

항암활성을 갖는 백금 착체의 합성과 신독성

이근임 · 황규자*
숙명여자대학교 약학대학
(Received May 23, 1994)

Synthesis and Nephrotoxicity of Pt Complexes as Antitumor Agent

Keun-Im Lee and Kyu-Ja Whang*

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract—Several Pt(II) and Pt(IV) complexes of N,N'-bis(2-hydroxyethyl)ethylenediamine(2-HEen) and N,N'-bis(2-chloroethyl) ethylenediamine(2-CEen) as carrier ligand were prepared. Water soluble Pt complexes were also synthesized by modification of leaving groups. The cytotoxicity of these compounds against leukemia L1210 and P388 cell in vitro were examined. The Pt complexes containing 2-CEen showed more effective cytotoxicity than those containing 2-HEen. Through the nephrotoxicity tests on the primary cultured proximal tubular cells of rabbit kidney and human kidney cells in vitro, Pt complexes with 2-CEen showed higher than those with 2-HEen which were consistent with cytotoxicity but showed very low nephrotoxicity compared with cisplatin. Also the values of BUN and creatinine in serum of Pt complexes were reduced remarkably compared with cisplatin, therefore it can be concluded that new Pt complexes seems to have much lower nephrotoxicity than cisplatin.

Keywords □ Platinum complex, antitumor activity, nephrotoxicity, cisplatin

백금착체인 cis-dichlorodiammineplatinum(II)(cisplatin)은 고환, 난소, 방광, 자궁, 경두부암 등의 고형암 치료에 사용되고 있는 항암제로서 임상시험에서도 탁월한 임상효과가 인정되어¹⁻³⁾ 지금까지 유력한 항암제로 사용되고 있다.

그러나 cisplatin은 신독성, 오심·구토, 난청 등 강한 부작용을⁴⁻⁷⁾ 수반하기 때문에 사용에 제약을 받을 뿐만 아니라 임상적 유용성을 감소시켰다. cisplatin의 신독성은 dose-limiting (용량 증가에 따른 독성 증가)으로서⁸⁾ 주로 뇨세관 괴사인 것으로 고찰되었고⁹⁻¹²⁾ 신피질에 직접적으로 독성을 나타내며 원위세뇨관과 집합관에도 손상을 주나 근위세뇨관에 가장 심한 영향을 준다.¹³⁾

백금착체의 항암 활성은 대체로 carrier ligand에 의존하고 leaving group은 백금 착체의 수용성, 반응성 등에 관계하고 있는 것으로 알려져 있다.¹⁴⁾ 특히

carrier ligand는 항암 활성의 강도 뿐 아니라 항종양 스펙트럼을 규정하고 있기 때문에 감수성이 낮은 세포에 광범위한 효과를 나타내는 carrier ligand를 찾는 것이 중요하다. 최근 cisplatin 내성 종양에 교차내성을 나타내지 않을 뿐만 아니라 cisplatin으로 치료 효과를 나타내지 못하는 종양에 활성을 가지면서 보다 우수한 항암 효과를 나타내고 부작용의 경감과 수용성화를 목적으로 한 새로운 백금 착체가 개발되고 있다. 그 일환으로 carboplatin,¹⁵⁻¹⁶⁾ oxaliplatin (I-OHP)¹⁷⁻¹⁸⁾ 등의 제 2세대 백금(II)착체가 개발되었으며 최근에는 물에 대한 용해도를 증가시키려는 제 3세대 항암제에 대한 백금 착체의 연구가 진행중에 있다.¹⁹⁾

한편 백금(II)착체를 산화하여 square plane에 수직으로 2개의 Cl⁻ 또는 OH⁻를 넣은 백금(IV)착체는 항암 활성을 가지면서 수용성이 높아진다. 그 예로 2-(aminomethyl)cyclohexylamine(amcha)와 trans-1-

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

platinum(II) [이하 PtCl₂(2-CEen)]

K₂PtCl₄ 500 mg(1.20 mM)을 물 5 ml에 녹이고 2-CEen 310.8 mg(1.20 mM)을 물 5 ml에 용해하고, 10% NaOH 용액으로 반응액의 pH를 7.0으로 조절한 다음 24시간 실온에서 교반한 후 생성된 황색 침전을 여과하여 소량의 물과 EtOH로 세척한 후 감압하에 50~60°C에서 2시간 건조하였다(80.9%).

IR(KBr, cm⁻¹) 3450, 3145, 2960, 1447, 1055, 672 Anal. Calcd. for C₆H₁₄N₂Cl₄Pt: C,15.98; H,3.12; N, 6.21 Found: C,15.85; H,3.08; N,6.12

Dinitrato[bis(2-hydroxyethyl)ethylenediamine-N, N']platinum(II) [이하 Pt(NO₃)₂(2-HEen)]

PtCl₂(2-HEen) 500 mg(1.20 mM)을 물 10 ml에 현탁하고 AgNO₃ 402 mg(1.18 mM, 0.98 eq)을 가하였다. 반응액은 차광용기에서 교반하면서 실온에서 24시간 반응시켜 AgCl을 여과하여 제거하고 여액을 감압하에서 증발 농축시키고 농축액을 동결 건조하였다(48.8%).

IR(KBr, cm⁻¹) 3386, 3142, 2878, 1503, 1380, 1054, 825 Anal. Calcd. for C₆H₁₆N₄O₈Pt·2H₂O: C, 14.32; H,4.01; N,11.13 Found: C,14.28; H,3.23; N, 10.92

[Dinitrato-bis(2-chloroethyl) ethylenediamine-N, N'] platinum(II) [이하 Pt(NO₃)₂(2-CEen)]은 Pt(NO₃)₂(2-HEen)과 동일한 방법으로 합성하였다(40.3%).

