

Flavin mononucleotide 를 탈리기로한 백금 (II) 착체의 합성과 그 항암활성

권영이* · 황규자

숙명여자대학교 약학대학

(Received May 24, 1999)

Synthesis of Pt(II) Complexes containing Flavin mononucleotide as Leaving Ligand and their Anticancer Activity

Y. E. Kwon* and K. J. Whang

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

Abstract—A series of vitamin-containing Pt(II) complexes of the type [Pt (FMN) (L)] (FMN=flavin mononucleotide, L=ethylenediamine, 1,3-propanediamine, 1,4-butenediamine) was synthesized and characterized by IR, electronic absorption, elemental analysis and FAB-Mass. The coordination sites of FMN to Pt(II) ions were determined to be N(5) and O(6) with resultant chelate ring formation. These compounds have much better water solubility (30-35 mg/ml) than cisplatin (1 mg/ml). The anticancer activity of this vitamin-containing Pt(II) series was investigated by MTT assay against mouse and human leukemia cell lines in vitro. Among these compounds, FMN (1,4-butenediamine) Pt(II) having seven-membered ring structure as amine ligand showed moderate anticancer activity.

Keywords □ Water-soluble Pt(II) complex, vitamin, anticancer activity, cisplatin.

시스플라틴 *cis*-Diaminedichloroplatinum(II), cisplatin)¹⁻²⁾ (1)은 1972년에 소개되어 현재까지 임상적으로 쓰이고 있는 항암제로써 기존의 다른 항암제로는 치료가 어려웠던 전립선암에서 탁월한 치료효과를 나타내고 있으며, 난소암, 방광암등의 고형암에 뛰어난 치료효과를 보여주었다³⁻⁶⁾. 시스플라틴은 단독으로 사용되기도 하지만 doxorubicin, etoposide, bleomycin, 5-fluorouracil 등의 다른 항암제들과 병용요법을 사용하여 두경부암, 폐암, 위암등의 치료에 광범위하게 이용되고 있다⁷⁻⁸⁾.

그러나 시스플라틴 (1)은 다음의 몇가지 문제점들로 인하여 임상에서 제한된 경우에만 사용되고 있다. 첫째, 치료받는 환자의 20%정도에서 심각한 부작용인 신독성 및 오심, 구토, 난청, 신경독성등을 일으키며⁹⁻¹⁰⁾

둘째, 항암작용이 광범위하지 못하여 유방암이나 직장암등 몇몇 암에 대하여 낮은 치료효과를 나타내고¹¹⁾ 셋째, 시스플라틴내성 종양 세포의 발현과^{12,13)} 넷째, 낮은 수용성등의 문제점들이 있다. 이러한 시스플라틴의 문제점들을 극복하기 위하여 수많은 유도체들이 개발되어^{14,15)} 항암활성을 검토하던 중 *cis*-diamine (1,1-cyclobutane-dicarboxylato) platinum (II) (carboplatin) (2)이 제2세대 백금착체로 개발된후 상품화되어 현재 임상에서 사용되고 있다. 카보플라틴은 시스플라틴의 leaving group이 1,1-cyclobutanedicarboxylato로 치환된 화합물로 (Fig. 1) 신독성이나 오심등의 부작용이 시스

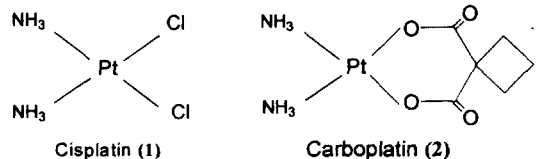


Fig. 1 - Structures of cisplatin and carboplatin.

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-710-9571 (팩스) 02-715-9498

플라틴보다 적고,^{16,17} 수용성이 좋으며, 난소암, 소세포 폐암등의 몇종류의 암에서 시스플라틴과 비슷한 효과를 나타내어 우수한 항암제로 인정되었다.^{18,19} 그러나 여전히 좁은 항암스펙트럼¹⁸과 시스플라틴과의 교차내성발현으로 시스플라틴에 내성이 있는 암세포에 적용하지 못하는 문제점을 나타내었다.^{20,21} 수용성 비타민 중의 하나인 리보플라빈(VB₁₂, riboflavin)이 항암활성을 나타내는 것으로 오래전 보고된²² 이후, 리보플라빈의 부족으로 발암위험성이 훨씬 증가하는 것으로 알려졌으며²³ 리보플라빈의 투여로 종양이 줄어드는 것을 발견하였고²⁴ carcinogen-DNA binding에도 영향을 미치는 것으로 보고되었다.²⁵⁻²⁶ 백금착체에도 이 수용성 비타민을 결합시켜 합성한 것이 Noji 등에 의하여 보고되었다.²⁷ 또한 vinca alkaloids와 리보플라빈을 여러 약물에 내성이 있는 암세포에 집중하여 세포증식 억제효과를 검토하였더니 광과민현상이 일어나면서 암세포증식에 상당히 좋은 효과가 있는 것으로 연구되었다.²⁸ 수용성이 좋으며 항암활성도 뛰어나다면 매우 이상적인 항암제가 될 수 있으므로 새로운 효과적인 항암제를 도출해내기 위하여 탈리기로 flavin mononucleotide(이하 FMN)를 도입하기로 하였다. 리보플라빈이 항암활성이 있다는 것이 보고되어 이를 탈리기로한 백금착체를 합성하였으니²⁹ 낮은 항암활성을 보였으므로 리보플라빈의 보조소이며 생체내 활성형인 FMN을 이용하기로 하였다. 아울러 많이 사용되고있는 아민배위자인 ethylenediamine이 5원환이므로 이것과 환의 크기에 따른 항암활성의 변화를 관찰하기 위하여 6원환, 7원환을 이루는 1,3-propanediamine, 1,4-butanediamine을 이용하기로 하였다. 수용성이 좋은 백금착체는 합성도 어려울 뿐만 아니라 합성된 것을 순수하게 분리하는 것도 어려운 작업이다. 이에 항암활성이 있으면서 수용성을 가진 백금착체의 합성에 성공하였으므로 보고하고자한다.

