전과 미반응물을 제거하고 여액을 감압농축한 후 동결건조하였다. 생성한 백색 결정물을 증류수로 재정제하여 [Pt(*cis*-DACH)(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (M.W. 476) 1.98 g을 얻었다. 이 물질은 물에는 용해하나 에탄올등의 유기용매에는 난용이었다(수득률 90%).

[*DL-2-hydroxy-3-methylbutyrate*](*cis-1,2-diaminocyclohexane*)Pt(II) : [Pt(*cis*-DACH)(HMB)] (이하 PC-2). 위의 단계에서 얻어진 [Pt(*cis*-DACH)(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] 1.5 g을 증류수

15.0 ml에 용해하고 HMB 115 mg을 acetone 30 ml에 용해시켜 이 용액을 교반하면서 추가하였다. 2시간 반응시킨 후 감압 증류하여 용매를 제거하고 동결건조하였다. 생성한 백색 결정물을 증류수로 재정제하여 [Pt(*cis*-DACH)(HMB)] (M.W. 428) 0.7 g을 얻었다. 이 물질은 물에 용해하며 acetone 및 ethanol등에 약간 용해하였다.

### 세포배양

**토끼의 근위세뇨관 상피세포의 배양** : Chung 등 (1992) 및 Jung 등 (1992)의 방법에 준하여 체중 1.8-2.0 kg의 토끼를 cervical dislocation에 의하여 치사시킨 다음, 신동맥을 보존한 채 신장을 적출하였다. 신동맥을 통하여 인산완충용액(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4)을 주입하여 세척한 다음 DME/F12(pH 7.4) 배양액에 넣은 후 Dounce homogenizer(type B pestle)로 homogenize시켰다. Homogenate를 253 μm mesh filter에 통과시키고 83 μm mesh filter에 모아진 세뇨관과 사구체를 DME/F12 배양액에 옮긴 다음 사구체는 magnetic stir bar를 사용하여 제거하였다. 그 직후 soybean trypsin inhibitor(0.025%)와 collagenase(0.125 mg/ml)를 넣어 2분간 실온에서 배양한 후, insulin(5 μg/ml), transferrin(5 μg/ml) 및 hydrocortisone (5×10<sup>-8</sup> M)을 첨가한 DME/F<sub>12</sub> 배양액에 부유시켜 일정량씩 배양접시에 접종하고 CO<sub>2</sub> 배양기에 37°C로 2주간 배양하였다.

**인체의 정상 신피질 세포의 배양** : Jung (1992) 등의 방법을 변형하여 실험하였다. 먼저 신장암으로 근치적 신장절제수술을 받은 환자로부터 정상신장조직을 취하고, penicillin G 및 streptomycin을 함유하는 DME/F12(pH 7.4) medium으로 수 회 세척하여 준 다음, renal capsule을 제거하고 mess를 사용하여 신피질만 얇게 잘라준 후 무균상태하에서 homogenize하여 일정량의 DME/F<sub>12</sub>(pH 7.4) medium에 부유시켰다.

Trypsin inhibitor와 collagenase(10 mg/ml)을 0.2 ml씩 넣고 2분간 실온에서 배양한 후 1%의 fetal bovine serum(FBS)을 함유한 DME/F12 medium 에 부유시켜 배양접시에 접종하고 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 2주간 배양하였다.

**MTT 분석에 의한 항암 활성 실험** : 각종 암세포주를 각각 2×10<sup>6</sup>개씩 10% FBS 및 100 unit/L의 penicillin G 와 streptomycin(100 mg/L)을 첨가한 RPMI 배양액 20 ml에 이식하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 이식한지 제 3일에 1000 rpm에 5 분간 원심분리 하여 세포를 모은 다음 배지를 교환하였다. 세포 증식기인 제 4일에 다시 배지를 교환한 후 10<sup>6</sup> cell/ml 농도로 희석하고, 합성된 백금(II)착체를 5 μM 농도~500 μM 농도로 만들었다. 96 well titer plate에 세포 희석액 0.1 ml 및 각종 농

도의 검체 0.1 ml을 가하고 48 시간 동안 배양하였다. 배양액속에 2 mg/ml농도의 MTT용액 0.05 ml을 가하고 침전물을 용해시킨 다음 ELISA Reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비교 약물은 CDDP를 사용하였고 검체없이 동일한 조건하에서 배양된 세포군을 대조군으로 하였으며, 판정은 다음의 산출식에 따라 %로 나타내었다 (Mossman T, 1973; Shimoyama 등, 1989).

