

## 새로운 백금 착체(II) 화합물의 흰쥐 혈장에서 대사체 확인

김종환 · 조요나 · 노영수 · 서성훈 · 정지창\* · 장성구\*  
이규홍\*\* · 이주한\*\* · 이경태†

경희대학교 약학대학, \*의과대학, \*\*보령제약 중앙연구소

(1998년 7월 27일 접수)

### Identification of Major Metabolites of New Platinum(II) Complexes in Rats

Jong-Whan Kim, Yo-Na Jo, Young-Soo Rho, Seong-Hoon Seo, Jee-Chang Jung\*, Sung-Goo Chang\*,  
Kyo-Heung Lee\*\*, Joo-Han Lee\*\* and Kyung-Tae Lee†

College of Pharmacy, \*College of Medicine, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

\*\*Boryung Research Institute, Kyunggi-Do 435-050, Korea

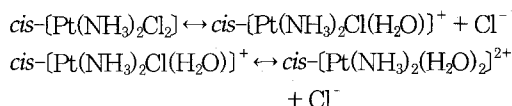
(Received July 27, 1998)

KHPC-002[(trans-1-diaminocyclohexane-bis-1,2(diphenylphosphinoethane)platinum) · 2NO<sub>3</sub>] and KHPC-006[(cis-diaminocyclohexane-bis-1,2(diphenylphosphinoethane)platinum) · 2NO<sub>3</sub>] were synthesized as candidates for third platinum antitumor agent. Before their pharmacokinetic study, we optimized the analytical condition with HPLC and identified the major metabolites in the rat plasma. HPLC analysis by C<sub>18</sub> reverse-phase column showed that standard peak of both compounds appeared rapidly at around 1 minutes, whereas metabolites of KHPC-002 and KHPC-006 which were extracted from plasma after single I.V. administration in rats or incubation for 24 hr at 37°C showed retention time of 10~11 minutes. These metabolites were identified as the major compound by Matrix Associated Laser Deposition/Ionization (MALDI), which only lose the 2 molecules of NO<sub>3</sub>. Based on these results, we suggest that the major metabolites of KHPC-002 and KHPC-006 were [trans-1-diamino-cyclohexane-bis-1,2(diphenylphosphinoethane)platinum] and [cis-diaminocyclohexane-bis-1,2(diphenylphosphinoethane)platinum], respectively.

**Keywords**—Platinum complexes, Metabolite, MALDI, HPLC, Plasma

현재 신생물성 질환에 임상으로 사용되는 화학요법제로는 nitrogen mustards, nitrosoureas, alkyl sulfonates와 같은 alkylating agent류, folic acid, purine 및 pyrimidine analog 등의 antimetabolites류, vinca alkaloids, antibiotics, enzyme 등의 natural products 류, adrenocorticosteroids, estrogen, androgen 등의 호르몬류 및 백금착체류등 30여종이 있다.<sup>1)</sup> 이 중에서 유일한 무기의약품인 백금착체는 Werner의 금속착체에 대한 이론 도입과 Rosenberg의 *E.coli*의 성장과정에 대한 전기장의 영향실험 중 백금에 의한 성장억제현상의 발견<sup>2,3)</sup> 이후로 미국 FDA에서 1978년에 임상적 사용으로 허가된 cisplatin(cis-diamminedichloroplatinum(II))이 대표적이다.

이러한 cisplatin의 작용기전으로는 혈액중에 투여된 cisplatin이 유리형태로 암세포에 도달한 후 수동확산에 의해 세포내로 침투하여 alkylating agent와 같이 공격목표로서 세포내 DNA에 결합하게 된다. 세포 외액에서는 높은 염소이온농도(100 mM)로 인해 cisplatin의 해리가 억제되었다가 세포내액에서는 낮은 염소 이온농도(4 mM)로 인해 이탈기(leaving group)인 염소이온이 물분자에 의해 2분자까지 대체되어 활성형태인 aquatic form을 형성하게 되는데 cisplatin의 해리과정은 다음과 같다.<sup>4,9)</sup>



<sup>1)</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

여기서 cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(H<sub>2</sub>O)]<sup>+</sup>이온이 약 40%를

차지하는데 이 형태로서 DNA의 adenine이나 guanine에 결합, 착체를 형성하여 DNA를 35° 휘어지게 함으로써 DNA의 복제를 억제하는 것으로 알려져있다.