IR(KBr, cm⁻¹) 3448, 3143, 2956, 1508, 1380, 1060, 838 Anal. Calcd. for C₆H₁₄N₄O₈Cl₂Pt·2H₂O: C,13.34; H,3.36; N,10.37 Found: C,13.55; H,3.00; N,10.68

Sulfato[bis(2-hydroxyethyl)ethylenediamine-N, N']platinum(II) [이하 PtSO₄(2-HEen)]

PtCl₂(2-HEen) 500 mg(1.20 mM)을 물 10 ml에 현탁하고 Ag₂SO₄ 369 mg(1.18 mM, 0.98 eq)을 가하였다. 반응액은 차광용기에서 교반하면서 실온에서 24시간 반응시켜 AgCl을 여과하여 제거하고 여액을 감압하에서 증발농축시켰다. 농축액에 EtOH을 가하여 생성된 백색 침전을 여과하고 침전을 소량의 EtOH로 세척한 후 감압하에 60°C에서 건조하였다(24.5%).

IR(KBr, cm⁻¹) 3385,3157,2880,1448,1220,1056,619 Anal. Calcd. for C₆H₁₆N₂O₆SPt: C,16.40; H,3.67; N, 6.38 Found: C,16.66; H,4.06; N,6.14

Sulfato[bis(2-chloroethyl)ethylenediamine-N,N'] platinum(II)

[이하 PtSO₄(2-CEen)]은 PtSO₄(2-HEen)과 동일한 방법으로 합성하였다(32.2%).

IR(KBr, cm⁻¹) 3422, 3128, 2956, 1448, 1120, 1050, 620 Anal. Calcd. for C₆H₁₄N₂O₄SCl₂Pt·H₂O: C,14.58; H,3.26; N,5.67 Found: C,14.58; H,3.18; N, 5.63

[1,1-cyclobutanedicarboxylato(2-)-O,O'] [bis(2-hydroxyethyl)ethylenediamine-N,N']platinum(II) [이하 Pt(1,1-CBDCA)(2-HEen)]

K₂PtCl₄ 1.5 g(3.61 mM)을 물 30 ml에 녹이고 KI 3.6 g(21.68 mM)을 가한 후 차광하에 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응액을 감압하에 건조시킨다음 잔사는 EtOH 45 ml를 가해 용해시키고 과잉의 KI를 여과하여 제거하였다. 여액의 K₂PtCl₄에 2-HEen 540 mg(3.64 mM)을 용해시켜 천천히 가하였다. 5시간 실온에서 반응시켜 얻은 PtCl₂(2-HEen) 1 g(1.67 mM)을 물 20 ml에 현탁시키고 Me₂CO 5 ml로 homogeneous suspension으로 만든 후 Ag₂SO₄ 512 mg(1.64 mM, 0.98 eq)을 가하였다. 전체 반응액을 100 ml로 하고 차광용기에서 24시간 반응시킨 다음 AgI를 여과하여 제거하고 여액을 감압하에서 50 ml로 농축시켰다. 한편 1,1-cyclobutanedicarboxylic acid(이하 CBDCA) 240 mg(1.67 mM, 1.02 eq)을 물 5 ml에 녹이고 Ba(OH)₂·8H₂O 506 mg(1.60 mM, 0.98 eq)을 용해한 액을 가하고 0°C에서 30분간 교반한 후 실온에서 30분간 더 반응시켰다. 생성한 1,1-cyclobutanedicarboxylate-Ba를 여과하여 농축된 PtSO₄(2-HEen) 용액에 가한 후 30분간 반응시킨 후 BaSO₄를 여과하고 여액을 15~21시간 차광하에 반응시킨 다음 35~40°C에서 감압건조하였다(27.8%).

Anal. Calcd. for C₁₂H₂₂O₆N₂Pt·2H₂O: C,27.64; H, 4.64; N,5.37 Found: C,27.25; H,4.69; N,5.29 [1,1-cyclobutanedicarboxylato(2-)-O,O'] [bis(2-chloroethyl) ethylenediamine-N,N']platinum(II) [이하 Pt(1,1-CBDCA)(2-CEen)]은 Pt(1,1-CBDCA)(2-HEen)과 동일한 방법에 의해 합성하였다(32.5%).

Anal. Calcd. for C₁₂H₂₀O₄N₂Cl₂Pt·2H₂O: C,25.81; H,4.33; N,5.02 Found: C,26.07; H,4.32; N,4.84

Tetrachloro[bis(2-hydroxyethyl)ethylenediamine-N,N']platinum(IV) [이하 PtCl₄(2-HEen)]

PtCl₂(2-HEen) 2 g을 물 45 ml에 현탁시키고 80°C로 가열하면서 Cl₂ gas를 도입시켜 반응하였다. 90분간 교반하면서 반응시킨 후 10분간 공기를 통과시켜 과잉의 Cl₂ gas를 제거한 후 생성된 황색 침전을 여과하여 취하고 침전을 소량의 물과 EtOH로 세척한 후 감압하에 60°C에서 건조하였다(63.4%).

Anal. Calcd. for C₆H₁₆N₂O₂Cl₂Pt · 1/2H₂O: C,14.59; H,3.47; N,5.67 Found: C,14.69; H,3.41; N,5.54 Tetrachloro[bis(2-chloroethyl)ethylenediamine-N,N'] platinum(IV) [이하 PtCl₂(2-CEen)은 PtCl₂(2-HEen)과 동일한 방법에 의해 합성하였다(78.8%).