항암 활성(%) = (1-검액의 흡광도/대조군의 흡광도) × 100

### 신장독성 시험

**MTT assay** : 토끼 신장의 근위세뇨관 상피세포와 인체의 신피질세포의 일차배양에 의하여 배양된 각각의 세포를 이용하여 상술한 항암 활성 실험에서 실시한 MTT assay와 같은 방법에 준하여 실험을 실시하였으며 동일한 산출식에 의하여 세포독성을 판정하였다.

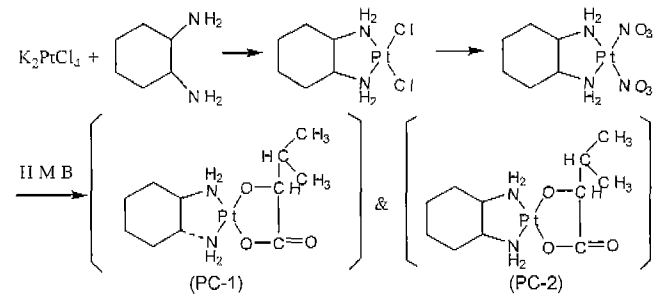
**<sup>3</sup>H-Thymidine incorporation 실험** : 일차배양하여 7일에서 10일이 경과된 토끼 신장의 근위세뇨관 상피세포 및 인체의 정상 신피질 세포를 24 well plate에 각 well당 10<sup>6</sup>개씩 접종하고 1시간 동안 배양하였다. 다시 여기에 각 well 당 50 μM 되도록 백금(II) 착체를 가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 1 μCi/ml 농도의 <sup>3</sup>H-thymidine을 가한 다음 다시 24시간 동안 배양하고 trypsin처리 하여 모은 세포를 10% trichloroacetic acid 및 PBS로 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-counter로 측정하였다. 비교약물은 CDDP를 사용하였으며 검체없이 동일한 조건으로 배양한 세포를 대조군으로 하여 100% thymidine 섭취율로 하였고, 각 검액에 따른 thymidine 섭취율로부터 세포의 생존율을 구하였다.

### 실험 결과

#### 백금(II) 착체의 합성

[PtCl<sub>2</sub>(trans-*l*-DACH)] 및 [PtCl<sub>2</sub>(cis-DACH)]는 이미 보고 (Kidani, 1985)되어 있는 방법에 따라 합성하였다. 이 물질은 황색 결정성 분말로서 물에 난용성이었다. 따라서 Cl-부분을 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>로 치환시켜 수용성인 [Pt(trans-DACH) · 2NO<sub>3</sub>], [Pt(cis-DACH) · 2NO<sub>3</sub>]로 하였다. 여기에 HMB를 1:1로 반응시켜 [Pt(trans-*l*-DACH)(HMB)] · 2NO<sub>3</sub>와 [Pt(cis-DACH)(HMB)] · 2NO<sub>3</sub>의 혼합배위성 백금(II) 착체를 합성하였으며 그 합성 경로는 Fig. 1 과 같다.

본 화합물의 IR spectra의 관능기에 따른 흡수 파수와



**Fig. 1.** Synthetic process of Pt(II) complexes containing 1,2-diaminocyclohexane isomer and DL-2-hydroxy-3-methylbutyric acid.

DACH : trans-*l*, cis-1,2-diaminocyclohexane, HMB : DL-2-hydroxy-3-methylbutyric acid.

PC-1 : Pt(II)(trans-*l*-DACH)(HMB),

PC-2 : Pt(II)(cis-DACH)(HMB)

<sup>13</sup>C-NMR의 분석은 다음과 같다.

IR(KBr): cm<sup>-1</sup> 3600-2800(b); NH<sub>2</sub>, 2850(m); CH, 1630 (s); C = O, 1410(br s); CH.