이에 저자는 새롭게 합성된 백금착체인 KHPC-002 및 KHPC-006이 *in vivo* 및 *in vitro*에서 항암활성이 매우 높고, 수용성이 매우 높은 제 3세대 백금착체의 후보물질로 보고되어 약물동력학적 비교평가를 하기 위해 흰쥐의 암컷과 수컷에 대해 1회 정맥투여후 HPLC에 의한 새로운 백금화합물의 분석 조건 개발에 대한 소견을 얻고 혈중 대사산물의 구조를 확인하고자 하였다.

## 실험방법

### 시약 및 기기

KHPC-002와 KHPC-006은 경희대학교 약학대학 노영수 교수님으로부터 공급받았고 Zoletil 50® (Virbac, France)을 마취제로 사용하였다. 15% mannitol과 주사용 멸균증류수는 대한약품공업주식회사로부터, 생리식염수는 중외제약으로부터 구입하였고 기타 유기용매는 시판 특급 및 일급시약을 사용하였다. HPLC system은 pump(Waters Millipore Model 501), integrator(Waters Millipore Model 746), detector(U.V, Young-In M720 UV/VIS)를 사용하였으며 MALDI(Kratos Kompact MALDI II, U.S.A)와 vacuum evaporator(Savant, Speed Vac Plus SC 110A, U.S.A)를 사용하였다.

### 실험동물

체중 180g대의 수컷과 암컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 구입하여 동물사육실에서 일주일간 사료와 물을 충분히 공급하면서 환경에 적응시킨 후 200-260g이 되었을 때 실험 12시간전부터 절식시킨 뒤 사용하였다. 약물 투여량은 KHPC-002와 KHPC-006의 경우 5% mannitol을 함유한 3ml 생리식염수에 20mg/kg으로 용해시켜 정맥주사하여 실험하였으며 생리식염수에 대한 용해성은 매우 좋았다.

### 실험동물의 준비

Zoletil 50®(25mg/kg i.p.)으로 마취된 흰쥐의 좌측 대퇴부와 목등쪽의 털을 제거하고 수술대에 고정시킨 뒤 수술부위를 70% 에탄올로 소독한다. 좌측 대퇴부의 동맥과 정맥을 분리하고 동맥내에는 끝이 약간 가늘게 되고 50 I.U./ml의 헤파린을 채워진 PE-50 polyethylene tubing(i.d. 0.58 mm, o.d. 0.965 mm,

INTRAMEDIC®, CLAY ADAMS, USA)을, 정맥내에는 PE-10 polyethylene tubing(i.d. 0.28 mm, o.d. 0.61 mm)을 약 4cm정도 삽입시키고 silk suture를 사용하여 고정시킨 후 목 뒷부분을 약간 절개하여 두 개의 polyethylene tubing을 빼낸 뒤 봉합사로 수술부위를 봉합하였다.

### 약물 투여 및 시료의 준비

KHPC-002 및 KHPC-006을 마취에서 충분히 회복된 흰쥐의 정맥에 연결시킨 PE-10 polyethylene tubing을 통해 주사한 후 50 I.U./ml 헤파린을 0.1 ml 투여하여 dead volume을 없앤 뒤 blank를 비롯해서 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 45, 60 그리고 120분에 동맥에 연결된 PE-50 polyethylene tubing을 통해 혈액을 0.4 ml씩 취했으며 즉시 동량의 생리식염수를 동맥으로 보충하여 총 부피량은 일정하게 하였다. 채취한 혈액은 헤파린 처리된 microcentrifuge tube에 넣어 즉시 얼음에 보관하였다가 refrigerated centrifuge를 사용하여 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 분리된 plasma를 얻어 -70°C에 보관하였다가 분석전에 상온에서 녹여 측정하였다. 실험 동물은 각시료당 2마리를 사용하였다.