Anal. Calcd. for C₆H₁₄N₂Cl₄Pt · H₂O: C,13.35; H,2.99; N,5.19 Found: C,13.71; H,2.87; N,4.83

Dichlorodihydroxy[bis(2-hydroxyethyl)ethylenediamine-N,N'] platinum(IV) [이하 PtCl₂(OH)₂(2-HEen)]

PtCl₂(2-HEen) 1 g을 물 20 ml에 현탁시키고 수욕 상에서 70°C로 가온하면서 30% H₂O₂ 7 ml를 소량씩 적하하여 반응액을 용해시켰다. 70°C에서 1시간 반응시킨 다음 감압농축하고 빙냉시켰다. EtOH를 가하여 생성된 침전을 여과하여 취하고 소량의 EtOH로 세척한 후 50°C에서 2시간 건조하였다(57.3%).

Anal. Calcd. for C₆H₁₈N₂O₄Cl₂Pt: C,16.08; H,4.05; N,6.25 Found: C,15.94; H,3.97; N,6.25

Dichlorodihydroxy[bis(2-chloroethyl)ethylenediamine-N,N'] platinum(IV) [이하 PtCl₂(OH)₂(2-CEen)]

PtCl₂(2-CEen) 1 g을 물 20 ml에 현탁시키고 수욕 상에서 70°C로 가온하면서 30% H₂O₂ 15 ml를 소량씩 적하하여 반응액을 용해시켰다. 70°C에서 1시간 반응시킨 다음 감압농축하고 빙냉하여 생성된 침전을 여과하여 취하고 50°C에서 2시간 건조하였다(60.2%).

Anal. Calcd. for C₆H₁₆N₂O₂Cl₂Pt: C,14.86; H,3.32; N,5.77 Found: C,14.49; H,3.38; N,5.68

*In vitro*에서의 세포독성 효과

L1210 및 P388 leukemia cell 2×10⁵개를 각각 배지 2 ml를 넣은 culture tube에 이식하고 이날을 첫째일로 하여 37°C, 5% CO₂ 존재하에서 배양하였다. 2일째 및 4일째에 1200 rpm으로 5분간 원심분리하여 세포를 모으고 배지를 교환하였다. 대수증식기인 4일째에 합성한 백금(II) 착체 및 백금(IV)착체를 각종

농도로 37°C에서 2시간 접촉시켰고 배지교환하여 검체를 제거하였다. 6일째 세포를 tris-HCl 완충액(TBS, pH 7.4)으로 희석한 0.08% trypan blue 염색액으로 계수에 적합한 농도가 되도록 부유시켜 염색하는 방법에 의해 생세포와 사세포를 분별하였다. 생세포수를 적혈구계수판을 사용하여 현미경(X100)으로 측정하였다. 이와 같은 dye exclusion method를 이용하여 생존 세포수를 측정해서 L1210 또는 P388세포에 대한 50% 증식저해농도(IC₅₀치)를 구하고 세포독성효과(세포증식저해 효과)를 검토하였다. 배지는 RPMI 1640 분말배지에 1% penicillin-streptomycin액(100 units/ml)를 넣어 조제하고 사용시 10% fetal calf serum을 첨가하였다.

신독성 및 용혈성

토끼 근위세뇨관 상피세포의 성장에 미치는 영향 - Jung 등의 방법에²⁸⁾ 근거하여 체중 2 Kg 정도의 토끼를 cervical dislocation으로 치사시켜 토끼의 신장을 적출하였다. 신동맥으로 인산완충액(PBS)을 주입하여 세척한 다음 DME/F12(1 : 1) 배지로 관류시켰다. 0.5%산화철 용액을 주입시킨 후 신피질만을 절단시켜 DME/F12 배지에 넣고 Dounce homogenizer로 homogenize시켰다.

Homogenate를 253 μm mesh filter를 통과시키고 83 μm mesh filter에 모아진 세뇨관과 사구체를 DME/F12 배지에 옮기고 사구체는 magnetic bar를 사용하여 제거하였다. 그 직후 trypsin inhibitor와 collagenase(10 mg/ml)를 0.2 ml씩 넣고 2분간 실온에서 배양한 후 insulin(5 μg/ml), transferrin(5 μg/ml) 및 hydrocortisone(5×10⁻⁸M)을 첨가한 DME/F12 배지에 부유시켜 일정량씩 배양접시에 접종하고 접종후 1일째 부유되는 것을 없앤 다음 2~3일에 한번씩 배지를 교환해 주면서 CO₂ incubator에서 37°C로 2주일간 배양하였다. 배지는 Dulbecco's Modified Eagle's(DME)배지와 ham's F12배지를 1 : 1로 혼합하고 20 mM HEPES buffer(pH 7.4), 1% penicillin-streptomycin액(100 unit/ml)을 넣어 조제하였다.

3×10⁶cells/ml로 희석한 세포 100 μl를 96 well titer plate에 가하고 합성한 백금(II)착체 및 백금(IV)착체를 1% DMSO에 녹여 각각 10, 100 및 1000M로 조제한 검액 100 μl를 가하였다. 37°C, 5% CO₂ 존재하에서 48시간 배양하고 5 mg/ml 농도로 만든 MTT

액 50 μ 씩 가하였다. 다시 4시간 동일 조건에서 배양하고 aspiration하여 상등액을 제거한 다음 1% DMSO에 용해시키고 ELISA reader로 630 nm에서 측정하였다. 비교약물은 cisplatin을 사용하였다.