<sup>1</sup>H-NMR(500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 4.20 (d, J = 5.5 Hz, 1H); C = OCH, 2.49(m, 1H); CH-CH<sub>3</sub>, 2.92(ABq, d, j = 14.0, 3.5 Hz, 1H) and 2.67 (ABq, d, J = 14.0, 9.0 Hz, 1H); 2XCH-N, 1.41(m, 4H); CH<sub>2</sub>-C-N, 1.34(m, 4H); CH<sub>2</sub>-C-C-N, 1.01(d, J = 7.0 Hz, 6H); C = O.

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 179.9(C = O), 76.4(CH-C = O), 41.5(C-N), 32.3(C-C-N), 24.6(C-C-C-N), 17.5(CH<sub>3</sub>).

#### In vitro 항암효과

인체위암세포주 인 MKN-45세포의 감수성형(MKN-45/P)에 대한 PC-1과 PC-2의 항암효과는 50 μM농도에서부터 CI 63.5% 와 62.8%로서 항암활성을 보였고, 500 μM

**Table I.** *In vitro* cytotoxicities of new platinum (II) complexes (PC-1 & PC-2) and cisplatin (CDDP) on MKN-45 human gastric adenocarcinoma cell-lines.

Compounds	CC <sub>50</sub> (μM)		
	MKN-45/P <sup>a)</sup>	MKN-45/ADM <sup>b)</sup>	MKN-45/CDDP <sup>c)</sup>
CDDP <sup>d)</sup>	27.2 ± 3.25 <sup>o)</sup>	26.5 ± 4.13	27.7 ± 3.51
PC-1 <sup>e)</sup>	24.9 ± 3.54	26.8 ± 3.77	28.1 ± 4.02
PC-2 <sup>e)</sup>	21.0 ± 11.56	25.8 ± 3.25	28.5 ± 3.58 <sup>f)</sup>

CC<sub>50</sub> indicates mean cytotoxic concentration with MTT assay,

a) wild type cell,

b) adriamycin-resistant cell,

c) cisplatin resistant cell,

d) cisplatin,

e) Each value is the mean ± S.E of five experiments,

f) [Pt(II)(trans-*l*-DACH)(HMB)], g) [Pt(II)(cis-DACH)(HMB)].

\*Significantly different from cisplatin-control(P<0.05).

**Table II.** *In vitro* cytotoxicities of new platinum (II) complexes (PC-1&PC-2) and cisplatin (CDDP) on proximal tubular cells of rabbit kidney.

Compounds	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	P/C <sup>a)</sup>	P-values
CDDP <sup>b)</sup>	24.7 $\pm$ 3.61 <sup>c)</sup>	-	-
PC-1 <sup>d)</sup>	212.5 $\pm$ 29.02	8.60	< 0.01
PC-2 <sup>e)</sup>	229.3 $\pm$ 31.40	9.28	< 0.01

a) the ratio is the CC<sub>50</sub> of the PC divided by that of the cisplatin, b) Cisplatin, c) Each value is the mean  $\pm$  S.E. of at least five experiments, d) [Pt(II)(trans-*l*-DACH)(HMB)], e) [Pt(II)(cis-DACH)(HMB)].

**Table III.** *In vitro* cytotoxicities of new platinum (II) complexes (PC-1&PC-2) and cisplatin (CDDP) on renal cortical cells of human kidney.

Compounds	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	P/C <sup>a)</sup>	P-values
CDDP <sup>b)</sup>	23.4 $\pm$ 3.42 <sup>c)</sup>	-	-
PC-1 <sup>d)</sup>	227.6 $\pm$ 34.50	9.73	< 0.01
PC-2 <sup>e)</sup>	235.7 $\pm$ 36.18	10.07	< 0.01

a) the ratio is the CC<sub>50</sub> of the PC divided by that of the cisplatin, b) Cisplatin, c) Each value is the mean  $\pm$  S.E. of at least five experiments, d) [Pt(II)(trans-*l*-DACH)(HMB)], e) [Pt(II)(cis-DACH)(HMB)]

농도를 최대농도로 측정된 바 용량의존적인 활성증가 현상과 함께 대조약물인 CDDP와 대등한 세포독성효과를 나타내었다.

Adriamycin(ADM)에 내성 세포주인 MKN-45/ADM에 대한 항암효과는 MKN-45/P세포와 유사한 양상을 보였으며, 이와 같은 현상은 MKN-45/P 세포의 ADM에 대한 내성 발현기전과 백금(II)착체의 항암 활성과는 관련이 없는 것으로 보인다.