실험방법

시약 및 기기 - 대부분의 시약은 Aldrich Chemical Co., Sigma Co., Fluka Chemica 등에서 특급 및 일급시약을 구입하여 사용하였다. 가스류는 동아특수가사에서 구입하여 사용하였다. 합성후 물질확인에 사용된 기기로 IR은 Jasco FT/IR-430 분광광도계로 측정하였으며 ¹H-NMR은 Bruker(DPX300), JNM-GCX-

400 분광광도계를 이용하였다. Mass는 Hewlett-Packard 5890-JMS AX 505WA를 사용하여 이온모드를 FAB+ 또는 FAB-로 측정하여 m/z로 나타내었으며 매트릭스로 글리세롤과 물을 사용하였다. 박층크로마토그래피는 RP-18F_{254S}를 사용하였으며, 중압액체크로마토그래피는 column으로 Yamazen#15를, 펌프로 FMI LAP Pump Model QSY를 사용하였고 고정상으로 C₁₈실리카겔을 사용하였다. 원소분석은 Carlo Erba instruments EA-1108사용하였고, UV는 Pharmacia U-4000을 사용하였다. 항암활성실험에 사용한 암세포주는 부유세포로서 HL60, L1210 세포주들이며, 한국세포주은행에서 냉동세포를 분양받아 배양하여 사용하였다. RPMI 1640배지, penicillinstreptomycin 1000 unit/ml, fetal bovin serum(이하 FBS), phosphate buffer saline(이하 PBS)는 Gibco에서 구입하였다. 세포수 계수는 hemacytometer를 이용하여 광학현미경(olympus CK2)으로 관찰하여 실시하였고 ELISA plate reader는 Dynatech MR5000을 사용하였다.

백금착체의 합성

cis-Diiodoethanediamine Pt(II) complex [5I] (9) - K₂PtCl₄ 5 g(12 mM)을 물 150 ml에 녹이고 KI 12 g(72.5 mM)을 물 50 ml에 따로 녹여 합하여 실온에서 30분 반응시켜 K₂PtI₄ 용액을 만들고, ethylenediamine 0.721 g(12 mM)을 물 10 ml에 녹여 K₂PtI₄ 용액에 가한 후 1시간 반응시켰다. 여과후 침전을 취하여 물, 에탄올로 세척하고 50°C에서 감압건조하여 황갈색의 침전 5.3 g을 얻었다. 이 침전을 0.25 mM KI 용액으로 재결정하여 밝은 오렌지색의 결정성 침전 (9) 4.95 g을 얻었다(Scheme 1).

수득률 : 81.1%

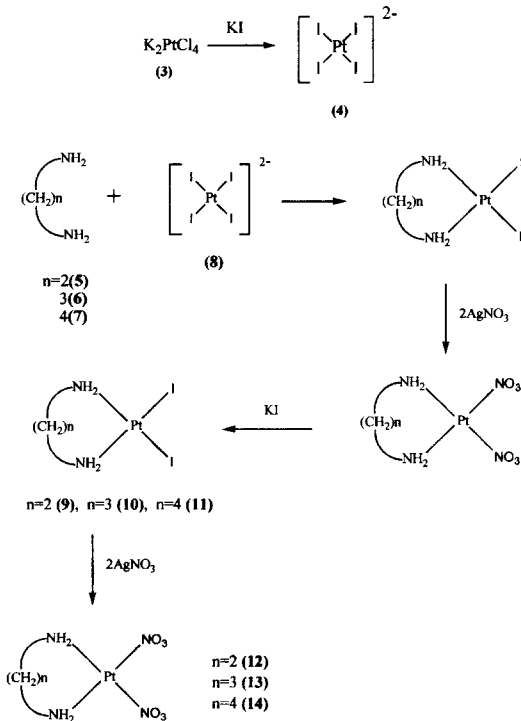
IR (KBr, cm⁻¹) : 3250, 1530, 1490, 860

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) : 6.1~5.9(4H, m), 2.5 (4H, m)

Elemental Anal.: Calcd. for C₂H₈N₂I₂Pt-C; 4.72%, H; 1.57%, N; 5.5%

Found. C; 4.79%, H; 1.54%, N; 5.44%

Flavin mononucleotide (ethylenediamine) Pt(II) complex [5FMN] (16) - 차광한 용기에 5I 9.2 g(3.93 mM)을 취하고 아세트론 5 ml, 물 100 ml를 가하여 현탁시켰다. 따로 질산은 1.31 g(7.7 mM, 0.98 eq.)을 물 50 ml에 녹여 합하고, 60°C에서 3시간 반응



Scheme 1 – Synthesis of dinitrato-platinum(II) complexes.

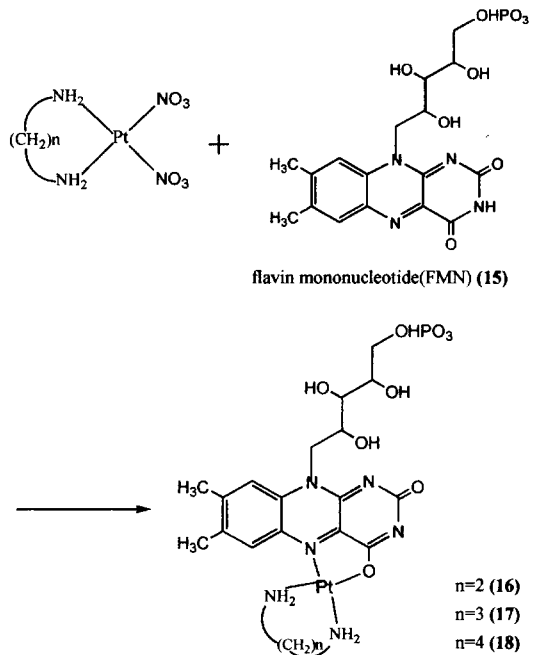
시킨후 pore size의 지름이 0.2 μm인 멤브레인 필터로 여과하여 여액을 취하였다. 따로 차광한 용기에 flavin mononucleotide 1.842 g(3.85 mM)을 물 50 ml에 녹여 취하여둔 여액과 합하여 공기를 질소가스로 치환하고 상온에서 5일간 반응시켰다. 이때 용액의 색깔은 형광오렌지색에서 점차적으로 적황색으로 변하였다. 반응후 0.2 μm 멤브레인 필터로 여과하고 여액을 20 ml 정도로 감압농축하여 중압액체컬럼크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 고정상으로 역상컬럼크로마토그래피용 옥타데실 실리카겔을 사용하였고 이동상으로는 에탄올과 물의 비를 4:5로 하였다. 분리된 용액을 10 ml정도로 감압농축하여 95% 에탄올에 한방울씩 떨어뜨려 침전을 생성시켰다. -20°C에서 2시간 방치후 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 침전을 취하고 에탄올로 세척후 40°C에서 감압건조하여 밝은 적황색의 침전 1.86 g을 얻었다(Scheme 2).

