

항엽산제에 대한 세포의 저항성 기작

- 총 설 -

김 정 상

인제대학교 식품영양학과

Cellular Resistance to Antifolates

Jong-Sang Kim

Dept. of Food Science and Nutrition, Inje University, Kimhae 621-749, Korea

Abstract

One of the major problems of cancer chemotherapy is the development of drug resistance in tumors, resulting in reduced responsiveness to subsequent treatments. The folate antagonists are being used to treat such diverse illnesses as cancer, leukemia, psoriasis, rheumatoid arthritis, etc. Previous studies have established that resistance to antifolates may occur in mammalian tumor cells by one or more of five mechanisms: (a) an increase in the levels of the target enzyme, generally as a consequence of gene amplification; (b) an alteration in the target enzyme, leading to an enzyme with a decreased binding affinity for the drug; (c) a decrease in the uptake of the drug into the cells; (d) increased extrusion of drugs out of cells; (e) impaired ability to polyglutamylate the parent drug which is capable of being intracellularly metabolized to longer chain length.

Key words : cancer chemotherapy, drug resistance, folate antagonists, gene amplification

서 론

엽산은 Fig. 1에 보여진 바와 같이 2-amino-4-hydroxy-pteridine (pterin)과 p-aminobenzoic acid 그리고 glutamate가 서로 결합된 크기가 약 440MW인 분자이다. 비타민 B군의 필수영양소인 엽산은 1930년대 Wills에 의해 처음으로 항빈혈성 인자로 그 존재가 알려진 이후로 많은 연구자들에 의하여 그 구조와 생리적 대사경로가 연구되어 왔다. 엽산의 주요기능은 thymidylate와 purine 염기의 합성, 그리고 glycine과 methionine의 합성을 들 수 있다. 따라서 엽산이 결핍될 경우, DNA합성이 저해되고, 이와 함께 세포분열이 제대로 이뤄지지 않아 여러가지 임상학적 증후군이 나타나게 된다^{1,2}. 그 대표적인 예가 악성빈혈증상의 하나인 적혈구 크기가 커지면서, 그 숫자가 감소하는 소위 megaloblastic anemia(거대 적혈구성 빈혈)이다. 최근에는 엽산보충이 기형아출산을 예방할 수 있다는 결과가 발표되어 미국에서는 임신부에 대한 일일 권장량(RDA)을 현재 200 μ g 수준에서 200mg까지 증가시킬 것 에 대한 찬반 논란이 있었다³. 엽산결핍은 분열속도

가 빠른 세포, 예를들어, 혈액을 생산하는 골수세포, 모근세포, 장관세포, 그리고 암세포 등에서 그들의 분열을 크게 저해한다. 엽산대사의 저해가 곧 세포분열의 억제로 이어진다는 사실은 임상학적으로 중요한 의미를 갖는다. 즉, 엽산대사에 관련된 효소들의 작용을 저해하는 물질(inhibitor)을 합성할 수 있다면 병원성 세균, 종양 등 인체내에서 빠르게 증식하는 세포들의 생육을 효과적으로 제어할 수 있다는 것이다⁴. 실제로 여러가지 항엽산제(antifolates)가 개발되어 왔고 일부는 임상적으로 사용되고 있다(Table 1)⁵. 항엽산제가운데 목암, 백혈병과 같은 종양치료에 많이 사용되고 있는 methotrexate(이하 MTX로 약함)는 그 구조가 엽산과 유사하며(Fig. 1), dihydrofolate reductase(이하 DHFR로 약함)의 저해제로 작용하여 엽산대사를 크게 위축시킨다^{6,7}. 즉, MTX는 DHFR에 엽산과 경쟁적으로 결합하여 엽산이 산화형에서, 핵산이나 아미노산 대사에 실제로 조효소역할을 하는 환원형으로 전환되는 것을 저해한다. 특히 종양세포는 세포분열 및 DNA 합성이 빠른 특징을 갖고 있기 때문에 항엽산제에 의해서 정상세포보다 더 많은 손상을 받게 된다⁸.