CDDP에 내성을 나타내는 MKN-45/CDDP 세포의 경우는 CDDP의 모든 농도에서 항암활성이 감수성형에서 보다 저하되어 있었으나 새로 합성된 백금착체류에는 별 다른 내성을 보이지 않고 감수성 세포에서와 유사한 항암활성을 유지하였다(Table I).

**신장세포 독성**

토끼의 근위세뇨관 상피세포에 대한 독성 : MTT 분석 방법에 의한 토끼의 근위세뇨관에 대한 세포독성은 Table II 에 제시한 바와 같다. 새로이 합성한 백금착체인 PC-1과 PC-2의 토끼 근위세뇨관 상피세포에 대한 평균세포독성작용 농도 (CC<sub>50</sub>)는 212.5  $\mu$ M과 229.3  $\mu$ M로서 CDDP의 24.7  $\mu$ M에 비하여 유의하게 (P < 0.01) 낮은 독성을 보였다.

<sup>3</sup>H-Thymidine incorporation 실험에 의한 토끼의 근위세뇨관 세포에 대한 독성은 Table IV에 나타난 바와 같이 CDDP의 세포내 섭취율(8.6%)에 비하여 PC-1과 PC-2의 세포내 섭취율은 각각 56.0%와 58.7%를 나타내는 등 검

**Table IV.** Effect of platinum(II) coordination complexes(PC-1 & PC-2) and cisplatin(CDDP) on <sup>3</sup>H-thymidine incorporation into primary cultured proximal tubular cells of rabbit kidney.

Compounds	<sup>3</sup> H-thymidine uptake (cpm/10 <sup>5</sup> cells)	Uptake rate(%)
Control	574.3 $\pm$ 65.7	100.0
CDDP	49.5 $\pm$ 7.2	8.6
PC-1	321.6 $\pm$ 40.4	56.0
PC-2	337.0 $\pm$ 44.5	58.7

Concentration of platinum(II) coordination in culture medium : 5 $\times$ 10<sup>-5</sup>M

Values are mean  $\pm$  S.E.. All the incorporations were determined in triplicate.

PC-1 : [Pt(II)(trans-*l*-DACH)(HMB)],

PC-2 : [Pt(II)(cis-DACH)(HMB)],

**Table V.** Effect of platinum(II) coordination complexes (PC-1 & PC-2) and cisplatin(CDDP) on <sup>3</sup>H-thymidine incorporation into primary cultured cortical cells of human kidney.

Compounds	<sup>3</sup> H-thymidine uptake (cpm/10 <sup>5</sup> cells)	Uptake rate(%)
Control	581.7 $\pm$ 67.4	100.0
CDDP	45.1 $\pm$ 6.9	7.8
PC-1	336.5 $\pm$ 38.5	57.8
PC-2	361.7 $\pm$ 41.0	62.2

Concentration of platinum(II) coordination in culture medium : 5 $\times$ 10<sup>-5</sup>M

Values are mean  $\pm$  S.E.. All the incorporations were determined in triplicate.

PC-1 : [Pt(II)(trans-*l*-DACH)(HMB)], PC-2 : [Pt(II)(cis-DACH)(HMB)],

체의 세포내 섭취율이 월등히 높아, 새로운 백금착체는 토끼신장세포에 대한 세포독성이 현저히 낮았다.

**인체의 정상신피질세포에 대한 독성**

MTT assay방법에 의한 인체의 정상 신피질세포에 대한 독성은 Table III에 나타난 CC<sub>50</sub>는 227.6  $\mu$ M(PC-1) 와 235.7  $\mu$ M(PC-2)로서 CDDP의 CC<sub>50</sub> 23.4  $\mu$ M에 비하여 유의하게 (P < 0.01) 낮았다.

인체의 정상신피질세포에 대한 각 검체의 <sup>3</sup>H-thymidine 섭취 정도가 PC-1에서 57.8%, PC-2는 62.2%로서 CDDP 섭취율 7.8%에 비하여 유의하게 (P < 0.01) 높게 나타나 인체의 신장세포에 대한 독성이 CDDP에 비하여 유의하게 낮았다(Table V).