인체 신장 세포의 성장에 미치는 영향—Jung 등의 방법을²⁸⁾ 변형하여 신장암 절제 수술을 받은 암 환자로부터 신장을 적출하고 중앙부위로부터 가능한 한 먼 부위를 취하여 피막을 벗겨내고 신피질만을 분리하여 얻은 다음 절개하였다. 이것을 DME/F12 배지에 넣고 Dounce homogenizer로 homogenize시켰다. 이하 상술한 MTT assay와 동일한 방법으로 실험하였다.

혈액에 대한 영향—건강한 흰쥐의 혈액을 heparin으로 처리한 주사기로 심장 채혈하고 채취한 혈액에 TBS액을 1 : 1 비율로 가해 희석한 후 1500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액과 buffy coat를 제거하였다. 이러한 방법으로 혈액 세척을 2회 반복하여 적혈구만을 분리하고 최종 침전에 TBS액으로 적혈구가 2×10^8 cells/ml이 되도록 희석하였다. 시험관에 분리된 적혈구 100 μ 를 가하고 합성한 백금(II)착체 및 백금(IV)착체의 최종 농도가 1, 10, 100 및 1000 μ M이 되도록 가한 다음 TBS액으로 1 ml가 되도록 한다. 37°C에서 30분간 배양한 후 1500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액 600 μ 를 취하고 TBS액으로 전체 3 ml로 한 후 상등액 중의 용혈에 의해 혈구만 있는 헤모글로빈 농도를 415 nm에서 측정하였다. 비교약물로 cisplatin을 사용하였으며 100% 용혈은 saponin 0.5 mg/ml을 가해서, 0% 용혈은 TBS액만을 사용하여 위와 동일 조작 후 비교 검토하였다.

흰쥐의 체중, 신장에 미치는 영향—체중 160~210 g 정도의 흰쥐 3마리를 1군으로 하여 6군으로 나누고 합성한 백금(II)착체와 백금(IV)착체 및 비교약물인 cisplatin을 투여군과 대조군으로 분류하여 실험하였다. 검체는 1% DMSO(PBS용액)에 용해시켜 5 mg/Kg의 용량을 복강내 주사하였고 4일 후 체중 변화를 관찰한 다음 에테르로 마취하여 심장 채혈하였다. 또한 각 투여군의 신장을 적출하고 무게를 측정한 다음 냉동시켰다.

체중에 미치는 영향—검체 투여전의 체중과 투여 2일, 4일후의 체중을 측정하여 백금(II)착체와 백금(IV)착체의 투여에 따른 체중의 변화를 관찰하였다.

신장에 미치는 영향—혈청을 분리하기 위해 채취한

혈액을 실온에서 45분간 방치하여 응고시키고 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 혈청중의 blood urea nitrogen(BUN) 및 creatinine의 함량을 측정하였다. BUN은 urea NE kit를, creatinine은 creatinine kit를 사용하였다.

신장 조직중의 백금 함량 측정—동일하게 처리한 흰쥐의 신장 조직은 도가니에서 115°C로 하룻밤 건조하고 500°C에서 24시간 동안 회화하였다. 여러 종류의 산 가운데 백금의 회수율이 높은 11N HNO₃을 이용하여 회화시킨 시료를 용해하고 여과하여 일정량으로 하였다. 사용한 모든 용기는 사용하기 전 3N HNO₃으로 세척하여 사용하였고 백금표준시액은 0.2% HNO₃으로 제조하였다. 백금은 AAS 5100형 HGA graphite furnace를 이용하여 265.9 nm에서 30 μ 를 주입하여 측정하였다.

결과 및 고찰

In vitro에서의 세포독성 효과

합성한 백금(II)착체와 백금(IV)착체의 L1210 및 P388세포에 대한 In vitro에서의 세포독성 효과를 검토하기 위해 dye exclusion method에 의해 생존 세포수를 측정하고 산출한 50% 세포증식저해 농도를 Table I에 나타내었다.

2-HEen의 착체보다 2-CEen의 착체가 높은 경향을 나타내었고 in vivo에서의 항암효과²⁹⁾와 같이 PtCl₄

Table I—IC₅₀ values of Pt(II) and Pt(IV) complexes against L210 and P388 leukemia cell lines

Complexes	IC ₅₀ (μ M)	
	L1210	P388
PtCl ₂ (2-HEen)	6.4	11.0
Pt(NO ₃) ₂ (2-HEen)	5.4	18.5
Pt(1,1-CBDCA)((2-HEen)	4.2	14.5
PtCl ₂ (2-CEen)	0.9	3.5
Pt(NO ₃) ₂ (2-CEen)	2.5	5.7
PtCl ₄ (2-HEen)	2.5	8.6
PtCl ₂ (OH) ₂ (2-HEen)	4.3	17.5
PtCl ₄ (2-CEen)	0.5	2.4
PtCl ₂ (OH) ₂ (2-CEen)	1.7	4.3
Cisplatin	1.1	6.2

• L1210 and P388 leukemia(2×10^5 cells) were implanted in tubes.

• Each drugs were contacted for 2 hrs on day 4.