현재 치료제로 사용되고 있거나 시험단계에 있는 항엽산제로는 MTX와에도 trimetrexate, 10-ethyl-10-deazaaminopterin (Edatrexate), TNP-351 (pyrrolopyrimidine 유도체), 2-desamino-2-methylaminopterin (이상 DHFR저해제)⁹⁾와 thymidylate synthase의 저해제인 10-propargyl-5,8-dideazafofate (PDDE, CB3717), ICI D1964 (quinazoline 유도체), LY231514 (유도체), 2-desamino-5,8-dideaza-N10,3'-ethylene folic acid, BW1843U89 (benzoquinazoline 유도체), 5,10-dideazatetrahydrofolate 등⁸⁻¹¹⁾이 있으며, purine염기합성을 저해하는 항엽산제로는 5-deazaacyclotetrahydrofolate (5-DACTHF), (6R, S)-5,10-dideazatetrahydrofolic acid (DDATHF) 등^{8,12-16)}이 있다. 이 가운데 CB3717과 같은 항엽산제는 신장 및 간에 부작용이 커서 임상적으로 사용하는 것이 금지된 상태이지만^{10,11)}, 이러한 부작용의 원인인 낮은 용해도의 문제만 해결할 수 있다면 이 화합물이 갖는 항종양효과가 크기 때문에 임상적으로 유용한 치료제가 될 가능성이 높다. LY231514 나 5-DACTHF 등은 세포내로 이동된 다음 folylpolyglutamate synthetase (FPGS)에 의해서 polyglutamate 형태로 전환됨

으로서 세포독성이 증강된다. 이러한 특성은 일반적으로 종양세포가 정상세포에 비해 FPGS역가가 높기 때문에 약제의 선택성을 높이는 결과를 가져온다.

이렇듯 다양한 항엽산제가 개발되어온 배경에는, 한 가지 약제를 계속해서 투여할 경우 종양세포가 궁극적으로 이 약제에 대하여 저항성을 발현하게 된다는 사실에 근거를 두고 있다⁴⁾. 이러한 세포의 약제에 대한 저항성을 극복하기 위한 한가지 방안은 세포가 어떤

Table 1. Diseases treated with drugs known to interfere with folate metabolism

Diseases	Drug
Cancer, leukemia	Methotrexate
Psoriasis	Methotrexate
Rheumatoid arthritis	Methotrexate
Bronchial asthma	Methotrexate
Bacterial infection	Trimethoprim
Malaria	Pyrimethamine
Hypertension	Triamterene
Crohn disease	Sulfasalazine
Gout	Colchicine
Epilepsy	Phenytoin
AIDS	Trimetrexate

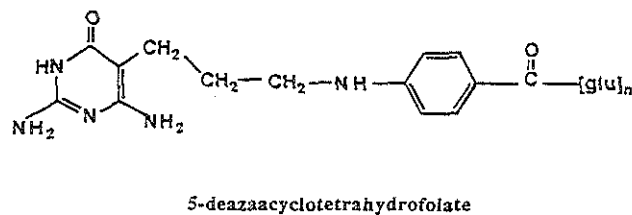
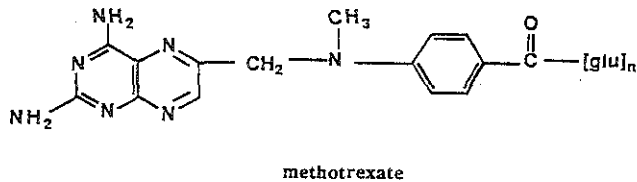
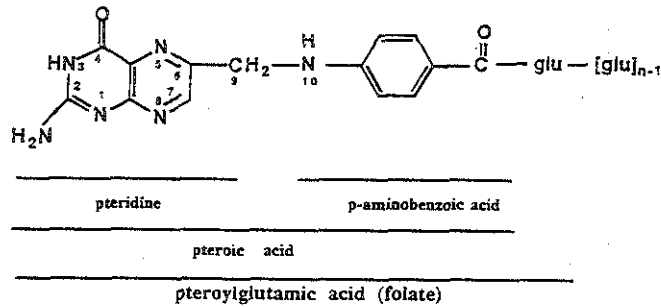


Fig. 1. Structure of folate and antifolates.

기작을 통하여 특정 항엽산제에 저항성을 가지게 되는 가 하는 것을 밝히고 이를 근거로 하여 항엽산제를 개발하는 것이다.

항엽산제 MTX에 대한 세포의 저항성

MTX를 필두로 화학요법제는 여러 형태의 종양치료에 중요한 역할을 했지만 이들에 의한 종양의 완치는 아직 어려운 상태이다. MTX나 여타 종양치료제들이 이용하는데 있어서 주요한 문제점은 이들이 정상세포에 대해서 갖는 독성과 종양세포가 이들 약제에 저항성을 나타낼수 있다는 것이다. MTX에 대한 세포의 저항성은 선천적인 수도 있고 약제에 1회이상 노출된 후 발생하는 후천적인 경우도 있다⁶.