**고 찰**

백금(II)착체의 항암활성은 carrier ligand와 leaving group을 변화시킴에 따라 항암활성, 수용성 및 안정성에 큰 영향을 주게 된다(Tashiro, 1988). 백금(II)착화합물에서 leaving group이 떨어진 후 세포안의 DNA염기외에 thiol기

를 가지고 있는 정상세포와도 쉽게 결합할 수 있고 (Appleton 등, 1989; Bradley 등, 1982; Day 등, 1980; Royer-Pokora 등, 1981; Stone 등, 1974; Zhong 등, 1990), 이와 같은 작용은 항암활성과는 관계없이 독성만을 나타내게 되는 것으로 알려져 있다. 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, 항암효과를 일으키기 전에 체외로 배설되고 말것이다.

CDDP을 위시한 백금(II)착체의 신장독성에 대한 구체적인 기전은 아직 정확하게 밝혀져 있지 않으나, 신장 혈류의 저해설이나 신장내 sulfhydryl group의 감소를 주장하는 연구자도 있는 바, 이 실험에서 밝혔듯이 신장 혈류와 관계없는 in vitro에서 근위세뇨관상피세포 또는 신장조직 자체가 손상을 받는 점으로 미루어 신장 혈류장애 이외의 원인이 있을것으로 생각된다 (Meijer 등, 1982; Levi 등, 1980).

CDDP에 의하여 일어나는 신장의 손상부위에 관한 연구로서 Dobyan 등 (1980)은 원위세뇨관의 S3 segment에 많은 변화가 일어남을 관찰한 바 있고, Gonzales-Vitale 등 (1977)은 인체 신조직을 이용한 연구에서 주된 병변이 distal tubule에 일어남을 보고하고 있으며, 근위세뇨관과 원위세뇨관에 모두 손상이 생긴다는 주장도 있다 (Porter 등, 1981; Jones 등, 1980).

이러한 신독성을 줄이기 위한 방법으로 CDDP의 투약 전후 충분한 수분의 공급이나 mannitol 그리고 WR-2721과 같은 sulfhydryl의 투여 뿐만 아니라 diethyldithiocarbamate를 투여한 보고들이 있다 (Glover 등, 1984, 1986; Bodenner 등, 1986).

CDDP에 의한 신장의 병소가 어느 부위이든 간에 CDDP의 신독성은 임상적으로 많은 문제를 유발하여 충분한 항암 효과를 기대하기 위한 고용량의 치료가 불가능하게 되어, 많은 학자들에 의하여 CDDP에 버금가는 항암 효과와 아울러 독성이 적은 약품의 개발에 노력하게 하였다. 이러한 연구의 결과 임상적으로 사용되는 대표적인 약제가 carboplatin이다. 그러나 이 carboplatin은 신독성이나 신경독성은 경감시킨 반면 골수 억제 현상이 강하게 나타나는 문제점이 제기되고 있다 (Field 등, 1994; Ettinger 등, 1994).

물론 본 연구에서 사용된 실험 약제가 골수억제 효과나 이 독성 (ototoxicity) 또는 신경 독성에 관하여 검증된 바는 아니지만 CDDP와 같은 항암효과가 있으면서 (Jung 등, 2000) in vitro 검사상 신장 독성을 현저히 감

소시킨 새로운 약제라는 것은 의미있는 가치성을 지닌다 하겠다.

본 실험 약제의 신장 독성을 측정하기 위한 in vitro 실험 방법론인 조직 배양이나 일차배양은 이미 공인된 바 있다. 실험 동물(토끼)에서 근위세뇨관 상피세포의 일차배양은 Chung 등 (1982)에 의하여 최초로 보고되었는데 본 연구에서도 동일한 방법으로 실험동물 및 인체신장세포의 일차배양을 실행하여 세포독성을 측정하였다. 이 실험방법의 장점은 hormonally defined medium을 사용하기 때문에 섬유아세포의 증식을 방지할 수 있는 것이다.

이와 같이 조직 배양된 인체 신장조직에서의 일차배양된 인체 및 실험동물 신세포에서 MTT 분석을 통한 세포독성 검사결과가 상호 일치하는 것은 본 연구의 적정성을 의미한다 하겠다. 즉 대조약물인 CDDP는 조직배양된 세포배양에서도 아주 강한 세포독성을 보였다.