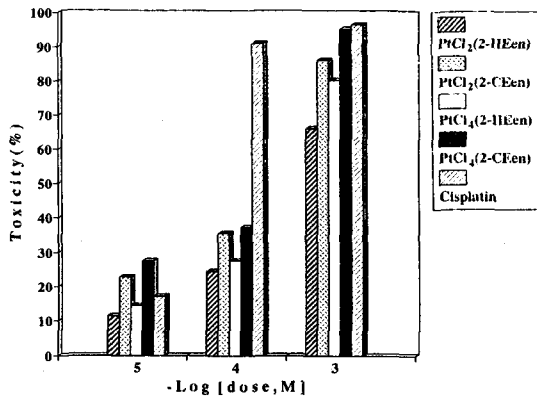


Fig. 1—Toxicity of Pt(II) and Pt(IV) complexes on the proximal tubular cells of rabbit kidney

(2-CEen)이 가장 높은 세포독성 효과를 나타내었다. 따라서 ethylenediamine에 2-chloroethyl기를 치환시킴에 따라 백금(II)착체 PtCl₂(2-CEen)에서는 3~7배, 백금(IV)착체 PtCl₄(2-CEen)에서는 4~5배의 향상된 세포독성 효과를 얻었으며 백금(II)착체를 백금(IV)착체로 산화시킴에 따라 약간 상승된 세포증식저해 효과를 얻을 수 있었다. 이것은 알킬화제에 의한 항암 효과의 기전을 뒷받침하는 것으로 사료된다.

또한 leaving group을 치환하여 용해도를 상승시킴에 따라 세포독성 효과는 감소되었으며 이는 leaving group이 백금 착체의 수용성과 반응성에 영향을 주어 항암 활성에 관계하고 있음을 설명한다.¹⁴⁾

신독성 및 용혈성

토끼 근위세뇨관 상피세포에 대한 독성—합성환 백금(II)착체 및 백금(IV)착체의 근위세뇨관 상피세포에 대한 독성을 Fig. 1에 나타내었다. 10 μM 농도에서는 12~28%의 독성을 나타내었고 2-CEen의 착체는 2-HEen의 착체에 비해 약 2배 높았고 cisplatin보다 높았으나, 2-HEen의 착체는 cisplatin보다 낮았다. 또한 100 μM 농도에서는 검체 모두 cisplatin보다 낮은 독성을 나타내었고 2-CEen의 백금(II)착체와 백금(IV)착체는 2-HEen의 착체에 비해 약 1.4배 높았다. 1000 μM 농도에서는 검체 모두 66~95%의 높은 독성을 보였고 항암 효과가 가장 높았던 PtCl₄(2-CEen)은 cisplatin과 유사한 독성을 나타내었다. 한편 각 농도에서 백금(IV)착체가 백금(II)착체의 경우보다 약 5~26% 정도의 높은 독성을 나타냈고

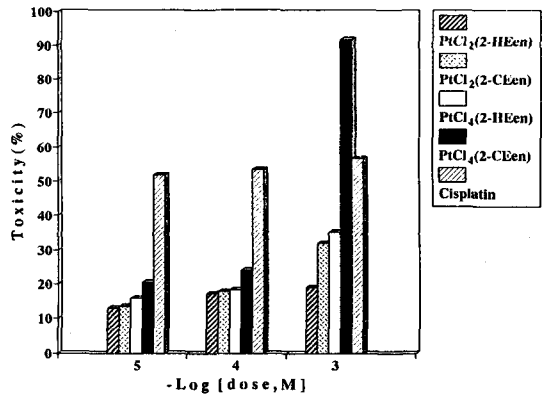


Fig. 2—Toxicity of Pt(II) and Pt(IV) complexes on the human kidney cells

2-CEen의 백금착체가 2-HEen의 백금착체보다 높은 독성을 나타냈는데 이는 항암 효과와 일치하였다.

인체 신장 세포에 대한 독성—인체 신장 세포에 대한 백금(II)착체 및 백금(IV)착체의 독성을 Fig. 2에 나타내었다. 10 μM 농도에서는 13~21%의 독성을 나타내었고 2-CEen의 백금(II)착체는 2-HEen의 착체와 비슷하였다. 백금(IV)착체는 백금(II)착체에 비해 약 1.3배 높은 독성을 나타냈으나 cisplatin보다 훨씬 적은 독성을 나타내었다. 100 μM 농도에서도 17~24%의 독성을 나타내었고 10 μM 농도에서와 같은 경향을 나타내었다. 1000 μM 농도의 경우에는 2-CEen의 백금(II)착체는 2-HEen의 착체에 비해 1.7배 독성이 높았고 백금(IV)착체는 2.6배의 높은 독성을 나타내어 2-CEen의 착체가 독성이 높았고, cisplatin에 비해 PtCl₄(2-CEen)은 1.6배의 높은 독성을 나타냈다.

한편 각 농도에서 cisplatin은 비슷한 독성을 보였고, 1000 μM에서의 PtCl₄(2-CEen)을 제외한 다른 착체는 각 농도에서 전반적으로 13~35% 정도의 비교적 낮은 독성을 나타내어 cisplatin보다 독성이 적은 것으로 판단된다.

혈액에 대한 독성—백금착체 화합물이 혈액중으로 유입될 경우 가장 먼저 접하게 되는 것이 혈구세포이며 이들 혈구세포 중 표면적이 가장 넓으며 단순한 영양소나 산소의 운반기능 이외에 세포독성이 강한 물질을 제거하는 기능이 강조되고 있는 적혈구에 대한 용혈성을 보면 저농도인 1 μM에서는 거의 용혈을 보이지 않았고, 검체 모두 농도 증가에 따라 용혈 독성이 증가하였으며 백금(II)착체와 백금(IV)착체는 cisplatin

tin과 유사한 용혈성을 나타내었다. 1000 μ M의 고농도에서는 2-HEen의 착체는 cisplatin의 약 40%에 불과한 낮은 용혈 독성을 보였으나 2-CEen기의 착체는 cisplatin의 64~85% 정도의 조금 높은 용혈성을 나타내어 2-HEen의 착체가 2-CEen의 착체에 비해 용혈 독성이 낮은 것으로 나타났다.