왜 MTX가 어떤 형태의 종양에는 잘 작용하고 어떤 종양에는 별 효과가 없는지 잘 알려져 있지는 않지만 (Table 2), MTX에 저항성을 부여하는 가능한 기작에 대하여 몇가지 추측해 볼 수는 있다. 우선 MTX는 DNA 합성을 저해하기 때문에 cell cycle 가운데 S-phase에 있는 세포에 특히 치명적이다. 결과적으로 증식속도가 느린 종양세포나 조직은 상대적으로 MTX의 영향을 적게

받을 것이다¹⁷. 둘째, MTX는 세포막의 active transport system을 이용하여 세포내로 이동되는 것으로 생각되고 있다. 따라서 세포내로 약제가 전달되는 속도가 선천적으로 제한된 경우는 세포 저항성을 나타낼 것으로 예상된다⁶.

세포내로 전달된 엽산이나 MTX는 folylpolyglutamate synthetase에 의해서 polyglutamates 형태로 전환되는데 이는 세포막을 통과하지 못하므로 세포내에 축적된다^{2,18}. MTX에 의하여 DHFR이 저해를 받으면 세포내 dihydrofolate의 농도가 증가하게 되고 cofactor 역가가 없는 이 산화형 엽산은 세포내 여러 엽산 관련효소들과 경쟁적으로 결합하여 active cofactor인 tetrahy-

Table 2. Sensitivity of neoplastic disease to methotrexate

Sensitive ^a	Moderately sensitive	Not sensitive
Acute lymphocytic leukemia	Head and neck cancer	Acute myelocytic Leukemia
Burkitts lymphoma	Breast cancer	Colon cancer
Choriocarcinoma	Bladder cancer	Renal cell cancer
Diffuse lymphoma		

^aCures disease or is part of curative regimen

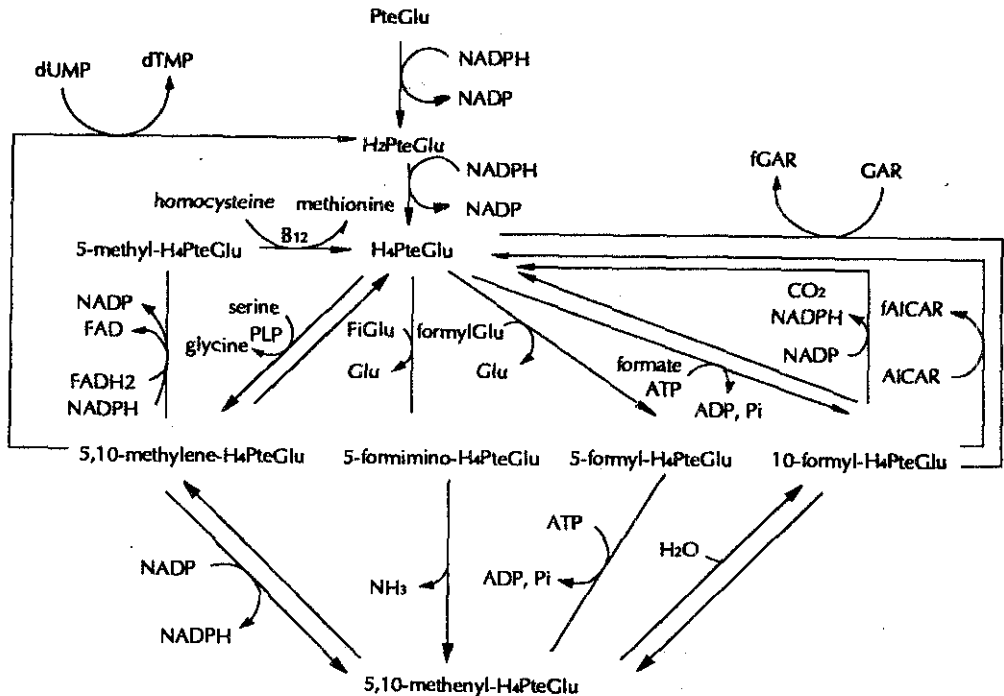


Fig. 2. Cytoplasmic pathways of one-carbon metabolism.