수득률 : 65.4%

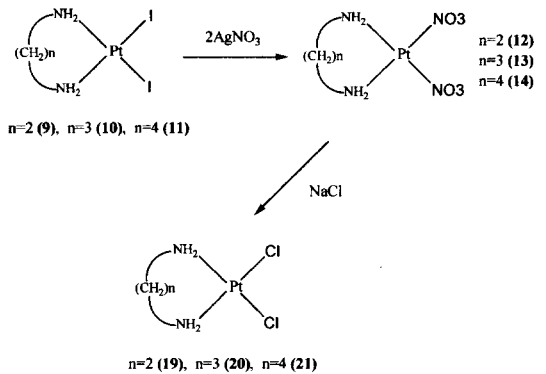
UV-VIS (H₂O, 5×10⁻⁵M) λ_{max} (ε) : 456 (300), 367 (300), 275 (845), 220 (1440) nm

IR (KBr, cm⁻¹) : 3220, 1597, 1542 1383 1052, 512

MS (FAB-, m/z) : 493, 471, 360, 338, 246, 183,



Scheme 2 – Synthesis of water-soluble Pt(II) complexes containing FMN.



Scheme 3 – Synthesis of Pt(II) complexes with leaving ligand as chlorine.

154, 147, 62, 59

Anal. Calcd. for C₁₉H₂₇N₆O₆Ppt · NO₃ · 2H₂O

C; 29.67%, H; 4.03%, N; 10.93%

Found. C; 29.77%, H; 4.13%, N; 11.02%

cis-Diiodo-1,3-propanediamine Pt(II) complex

[6I] (10) – K₂PtCl₄ 5 g(12 mM)을 물 150 ml에 녹이고 KI 12 g(72.5 mM)을 물 50 ml에 따로 녹여 합하여 실온에서 30분 반응시켜 K₂PtI₄ 용액을 만들고, 1,3-propanediamine 0.89 g(12 mM)을 취하여 물 50 ml에 녹이고 이하 5I 9와 동일한 방법으로 합성하여

미황색의 침전 **10** 5.30 g을 얻었다.

수득률 : 84.48%

IR (KBr, cm^{-1}) : 3230, 1540, 1490, 860

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : 4.9-4.7 (4H, m), 2.2 (2H, m), 1.9-1.8 (2H, m), 1.2 (2H, m)

Anal.: Calcd. for $\text{C}_3\text{H}_{10}\text{N}_2\text{I}_2\text{Pt-C}$; 6.89%, H; 1.91%, N; 5.36%

Found. C; 6.82%, H; 1.84%, N; 5.34%

Flavin mononucleotide (1,3-propanediamine) Pt (II) complex [6FMN] (17) - 차광한 용기에 **6I (10)** 2.05 g(3.93 mM)을 취하여 이하 **5FMN 16**와 동일한 방법으로 합성하여 적황색의 침전 **17** 1.57 g을 얻었다.

수득률 : 50.92%

UV-VIS (H_2O , $5 \times 10^{-5}\text{M}$) $\lambda_{\text{max}}(\epsilon)$: 450 (502), 366 (508), 273 (1580), 220 (1570) nm

IR (KBr, cm^{-1}) : 3400, 3227, 1582, 1539, 1384, 508

MS (FAB+, m/z) : 803, 725, 627, 510, 474, 347, 243, 185, 75, 45

Anal. Calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_6\text{Ppt} \cdot \text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

C; 29.98%, H; 4.12%, N; 12.24%

Found. C; 29.87%, H; 4.13%, N; 12.16%

cis-Diiodo-1,4-butanediamine Pt(II) complex [7I] (11) - 차광한 용기에 K_2PtCl_4 10 g(24 mM)을 취하여 물 250 ml에 녹이고 KI 24 g(145 mM)을 물 50 ml에 따로 녹여 합하여 실온에서 30분 교반하여 K_2PtI_4 용액을 만든후 0°C 에서 냉각시켰다. (가 용액) 별도로 1,4-butanediamine 2.12 g(24 mM)을 물 300 ml에 녹였다. (나 용액) 차광한 용기에 물 800 ml를 취하여 60°C 에서 질소가스를 통과시키며 가 용액과 나 용액을 이 용기에 번갈아 점적하며 교반하였다. 이때 부반응물을 최소한으로 억제하기 위하여 일정한 속도로 지속적으로 점적하여 가하였다. 약 3시간후 점적이 완료되어 1시간 더 교반하였다. 용액을 차게 식혀 여과하고 침전을 취하여 물, 에탄올로 세척한후 60°C 에서 감압건조하여 황갈색의 침전 11.56 g을 얻었다. 이 침전을 정제하기 위하여 11.3 g (21 mM)을 취하여 아세톤 10 ml, 물 200 ml에 현탁시키고 질산은 6.78 g (39.91 mM, 0.95 eq.)을 가하여 60°C 에서 3시간 반응시킨후 0.2 μm 멤브레인 필터로 여과하여 여액을 취하였다. 이 여액에 KI 20 g을 가하여 1시간 실온에서 교반후 생성된 침전을 여과하여 취하고 물, 에탄올로

세척후 60°C 에서 감압건조하여 밝은 황색의 결정성 침전 **11** 7.5 g을 얻었다.

수득률 : 66.4%

IR (KBr, cm^{-1}) : 3205, 2928, 1591, 1183

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : 4.9 (4H, m), 2.25 (4H, m), 1.4 (4H, m)

Anal.: Calcd. for $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{I}_2\text{Pt-C}$; 8.94%, H; 2.24%, N; 5.22%

Found. C; 8.90%, H; 2.2%, N; 5.24%

Flavin mononucleotide (1,4-butanediamine) Pt (II) complex [7FMN] (18) - 차광한 용기에 **11** 2.11 g (3.93 mM)을 취하여 이하 **5FMN 16**과 동일한 방법으로 합성하여 적황색의 침전 **18** 1.58 g을 얻었다.