### HPLC 정량을 위한 혈액시료의 준비

준비한 plasma 200 µl에 cold MeOH 200 µl를 넣고 30초간 vortex mixing한 뒤 refrigerated centrifuge로 10,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액 200 µl를 얻은 후 다시 cold MeOH 200 µl를 가해 1분간 vortex mixing을 한 뒤 동일조건에서 상등액 200 µl를 얻었다. 분리된 400 µl의 상등액을 evaporation시키고 MeOH 100 µl를 넣고 30초간 vortex mixing을 한 뒤 동일조건으로 원심분리하여 80 µl를 취해 10 µl를 HPLC 정량에 사용하였다.

### HPLC를 이용한 백금착체의 분석조건

KHPC-002와 KHPC-006의 plasma에서의 분석중 칼럼은 µBondapak™ C<sub>18</sub> reverse-phase column (3.9 mm×300 mm, Waters)를 사용하였으며, 유속은 1 ml/min 이었으며 검출파장은 215 nm에서 측정하였다. 이동 용매의 구성은 MeOH/phosphate buffer (3:2 v/v)로 하였으며 phosphate buffer에 1g/L의 heptane sulfonate를 함유하고 있다.

### MALDI를 이용한 대사체의 분석

KHPC-002와 KHPC-006의 Table I의 조건에 따랐으며 MeOH에 시료를 녹여 dihydroxybenzoic acid를 기질로 사용하여 측정하였다.

**Table 1**— The Analytical Condition of Platinum by ICP-MS

Dwell time	10.24	Replicates	3
Time/sweep (sec)	0.12	Internal standard	In-115, Tl-205
Points/peak	3	Integration range(AMU)	0.80
Detection mode	PC	Valley search range(AMU)	0.80
Scanning Mode	Peak jump	Multiplier dead time(ns)	20.00

### ICP-MASS를 사용한 platinum 분석

시료 100  $\mu$ l를 취해 분석용 질산 3ml를 가하고 200°C에서 3-4시간 동안 반응시켜 분자구조를 분해하였다. 질산이 증발되면 순수 물로 비이커 내부를 세척한 후 계속 가온하여 질산을 제거하였다. 1% 질산으로 비이커를 세척하여 20 g으로 조정한 후 200배 희석하여 만든 뒤 ICP-MASS를 사용하여 정량하였다. ICP-MASS의 분석 조건은 아래와 같다.

### 결과 및 고찰

현재 임상적으로 사용되고 있는 백금착체화합물들의 부작용들은 약물들의 대사에 의해 형성되는 대사체에 기인하는 반면 항암활성 또한 이들의 대사체에 의한

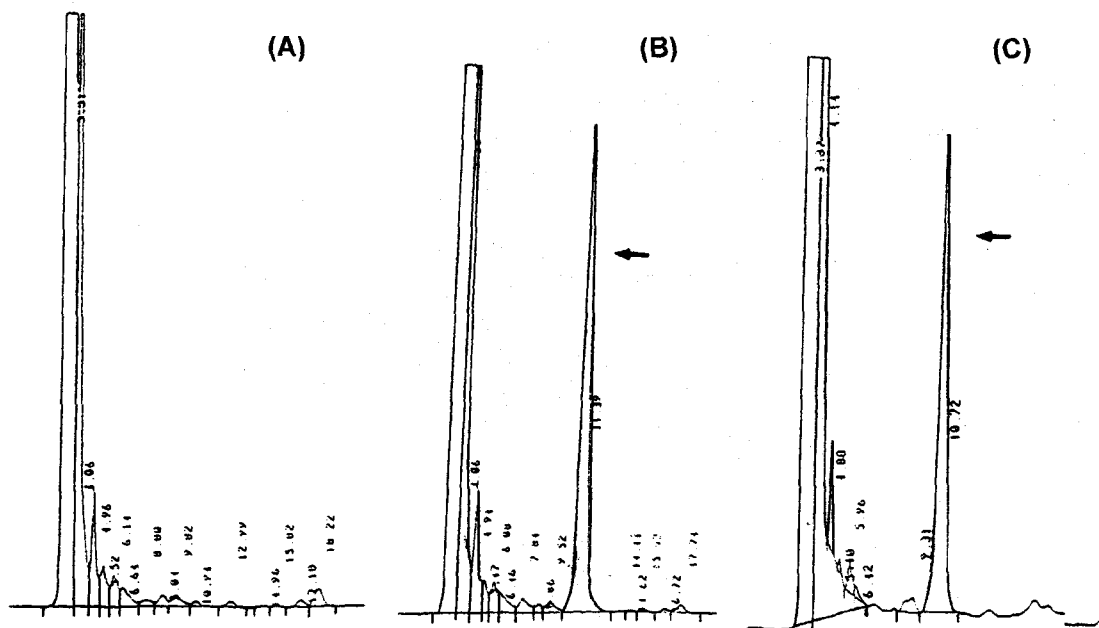
것으로 이러한 작용들은 대사체가 모화합물보다 생체 내에 오랜기간 존재하기 때문으로 알려져 있다.<sup>10)</sup>