drofolate (THF)의 작용을 크게 위축시킨다. 한편 분열이 진행되고 있지 않은 세포라도 polyglutamylation에 의해 MTX를 세포내에 축적할 수 있으므로 나중에 세포가 S-phase로 진입할때 세포에 치명적인 영향을 줄 수 있다. 이렇듯 FPGS 효소가 낮은 수준으로 존재하거나 결손되었을 때는 MTX의 polyglutamylation이 저해되어 세포는 MTX에 대해 저항성을 나타내게 될 것이다¹⁸. 실제로 몇몇 종양세포에서 polyglutamylation이 제대로 이뤄지지 않는 것과 MTX에 대한 저항성 사이에 밀접한 상관 관계가 있음이 보고되어 있다^{4,19-21}. 또 다른 MTX에 대한 세포저항성의 기작으로는 MTX에 친화성이 극히 낮은 DHFR을 생성하는 경우²²이다. 이들 각 기작에 대하여 좀더 자세히 살펴보자.

DHFR 유전자의 증폭에 의한 저항성 발현

통계적으로 림프구성 급성백혈병 환자의 90%와 비림프구성 백혈병 환자의 70%는 MTX를 포함한 약물요법으로 일시적으로 완치되지만, 5년내에 재발하지 않을 확률은 불과 각각 50%와 10%에 지나지 않는다⁴. 질병이 재발한 경우 처음에 사용했던 MTX에 세포는 더이상 반응을 하지 않는 경우가 많은데, 이는 세포가 저항성을 발현했기 때문이다. 이러한 후천적 저항성은 주로 DHFR의 유전자 증폭에 의한 것인데, 이와같은 gene amplification이 어떻게 이뤄지는지 명확한 기작이 알려져 있지는 않지만 Schimke 등^{17,23}은 이 과정이 DNA의 overreplication 및 recombination에 의해 일어나며, overreplication은 DNA 합성이 저해받은 상태하의 세포가 DNA 합성을 시작할 수 있는 능력이 증가한 데서 비롯된 것이라는 이론을 제기한 바 있다. 이는 초파리의 chorion유전자²⁴가 발생단계에서 유전자 복제를 반복해서 initiation함으로써 유전자 증폭이 이뤄지는 것과 비슷한 기작이다. 이 가설에 의하면 DNA 증폭 현상은 DNA 합성이 저해를 받고 있는 상황에서 가장 빈번히 일어날 것이다. 이와는 대조적으로 DNA 합성이 아닌 단백질합성을 저해하는 물질은 유전자 증폭에 의해서 내성을 유발시킬 가능성은 희박하게 된다⁴.

저자는²⁵ Chinese hamster ovary cell과 human fibrosarcoma cell을 이용하여 FPGS와 DHFR을 선택적으로 저해하는 항엽산제 (5-chloro-5,8-dideazapteroylornithine)의 농도를 서서히 증가시키면서 여기서 살아남는 세포만을 선별하는 방법 (stepwise selection)으로 이 약제에 저항성을 갖는 세포를 얻었는데, 분석 결과 이들은 모두 DHFR이 증폭되어 있음을 관찰할 수 있었으며 이들 세포는 MTX에 대한 LD₅₀ 값이 최대 200배

까지 증가 되어 있었다. DHFR유전자는 염색체내에서의 위치(cytology) 또는 자체가 가지고 있는 밝혀지지 않은 고유한 특성에 때문에 FPGS유전자보다 증폭되기 쉬운 것으로 생각된다²⁵.

한편, MTX에 저항성이 발현되기 쉬운 세포에 대해서는 trimetrexate나 thymidylate synthase inhibitor (예, homofolate)들이 효과적으로 사용될 수 있는데, DHFR의 저해제인 trimetrexate는 FPGS의 기질은 아니지만 세포내에 축적이 잘되는 친유성제제로 DHFR이 약간 증폭된 세포에 대해 MTX보다 오히려 독성이 높은 것으로 알려져있다 (Table 3)^{6,26}.

