

## Benzotriazepin 유도체의 암세포에 대한 다약제내성 억제효과

김미혜<sup>#</sup> · 최상운 · 최은정 · 김성수 · 최중권 · 안진희 · 이정옥 · 권광일<sup>\*</sup>

한국화학연구원 생명의약연구부, \*충남대학교 약학대학  
(Received December 2, 2004; Revised December 30, 2004)

## Reversal of Multidrug Resistance by Benzotriazepin Analogues in Cancer Cells

Mi Hye Kim<sup>#</sup>, Sang Un Choi, Eun Jung Choi, Sung Soo Kim, Jung Kwon Choi,  
Jin Hee Ahn, Chong Ock Lee and Kwang Il Kwon

Medicinal Research Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Jang-Dong 100, Yusong, Taejeon 305-343, Korea  
<sup>\*</sup>College of Pharmacy, Chungnam National University, Kung-Dong 220, Yusong, Taejeon 305-764, Korea

**Abstract** - The occurrence of resistance to chemotherapeutic drugs is a major problem for successful cancer treatment. This resistant phenotype of cancer cell frequently reveals a broad spectrum to structurally and/or functionally unrelated anti-cancer drugs, termed multidrug resistance (MDR). Overexpression of P-glycoprotein (P-gp), a transmembrane drug efflux pump, is a major mechanism of MDR. Accordingly, considerable effort has been directed towards development of compounds that inhibit P-gp, reverse the MDR phenotype and sensitize cancer cells to conventional chemotherapy without undesired toxicological effects. In an effort to search for novel MDR reversal agent, we tested the cytotoxicity of paclitaxel, a well-known substrate of P-gp, against P-gp-expressing HCT15 and HCT15/CL02 human colorectal cancer cells in the presence or absence of benzotriazepin analogues, as well as against P-gp-negative A549 human non-small cell lung and SK-OV-3 human ovarian cancer cells *in vitro*. Among the compounds tested, the agents that have phenyl amide moiety at 3 position remarkably increased the cytotoxicity of paclitaxel against P-gp-expressing cancer cells, but not against P-gp-negative cancer cells. BTZ-15 and BTZ-16 at 4  $\mu$ M revealed similar MDR reversal activity to 10  $\mu$ M verapamil, a well-known MDR reversal agent.

**Keywords** □ benzotriazepin analogues, multidrug resistance, MDR reversal agent

항암 화학요법은 50년 이상의 역사를 가지고 있으며, 현재까지 수백여 종의 항암제가 개발되어 임상에서 사용되어 왔으나, 임상적으로 만족할만한 효과를 얻을 수 있는 경우는 아직 많지 않다. 이렇게 암이 난치성 질환으로 남아 있는 주요한 이유 중의 하나가 암세포에서 흔히 관찰되는 약제내성의 발현이며, 특히 구조적으로나 기능적으로 서로 연관이 없는 여러 가지 종류의 항암제들에 대해 교차내성을 나타내는 다약제내성의 발현은 항암 치료를 더욱 어렵게 하고 있다. 지금까지 다약제내성의 발현과 관련된 여러 기작들이 밝혀지고 있으며, 그 중 임상에서 가장 일반적으로 발현되고 문제가 되는 기작 중의 하나가 세포막 단백질인 P-당단백질(P-glycoprotein)의 과다발현에 의한 다약제내성이다. P-당단백질은 사람의 ABCB-1(MDR1) 유전자에 의해 암

호화 되는 세포막 단백질(membrane protein)로서 ATP binding cassette(ABC) 수송단백질(transporter proteins)의 상족(super-family)에 속한다.<sup>1,2)</sup>

P-당단백질에 의한 다약제내성의 발현은 P-당단백질이 약물과 직접 결합하여 ATP를 소모하는 에너지 의존적 기작에 의해 약물을 세포 밖으로 방출시킴으로써 세포내의 약물 농도를 낮추는 기작을 통해 나타나는 것으로 밝혀졌다. P-당단백질에 의해서 영향을 받는 항암제로는 vinca alkaloids 계열의 vinblastine, vincristine 및 navelbine, taxanes 계열의 paclitaxel(TAX)과 taxotere, anthracyclines 계열의 doxorubicin, daunorubicin, epirubicin 및 idarubicin, epipodophyllotoxins 계열 약물인 etoposide 및 teniposide 등과 기타약물들로 mitoxantrone, dactinomycin, topotecan, mithramycin 및 mitomycin C 등의 다양한 약물들이 있다.<sup>2,3)</sup>