흰쥐의 체중, 신장에 대한 독성

체중에 미치는 영향— 합성한 백금(II)착체와 백금(IV)착체를 1% DMSO용액에 용해시켜 5 mg/Kg을 투여하고 그에 의한 체중 변화를 보면 대조군이 약 23% 상승한 데 비해 합성한 백금(II)착체는 13~15%, 백금(IV)착체는 17~19% 상승하였고, cisplatin의 경우는 17%의 상승을 나타내었다. 이 결과는 cisplatin (7.5 mg/Kg)을 투여했을 때 신독성이 최대에 이르는 4일째까지 체중이 증가하여 최고치에 이른 후 차차 감소하는 경향을 보인 결과와 일치하였고,³⁰ 소화관 상피 세포 자극에 의한 하리(下痢)에 기인하는 것으로 생각되는 체중감소 경향은 나타나지 않았다.³¹⁾

신장에 미치는 영향— 백금 착체 화합물의 신독성은 신세뇨관 괴사에 기인되며 BUN 및 creatinine의 상승이 대표적인 지표이므로 혈청중의 BUN과 creatinine 함량을 측정하여 Table 2에 나타내었다. cisplatin은 높은 BUN 및 creatinine 함량을 나타내며 강한 신독성을 유발하였으나 합성한 백금(II)착체 및 백금(IV)착체는 정상 범위의 BUN, creatinine 함량을 나타내었고 착체 중에서 비교해 보면 항암효과가 가장 높았던 PtCl₄(2-CEen)에서 약간 높은 BUN, creatinine 함량을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 토끼의 근위세뇨관 상피 세포와 인체의 신장 세포에 대한 낮은

세포 독성과 일치하였다.

신장 조직중의 백금 함량 측정— 조직중의 항암제 분포 연구는 작용 기전을 이해하고 독성을 검토하는데 필수적이다.³²⁻³³⁾ 백금 착체의 신독성에 대한 영향을 평가하기 위한 수단으로 EAAS(electrothermal atomic absorption spectroscopy)를 이용하여 조직중에 투여된 백금 착체의 백금 함량을 측정하는데는 가용화, 추출, 유도체화의 단계를 포함해야 하므로 복잡성과 시간 소비가 많으나³⁴⁻³⁵⁾ 최소한의 전처리를 한 조직에서 직접 분석하는 조건에³⁶⁾ 따라 백금(II)착체 및 백금(IV)착체를 흰쥐의 복강내에 투여한 후 4일째 신장을 적출하고 AAS를 이용하여 백금 함량을 측정하였다.

cisplatin은 높은 백금 함량을 나타내어 강한 신독성을 확인할 수 있었으나 합성한 백금(II)착체는 cisplatin의 1/2 정도의, 백금(IV)착체는 1/3 정도의 백금 함량을 나타내어 정상 범위에 있었던 BUN 및 creatinine 함량과 일치하는 결과를 보였다.

한편 토끼의 근위세뇨관 세포와 인체의 신장세포에 대한 *in vitro* 실험에서 독성이 높았던 백금(IV)착체 PtCl₄(2-CEen)는 백금(II)착체에 비해 높은 백금 함량을 예상하였으나 백금(IV)착체가 백금(II)착체에 대해 백금 함량이 60%에 지나지 않았고 이는 생체 내에서 백금(IV)착체가 환원되어 백금(II)착체로서의 항암 작용을 가지는 것과 관계가 있는 것으로 고찰된다.³⁷⁾ 또한 2-CEen의 착체에 비해 2-HEen의 착체의 백금 함량은 80~90% 정도로서 이는 *in vitro*에서의 실험 결과와 일치하였다.

결 론

본 연구에서는 알킬화제로 유용한 2-chloroethyl기를 가지는 N,N'-bis(2-chloroethyl) ethylenediamine(2-CEen) 유도체를 carrier ligand로 하는 일련의 백금(II)착체를 합성하고 용해도를 증가시키기 위해 leaving group을 nitrate, sulfate 및 1,1-cyclobutanedicarboxylate로 치환하였으며 백금(II)착체를 산화시켜 백금(IV)착체를 합성하고 *in vitro*에서의 세포독성 효과와 신독성을 실험하였다.

백금착체의 L1210과 P388 세포에 대한 *in vitro* 세포독성 효과는 2-CEen의 착체가 2-HEen의 착체보다 상승하였다. 또한 leaving group을 치환시켜 용

Table II— Effect of Pt(II) and Pt(IV) complexes on BUN & creatinine levels in rat following i.p.e. administration(5 mg/kg)

Complexes	BUN(mg/dl)	creatinine(mg/dl)
Control	18.4 ± 0.74	0.56 ± 0.12
PtCl ₂ (2-HEen)	17.4 ± 0.64	0.46 ± 0.06
PtCl ₂ (2-CEen)	15.7 ± 0.45	0.55 ± 0.21
PtCl ₄ (2-HEen)	18.5 ± 0.75	0.44 ± 0.07
PtCl ₄ (2-CEen)	19.8 ± 1.35	0.67 ± 0.19
Cisplatin	39.7 ± 1.48	1.58 ± 0.04

· Each value represents the mean ± S.E. of 3 rat.
 · Nephrotoxicity was measured on day 4 after administration.