Polyglutamylation기능 결손에 의한 항엽산제에 대한 저항성 발현

Pizzorno 등²⁷은 세포가 polyglutamylation기능의 결손만으로 MTX에 저항성을 갖게 될 수 있다는 것을 처음으로 제기했다. 이들은 이러한 돌연변이세포주를 만들기 위해서 MTX를 실제 임상적으로 사용하는 schedule에 따라, 고농도로 단기간 처리하는 기법을 사용했는데, 분석결과 몇몇세포에서 DHFR의 역가에는 변화가 없었지만 FPGS에 결함이 발생하여 MTX를 정상적으로 축적하지 못하는 것으로 나타났다. 그러나 이 방법은 FPGS의 level과 MTX의 세포독성과의 직접적인 관계를 명확히 설명하는 데는 한계가 있다. 즉, FPGS이외에 다른 효소계에 결함이 생겼을 가능성도 있고, 세포의 FPGS의 역가와 MTX에 대한 세포의 저항성이 어떤 상관관계를 갖는지 이 결과로 판단하기 어렵다. 저자 등²⁸은 FPGS역가가 소실된 mutant인 AuxB1 세포에 human genomic library를 transfection시켜 여러 수준의 FPGS 역가를 나타내는 transfectants를 만들고, 이들 세포를 이용하여 세포내 FPGS역가와 MTX에 대한 세포의 저항성이 어떠한 상관관계를 나타내는지 연구하였다. 그 결과, MTX를 짧은 시간(4시간) 처리하였을 때, 세포의 FPGS역가와 MTX의 세포저항성은 반비례 관계가 있다는 것을 발견하였다 (Table 4). 즉, FPGS역

Table 3. Inhibitory effects of trimetrexate on MTX sensitive and resistant cell lines^a

Cell line	MTX, ED ₅₀ (μ M)	TMQ, ED ₅₀ (μ m)
CCRE-CEM	0.015	0.005
CCRF-CEM/R1	1.5	0.15
CCRF-CEM/R2	5.0	0.05
CCRF-CEM/R3	3.4	0.003

^aCEM/R1, MTX-resistant via 18-fold DHFR gene amplification
CEM/R2, MTX-resistant via amplification and transport defect
CEM/R3, MTX-resistant via transport defect

Table 4. Effect of FPGS activity on sensitivity of CHO cells to MTX

Cell	ED ₅₀ after exposure to MTX for	
	4h	72h
	μM	μM
WTT2	10-33	3-10
AUX-human-2	33-100	3-10
AUX-human-7	10-33	1-3
AUX-human-21	3-3	3-10
AUX-human-79	1-3	3-10
AUX-coli ^a	10-33	3-10
HT1080	0.1-0.3	3-10

^amedium contained glycine

Cells were cultured in DMEM/dFBS-GHT medium containing 0.5μM PteGlu and various concentrations of MTX were added. After 4 or 72h, the medium was replaced with identical medium lacking MTX and the cells were cultured for the balance of the 72h period. ED₅₀ was calculated as the MTX concentration that reduced cell number by 50 percent

가가 정상세포의 약 79%인 transfectants (AUX-human-79)는 FPGS 역가가 극히 낮은 transfectant (AUX-human-2)에 비하여 훨씬 낮은 농도의 MTX에 의해서 사멸되는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 푸린염기합성 저해제 (antipurine agent) 인 5-DACTHF를 이용한 같은 실험에서 보다 명확하게 증명되었다²⁷⁾.

한편 FPGS는 MTX와 같은 항염산제의 세포내 잔류 (retention)를 위해서도 중요하지만 이 효소의 보다 중요한 생리적기능은 염산의 세포내 축적 및 기질특이성의 부여이다. 즉, 생리적 조건하에서 염산은 polyglutamate형태가 mono- 또는 diglutamate형태에 비하여 cofactor activity가 훨씬 높다. 이러한 관점에서 볼때 FPGS는 항암치료제의 target이 될 잠재성이 높은 효소이다²⁸⁾. 그동안 이 효소의 분리·정제가 어려워, 체계적인 연구가 이뤄지지 못했었는데, 최근 Garraw 등²⁹⁾에 의해 인체 FPGS유전자의 cloning이 성공함에 따라 이를 target으로 한 중앙치료제 개발 연구가 활발해 될 것으로 전망된다.

DHFR의 변형에 의한 MTX에 대한 저항성 발현

MTX에 저항성을 갖는 많은 세포주들이 비정상적인 DHFR(예를들면, MTX에 대한 *K_i* 값이 크게 증가함)를 갖고 있는 것으로 보고 되어 왔지만 이들에 대한 분자 level에서의 연구는 별로 많이 진행되지 못했다^{3,30)}.