따라서 항암제의 사용에 있어서 이러한 다약제내성이 중요한 제한요소로 작용할 수 있으며, 임상적으로도 P-당단백질을 발현

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 042-860-7416 (팩스) 042-861-4246  
(E-mail) mhkim7998@naver.com

하는 암을 갖는 환자의 치료율이 이를 발현하지 않는 암 환자에 비해 현저히 떨어지는 결과를 보이고 있다.<sup>3,4)</sup> 현재 이러한 다약제내성을 극복하기 위한 연구들이 다양하게 진행되고 있으며, 다약제내성 억제제의 개발은 1980년대 초에 Tsuruo 등<sup>5)</sup>에 의해 verapamil의 다약제내성 억제효과가 처음으로 발표된 이후에 다양한 약물들이 다약제내성 억제효과가 있음이 밝혀지고 있다. 다약제내성 억제제의 활성이 있는 물질들로는 verapamil(VER)을 비롯하여, cephalanthine, phenothiazine, cyclosporine A, dipyridamol, quinidine, progesterone, cefoperazone 등 다수의 약물들이 지금까지 보고 되고 있으며,<sup>3,6)</sup> 최근에는 dexverapamil, dextriguldipine, Ro11-2933, PSC-833, S9788, LY335979, XR-9576, GF120918, VX-710, VX-853 등이 임상 실험을 진행하였거나 현재 진행 중에 있으나 아직까지 임상에서 만족할 만한 효과를 나타내는 약물은 보고 되고 있지 않다.<sup>6-8)</sup>

본 연구실에서는 기존의 다약제내성 억제제보다 우수한 특성을 갖는 약물개발을 목적으로 다양한 구조의 약물들을 대상으로 다약제내성 억제효과를 갖는 화합물을 검색하던 중 benzotriazepin 유도체들이 우수한 다약제내성 억제 효과를 나타내는 것을 관찰하였다. 따라서 본 실험에서는 P-당단백질의 기질로 알려진 TAX와 benzotriazepin 유도체들을 P-당단백질을 발현하는 암세포 및 발현하지 않는 암세포에 병용 처리하여 TAX의 암세포에 대한 세포독성 변화를 비교 측정하여, 각 유도체들의 다약제내성 억제효과를 측정하고 구조와의 상관관계에 대하여 밝히고자 하였다.

## 실험 방법

### 시약

5-Phenyl-1,3-dihydrobenzo[e][1,2,4]triazepin-2-one(BTZ-01), (2-Oxo-5-phenyl-1,2-dihydrobenzo[e][1,2,4]triazepin-3-yl)acetic acid ethyl ester(BTZ-02), (7-Chloro-2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydrobenzo[e][1,2,4]triazepin-3-yl)acetic acid ethyl ester(BTZ-03), (1-Methyl-2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydrobenzo[e][1,2,4]triazepin-3-yl)acetic acid ethyl ester(BTZ-04), (1-Methyl-2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydrobenzo[e][1,2,4]triazepin-3-yl)acetic acid(BTZ-05), N-(4-Chlorophenyl)-2-(1-methyl-2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydrobenzo[e][1,2,4]triazepin-3-yl)acetamide(BTZ-06), 2-(1-Methyl-2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydrobenzo[e][1,2,4]triazepin-3-yl)-N-m-tolylacetamide(BTZ-07), N-(4-Fluorophenyl)-2-(1-methyl-2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydrobenzo[e][1,2,4]triazepin-3-yl)acetamide(BTZ-08), N-(2-Fluorophenyl)-2-(1-methyl-2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydrobenzo[e][1,2,4]triazepin-3-yl)acetamide(BTZ-09), N-(4-Methoxyphenyl)-2-(1-methyl-2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydrobenzo[e][1,2,4]triazepin-3-yl)acetamide(BTZ-10), 2-(7-Chloro-1-methyl-2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydrobenzo[e][1,2,4]triazepin-3-