수득률 : 50.37%

UV-VIS (H_2O , $5 \times 10^{-5}\text{M}$) $\lambda_{\text{max}}(\epsilon)$: 450 (480), 370 (490), 273 (1410), 220 (1300)nm

IR (KBr, cm^{-1}) : 3383, 3220, 1580, 1541, 1354, 600

MS (FAB-, m/z) : 591, 535, 455, 241, 183, 139, 79, 59, 42

Anal. Calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_6\text{Ppt} \cdot \text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

C; 30.94%, H; 4.54%, N; 12.03%

Found. C; 30.97%, H; 4.50%, N; 12.11%

cis-Dichloroethanediamine Pt(II) complex [5CI] (19) - 차광한 용기에 **9** 0.2 g (0.393 mM)을 취하고 아세톤 1 ml, 물 30 ml를 가하여 현탁시켰다. 따로 질산은 0.131 g (0.77 mM, 0.98 eq.)을 물 10 ml에 녹여 합한다. 60°C 에서 2시간 반응시킨후 0.2 μm 멤브레인 필터로 여과하여 여액을 취하였다. 여액에 염화나트륨 0.2 g을 가하여 2시간 교반후 생성되는 침전을 여과하여 물, 에탄올로 세척하고 60°C 에서 감압건조하여 밝은 오렌지색의 침전 **19** 0.115 g을 얻었다.

수득률 : 89.79%

IR (KBr, cm^{-1}) : 3200, 1590, 1153, 508

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : 5.3 (4H, m), 2.2-2.5 (4H, m)

Anal.: Calcd. for $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2\text{Cl}_2\text{Pt-C}$; 7.36%, H; 2.45%, N; 8.59%

Found. C; 7.36%, H; 2.44%, N; 8.57%

cis-Dichloro-1,3-propanediamine Pt(II) complex [6CI] (20) - 차광한 용기에 **10** 0.205 g (0.393 mM)을

취하고 이하 5Cl **19** 동일한 방법으로 합성하여 미황색의 침전 0.12 g **20**을 얻었다.

수득률 : 89.8%

IR (KBr, cm^{-1}) : 3220, 1525, 1189, 509

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : 4.9 (4H, m), 2.3-2.5 (4H, m), 1.5 (2H, m)

Anal.: Calcd. for $\text{C}_3\text{H}_{10}\text{N}_2\text{Cl}_2\text{Pt-C}$; 10.59%, H; 2.94%, N; 4.12%

Found. C; 10.51%, H; 2.87%, N; 4.11%

cis-Dichloro-1,4-butanediamine Pt(II) complex [7Cl] (21) - 차광한 용기에 **11** 6 g (11.18 mM)을 취하고 이하 5Cl **19**과 동일한 방법으로 합성하여 미황색의 침전 3.4 g **21**을 얻었다.

수득률 : 87.3%

IR (KBr, cm^{-1}) : 3225, 1579, 1156, 508

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : 4.9 (4H, m), 2.5-2.7 (4H, m), 1.8~2.0 (4H, m)

Anal.: Calcd. for $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{Cl}_2\text{Pt-C}$; 13.56%, H; 3.39%, N; 7.91%

Found. C; 13.51%, H; 3.34%, N; 7.85%

MTT를 이용한 항암활성 분석

세포배양 - RPMI 1640 배지에 1% penicillin-streptomycin(10,000 unit/ml), 10% FBS의 농도로 조제하여 37°C, 5% CO_2 존재하에 2-3일 간격으로 세포수 2×10^5 개- 5×10^5 개/ml 정도로 계대 배양하였다.

시약 및 약물조제 - 약물은 합성한 백금착체들로서 PBS를 가하여 각각 2 mM의 농도가 되도록 조제하고 0.2 μm syringe filter로 여과하여 무균 상태로 만들어 세포주에 접촉하기 직전에 배지로 계열 희석하여 각각의 해당농도로 조제하였다. MTT시약은 PBS에 녹여 0.2 μm syringe filter로 여과하여 무균 상태로 만들어 사용하였다.

실험방법 - HL60, L1210 세포주를 각각 96-well plate에 10^4 개/well 이 되도록 취하고 37°C, 5% CO_2 존재하에 30분간 안정화시켜 합성한 백금착체들을 각각 1 m^2 당 10^{-4}M - 10^{-7}M 의 농도로 조제하여 100 μL 씩 가하였다. HL60 세포주는 37°C, 5% CO_2 존재하에 72시간 배양후, L1210 세포주는 48시간 배양후에 MTT시약(2 mg/1 ml) 50 μL /well씩 가하여 주고 37°C, 5% CO_2 존재하에 4시간 배양한 다음 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액 170 μL /well씩 제거하였다.

DMSO 150 μL /well씩 가하여 40°C, 30분간 방치후 3분간 흔들어주고 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 같은 조건으로 동일한 96 well plate에서 공시험하여 보정하였다. 이 실험은 각 농도별로 3개 이상의 well에 동일 시행하고 동일실험을 3회 이상 반복하였다.