Dicker 등²²⁾은 MTX에 저항성을 갖는 HCT-8 human colon carcinoma 세포주에서 DHFR 유전자를 cloning 하여 염기배열 순서를 조사한 결과 active site에 있는 phenylalanine이 serine으로 치환된 것을 발견했다. 또

한 정상적인 DHFR 유전자의 active site에 있는 phenylalanine 잔기를 site directed mutagenesis에 의해 serine으로 치환한 결과, MTX에 대한 친화성이 크게 감소된 것을 확인하였다. DHFR의 변형에 의한 MTX에 대한 저항성은 대처하기가 그리 쉽지 않다. DHFR이외의 효소를 target으로 한 저해제를 이용하던가 변형된 DHFR에 친화성을 갖는 항염산제를 검색하는 방법이 있을 수 있고, 시간이 좀 걸리지만 PCR 등의 방법으로 환자로부터 변형된 DHFR유전자의 mutation된 부위를 찾아내고 가능한 효소단백질의 구조를 예측함과 동시에, computer modeling 등의 방법을 이용하여 여기에 친화성을 갖는 새로운 약제를 design하는 것이다.

기타 항염산제에 대한 저항성 발현 기작

지금까지 설명한 기작과는 달리 여러가지 약제 동시에 저항성을 갖는 소위 multidrug-resistance (MDR)가 보고된 바 있다³¹⁻³²⁾. 이러한 세포들은 한결같이 소위 *mdr1* 유전자에 encode되어 있는 단백질 함량이 증가되어 있음이 확인 되었다. 이 유전자의 cDNA를 약제에 민감한 세포에 transfection시킨 결과 multidrug-resistance가 발현되는 것이 확인 되었다. 이 *mdr1* 유전자의 단백질은 P-glycoprotein이라는 분자량 170,000의 세포막에 존재하는 단백질로서 세포내로 전달된 약제를 배출함으로써 세포내 약제의 농도를 감소시킨다. 유전자 증폭이나 transcriptional activation 등에 의해서 세포내 P-glycoprotein 함량이 크게 증가하게 되면 multidrug-resistance 특성을 나타내게 된다. P-glycoprotein은 2개의 subunit으로 이뤄져 있으며 각각 6개의 transmembrane domain과 1개의 ATP 결합부위를 갖고 있는 것으로 밝혀져 있다. 이 단백질의 원래 기능은 세포에 해로운 xenobiotics나 여러가지 대사물을 세포밖으로 배출하는 것으로 추정하고 있다. 그러나 보다 명확하게 그 기능을 구명하기 위해서는 강력하면서도 이 단백질에만 특이적으로 작용하는 저해제의 개발이나 *mdr* 유전자가 선택적으로 결실(deletion)된 세포를 만드는 작업이 선행되어야 할 것이다. 한 가지 MDR특성을 갖는 세포에 대하여 흥미 있는 사실은 verapamil, quinine, dideoxyforskolin 등과 같은 염소통로 차단제(chloride channel blocker)에 의해서 MDR phenotype이 소실되어 약제에 민감하게 된다는 것이다^{32,37)}.

결 론

항염산제는 병원성 세균에서부터 종양에 이르기까지

지 광범위하게 질병치료에 이용되어 왔다. 이러한 치료제가 갖추어야 할 중요한 요건중의 하나가 선택성이며, 이는 숙주와 parasite 효소간의 구조적 차이를 이용하여 부여 될 수 있다. 어떤 경우에 선택성은 정상세포와 종양세포간의 생화학적 차이에 의한 것일 수도 있다. 지금까지 설명한 항엽산제에 대한 저항성 기작에 관한 연구를 토대로 많은 저해제가 개발되어 왔으나 아직까지 만족할만한 단계에 이르지 못하고 있다. 앞으로 세포독성이나 선택성 측면에서 우수한 항엽산제가 개발되기 위해서는 X-ray crystallography, 효소학, 분자생물학 등 관련학문의 발전과 상호협력으로 엽산대사에 관련된 효소들에 대한 분자 수준에서의 이해가 선행되어야 할 것이다. 또한 세포의 약제에 대한 저항성 발현이 화학요법의 주요 난제로 남아 있는 만큼 이를 극복하기 위해서는 작용특성이 다양한 항엽산제의 개발 등 다각적인 연구가 이뤄져야 할 것이다.