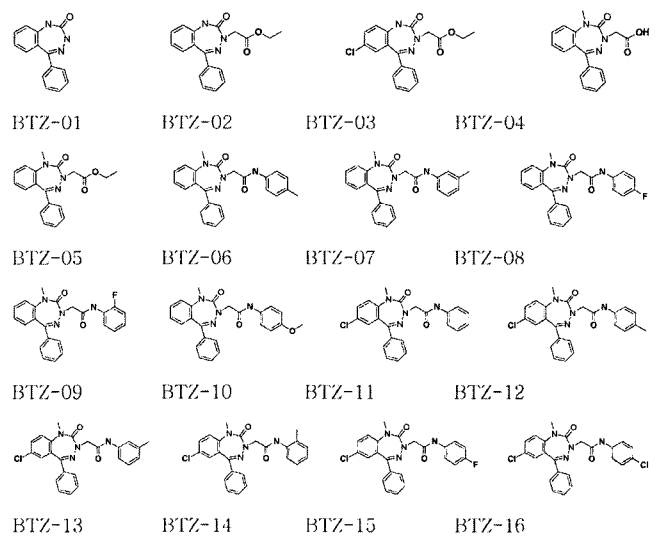


Fig. 1 – Structures of benzotriazepin derivatives tested.

yl)-N-phenylacetamide(BTZ-11), 2-(7-Chloro-1-methyl-2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydrobenzo[e][1,2,4]triazepin-3-yl)-N-p-tolylacetamide(BTZ-12), 2-(7-Chloro-1-methyl-2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydrobenzo[e][1,2,4]triazepin-3-yl)-N-m-tolylacetamide(BTZ-13), 2-(7-Chloro-1-methyl-2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydrobenzo[e][1,2,4]triazepin-3-yl)-N-o-tolylacetamide(BTZ-14), 2-(7-Chloro-1-methyl-2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydrobenzo[e][1,2,4]triazepin-3-yl)-N-(4-fluoro-phenyl)acetamide(BTZ-15), 2-(7-Chloro-1-methyl-2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydrobenzo[e][1,2,4]triazepin-3-yl)-N-(4-chloro-phenyl)acetamide(BTZ-16) 등 모든 Benzotriazepin 유도체들(Fig. 1)은 한국화학연구원에서 합성하여 사용하였다.

세포배양 및 세포 독성 실험에 사용한 Sodium bicarbonate, amphotericin, gentamycin, 1, 2-cyclohexanediaminetetraacetic acid(CDTA), Sulforhodamine B(SRB), Trisma base, Trichloacetic acid(TCA), TAX 및 VER 등의 시약은 Sigma Chemical 사(St. Louis, MO) 제품을 사용하였다. 세포배양을 위해 사용한 T-25, T-75 배양용기와 96-well plate 및 기타 세포배양에 사용한 일회용 초자류는 모두 Falcon 사(Lincoln Park, NJ)제품을 사용하였다.

### 사용기기

세포독성 측정을 위한 Microtiter plate reader(ELISA reader)는 Molecular Devices 사(Sunnyvale, CA)의 E-max기종을 사용하였다.

### 세포배양

실험에 사용한 암 세포주는 모두 인체기원 암세포 주들로서,

P-당단백질을 발현하지 않는 세포주로서 비소세포 폐암세포주인 A549 및 난소암세포주인 SK-OV-3 와 P-당단백질을 발현하는 암 세포주로서 대장암 세포주인 HCT15 세포들은 미국 국립암 연구소로부터 분양받아 사용하였다. 한편 HCT15/CLO2 세포는 한국화학연구원에서 HCT15 세포에 doxorubicin을 지속적으로 처리하여 보다 강한 다약제내성을 갖는 세포로 확립하여 사용하였다.<sup>9)</sup>

세포배양액으로는 Glutamine, Sodium bicarbonate, Gentamycin 및 Amphotericin을 첨가한 RPMI1640 용액을 5% FBS를 첨가한 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% 이산화탄소, 95% 공기 및 100% 습도의 조건에서 배양하며, 3~4일에 한번씩 계대 유지하였다.

### 세포독성 실험

세포독성의 측정은 Skehan 등의 방법을 일부 수정하여 사용하였다.<sup>10,11)</sup> 즉 세포를 96-well plate에 분주하고 세포가 plate 바닥 면에 부착되도록 24시간 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 각 약물을 농도별로 처리한 후 CO<sub>2</sub> 배양기에서 72시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 배양액을 제거하고 10% TCA용액으로 세포를 고정한 후 1% acetic acid 용액에 녹인 0.4% SRB 용액으로 세포를 염색하였다. 여분의 SRB를 1% acetic acid 용액으로 세척하여 제거한 후, 염색된 세포들에 10 mM Tris base(pH 10.5) 용액을 가하여 SRB를 용출 시켰다. 각 plate의 흡광도는 microplate reader를 이용하여 520 nm 파장에서 측정하였으며, 약물을 가하지 않은 well(CC)과 약물을 처음 가할 때 well(Tz) 및 약물을 가한 각 well(DT)를 비교하여, DT≥Tz인 경우에는 [(DT-Tz)/(CC-Tz)]×100의 수식으로, DT<Tz인 경우에는 [(DT-Tz)/(Tz)]×100의 수식으로 약물의 세포독성을 계산하였다.