이 연구에서는 carrier ligand로서 trans-l-DACH와 cis-DACH를, leaving group에 DL-2-하이드록시 3-메틸부틸산 (HMB)을 각각 반응시켜 [Pt(trans-l-DACH)(HMB)]와 [Pt(cis-DACH)(HMB)]를 합성하였으며, 이들 백금(II)착체에 대한 항암활성, 토끼와 인체의 신장에서의 세포단위에서의 독성 및 인체의 정상 신조직에 대한 신독성을 놓고 CDDP와 비교 검토하였다.

Jung 등 (1994; 1995)은 새로운 항암성 백금(II)착체인 DACH 및 diphosphine유도체의 항암효과에 관한 연구를 통하여 마우스의 임파구성 백혈병세포주인 P-338과 L-1210 및 SKOV-3 인체난소암세포주에 대하여 우수한 항암활성을, 흑색종 세포주인 M-14에 대하여는 항암효과가 없음을 이미 보고한 바 있다.

이 실험에 사용된 백금(II)착체는 MKN-45 인체위암세포주의 경우에는 검체의 모든 농도에서 CDDP와 대등한 항암활성을 보였으며, 특히 CDDP에 저항성이 형성된 MKN-45/CDDP 세포에 대하여 항암활성이 우수한 점으로 미루어 보아 CDDP의 대용약물로 사용될 가능성이 있을 것으로 생각된다.

이 실험에서 백금(II)착체는 CDDP의 carrier ligand인 diamine을 DACH로 치환시켰고, leaving group을 2분자의 Cl 대신에 HMB로 치환시킴으로써 보다 우수한 항암효과와 아울러 신독성의 감소를 보이는 것이 아닌가 여겨진다.

In vitro에서의 신독성을 측정하는데 Mortine과 Borch (1988)는 돼지의 근위세뇨관상피세포인 LLC-PK1을 CDDP에 의한 신독성을 측정하는데 좋은 모델이 된다고 한 바 있으나, 이 실험에서는 일차배양세포를 이용함으로써 앞으로 신독성의 index를 결정하는데 있어서 토끼근위세뇨관상피세포와 인체신피질세포의 일차배양세포를 활용하는 것이 바람직 할 것으로 생각된다.

이상의 결과로 보아 trans-l 및 cis-DACH를 함유하는

항암성 백금(II)착체인 PC-1과 PC-2는 CDDP와 비슷한 항암활성을 보인 반면, 토끼와 인체의 신피질 세포와 인체의 신피질 조직에 미치는 독성이 현저히 저하되었으며 특히 인체의 신세포 독성이 훨씬 더 저하되었다는 점을 미루어, 새로운 백금(II)착체인 PC-1과 PC-2는 앞으로 다각적인 연구를 계속할 필요성이 있으며 향후 새로운 항암 화학요법제로 개발될 가능성이 있을 것으로 판단된다.

감사의 말씀

본 연구는 2001년도 경희대학교 교내 연구비의 지원에 의하여 이루어 졌으므로 이에 감사를 드립니다.

참고 문헌

Adrie, C. M., Dijk, M. and Lohman, H. M. (1984). 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**, 2043-2051.

Appleton, T. G., Bennett, M. A. and Tomkins, I. B. (1976). Effect of chelating size on spectroscopic and chemical properties of methylplatinum(II) complexes of the tertiary phosphines Ph<sub>2</sub>P[CH<sub>2</sub>]<sub>n</sub>PPh<sub>2</sub> (n = 1, 2 or 3) *JCS Dalton* 439-446.

Baek, M. S., Rho, Y. S., Jung, J. C., Chang, S. G., Normura, M., Miyamoto, K. I. (1977). Antitumor activity and nephrotoxicity of a novel platinum complex, [1,2-bis(diphenylphosphine) propane](trans-1-DACH) platinum dinitrate. *Anticancer Research* **17**, 995-960.

Bodenner, D. L., Dedon, P. C., Katz, J. C., and Borch, R. F. (1986). Selective protection against cis-diaminedichlore platinum (II) induced toxicity in kidney, gut and bone marrow by diethyl-dithiocarbamate. *Cancer Res* **46**(6), 2751-2757.