문 헌

- Shane, B. and Stokstad, E. L. R. : Vitamin B₁₂-folate interrelationship. *Ann. Rev. Nutr.*, **5**, 115 (1985)
- Shane, B. : Folylpolylglutamate synthesis and role in the regulation of one-carbon metabolism. *Vitamins and Hormones*, **45**, 263 (1989)
- Palca, J. : Agencies split on nutrition advice. *Science*, **257**, 1857 (1992)
- Schweitzer, B. J., Dicker, A. P. and Bertino, J. R. : Dihydrofolate reductase as a therapeutic target. *FASEB J.*, **4**, 2441 (1990)
- Butterworth, C. E. and Tamura, T. : Folic acid safety and toxicity : A brief review. *Am. J. Clin. Nutr.*, **50**, 353 (1989)
- Pizzorno, G., Chang, Y. M., McGuire, J. J. and Bertino, J. R. : Inherent resistance of human squamous carcinoma cell lines to methotrexate as a result of decreased polyglutamylamylation of this drug. *Cancer Res.*, **49**, 5275 (1989)
- McGuire, J. J., Mini, E., Hsieh, P. and Bertino, J. R. : Role of methotrexate polyglutamates in methotrexate- and sequential methotrexate-5-fluorouracil-mediated cell kill. *Cancer Res.*, **48**, 2149 (1988)
- Kisliuk, R. L. : Advances in antifolate development. In "Proceedings of the sixth international conference on pteridines and related biogenic amines and folates" Blau, N., Curtius, H. C., Levine, R. and Yim, J. (eds.), p.245 (1992)
- Jackman, L. A., Taylor, G. A., O'Conner, B. M., Bishop, J. A., Moran, R. G. and Calvert, A. H. : Activity of the thymidylate synthase inhibitor 2-ds amino-N10-propargyl-5, 8-dideazafoolic acid and related compounds in murine (L1210) and human (W1L2) systems *in vitro* and in L1210 *in vivo*. *Cancer Res.*, **50**, 5212 (1990)
- Hagan, R. L., Duch, D. S., Smith, G. K., Hanlon, M. H., Shane, B., Freisheim, J. H. and Hynes, J. B. : Studies on the mechanism of antitumor action of 2-desamino-2-methyl-5,8-dideazafoolic acid. *Biochem. Pharmacol.*, **41**, 781 (1991)
- Jackman, A. L., Taylor, G. A., Gibson, W., Kimbell, R., Brown, M., Calvert, A. H., Judson, I. R. and Hughes, L. R. : ICID1694, a quinazoline antifolate thymidylate synthase inhibitor that is a potent inhibitor of L1210 tumor cell growth *in vitro* and *in vivo* : A new agent for clinical study. *Cancer Res.*, **51**, 5579 (1991)
- Kelly, J. L., McLean, E. W., Cohn, N. K., Edelstein, M. K., Duke, D. S., Smith, G. K., Hanlon, M. H. and Ferone, R. : Synthesis and biological activity of an acyclic analogue of 5,6,7,8-tetrahydrofolic acid, N-[4-[3-(2,4-diamino-1,6-dihydro-6-oxo-5-pyrimidinyl)propyl]amino]-benzoyl]-L-glutamic acid. *J. Med. Chem.*, **33**, 561 (1990)
- Thorndike, J., Gaumont, Y., Kisliuk, R. L., Sirotiak, F. M., Murthy, B. R., Nair, M. G. and Piper, J. R. : Inhibition of glycinamide ribonucleotide formyltransferase and other folate enzymes by homofolate polyglutamates in human lymphoma and murine leukemia cell extracts. *Cancer Res.*, **49**, 158 (1989)
- Beardsley, G. P., Moroson, B. A., Taylor, E. C. and Moran, R. G. : A new folate antimetabolites, 5, 10-dideaza-5, 6, 7, 8-tetrahydrofolate is a potent inhibitor of *de novo* purine synthesis. *J. Biol. Chem.*, **264**, 328 (1989)
- Hanlon, M. H., Ferone, R., Mullin, R. J. and Keith, B. R. : *In vivo* and *in vitro* metabolism of 5-deazaacyclotetrahydrofolate, an acyclic tetrahydrofolate analogue. *Cancer Res.*, **50**, 3207 (1990)
- Sokoloski, J. A., Beardsley, G. P. and Sartorelli, A. C. : Induction of HL-60 leukemia cell differentiation by the novel antifolate 5, 10-dideazatetrahydrofolic acid. *Cancer Res.*, **49**, 4824 (1989)
- Schimke, R. T., Roos, D. S. and Brown, P. C. : Amplification of genes in somatic mammalian cells. *Method in Enzymology*, **151**, 85 (1987)
- Johnson, T. B., Nair, M. G. and Galivan, J. : Role of folypolyglutamate synthetase in the regulation of methotrexate polyglutamate formation in H35 hepatoma cells. *Cancer Res.*, **48**, 2426 (1988)
- Pizzorno, G., Mini, E., Coronello, M., McGuire, J. J., Moroson, B. A., Cashmore, A. R., Dreyer, R. N., Lin, J., Mazzei, T., Periti, P. and Bertino, J. R. : Impaired polyglutamylamylation of methotrexate as a cause of resistance in CCRF-CEM cells after short-term, high-dose treatment with this drug. *Cancer Res.*, **48**, 2149 (1988)
- Kim, J., Lowe, K. E. and Shane, B. : Regulation of folate and one carbon metabolism in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 21680 (1993)
- Kim, J. : Cytotoxicity and metabolism of antifolates. *Ph. D. dissertation*, Dept. of Nutritional Sciences, University of California at Berkeley (1991)
- Dicker, A. P., Volkenandt, M., Schweitzer, B. L.,