### 다약제내성 억제효과 실험

세포들은 96-well plate에 분주하고, 세포가 plate 바닥 면에 부착되도록 24시간 동안 배양하였다. 세포가 plate 바닥 면에 부착한 후에 배양액을 제거하고 TAX와 benzotriazepin 유도체(4 mM) 또는 verapamil(10 μM)과 병용 처리하고 72시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양이 끝난 후 세포독성의 실험은 앞의 SRB 방법을 이용하였다.<sup>11)</sup>

### 통계분석

모든 실험 자료는 Microsoft Excel 프로그램을 이용하여 평균 값과 표준오차를 계산하였으며, 유의성 검정은 Sigma Stat 프로그램의 Student-Newman Keuls test에 의한 one-way analysis of variance(ANOVA)를 이용하였다. 유의성 검정은 p값이 0.05이하인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결과 및 고찰

실험에 사용한 benzotriazepin 유도체들의 자체 세포독성을 측정하고 다약제내성 억제 실험에 사용할 농도를 정하기 위하여 A549, SK-OV-3, HCT15 및 HCT15/CLO2 세포를 대상으로 각 유도체들의 세포독성 실험을 수행하였다. 실험에 사용한 대부분의 benzotriazepin 유도체들은 10 μM까지 유의성 있는 세포독성이 관찰되지 않았으며, BTZ-07, BTZ-12 및 BTZ-13은 3 μM까지는 세포독성이 관찰되지 않았으나, 10 μM에서는 실험에 사용한 모든 세포에서 60~80%의 세포성장 억제 효과가 있는 것으로 나타나 P-당단백질의 발현과 세포독성 간의 상관관계가 없는 것으로 나타났다. 실험에 사용한 모든 Benzotriazepin 유도체들의 50% 세포성장 억제하는 농도(Effective concentration that cause 50% cell growth inhibition; EC<sub>50</sub>)가 5 μM 이상을 나타냈으며, 따라서 본 실험에서는 benzotriazepin 유도체들의 다약제내성 억제 효과를 측정하기 위한 실험농도를 4 μM로 결정하여 사용하였다(Table I). 한편, 4 μM 농도에서 BTZ-07 및 BTZ-13은 자체 세포독성이 있는 것으로 나타났으나, BTZ-12는 자체 세포독성이 관찰되지 않았다.

Benzotriazepin 유도체들의 다약제내성 억제 효과를 측정하기 위하여 여러 가지 인체기원 암 세포주에 TAX와 benzotriazepin 유도체들을 병용 처리하여 TAX의 세포독성 변화를 측정하였다. TAX를 단독으로 HCT15 세포에 처리한 결과 EC<sub>50</sub> 값이 0.092 μM로 나타났으며, 실험에 사용한 benzotriazepin 유도체들을 병용 처리한 경우 BTZ-04를 제외한 대부분의 경우에서 TAX의 EC<sub>50</sub> 값이 유의성 있게 낮아지는 것으로 나타났다. 한편 BTZ-16을 병용 처리한 경우 TAX의 EC<sub>50</sub> 값이 0.003 μM로 가장 우

Table I – Cytotoxicity of benzotriazepin analogues

Compounds	EC <sub>50</sub> ** (μM)			
	A549	SK-OV-3	HCT15	HCT15/CLO2
+BTZ-01	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
+BTZ-02	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
+BTZ-03	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
+BTZ-04	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
+BTZ-05	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
+BTZ-06	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
+BTZ-07	5.4*	5.6	5.4	5.7
+BTZ-08	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
+BTZ-09	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
+BTZ-10	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
+BTZ-11	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
+BTZ-12	5.8	5.6	5.7	5.8
+BTZ-13	5.6	5.2	5.7	5.5
+BTZ-14	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
+BTZ-15	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
+BTZ-16	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0

\*A representative value of two distinct experiments.