실험결과 및 고찰

합성 - 아민 배위자를 K_2PtI_4 와 물에서 반응시켜 *cis*-diiodo-Pt(II) complex를 우선 만들고 수용성 비타민과 반응시켰다. 이때 5원환 **9**, 6원환 **10**을 이루는 ethylenediamine, 1,3-propanediamine과 K_2PtI_4 의 반응은 실온에서 1시간동안 두 수용액을 합하여 반응시킨후 0.1 M KI 용액으로 재결정하여 중간체인 요오드 백금착체를 얻었다. 7원환 **11**을 이루는 1,4-butanediamine과 K_2PtI_4 의 반응은 5원환 **9**이나 6원환 **10**과는 달리 아민과 백금과의 킬레이트효과가 적어 두 수용액을 같이 한꺼번에 반응시키면 합성이 되지 않고 1,4-butanediamine수용액과 K_2PtI_4 수용액을 각각 같은 용량으로 준비하여 5배 가량의 물속으로 서서히 한방울씩 점적하면서 반응시켜야만 합성이 가능하였다. 그 이유는 부반응을 최소화하기 위함이었다. 이렇게 합성한 요오드 화합물도 순수하지 않기 때문에 이를 정제하기 위하여 요오드 화합물에 질산은을 0.98당량 가하여 반응시켜 수화물을 만든후 KI를 가하여 다시 요오드 화합물 **11**로 하였다. 이렇게 반응시켜 얻은 각각의 요오드백금착체는 5원환 **9**과 6원환 **10**의 경우 수득율이 80%이상으로 좋은 편이었으나 7원환 **11**의 경우는 수득율이 약 66%정도였다. 각각의 적외선 스펙트럼은 아민의 N-H 신축진동이 3200 cm^{-1} 부근에서 넓게 나타났다. 핵자기공명스펙트럼은 용매로 $\text{DMSO-}d_6$ 를 사용하였고 아민의 질소에 결합된 수소는 저자장쪽인 5~6 ppm 정도에서 나타났으며, 아민과 멀리 떨어져 위치한 수소일수록 차례로 고자장쪽에서(2.5, 2.2, 1.8, 1.2 ppm) 나타났다. 원소분석결과는 탄소, 수소, 질소 원자의 각 분자에 대한 비율이 이론치와 실험치가 거의 일치하였다. 이렇게 합성한 각각의 diiodo-ethylenediamine Pt(II) complex **9**, diiodo-1,3-propanediamine Pt(II) complex **10**, diiodo-1,4-butanediamine Pt(II) complex **11**에 질산은 0.98 당량을 가하여 침전인 AgI를 제거하고, 수용액상태인 dinitra-

toethylenediamine Pt(II) complex **12**, dinitrato-1,3-propanediamine Pt(II) complex **13**, dinitrato-1,4-butanediamine Pt(II) complex **14**을 만들어 FMN **15**과 실온에서 5일간 반응시켰다. 반응이 진행되는 동안 반응액의 색깔은 밝은 형광 노란색에서 주황색을 거쳐 점차적으로 적색으로 변하였다. 각각의 Rf치는 FMN 백금착체 **16**, **17**, **18**의 경우는 0.28에서 나타났다. 합성된 백금착체에서는 FMN **15**에서 보이는 형광성이 없어졌다. 적외선 스펙트럼으로 관찰한 결과 FMN **15**에 있는 2개의 카보닐기(C=O)는 1700 cm⁻¹부근과 1600 cm⁻¹부근에서 나타났으나 합성된 백금착체는 1700 cm⁻¹부근의 C=O 흡수는 사라지고 1600 cm⁻¹부근의 C=O 흡수만 보여주었다. 이 정보로 C(4)에서의 카보닐기가 엔올형태(enol form)로 바뀌어 Pt-O(4)의 결합이 이루어졌음을 추정할 수 있었다. 가시광선에서의 흡수를 조사한 결과 FMN **15**이 374 nm부근에서 중간정도의 흡수를 나타내고 445 nm에서 최대 흡수를 나타내는 것에 비하여 각각의 백금착체들은 366 nm와 450 nm에서 최대흡수를 나타내었다. 원소분석은 이론치와 실험치가 거의 같은 수치로 나타났다. 질량분석은 용매로 물과 글리세롤을 사용하여 이온모드를 FAB+ 또는 FAB-로 하여 분석한 결과 각 분자들의 질량과 각 분자들의 fragment들에 대한 정보로 합성이 성공적으로 이루어졌음을 알 수 있었다. 합성된 각각의 백금착체에 대한 수용성을 측정된 결과 물 1 ml에 대하여 약 30 mg정도(25°C)가 녹았다. 이는 시스플라틴의 용해도(1 mg/ml, 37°C)에 비하여 약 30배 정도 높았다(Fig. 2).

항암활성 - 탈리기로서 FMN을, 아민 배위자로 ethylenediamine을 사용한 5원환 구조 **16**, 1,3-propane-

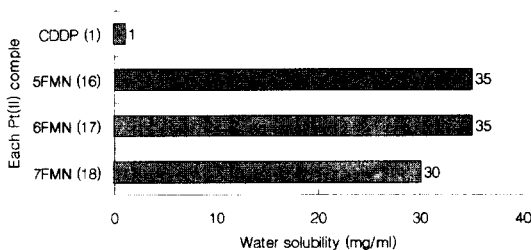


Fig. 2 - Water solubility of FMN-containing Pt(II) complexes. CDDP **1**: cisplatin, 5FMN **16**: flavin mononucleotide (ethylenediamine), Pt(II) complex, 6FMN **17**: flavin mononucleotide (1,3-propanediamine) Pt(II) complex, 7FMN **18**: flavin mononucleotide (1,4-butanediamine) Pt(II) complex

diamine을 사용한 6원환 구조 **17**, 1,4-butanediamine인 7원환구조 **18** 각각의 백금(II)착체들에 대한 항암활성 검색을 사람과 마우스의 백혈세포인 HL60와 L1210을 실시하였다. 이미 저자등에 의하여 보고된 바 있는 리보플라빈을 탈리기로한 백금착체의 경우²⁹⁾ 항암활성이 7원환 백금착체가 5, 6원환보다 조금 좋은 편이었으나 그다지 현저한 차이는 보이지 않았고 대체적으로 항암제로 개발될수 있을 정도의 항암활성은 나타내지 않았다(Fig. 3). 그러나 리보플라빈 보호소형태인 FMN이 탈리기로 도입된 7원환 백금착체 7FMN **18**의 IC₅₀는 13.46 μM/m² 시스플라틴보다는 약 6배 정도 높아서 항암활성이 상대적으로 떨어지지만, 제 2세대 백금착체로서 현재 임상에서 쓰이고 있는 카보플라틴의 IC₅₀가 일반적인 암세포주에서 시스플라틴의 10배 정도인 것에 비한다면³⁰⁾ 비교적 높은 수치인 것으로 나타났다. 리보플라빈, FMN, 염소기를 탈리기로한 각각의 백금착체에 대한 IC₅₀를 Table I에 나타내었다. FMN이 탈리기로 있는 백금착체는 수용성이 매우 좋은 편이므로 상당히 흥미로운 것으로 사려된다. 7원환 구조는 지금까지 밝혀진 백금착체의 작용기전인 DNA의 guanine N-7과 결합하여 복제할수 없도록 하는 작용외에도 분자 구조로 인하여 DNA이중나선 구조를 많이 변형시켜 세포증식에 더 많은 장애를 가져다 주는 것으로 추정된다. 7원환 구조의 백금착체가 항암활성이 월등히 좋다고 보고되어 있지만³¹⁻³²⁾ 리보플라빈이 탈리기로 사용된 경우는 환의 크기변화에 따르는 항암활성의 현저한 차이를 보이지 않았기 때문에²⁹⁾ 이를 다시 뒷받침하기 위하여 탈리기로 염소배위자를 사용하여 백금착체를 합성하여 항암활성을 검색해본 결과 사람이나 마우스의 백혈암 세포주에서 5원환 **19**이 6원환 **20**보다 약간 항암활성이 좋았고, 7원환 **21**은 매우 항암활성이 뛰어난 것으로 나타났다. 탈리의 구조변화로 인하여 수용성이나 항암활성에 영향을 미치는 것을 볼 때 수용성이 매우 좋은 리보플라빈 백금착체는²⁹⁾ 상대적으로 지용성이 낮아 지질막으로 이루어진 세포막으로의 침투가 잘되지 않아 환의 구조변화에 따른 항암활성의 차이가 적었을 것으로 추정할 수 있었다. 이에 비하여 FMN 백금착체는 비교적 구조-활성 상관관계가 명확한데 이것은 수용성이 좋으면서도 인산기에 의한 세포지질막과의 친화력증대가 원인일 것으로 추정된다. 염소 배위자는 물에는 잘 녹지 않으나 지질막과의 친화력이 매우 우수하므로 세포막내

