몇 가지 전이금속, Ni(II), Cu(II) 및 Zn(II) 3,6-bis(2'-pyridyl)pyridazine 착 화합물들의 세포 독성효과

권병목 · 이정옥[1] · 최상운[1] · 성낙도[2,*]

생명공학연구소 단백질조절연구부, [1]한국화학연구소 스크리닝연구부, [2]충남대학교 형질전환복제돼지연구센터

Cytotoxic Effects of Some Transition Metals, Nickel(II), Copper(II) and Zinc(II), with 3.6-bis(2'-pyridyl)pyridazines Complexes

Byung-Mok Kwon, Chong-Ock Lee[1], Sang-Un Choi[1] and Nack-Do Sung[2,*]

Korea Research Insititute of Chemical Technology, Protein Regulator R.U., Daejon 305-764, Korea
[1]Screening and Toxicology Research Center, Korea research Institute of Chemical Technology, P.O. Box 107, Yuseong, Daejeon 305-606, Korea
[2]Research Center for Transgenic Cloned Pigs, Chungnam National University, Daejon 305-764, Korea

Received February 9, 2006; Accepted March 7, 2006

A series of cytotoxic activities (ED_{50}) *in vitro* against six human cancers (lung cancer, uterine cancer, skin cancer, brain cancer, colon cancer and adenocarcinoma) and their seventeen cell lines of 3,6-bis(2'-pyridyl)pyridazine, 1, 3,6-bis-(6'-methyl-2'-pyridyl)pyridazine, 2 and their transition metal, Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes, 3~6 were measured. Particularly, the results revealed that the cytotoxic activities against the brain cancer cell line (SNB-19) and the colon cancer cell line (SW62) of bis-[3,6-bis-(6'-methyl-2'-pyridyl)pyridazine-k^2N^2,N^3]chlorocopper(II)perchlorate, 4 were shown to be higher than that of the first generation anticancer agent, Cis-platin.

Key words: 3,6-bis(6'-methyl-2'-pyridyl)pyridazine, transition metal complexes, cytotoxic activity, human cancer cell lines

서 론

전이금속 착 화합물들의 주 응용성에 관한 연구중의 하나는 효과적이고 안전한 치료제로서 항 박테리아성이나 항 종양성 시험에 관한 것들이 대부분이다. 종양성 치료제로서 특히, *cis*-platin은 다양한 고형 종양들의 치료에 매우 광범위하게 사용되고 있으나,[1] 백금제제들의 독성이 완전하게 배제된 새로운 화합물들이 아직까지 개발되고 있지 않다.[2]

많은 화학 치료제들은 면역조절 성질에 관한 것들이며[3,4] 전이금속 착 화합물들에 의한 방사선 면역 치료와 감지에 대한 연구도 보고되고 있다.[5] 그럼에도 항 종양 활성에 따른 금속 착 화합물들의 잠재적 면역조절에 관한 연구들이 적절하게 탐구되지 않고 있으며 항 종양 세포주에 대한 많은 화학 치료제들은 면역조절 성질을 가지는 것으로 알려져 있다.[6] 뿐만 아니라, 이와 관련한 DNase의 반응성을 이해하기 위하여 DNA 모델 화합물로서 phosphate diester의 가수분해 반응을 촉진하는 유기금속 착 화합물들의 촉매작용에 관한 다양한 연구들이 시도되고 있다.[7-10]

본 연구는 DNA에 대한 위치 지향적 돌연변이(site directed mutagenesis)를 유발하는 신 의약이나 농약을 위시하여 유기인계 신경가스의 해독제는 물론, 다양한 제한효소들의 개발을 목표로 하는 일련의 artificial DNase의 구조와 반응성[11] 관계를 탐색하려는 시도의 일환으로 3,6-bis(2'-pyridyl)pyridazine 및 3,6-bis(6'-methyl-2'-pyridyl)pyridazine을 리간드로 하는 Ni(II), Cu(II) 및 Zn(II) 등, 전이금속 착 화합물들[12-15]의 인체 암 세포주에 대한 세포독성 효과를 검토하였다.