\*\*EC<sub>50</sub>; Effective concentration that cause 50% cell growth inhibition.

수한 세포독성 증강 효과가 있는 것으로 나타났으며, 이는 대조 약물로 사용한 10  $\mu\text{M}$  VER과 유사한 정도의 세포독성 증가 효과를 보이는 것으로 나타났다. TAX의 HCT15/CL02 세포에 대한  $\text{EC}_{50}$  값은 0.375  $\mu\text{M}$ 로 나타났으며, BTZ-03, BTZ-06, BTZ-08, BTZ-09, BTZ-10, BTZ-11, BTZ-12, BTZ-14, BTZ-15 및 BTZ-16을 병용 처리한 경우 TAX의  $\text{EC}_{50}$  값은 각각 0.133, 0.046, 0.102, 0.093, 0.118, 0.071, 0.049, 0.047, 0.015 및 0.012  $\mu\text{M}$ 로 나타나 세포독성이 유의성 있게 증가하는 것으로 나타났다. 한편, 10  $\mu\text{M}$  VER을 병용 처리한 경우에는 TAX의  $\text{EC}_{50}$  값이 0.008  $\mu\text{M}$ 로 나타나 4  $\mu\text{M}$  BTZ-15 및 BTZ-16을 병용 처리한 경우와 유사한( $p > 0.05$ ) 정도의 세포독성 증가 효과를 보였다.

한편 위의 benzotriazepin 유도체들 및 VER을 A549 및 SK-OV-3 세포에 TAX와 병용 처리한 경우에는 세포독성에 유의성 있는 증가가 나타나지 않았다(Table II) 실험에 사용한 benzotriazepin 유도체들 중 다약제내성 억제효과 우수한 것으로 나타난 BTZ-06, BTZ-12, BTZ-14, BTZ-15 및 BTZ-16과 VER을 TAX와 병용 처리한 실험 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

미국의 국립암연구소에서는 항암제 약효검색에 사용하는 60종의 인체기원 암 세포주들을 이용하여 형광물질인 rhodamine-123(Rho-123)의 방출과 세포의 P-당단백질 발현이 밀접한 관련이 있음을 확인하였다.<sup>12)</sup> 또한, 이를 바탕으로 기존에 컴퓨터 데이터 베이스와 되어있는 약물의 세포독성을 검색하여 rhodamine-123의 방출과 유사한 세포 선택성을 나타내는 약물들을 찾아내고, 이들을 다약제내성 억제제인 verapamil 및 cyclosporin A와 병용 투여하여, 이들이 P-당단백질의 기질임을 밝혀냈다. 또한 유사한 방법으로 P-당단백질 억제제도 검색하여 다수의 P-당단백질 억제제를 찾아내었다. 한편, 이렇게 찾아진 약물들에 대하여

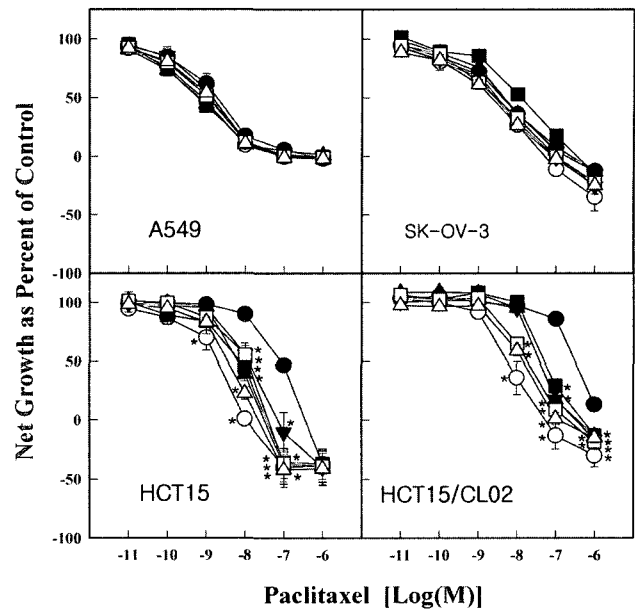


Fig. 2 – Cytotoxicity of paclitaxel in the absence (●) or presence of 10  $\mu\text{M}$  verapamil (○) and 4  $\mu\text{M}$  BTZ-06 (▼), BTZ-12 (■), BTZ-14 (▲), BTZ-15 (□) and BTZ-16 (△) against A549, SK-OV-3, HCT15 and HCT15/CL02 cells. Cell survival fractions were assessed after continuous drug-exposure for 3 days by SRB assay. Each data point represents the mean of at least three experiments, and bar reveals standard error associated with the mean. \*Significantly different from control (paclitaxel only) at same concentration,  $p < 0.05$