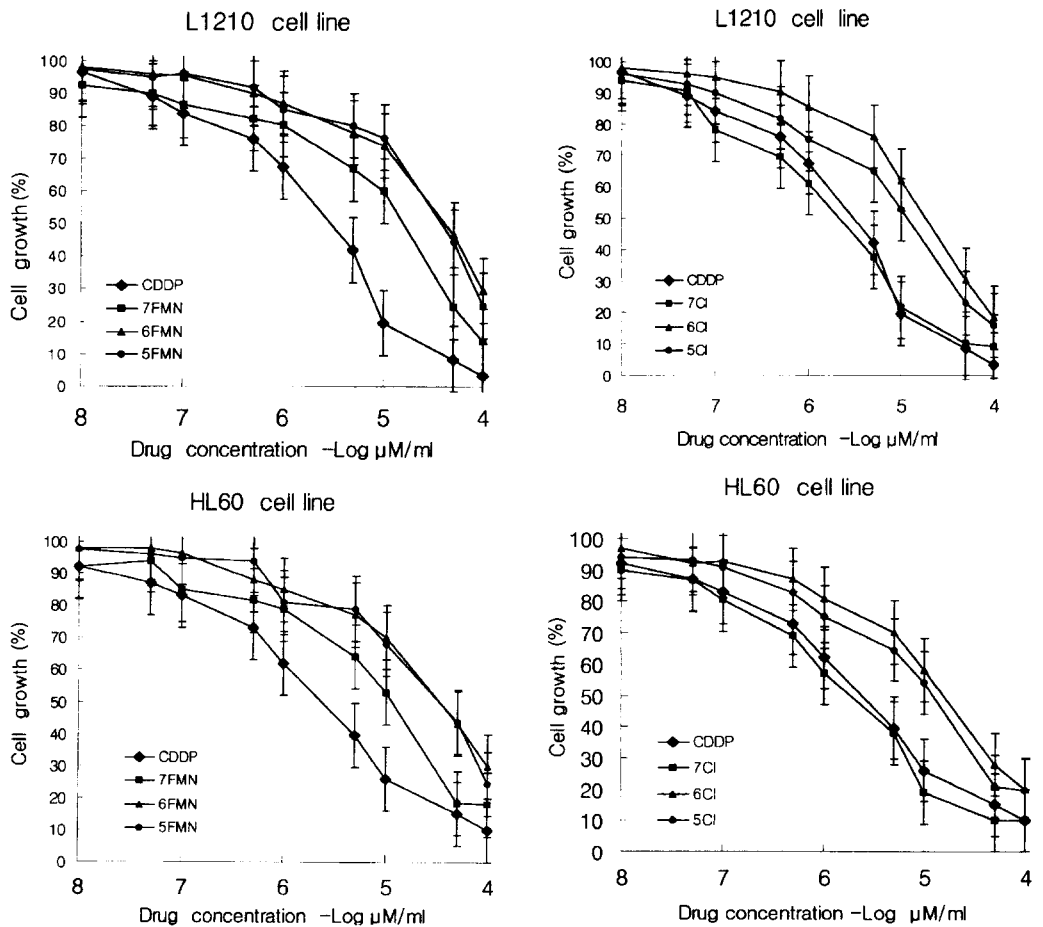


Fig. 3 – Anticancer activity of (FMN) Pt(II) complexes in cancer cell lines. CDDP : cis-diaminedichloroplatinum(II) (cisplatin) **1**, 5FMN: flavin mononucleotide (ethylenediamine) Pt(II) complex **16**, 6FMN: flavin mononucleotide (1,3-propanediamine), Pt(II) complex **17**, 7FMN: flavin mononucleotide (1,4-butanediamine) Pt(II) complex **18** 5Cl: *cis*-dichloroethanediamine Pt(II) complex **19**, 6Cl: *cis*-dichloro-1,3-propanediamine, Pt(II) complex **20**, 7Cl: *cis*-dichloro-1,4-butanediamine Pt (II) complex **21**

로의 침투가 더욱 용이하여 환의 구조변화에 따른 민감한 항암활성의 차이를 보였을 것으로 추정하였다.