재료 및 방법

리간드 착물과 소수성. 리간드, 3,6-bis(2'-pyridyl)pyridazine, **1**과 3,6-bis(6'-methyl-2'-pyridyl)pyridazine, **2**는 2-picoline으로부터 2-picoline-N-oxide를 경유하여 합성하였다. 그리고 이들을 리간드로 하는 전이금속(Ni(II), Cu(II) 및 Zn(II)) 착 화합물, **3**, μ-aquapentaaqua[μ-3,6-bis-(6'-methyl-2'-pyridyl)pyridazine] chlorodinickel(II)trichlorodetrihydrate,[12] **4**, bis-[3,6-bis-(6'-methyl-2'-pyridyl)pyridazine-k^2N^2,N^3]chlorocopper(II)perchlorate,[13] **5**, [3,6-

*Corresponding author
Phone: 82-42-821-6737; Fax: 82-42-825-330
E-mail: ndsung@cnu.ac.kr

bis(6'-methyl-2'-pyridyl)pyridazine]zinc(II)chloride[14] 및 **6**, $[Ni_4(\mu\text{-}OH)_2(\mu\text{-}3,6\text{-bis}(2'\text{-pyridyl})\text{pyridazine})_4(\mu\text{-}H_2O)_2](Cl)(CLO_4)_5 \cdot 9H_2O_{15}$를 종양 세포주에 대한 검정용 시약으로 사용하였다. 그리고 이들 화합물의 소수성 상수(logP)는 PCA101 autotitrator (Sirius Co.)를 사용하여 측정하였다. Cis-diammine-dichloroplatinum (II) 즉, Cis-platin은 Aldrich제 시약(Milwaukee, WI)을 사용하였다.

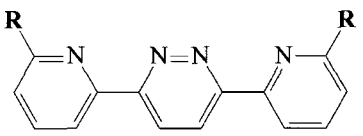
세포독성 시험과 독성예측. 폐암(A549), 피부암(SKMEL-2, SK-MEL-5, SK-MEL-28, LOXIMVI, MALME-3M 및 M14), 결장암(HCT-15 및 SW620), 자궁암(SKOV-3), 선암(adenocarcinomal; DLD-11) 및 뇌암(XF-498, SNB-19, SNB-75, SNB-78, U251 및 SF-298) 등, 6종의 인체 암(종양)에 유래하는 17종의 암 세포주에 대한 항암활성(세포독성) 검정은 문헌에 따라[16] 한국화학연구원 의약활성연구실에서 실행하여 ED_{50}(ppm)값을 각각 구하였다. 또한, 리간드 화합물 **1**, **2**의 잠재적 독성 발현수치(DPT: Developmental toxicity potential) 및 쥐(rat)의 경구독성(LD_{50}: mg/kg)은 Health Design Inc.(HDI)에 의하여 개발된 TOPKAT (Ver. 6.2)[17] 프로그램을 이용하여 예측하였다.

결과 및 고찰

리간드와 착 화합물. 유기금속 착 화합물을 구성하는 리간드 (**1** 및 **2**)의 구조와 X-ray 결정구조에 근거한 전이금속(Ni(II), Cu(II) 및 Zn(II)) 착 화합물들의 구조를 Fig. 1 및 2에 각각 나타내었다. 6'-methyl 치환체인 **2**를 리간드로 합성된 착 화합물, **3** 및 **5**는 단량체, **4**는 2량체 그리고 **1**를 리간드로 합성된 착 화합물, **6**은 4량체이었다. 이 중에서 **3**은 2핵 Ni(II) 착 화합물, **4** 및 **5**는 1핵의 Cu(II) 및 Zn(II) 착 화합물 그리고 6은 4핵 Ni(II) 착 화합물이다. 여기에서 **3** 및 **5**가 2량체가 되지 못하고 단량체로 생성되는 이유중 하나는 두개의 6'-methyl group으로 인한 입체장애에 기인하는 것으로 판단된다.