구조와 활성의 상관관계를 연구하였으나, P-당단백질의 기질 약물과 P-당단백질 억제제 사이에 구조적 관련성을 찾지는 못하였다. 즉, P-당단백질은 대단히 적은 기질 특이성을 가지며, 기질간

Table II – MDR reversal activity of benzotriazepin analogues

Sample ( $\mu\text{M}$ )	$\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )			
	A549	SK-OV-3	HCT15	HCT15/CL02
TAX only	0.002 $\pm$ 0.000	0.005 $\pm$ 0.001	0.092 $\pm$ 0.008	0.375 $\pm$ 0.022
+Verapamil (10)	0.001 $\pm$ 0.000	0.003 $\pm$ 0.000	0.002 $\pm$ 0.000*	0.008 $\pm$ 0.001*
+BTZ-01(4)	0.001 $\pm$ 0.000	0.002 $\pm$ 0.000	0.034 $\pm$ 0.007*	0.326 $\pm$ 0.020
+BTZ-02(4)	0.001 $\pm$ 0.000	0.002 $\pm$ 0.000	0.030 $\pm$ 0.004*	0.226 $\pm$ 0.017
+BTZ-03(4)	0.001 $\pm$ 0.000	0.002 $\pm$ 0.000	0.018 $\pm$ 0.003*	0.133 $\pm$ 0.015*
+BTZ-04(4)	0.002 $\pm$ 0.000	0.003 $\pm$ 0.000	0.074 $\pm$ 0.010	0.214 $\pm$ 0.019
+BTZ-05(4)	0.001 $\pm$ 0.000	0.004 $\pm$ 0.000	0.032 $\pm$ 0.006*	0.273 $\pm$ 0.009
+BTZ-06(4)	0.001 $\pm$ 0.000	0.003 $\pm$ 0.000	0.011 $\pm$ 0.002*	0.046 $\pm$ 0.008*
+BTZ-07(4)	CT**	CT	CT	CT
+BTZ-08(4)	0.001 $\pm$ 0.000	0.003 $\pm$ 0.001	0.014 $\pm$ 0.003*	0.102 $\pm$ 0.009*
+BTZ-09(4)	0.001 $\pm$ 0.000	0.005 $\pm$ 0.001	0.015 $\pm$ 0.002*	0.093 $\pm$ 0.010*
+BTZ-10(4)	0.001 $\pm$ 0.000	0.006 $\pm$ 0.001	0.019 $\pm$ 0.002*	0.118 $\pm$ 0.012*
+BTZ-11(4)	0.001 $\pm$ 0.000	0.002 $\pm$ 0.000	0.012 $\pm$ 0.001*	0.071 $\pm$ 0.008*
+BTZ-12(4)	0.001 $\pm$ 0.000	0.010 $\pm$ 0.004	0.008 $\pm$ 0.001*	0.049 $\pm$ 0.007*
+BTZ-13(4)	CT	CT	CT	CT
+BTZ-14(4)	0.001 $\pm$ 0.000	0.005 $\pm$ 0.001	0.007 $\pm$ 0.002*	0.047 $\pm$ 0.004*
+BTZ-15(4)	0.001 $\pm$ 0.000	0.002 $\pm$ 0.000	0.011 $\pm$ 0.002*	0.015 $\pm$ 0.004*
+BTZ-16(4)	0.001 $\pm$ 0.000	0.002 $\pm$ 0.000	0.003 $\pm$ 0.000*	0.012 $\pm$ 0.003*

\*Significantly different from the control (paclitaxel only),  $p < 0.05$ .

\*\*CT; cytotoxic at 4  $\mu\text{M}$ .