결론

리보플라빈 보조소인 FMN을 탈리기로하고, 아민배위자로 ethylenediamine, 1,3-propanediamine, 1,4-butanediamine을 이용하여 각각 5원환 **16**, 6원환 **17**, 7원환 **18**의 백금착체를 합성하였고 이와 비교하기 위하여 염소기를 탈리기로한 백금착체들을 합성하였다. FMN 백금착체들은 시스플라틴의 문제점들중의 하나인 물에 대한 난용성을 해결한 백금착체로서 시스플라

틴에 비하여 용해도가 30~35배정도로 좋은 수용성을 보여주었다. 항암제는 생체내 투여시 주사제 형태로 투여되므로 시스플라틴처럼 난용성인 화합물은 생체투여에 많은 어려움을 겪지만 수용성이 좋은 본 백금착체는 생체투여가 용이할 것으로 판단된다. 사람과 마우스의 백혈암 세포주인 HL60와 L1210세포주에서 시스플라틴 **1**의 IC_{50} 는 각각 2.74, 2.86 $\mu\text{M}/\text{m}$ 인데 비하여 5FMN **16**은 32.64, 33.71 $\mu\text{M}/\text{m}$, 6FMN **17**은 32.64, 37.17 $\mu\text{M}/\text{m}$, 7FMN **18**은 11.2, 13.46 $\mu\text{M}/\text{m}$ 로서 7원환 **18**의 항암활성이 5원환 **16**이나 6원환 **17**의 항암활성보다 비교적 좋았다. 리보플라빈자체를 탈리기로한 백금착체의 경우 수용성이 지나치게 좋아서 상대적

Table I— IC₅₀ for L1210, HL60 cell lines

	L1210 (μM/ml)	HL60 (μM/ml)
CDDP (1)	2.86	2.74
7FMN (18)	13.46	11.2
6FMN (17)	37.17	32.64
5FMN (16)	33.71	29.15
7Rf ⁽²⁹⁾	49.62	38.66
6Rf ⁽²⁹⁾	64.37	51.06
5Rf ⁽²⁹⁾	51.37	42.42
7Cl (21)	2.01	1.83
6Cl (20)	19.26	16.05
5Cl (19)	11.04	11.7

IC₅₀ Values : 50% cell growth inhibition concentration of drugs
 CDDP : cis-diaminedichloroplatinum(II) (cisplatin) **1**, 5FMN flavin mononucleotide (ethylenediamine) Pt(II) complex **16**, 6FMN : flavin mononucleotide (1,3-propanediamine) Pt(II) complex **17**, 7FMN : flavin mononucleotide (1,4-butanediamine) Pt(II) complex **18**, 5Rf : riboflavin (ethylenediamine) Pt(II) complex, 6Rf : riboflavin (1,3-propanediamine) Pt(II) complex, 7Rf : riboflavin (1,4-butanediamine) Pt(II) complex, 5Cl : cis-dichloroethanediamine Pt(II) complex **19**, 6Cl : cis-dichloro-1,3-propanediamine Pt(II) complex **20**, 7Cl : cis-dichloro-1,4-butanediamine Pt(II) complex **21**

으로 지질막과의 친화도가 떨어져 환의 구조변화에 따르는 항암활성의 차이가 현저하지 않았다.²⁹⁾ 이것을 뒷받침하기 위하여 수용성이 좋아 지질막인 세포막내로의 침투가 비교적 용이한 염소배위자를 탈리기로한 기존의 알려진 5원환 **19**, 6원환 **20**, 7원환 **21**의 백금(II)착체를 합성하여 그 항암활성을 비교한 결과 7원환의 항암활성이 매우 좋은 것으로 나타나 구조-활성 상관 관계가 명확히 나타남을 알 수 있었다. FMN **15**을 탈리기로한 백금착체는 리보플라빈과 탈리 인산기를 가지고있어 세포막투과가 비교적 용이하여 구조-활성 상관 관계의 명백한 차이를 보여준 것으로 추정되며 이들 중 7FMN **18**의 경우 시스플라틴 **1**보다는 항암활성이 떨어지지만 수용성이 훨씬 좋은 것으로 나타났다. 또한 카보플라틴 **2**의 IC₅₀가 시스플라틴의 10배정도 되나³⁰⁾ 7FMN **18**의 IC₅₀는 약 6배정도로서 카보플라틴보다는 항암활성면에서 더 나올 수도 있으리라 생각된다. 그러나 이 실험치는 *in vitro*에서의 실험수치이므로 앞으로 *in vivo*에 대한 연구를 수행하여야만 정확한 결과가 밝혀질 수 있을 것이다.

문 헌

1) Rosenberg, B., VanCamp, L., Krigas, T. L. : Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis

products from a platinum electrode. *Nature* **205**, 698 (1965).
 2) Rosenberg, B., VanCamp, L., Trosko, J. E., Mansour, V. H. : Platinum Compounds : a New Class of Potent Antitumor Agents. *Nature* **222**, 385 (1969).
 3) Lippman, A. J., Helson, C., Krakoff, I. H. : Clinical trials of cis-Diamine dichloroplatinum (NSC-119875). *Cancer Chemother. Rep.* **57**, 191 (1973).
 4) Loehrer, P. J., Einhorn, L. H. : Drugs Five Years Later. Cisplatin. *Ann. Intern. Med.* **100**, 704 (1984).
 5) Ozols, R. F., Young, R. C. : Chemotherapy of Ovarian Cancer. *Semin. Oncol.* **11**, 251 (1984).
 6) Soloway, M. S. : cis-Diaminedichloroplatinum(II) (CD DP) in Advanced Bladder Cancer. *J. Urol.* **120**, 716 (1978).
 7) Fiorentino, M. V., Ghiotto, C. : Platinum, the Synergistic Drug; from Clinical Evidence to Laboratory Suggestions. In Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy; Nicolini, M., Ed.; *Martinus Nijhoff Publishing* : Boston, p.4155 (1988).
 8) Wagener, D. J., Yap, S. H., Wobbles, T., Burghouts, J., van Dam, F. E., Hillen, H. F., Hoogendoorn, G. J., Scheerder, H., van der Vegt, S. G. : Phase II Trial of 5-Fluorouracil, Adriamycin and Cisplatin (FAP) in Advanced Gastric Cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **15**, 86 (1985).
 9) Ward, J. M., Young, D. M., Fauvie, K. A., Wolpert, M. K., Davis, R., Guarno, A. M. : Comparative nephrotoxicity of platinum cancer chemotherapeutic agent. *Cancer Chemother. Rep.* **60**, 1675 (1976).
 10) Krakoff, I. H. : Nephrotoxicity of diammine-dichloroplatinum(II), *Cancer Treat. Rep.* **63**, 1523 (1979).
 11) Ishibiki, K., Kodaira, S., Abe, O., Yamamoto, K., Oochi, T., Fukaya, Y., Kimura, K., Takamatsu, K., Ootsuka, E., Sakabe, T., Nishiyama, T., Mishima, Y., Ogoshi, K., Mitomi, T. : Phase II Study with Cisplatin in Advanced Stomach and Colon Carcinoma. *Jpn. J. Cancer Chemother.* **16**, 3185 (1989).
 12) Ozols, R. F. : Pharmacologic Reversal of Drug Resistance in Ovarian Cancer. *Semin. Oncol.* **16**, 3185 (1989).
 13) Hong, W. S., Saijo, N., Sasaki, Y., Minato, K., Nakano, H., Nakagawa, K., Fujiwara, Y., Nomura, K. : Establishment and Characterization of Cisplatin-re-