Cisplatin 및 다른 백금화합물들의 생체내 대사는 효소에 의한 반응보다 단순한 화학적 반응에 관련되었으며 이는 간단한 무기화합물로서 ligand의 교환반응에 의한 것으로 보고 되어져 왔다.<sup>10)</sup> 이에 본 실험은 새로운 백금화합물의 생체내 대사체를 관찰하고자 한다.

### HPLC를 이용한 KHPC-002 및 KHPC-006의 분석

KHPC-002와 KHPC-006의 standard 피크를 얻기 위해 MeOH에 녹여 분석한 결과 retention time이 1분대에서 여러 개의 피크가 겹쳐 빠르게 나왔으며 정확한 피크를 확인할 수 없었으나 ICP-MASS에 의한 platinum 분석에 의해 백금을 확인함으로써 백금화합물의 존재를 확인하였다. 이는 시료가 강한 극성을 가짐으로서 역상 칼럼에 흡착이 되지 않음을 보여 주고 있으며 모화합물의 분리를 위해서는 역상 대신에 순상 또는  $\text{NH}_2$  칼럼을 사용하는 것이 적합하다고 추측된다.

흰쥐에서 분리한 혈장과 새로운 백금화합물을 *in vitro*에서 37°C에서 24시간 배양 후 추출한 화합물 위의 실험과 동일한 조건에서 HPLC를 사용하여 분석한 결과를 Figure 1에 나타내었다. KHPC-002와 KHPC-006 모두 10-11분대 피크가 나타났으며 순수 혈장만을 대조로 하여 분리한 결과와 비교해보면 유일



**Figure 1**— HPLC analysis of KHPC-002 and KHPC-006 standard after incubation with rat plasma. Key: (A): Blank, (B): KHPC-002, (C): KHPC-006

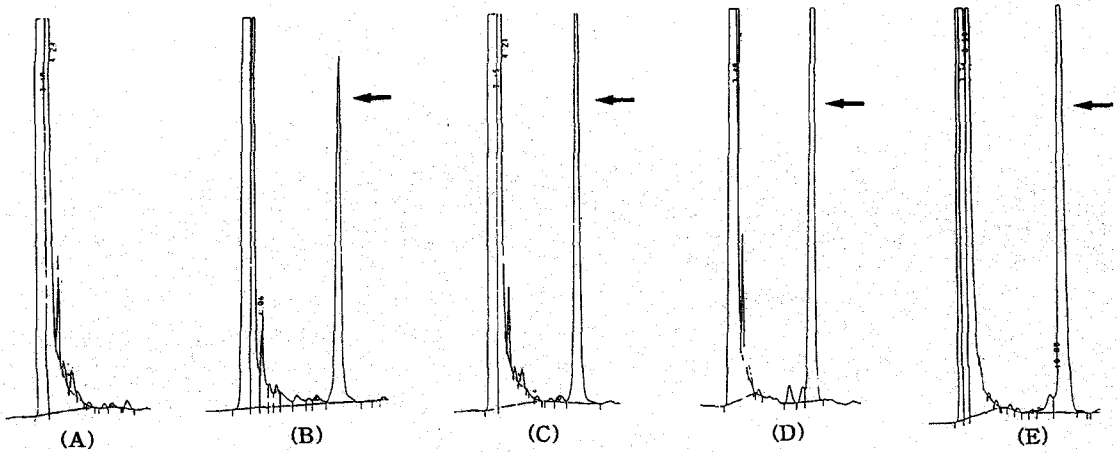


Figure 2—HPLC analysis of KHPC-002 and KHPC-006 metabolites after 1 min intravenous administration to rats. Key: (A): Blank, (B): KHPC-002 (male), (C): KHPC-002 (female), (D): KHPC-006 (male), (E): KHPC-006 (female).