Bradley, M. O., Patterson, S. and Zwelling, L. A. (1982). Thiourea prevents cytotoxicity and mutagenicity, but not sister chromatid exchanges in V79 cells treated with cis-diaminedichloroplatinum(II). *Mutat Res* **96**, 67-74.

Chung, S. D., Alavi, N., Livingston, D., Hiler, S. and Taub, M. (1982). Characterization of primary rabbit kidney cultures that express proximal tubule functions in a hormonally defined medium. *J Cell Biol* **95**, 118-126.

Clear, M. J., and Hoeschele, J. D. (1973). Antitumor platinum compound: Relationship between structure and activity. *Platinum Metals Review* **17**, 2-10.

Connors, T. A., Jones, M. and Ross, W. C. J. (1972). New platinum complexes with antitumor activity. *Chem Biol Interact* **5**, 415-420.

Cook, W. F. and Pickering, G. W. (1958). A rapid method for separating glomeruli from rabbit kidney. *Nature* **182**, 1103-1104.

Day, R. S., Ziolkowski, C. H. J. and Scudiero, D. A. (1980).

Defective repair of alkylated DNA by human tumor and SV40-transformed human cell strains. *Nature* **288**, 124-129.

Dobyan, D. C., Levi, J., Jacobs, C. (1980). Mechanism of cisplatin nephrotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* **213**(3), 551-556.

Einhorn, L. H. and Donohue, J. (1977). Cis-diaminedichloroplatinum, vinblastine and bleomycin combination chemotherapy in disseminated testicular cancer. *Ann Intern Med* **87**, 293-328.

Ettinger, L. T., Gaynon, P. S. and Krailo, M. D. (1994). A phase II study of carboplatin in children with recurrent or progressive solid tumors. A report from the childrens group. *Cancer* **73**, 1297-1302.

Fields, K. K., Zorsky, P. E. and Hiemenz, J. W. (1994). Ifosfamide carboplatin and etoposide: a new regimen with a broad spectrum of activity. *J Clin Oncol* **12**, 544-552.

Glover, D., Glick, J. H., Weiler, C. (1986). Phase I/II trials of WR-2721 and cis-platinum. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **12**(8), 1509-1512.

Gonzales-Vitale, J. C., Hayes, D. M. and Sternberg, S. S. (1977). The renal pathology in clinical trials of cis-platinum. *Cancer* **39**, 1362-1371.

Inagaki, K. and Kidani, Y. (1986). Differences in binding of 1,2-diaminocyclohexane platinum(II) isomers with d(GPG). *Inorg Chem* **25**, 1-5.

Jones, B. R., Bhalla, R. B., Mjadedk, J. (1980). Comparison methods of evaluating nephrotoxicity of cis-platinum. *Clin Pharmacol Ther* **27**(4), 557-562.

Jung, J. C., Lee, S. M., Kadakia, N. and Taub, M. (1992). Growth and function of primary rabbit kidney proximal tubule cells in glucose-free serum-free medium. *J Cellular Physiol* **150**, 243-249.

Jung, J. C., Lee, M. H., Chang, S. G. and Rho, Y. S. (1995). Antitumor activity and nephrotoxicity of the novel platinum(II) complex. *Korean J Pharmacology* **31**, 1, 103-109.

Jung, J. C., Chung, J. H., Chang, S. G., and Rho, Y. S. (2000). Selective Cytotoxicity of a Novel platinum(II) coordination complex on human bladder cancer cell lines and normal kidney cells. *Kor J Physiol & Pharmacol*. **4**, 159-167.

Jung, J. C., Yim, S. V., Park, S. J., Chung, J. H., Ko, K. C., Chang, S. G. and Rho, Y. S. (1996). In vitro antitumor activity and nephrotoxicity of the novel platinum(II) coordination complex containing cis-DACH/diphosphine. *The Korean J Pharmacol* **32**, 93-102.

Kidani, Y. (1985). Development of antitumor platinum complexes. *Yakugaku Zasshi* **105**(10), 909-914.

Levi, J., Jacobs, C., Kalman, S. M., McTigue, M., Wincer, M. W. (1980). Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity. I. Effects of sulfhydryl group in rat kidney. *J Pharmacol Exp Ther* **213**(3), 545-550.