- sistant Sublines of Human Lung Cancer Lines. *Int. J. Cancer* **41**, 462 (1988).
- 14) Burchenal, J. H., Kalaher, K., Dew, K., Lokys, L. : Rationale for Development of Platinum Analogs. *Cancer Treat. Rep.* **63**, 1493 (1979).
 - 15) Wilkinson, R., Cox, P. J., Jone, M., Harrap, K. R. : Selection of Potential Second Generation Platinum Compounds. *Biochimie*. **60**, 851 (1978).
 - 16) Calvert, A. H., Harland, S. J., Newell, D. R., Siddik, Z. H., Jones, A. C., McEwain, T. J., Raju, S., Wiltshaw, E., Smith, I. E., Baker, J. M., Peckham, M. J., Harrap, K. R. : Early Clinical Studies with *cis*-Diamine (1,1-cyclobutanedicarboxylato) Platinum (II). *Cancer Chemother. Pharmacol.* **9**, 140 (1982).
 - 17) Foster, B. J., Clagett-Carr, K., Leyland-Jones, B., Hoth, D. : Results of NCI-Sponsored Phase I Trials with Carboplatin. *Cancer Treat. Rev.* **12** (Suppl. A), 43 (1985)
 - 18) Carter, S. K., Canetta, R., Rozenzweig, M. : Carboplatin : Future Directions, *Cancer Treat. Rev.*, **12** (Suppl. A), 145 (1985).
 - 19) Harrap, K. R. : Preclinical Studies Identifying Carboplatin as Visible Cisplatin Alternative. *Cancer Treat. Rev.* **12** (Suppl. A), 21 (1985).
 - 20) Gore, M., Fryatt, I., Wiltshaw, E., Dawson, T., Robinson, B., Calvert, A. : Cisplatin/Carboplatin Cross-Resistance in Ovarian Cancer. *Br. J. Cancer* **60**, 767 (1989).
 - 21) Kikuchi, Y., Iwano, I., Miyauchi, M., Kita, T., Sugita, M. Tenjin, Y., Nagata, I. : Possible Mechanisms of Resistance to *cis*-Diamine (1,1-cyclobutanedicarboxylato) Platinum(II) of Human Ovarian Cancer Cells. *Jpn. J. Cancer Res.* **81**, 701 (1990).
 - 22) Kensler, G. I., Sugiura, K., Young, N. F. Halter, C. R. Rhodas, C. P. : Inhibition of induced tumors in mice by various vitamins. *Science* **93**, 308 (1941).
 - 23) Thurnham, D. I., Zheng, S. F., Munoz, N., Crespi, M., Grassi, A., Hambridge, M., Chai, T. F. : Comparison of riboflavin, Vitamine A and zinc status of Chinese populations at high and low risk for oesophageal cancer. *Nutrition and Cancer* **7**, 131 (1985).
 - 24) Bespalov, V. G., Troian, D. N., Petrov, A. S., Aleksandrov, V. A. : The effect of riboflavin, molybdenum, selenium and zinc on the development of induced tumors of esophagus and forestomach in rats. *Vopr. Onkol.* **36(5)**, 559 (1990).
 - 25) Pangekar, J., Krishnaswamy, K., Jagadeesan, V. : Effects of Riboflavin deficiency and Riboflavin administration on Carcinogen-DNA binding. *Chem. Toxic.* **31(10)**, 745 (1993).
 - 26) Lin, P., Zhang, J., Rong, Z., Han, R., Xu, S., Gao, R. Ding, Z., Wang, J., Feng, H., Cao, S. : Studies on medicamentous inhibitory therapy for esophageal precancerous lesions 3- and 5- year inhibitory effects of antitumor-B, retinamide and riboflavin. *Proc. Chin. Acad. Med. Sci. Peking Union Med. Coll.*, **5(3)**, 121 (1990).
 - 27) Suzuki, K., Noji, M., Tashiro, T. Kidani, Y. : Synthesis and Antitumor Activity of Riboflavin and Flavin Mononucleotide Pt(II) Complexes. *Chem. Pharm. Bull.* **36(5)**, 1895 (1988).
 - 28) Granzow, C. Kopun, M., Krober, T. : Riboflavin-mediated photosensitization of Vinca alkaloids distorts drug sensitivity assays. *Cancer Res.* **55(21)**, 4837 (1995).
 - 29) 권영이, 황규자 : 리보플라빈을 가진 수용성 백금(II) 착체의 합성과 항암활성 및 세포주기와의 관계. *숙명여자대학교 약학연구소논문집 제16호*, 33 (1999).
 - 30) Kim, D. K., Kim, G., Gam, J., Cho, Y. B., Kim, H. T., Tai, J. H., Kim, K. H., Hong, W. S., Park, J. G. : Synthesis and Antitumor Activity of a Series of [2-substituted-4,5-bis (aminomethyl)-1,3-dioxolane] Pt (II) Complexes. *J. Med. Chem.* **37(10)**, 1471 (1994).
 - 31) Nowatari, H., Kuroda, Y., Hayami, H., Okamoto, K., Ekimoto, H., Takahashi, K. : Synthesis and Antitumor Activity of Alkyl-1,4-butane-diamine Pt(II) Complexes Having Seven-membered Ring Structure. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2406 (1989).
 - 32) Yamaue, H., Tanimura, H., Tani, M., Iwahashi, M., Tsunoda, T. : In Vitro Antitumor Activity of a New Platinum Analogue, NK-121 against Fresh Human Tumor Cells and Established Tumor Cell Lines by Succinate Dehydrogenase Inhibition Test. *Chemotherapy (Tokyo)* **38**, 780 (1990).