의 공통점은 고리구조를 다수 함유하며 극성이 적고, 중성 pH에서 양성 또는 중성의 전하를 띠는 물질이 많다는 정도이다.<sup>13)</sup> 한편 최근에 Wang<sup>14)</sup> 등은 지금까지 P-당단백질의 기질 및 억제제로 알려진 다수의 화합물 등을 대상으로 컴퓨터 분석을 통해 구조와 활성간의 상관관계를 측정하여 몇 가지 원칙을 발견하였다. 이들에 따르면, 화합물이 강력한 다약제내성 억제 효과를 갖기 위해서는 혐수성 정도를 나타내는 log P 값이 2.92 이상으로 일정 정도 이상의 친지성을 가져야 하며, 적어도 18개 이상의 원자로 구성된 사슬 구조를 갖고, 높은 에너지 수준(Ehomo) 및 하나 이상의 삼급 질소(tertiary nitrogen atom)를 포함하여야 한다고 밝혔다.

본 실험에서 사용한 benzotriazepin 유도체들의 다약제내성 억제 효과를 비교해 보면 3번 위치의 측쇄(side chain)에 페닐 고리 구조를 포함하는 사슬을 갖는 유도체들이 페닐 고리 구조를 갖지 않는 유도체들에 비해 우수한 효과를 갖는 것으로 나타났다. 이는 앞의 미국국립암연구소의 실험에서 P-당단백질의 기질이 고리구조를 다수 함유한다는 사실과 일치하는 것으로, 최근 연구되고 있는 대부분의 다약제내성 억제제들도 서로 분리된 다수의 고리구조로 이루어져 있다는 점과도 일치하는 내용으로 생각된다.

한편 7번 위치에 염소분자를 갖는 benzotriazepin 유도체들과 이를 포함하지 않는 유도체들의 다약제내성 억제 효과를 비교해 보면 BTZ-06과 BTZ-12의 경우에는 서로 차이가 없는 것으로 나타났으며, BTZ-08 및 BTZ-15의 경우에서도 HCT15 세포에서의 다약제내성 억제 효과는 유사하게 나타났으나 HCT15/CL02 세포에서는 BTZ-15가 보다 우수한 효과를 나타내는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 구조적 차이는 다약제내성 억제 효과에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보이거나 향후 더욱 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 한편 실험에 사용한 benzotriazepin 유도체들 중 BTZ-15와 BTZ-16이 가장 우수한 다약제내성 억제 효과가 있는 것으로 나타났으며, 따라서 이들의 7번 측쇄에 연결된 페닐 고리의 불소 또는 염소 분자가 P-당단백질과의 결합에서 중요한 역할을 할 것으로 추측된다. 한편 BTZ-15 및 BTZ-16을 Rho-123와 병용하여 암세포에 처리한 경우 HCT15 및 HCT15/CL02 세포에서 Rho-123의 세포내 축적이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Data not shown).

통계자료에 의하면 암 환자로 진단을 받은 사람들의 50% 이상에서 이미 암세포가 한 가지 이상의 약제내성 기작을 발현하는 것으로 보고 되고 있다. 또한, 궁극적으로 암 환자의 90% 이상이 한 종류 이상의 약제내성기전의 발현에 의해 항암치료에도 불구하고 사망하는 것으로 보고 되고 있으며, 전이가 일어난 암 세포에서 이러한 약제내성의 발현이 더욱 증가되는 것으로 알려져 있다.<sup>15,16)</sup> 따라서, 이러한 다약제내성을 극복하기 위한 연구들이 다양하게 진행되고 있으며, 다약제내성 억제제의 개발 초

기에는 기존의 약물들을 대상으로 다약제내성 억제효과를 갖는 물질을 찾으려는 노력들이 이루어 졌으며, 칼슘채널 억제제, 칼모듈린 억제제, 호르몬 또는 스테로이드 유도체, 항생제, 심장순환계 약물 및 사이크로스포린 등의 약물들이 이러한 다약제내성 억제 효과를 갖는 것으로 보고 되었으나, 약물 자체가 갖는 독성 문제로 임상에서 사용할 수 있는 약물로는 개발되지 못하였다.<sup>1,3)</sup> 따라서 보다 강력하고 선택성이 있는 약물의 개발이 이루어졌고 1990년대 이후에 dexverapamil, PSC833 및 MS-209 등과 같이 제 2세대 다약제내성 억제제들이 개발되어 임상실험에 들어갔으나 대부분의 약물들이 임상실험에서 낮은 약효나 독성 등의 문제로 개발이 중단된 상태이다. 한편, 최근에는 VX-710, GF120918, LY335979 및 XR9576 등을 비롯한 보다 우수한 약효와 적은 독성을 갖는 제 3 세대 다약제내성 억제제들이 개발되고 있으나, 이들 역시 임상실험에서 원하는 정도의 효과를 보이지는 못하고 있다.<sup>3,6)</sup> 특히 최근에는 cytochrome P450 3A4가 P-당단백질과 기질특이성이 상당히 유사하여, P-당단백질 억제제의 생체 내 투여가 cytochrome P450 3A4에 의한 약물의 대사에 영향을 미쳐 궁극적으로 병용 투여되는 항암제의 생체 내 약물분포 및 대사에 변화를 미치는 것을 밝혀지고 있다.<sup>2,6)</sup> 따라서 cytochrome P450 3A4에는 영향을 미치지 않으면서 P-당단백질만을 억제할 수 있는 선택성을 갖는 억제제의 개발이 새로운 과제로 대두되고 있다. 본 연구에서 개발된 화합물들 역시 향후 보다 광범위한 연구가 이루어져야 할 것이며, 이러한 연구가 궁극적으로는 보다 우수한 다약제내성 억제제를 개발하는데 도움을 줄 것이다.