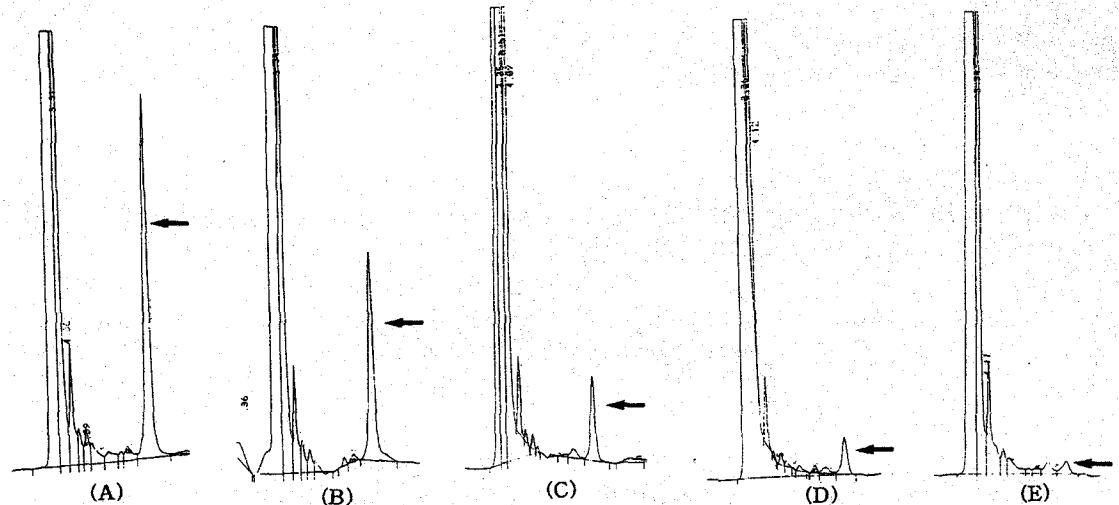


Figure 3—Plasma peak profiles of KHPC-002 after intravenous administration to male rats. Key: (A): 2 min, (B): 6 min, (C): 15 min, (D): 30 min, (E): 60 min

한 피크였으며 ICP-MASS에 의한 platinum을 확인하였다.

흰쥐에 KHPC-002와 KHPC-006을 1회 정맥주사 후 얻어진 혈장에서의 분석시 Figure 2에 나타난 바와 같이 성별에 관계없이 10-11분대에 피크가 나타났다. 이 피크는 blank plasma와 비교했을 때 나타나는 유일한 피크며 시간에 따라 피크면적이 유일하게 감소하는 양상을 보여주고 있다(Figure 3).

**KHPC-002 및 KHPC-006의 대사체 분석**

HPLC상에서 분리한 주 대사물의 구조를 확인하기 위하여 이동상 용매 조성중 phosphate와 heptane sulfonate 등의 adduction으로 GC-MASS와 LC-MASS

등의 분석과 열에 의한 분자구조의 파괴로 인해 정확한 분자량을 확인하기가 불가능하므로 이동상 용매 조건을 MeOH:H<sub>2</sub>O의 비율을 3:7로 바꿔 HPLC에서 분리되는 대사체 피크를 수집한 뒤 40°C 이하에서 진공으로 농축하여 100% MeOH에 용해한 시료를 MALDI로 분석하였다. Figure 4에서 나타난 바와 같이 성별에 관계없이 KHPC-002(M.W. 832)와 KHPC-006(M.W. 832) 모두 분자량이 708인 것으로 분석되었는데 이 구조는 KHPC-002 및 KHPC-006을 수용성화하기 위해 결합한 2분자의 질산염이 떨어져 나간 것으로 확인되었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 KHPC-002와 KHPC-006은 혈중에서 2분자의 질산염이 떨어져 나간 화학구