Meijer, S., Mulder, N. H., Sleijfer, D. T. and Schraffordt, K. H. (1982). Nephrotoxicity of cisplatin during remission-induction and maintenance chemotherapy of testicular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* **8**(1), 27-30.

Mortine, T. J. and Borch, R. F. (1988). Quiescent LLC-PK<sub>1</sub> cells as a model for cis-diaminedichloroplatinum(II)

- nephrotoxicity and modulation by thio rescue by agents. *Cancer Res* **48**, 6017, 24-29.
- Mossman, T. (1973). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application and cytotoxic assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-61.
- Munchausen, L. L. (1974). The chemical and biological effects of cis-dichlorodiamine platinum(II), and antitumor agent, on DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**, 4519.
- Porter, G. A. and Bennet, W. M. (1981). Toxic nephropathies: In the kidney(2nd.ed). Saunders Co. Philadelphia pp. 2045-2108.
- Reslova, S. (1971). The induction of lysogenic strains of *Escherichia coli* by cis-dichlorodiammineplatinum(II). *Chem Biol Interact* **4**, 66-74.
- Rho, Y. S., Lee, K. T., Jung, J. C. and Chang, S. G. (1996). *In vitro* cytotoxicity of Pt(II) complexes containing ethylenediamine in rabbit kidney proximal tubular and human renal cortical cell. *Yakhak Hoeji* **40**, 218-224.
- Rho, Y. S., Kim, S. A., Jung, J. C., Shin, C. C. and Chang, S.G. (2002). Anticancer cytotoxicity and nephrotoxicity of the new platinum(II) complexes containing diaminocyclohexane and glycolic acid. *Int J Oncology* **20**, 929.
- Ridgway, H. J., Speer, R. J. and Hall, J. M. (1977). Analogs of sulfato 1,2-diaminocyclohexane platinum(II): Modifications in leaving ligands. *J Clin Hematol Oncol* **7**, 220-227.
- Rosenberg, B. (1975). Possible mechanism for the antitumor activity of platinum coordination complexes. *Cancer Chemother Rep* **59**, 589-595.
- Rosenberg, B., Van Camp, L., Krigas, T. (1965). Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* **205**, 698-707.
- Rosenberg, B., Van Camp, L., Grimley, E. B. and Thomson, A. J. (1967). The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum complexes. *J Biol Chem* **242**, 1347-1352.
- Royer-Pokora, B., Gordon, L. K. and Haseltine, W. A. (1981). Use of endonuclease III to determine the site of stable lesions in defined sequences of DNA: the cyclobutane dimmer and cis- and trans-dichlorodiamineplatinum(II) examples. *Nucleic Acids Res* **9**, 4595-4609.
- Shimoyama, Y., Kubota, T. and Watanabe, M. (1989). Predictability of *in vivo* chemosensitivity by *in vitro* MTT assay with reference to the clonogenic assay. *J Surg Oncol* **41**, 12-18.
- Sorenson, C. M. and Eastman, A. (1988). Mechanism of cis-diaminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: Role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res* **48**, 4484-4488.
- Stone, P. J., Kelman, A. D. and Sinex, F. M. (1974). Specific binding of antitumor drug cis-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to DNA rich in guanine and cytosine. *Nature* **251**, 736.
- Susan, J. B., and Peter, J. S. (1987). Phosphines in medicine. *Chemistry in Britain* June: 541-547.
- Tashiro, T. (1988). The mechanism of antitumor action of platinum complexes. *Jap J Chem* **4**, 684.
- Ward, J. M., Young, D. M., Fauvie, K. A., Wolpert, M. K., Davis, R. and Guarino, A. M. (1976). Comparative nephrotoxicity of platinum cancer chemotherapeutic agent. *Cancer Chemother Rep* **60**, 1675-1981.
- Zhang, J. G., Zhang, L. F., Zhang, M. and Xia, Y. X. (1992). Protection effects of procaine on oxidative stress and toxicities of renal cortical slices from rats caused by cisplatin *in vitro*. *Arch Toxicol* **66**, 354-358.
- Zhong, L. F., Zhang, M., Ma, S. L. and Xia, Y. X. (1990). Protection against cisplatin induced lipid peroxidation and kidney damage by procaine in rats. *Arch Toxicol* **64**, 599-600.