## 참고문헌

- 1) Bradley, G., Juranka, P. F. and Ling, V. : Mechanism of multidrug resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* **948**, 87 (1998).
- 2) Gregory, D. L., Fojo, T. and Susan, E. B. : The role of ABC transporters in clinical practice. *The Oncologist.* **8**, 411 (2003).
- 3) Thomas, H. and Coley, H. M. : Overcoming multidrug resistance in cancer : An update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. *Cancer Control* **10**, 2 (2003)
- 4) Chan, H. S., Haddad, G., Thorner, P. S., DeBoer, G., Lin, Y. P., Ondrusek, K., Yeager, H. and Ling, V. : P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* **325**, 1608 (1991).
- 5) Tsuruo, T., Lida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y. : Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res.* **42**, 4730 (1982).
- 6) Robert, J. and Jarry, C. : Multidrug resistance reversal agents. *J. Med. Chem.* **46**, 23 (2003)
- 7) Lisa, J. G., Philip, M. and Christopher, A. S. : Modulation by

- LY335979 of P-glycoprotein function in multidrug-resistance cell line and human natural killer cells. *Biochem. Pharm.* **61**, 1393 (2001).
- 8) Prakash, M., Alistair, J., Wendy, D., Sade, O., Chris, L., Douglas, B., Jane, A. P., David, T. and Peter, C. : *In vitro* and *in vivo* reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576. *Cancer Res.* **61**, 749 (2001).
- 9) Choi, S. U., Choi, E. J., Kim, N. J., Park, S. H., Shin, H. S., Yoo, S. E., Jung, N. P. and Lee, J. O. : Establishment of doxorubicin-resistance subline derived from HCT15 human colorectal cancer cells. *Arch. Pharm. Res.* **17**, 1755 (1997).
- 10) Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R. : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107 (1990).
- 11) Rass, H. J., Canada, A. L. and Slater, L. M. : Cyclosporine A enhances paclitaxel toxicity against leukemia and respiratory epithelial cancers. *Clin. Cancer Res.* **3**, 57 (1997).
- 12) Lee, J. S., Paull, K., Alvarez, M., Hose, C., Monks A., Grever, M., Fojo, A. T. and Bates, S. E. : Rhodamine efflux patterns predict P-glycoprotein substrates in the national cancer Institute drug screen. *Mol. Pharmacol.* **46**, 627 (1994).
- 13) Alvarez, M., Paull, K., Monks, A., Hose, C., Lee, J. S., Weinstein, J., Grever, M., Bates, S. and Fojo, T. : Generation of a drug resistance profile by quantitation of mdr-1/P-glycoprotein in the cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen. *J. Clin. Invest.* **95**, 2205 (1995).
- 14) Wang, R. B., Kuo, C. L., Lien, L. L. and Lien, E. J. : Structure-activity relationship: Analyses of p-glycoprotein substrates and inhibitors. *J. Clin. Pharm. Therap.* **28**, 203 (2003).
- 15) Lum, B. L., Gosland M. P., Kaubisch, S. and Sikic, B. I. : Molecular targets in oncology: Implications of the multidrug resistance gene. *Pharmacotherapy* **13**, 88 (1993).
- 16) Perez, R. P., Hamilton, T. C., Ozoles R. F. and Young, R. C. : Mechanisms and modulation of resistance to chemotherapy in ovarian cancer. *Cancer* **71**, 1571 (1993).