- Banerjee, D. and Bertino, J. R. : Identification and characterization of a mutation in the dihydrofolate reductase gene from the methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cell line pro⁻³ Mtx^{RM}. *J. Biol. Chem.*, **265**, 8317 (1990)
23. Schimke, R. T. : Gene amplification in cultured cells. *J. Biol. Chem.*, **263**, 5989 (1988)
24. Stark, G. R., Debatisse, E. G. and Wahl, G. M. : Recent progress in understanding of mammalian DNA amplification. *Cell*, **57**, 901 (1989)
25. Milbrandt, J. D., Heintz, N. H., White, W. C., Rothman, S. M. and Hamlin, J. L. : Methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cells have amplified a 135-kilobase-pair region that includes the dihydrofolate reductase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 6043 (1981)
26. Mini, E., Moroson, B. A., Franco, C. T. and Bertino, J. R. : Cytotoxic effects of folate antagonists against methotrexate-resistant human leukemia lymphoblast CCRF-CEM cell lines. *Cancer Res.*, **45**, 325 (1985)
27. Kim, J. and Shane, B. : Role of folylpolyglutamate synthetase in the metabolism and cytotoxicity of 5-deazaacyclotetrahydrofolate, an anti-purine drug. *J. Biol. Chem.*, in press (1994)
28. Patil, S. A., Shane, B., Freisheim, J. H., Singh, S. K. and Hynes, J. B. : Inhibition of mammalian folylpolyglutamate synthetase and human dihydrofolate reductase by 5,8-dideaza analogues of folic acid and aminopterin bearing a terminal L-ornithine. *J. Med. Chem.*, **32**, 1559 (1989)
29. Garrow, T. A., Admon, A. and Shane, B. : Expression cloning of a human cDNA encoding folylpoly(γ -glutamate) synthetase and determination of its primary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 9151 (1992)
30. Urlaub, G., Mitchell, P. J., Ciudad, C. J. and Chasin, L. A. : Nonsense mutation in the dihydrofolate reductase gene affect RNA processing. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 1968 (1989)
31. Mickish, G. H., Pastan, I. and Gottesman, M. M. : Multidrug resistant transgenic mice as a novel pharmacologic tool. *Bio Essays*, **13**, 381 (1991)
32. Woodcock, D. M., Jefferson, S., Linsenmeyer, M. E., Crowther, P. J., Chojnowski, G. M., Williams, B. and Bertoncello, I. : Reversal of the multidrug resistance phenotype with cremophor EL, a common vehicle for water-insoluble vitamins and drugs. *Cancer Res.*, **50**, 4199 (1990)
33. Bliet, A. M. V., Baas, F., Velde-Koerts, T. V., Biedler, J. L., Meyers, M. B., Ozols, R. F., Hamilton, T. C., Joenje, H. and Borst, P. : Genes amplified and overexpressed in human multidrug-resistant cell lines. *Cancer Res.*, **48**, 5927 (1988)
34. Miyamoto, Y., Oda, T. and Maeda, H. : Comparison of the cytotoxic effects of the high- and low-molecular-weight anticancer agents on multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells *in vitro*. *Cancer Res.*, **50**, 1571 (1990)
35. Devault, A. and Gros, P. : Two members of the mouse *mdr* gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 1652 (1990)
36. Raymond, M., Rose, E., Housman, D. E. and Gros, P. : Physical mapping, amplification and overexpression of the mouse *mdr* gene family in multidrug-resistant cells. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 1642 (1990)
37. Gill, D. R., Hyde, S. C., Higgins, C. F., Valverde, M. A., Mintenig, G. M. and Sepulveda, F. V. : Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Cell*, **71**, 23 (1992)

(1993년 11월 1일 접수)