해도를 높인 착체보다 용해도가 작은 착체가 좋은 항암 활성을 나타냄은 적당한 용해도를 갖는 것이 오히려 효과적인 항암 활성을 나타냄을 알 수 있다.

토끼의 근위세뇨관 상피세포에 대한 신독성과 적혈구에 대한 용혈성은 2-CEen의 착체가 2-HEen의 착체보다 높았으나 인체의 신장 세포에 있어서는 2-HEen의 착체와 2-CEen의 착체가 비슷한 독성을 나타내었다.

혈중 BUN과 creatinine을 통한 신독성 실험에서 합성한 백금(II)착체 및 백금(IV)착체의 BUN, creatinine은 정상 범위로서 높은 BUN과 creatinine 함량 상승을 나타낸 cisplatin과 비교되었다. 신장 조직의 백금 함량은 cisplatin의 1/2-1/3 정도로서 정상범위의 BUN과 creatinine 함량과 일치하는 결과를 보였다.

이상 합성한 백금 착체의 carrier ligand에 2-chloroethyl기를 치환시킴으로써 항암 효과를 증대시켰으며 leaving group을 달리하여 용해도가 증가되었지만 항암 효과는 그에 비해 감소한 점을 볼 때 nitrate와 1,1-cyclobutanedicarboxylate 등의 leaving group으로 용해도를 증가시키는 데는 한계가 있으므로 carrier ligand에 용해도를 높일 수 있는 group을 치환시키는 것이 용해도를 증가시키면서 항암 효과를 감소시키지 않는 방법으로 생각된다. 산화시켜 합성한 백금(IV)착체 PtCl₄(2-CEen)는 백금(II)착체에 비해 약간 상승한 항암 효과를 나타내었고 cisplatin에 비해 신독성이 경감되어 새로운 의약품으로서 검토될 가치가 있다고 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 천만장학회 연구비의 지원을 받아 숙명여대 약학연구소 연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Lippman, A. J., Helson, C., Helson, L. & Kradoff, I. H.: Clinical trials of *cis*-diamminedichloroplatinum(NSC-119875), *Cancer Chemother. Rep.*, **57**, 191 (1973).
- 2) Higby, D. J., Wallace, H. J. & Holland, J. F.: *cis*-Diamminedichloroplatinum(NSC-119875) a phase I study, *Cancer Chemother. Rep.*, **57**, 459 (1973).
- 3) Higby, D. J., Wallace, H. J., Albert, D. & Holland, J. F.: A phase I study showing responses in testicular and other tumors, *Cancer*, **33**, 1219 (1974).
- 4) Ward, J. M. & Fauvie, K. A.: The nephrotoxic effects of *cis*-diamminedichloroplatinum(II) (NSC-119875) in male F344 rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **38**, 535 (1976).
- 5) Ward, J. M., Young, D. M., Fauvie, K. A., Wolpert, M. K., Davis, R. & Guarino, A. M.: Comparative nephrotoxicity of platinum cancer chemotherapeutic agent, *Cancer Chemother. Rep.*, **60**, 1675 (1976).
- 6) Kociba, R. J. & Sleight, S. D.: Acute toxicologic and pathologic effects of *cis*-diamminedichloroplatinum (NSC-119875) in the male rat, *Cancer Chemother. Rep.*, **55**, 1 (1971).
- 7) Schaeppi, U., Heyman, I. A., Fleischman, R. W., Rosenkrantz, H., Ilievski, V., Phelan, R., Cooney, D. A., Davis, R. D.: *cis*-Dichlorodiammineplatinum (NSC-119875); preclinical toxicologic evaluation of intravenous injection in dogs, monkeys and mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **25**, 230 (1973).
- 8) Gottlieb, J. A. & Drewinko, B.: Review of the current clinical status of platinum coordination complexes in cancer chemotherapy, *Cancer Chemother. Rep.*, **59**, 621 (1975).
- 9) Hardaker, W. T., Stone, R. A. & McCoy, R.: Platinum toxicity, *Cancer*, **34**, 1030 (1974).
- 10) Krakoff, I. H.: Nephrotoxicity of *cis*-diamminedichloroplatinum (II), *Cancer Treat. Rep.*, **63**, 1523 (1979).
- 11) Jacobs, C., Kalman, S. M., Tretton, M. & Weiner, M. W.: Renal handling of *cis*-diamminedichloroplatinum (II), *Cancer Treat. Rep.*, **64**, 1223 (1980).
- 12) Litterst, C. L.: Cisplatin; A review with special reference to cellular and molecular interactions, *Agents Actions*, **15**, 520 (1984).
- 13) Walker, E. M. & Gale, G. R.: Methods of reduction of cisplatin nephrotoxicity, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **11**, 397 (1981).
- 14) Tashiro, T.: 白金錯體の抗腫瘍活性と作用機序, 日本化学會誌, **4**, 684 (1988).
- 15) Takahashi, H., Sasaki, Y., Saijo, N., Sakurai, M., Nakagawa, H., Hoshi, A., Jett, J. R. & Hong, W. S.:

- In vitro* colony inhibition by carboplatin stomach and lung cancer cell lines in comparison with cisplatin, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **19**, 197 (1987).
- 16) Harstrick, A., Casper, J., Guba, R., Wilke, H., Poliwoda, H. & Schmoll, H. J.: Comparison of the antitumor activity of cisplatin, carboplatin and iproplatin against established human testicular cancer cell lines *in vivo* and *in vitro*, *Cancer* (Philadelphia), **63**, 1079 (1989).
- 17) Mathe, G., Kidani, Y., Noji, M., Maral, R., Bourut, C. & Chenu, E.: Antitumor activity of l-OHP in mice, *Cancer Lett.*, **27**, 135 (1985).
- 18) Tashiro, T., Kawada, K., Sakurai, Y. & Kidani, Y.: Antitumor activity of a new platinum complex, oxalato (trans-1,2-diaminocyclohexane) platinum (II); new experimental data, *Biomed. & Pharmacother.*, **43**, 251 (1989).
- 19) Bitha, P., Carvajal, S. G., Citarella, R. V., Santos, E. F. D., Dur, F. E., Hlavka, J. J., Lang, S. A., Lindsay, H. L., Thomas, J. P., Wallace, R. E. & Lin, Y.: A new family of water-soluble third generation antitumor platinum complexes, *J. Med. Chem.*, **32**, 2063 (1989).
- 20) Noji, M., Sumi, M., Ohmori, T., Mizuno, M., Suzuki, K., Tashiro, T. & Kidani, Y.: 1,2-シクロヘキサンジアミン および 2-(アミノメチル)シクロヘキサミン異性體の白金(IV)錯體の制癌性と性質, 日本化学會誌, **4**, 675 (1988).
- 21) Anderson, W. K., Quagliato, D. A., Haugwitz, R. D., Narayanan, V. L. & Wolpert-DeFilippse, M. K.: Synthesis, physical properties and antitumor activity of tetraplatin and related tetrachloroplatinum (IV) stereoisomers of 1,2-diaminocyclohexane, *Cancer Treat. Rep.*, **70**, 997 (1986).
- 22) Rahman, A., Roh, J. K., Wolpert-DeFilippes, M. K., Goldin, A., Venditti, J. M. & Wooley, P. V.: Therapeutic and pharmacological studies of tetrachloro(d,l-trans) 1,2-diaminocyclohexaneplatinum(IV) (tetraplatin), a new platinum analog, *Cancer Res.*, **48**, 1745 (1988).
- 23) Bramwell, V. H. C., Crowther, D., O'Malley, S., Swindell, R., Johnson, R., Cooper, E. H., Thatcher, N. & Howell, A.: Activity of JMG (CHIP) in advanced ovarian cancer; a phase I-II trial, *Cancer Treat. Rep.*, **69**, 409 (1985).
- 24) Hortobagyi, G., Holmes, F., Frye, D., Hug, V. & Frascchini, G.: A phase II study of CHIP in metastatic breast cancer (MBC), *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **28**, 788 (1987).
- 25) Tashiro, T.: Cisplatin 誘導體 開發の現況と問題點, 癌と化學療法, **16**, 1358 (1989).
- 26) Chan, P. K.: Cross-linkage of nucleophosmin in tumor cells by nitrogen mustard, *Cancer Res.*, **49**, 3271 (1989).
- 27) Ishidate, M., Sakurai, Y. & Sawatari, K.: Studies on carcinostatic substances. XXXVII. Preparation of derivatives of nitrogen mustard having metal chelate-forming activity, *Chem. Pharm. Bull.*, **9**, 679 (1961).
- 28) Jung, J. C., Lee, S. M., Kadakia, N. & Taub, M.: Growth and function of primary rabbit kidney proximal tubule cells in glucose-free serum-free medium, *J. Cellular Physiol.*, **150**, 243 (1992).
- 29) Lee, K. I., Tashiro, T., Noji, M.: Platinum and palladium complexes containing ethylenediamine derivatives as carrier ligands and their antitumor activity, *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 702 (1994).
- 30) 최동섭, 김용일, 민현기: cis-diamminedichloroplatinum(II) 투여에 의한 흰쥐 세노관 병변의 초미세구조 변화, 서울의대 학술지, **25**, 168 (1984).
- 31) Farris, F. F., King, F. G., Dedrick, R. L. & Litters, C. L.: Physiological model for the pharmacokinetics of cis-dichlorodiammineplatinum(II) (CDDP) in the tumored rat, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **13**, 13 (1985).
- 32) Nanji, A. A., Mikhael, N. Z. & Stewart, D. J.: Renal and hepatic concentrations of platinum; relationship to cisplatin time, dose and nephrotoxicity, *Arch. Intern. Med.*, **145**, 2013 (1985).
- 33) Jones, A. H.: Determination of platinum and palladium in blood and urine by flameless atomic absorption spectrophotometry, *Anal. Chem.*, **48**, 1472 (1976).
- 34) Pera, M. G. & Harder, H. C.: Analysis for platinum in biological materials by flameless atomic absorption spectrometry, *Clin. Chem.*, **23**, 1245 (1977).
- 35) McGahan, M. C. & Tyczkowska, K.: The determi-

- nation in biological materials by electrothermal atomic absorption spectroscopy, *Spectrochimica Acta*, **42B**, 665 (1987).
- 36) de Jong, W. H., Steerenberg, P. A., Vos, J. G., Bulten, E. J., Verbeek, F., Kruizinga, W. & Ruitenber, E. J.: Antitumor activity, induction of cross resistance and nephrotoxicity of a new platinum analogue, cis-1,1-diaminomethylcyclohexane platinum(II) sulfate and of cis-diamminedichloroplatinum(II) in an immunocytoxa model in the LOU/M rat, *Cancer Res.*, **43**, 4927 (1983).
- 37) Peritz, A., Al-Baker, S., Vollano, J. F., Schurig, J. E., Bradner, W. T. & Dabrowiak, J. C.: Antitumor and DNA-binding properties of a group of oligomeric complexes of Pt(II) and Pt(IV), *J. Med. Chem.*, **33**, 2184 (1990).