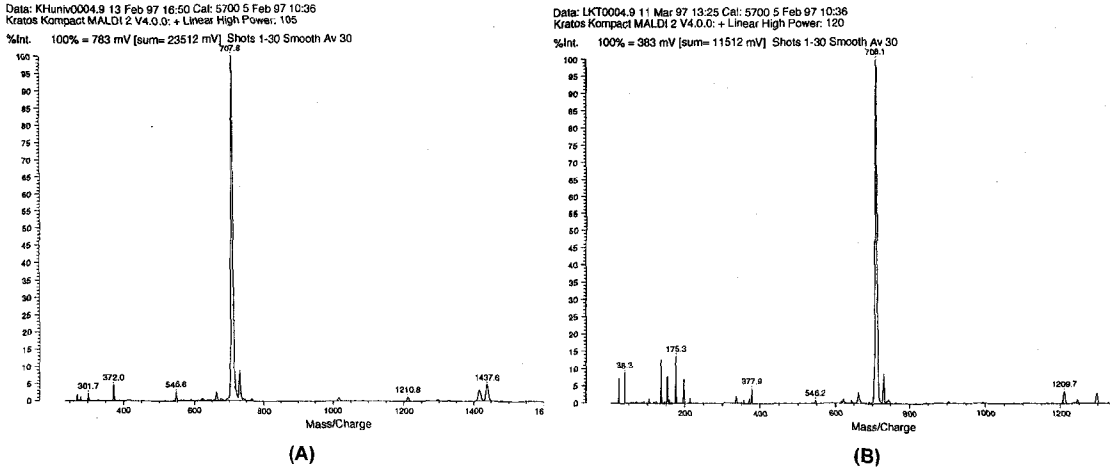


Figure 4—MALDI spectrum of KHPC-002 and KHPC-006 metabolite in male rat. Key: (A); KHPC-002, (B); KHPC-006

조로 혈중내 주 화합물로 존재한다고 사료된다.

### 감사의 말씀

이 논문의 일부는 보건복지부 주관 '97 보건의료기술 연구개발사업과 1998년 경약장학금에 의해 연구되었으며 이에 감사드립니다.

### 문헌

- 1) A.G. Gilman, T.W. Rall, A.S. Nies and P. Taylor, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed., McGraw-Hill, U.S.A. (1996).
- 2) B. Rosenberg, L. Van Camp and T. Krigas, Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode, *Nature*, **205**, 698-699 (1965).
- 3) B. Rosenberg, L. Van Camp, J.E. Trosko and V. H. Mansour, Platinum compounds: A new class of potent antitumor agents, *Nature*, **222**, 385-386 (1969).
- 4) J. Reedijk, A.T. Arcelis, J.H. Den Hartog, V. D. Marel and G. Wille, Interaction of platinum compounds with short oligodeoxynucleotides containing guanine and cytosine, *Eur. J. Biochem.*, **135**, 343-349 (1983).

- 5) B. Rosenberg, Fundamental studies with cisplatin, *Cancer*, **55**, 2303-2316 (1985).
- 6) S.E. Sherman, D. Gibson, A.H.J. Wang and S.J. Lippard, X-ray structure of the major adduct of the anticancer drug cisplatin with DNA, *Science*, **230**, 412-417 (1985).
- 7) A. Eastman, International cross-links and sequence specificity in the reaction of cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA, *Biochemistry*, **24**, 5027-5032 (1985).
- 8) J. Respondek and J. Engel, Organometallics in medicine, *Drugs of the future*, **21**, 391-408 (1996).
- 9) 손연수, 백금착물 항암제의 개발현황, *화학세계*, **36**, 16-19 (1996).
- 10) N.D. Tinker, H.L. Sharma and C.A. McAuliffe, Qualitative investigation, both *in vivo* and *in vitro*, of the metabolites formed by cisplatin and paraplatin involving high performance liquid chromatography analysis: In "Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy" by M. Nicolini (Ed.), Martinus Nijhoff Publishing, Boston, U.S.A., pp. 144-159 (1987).