이들 전이금속 착 화합물들에 따른 DNA 모델 화합물인, bis(*p*-nitrophenyl)phosphate의 가수분해 반응성을 살펴보면[18] **2**를 리간드로 한 착 화합물은 모두 Zn >> Cu > Ni >의 순서로 Zn(II) 착 화합물인 **5**가 가장 높은 반응성을 나타내었다.[19] 이러한 결과는 Cis-platin이 암 세포중 DNA에 대한 반응양상과 유사하게 5가 phosphoryl group에 대하여 반응이 용이하도록 Cis-diapue 형태의 구조를 유지하기 때문으로 추정된다.[20] 이와 같이 이들 착 화합물들에 의한 DNA 모델 화합물들의 가수분해 반응은 Cis-platin의 금속 원자에 결합되어 있는 활성화 된 친핵체로서 물 분자들이 polarity rule[21]에 따라 pseudo rotation을 경유하여 DNA 중 phosphoryl group에 대한 친핵성 첨가-제거($Ad_{N\text{-}E}$) 반응성에 의존적이다. 여기에서 5가 높은 활성을 나타내었던 이유는 DNA의 backbone인 phosphodiester의 가수분해 반응시, 금속 이온의 수가 많을수록 double Lewis acid activation[22]으로 금속 착 화합물의 촉매 반응성이 증가하는 경향[23]과 입체장애를 덜 받는 때문으로 설명된다.

착 화합물들의 세포 독성효과. 폐암(A549), 피부암(SKMEL-2), 결장암(HCT-15), 자궁암(SKOV-3) 및 뇌암(XF-498) 등, 5종의 인체암(종양)의 세포주들에 대한 리간드 화합물(**1** 및 **2**)과



R=H : **1** & R=CH_3 : **2**
Metals : Ni(II), Cu(II) & Zn(II)

Fig. 1. Ligand compounds, (1): 3,6-bis(2'-pyridyl)pyridazine, (2): 3,6-bis(6'-methyl-2'-pyridyl)pyridazine and transition metals.

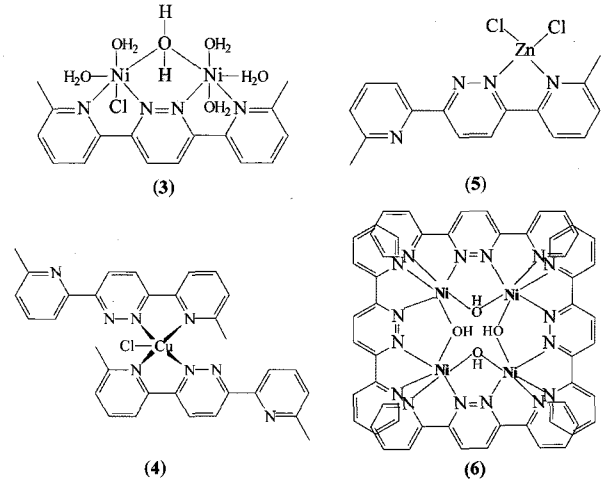


Fig. 2. Structures of transition metal complexes (3)~(6) with ligand (1) and (2).

그의 착 화합물(**3**~**6**) 및 Cis-platin의 항암활성 즉, 세포독성(ED_{50}: ppm)을 Table 1에 정리하였다. 대조용 시료로는 1978년 미국 식품의약품 안정청(FDA)에서 항암제로 인가된 Cis-platin을 사용하였다.[1] 전반적으로 리간드 분자 중, **2**보다 **1**이 높은 활성을 보였으며 **1**은 뇌암에 대하여 제일 강한 활성을 보였다. 이들 리간드 화합물의 독성 예측치 중, 잠재적 독성발현 수치(DTP)는 **1**: 0.891 및 **2**; 0.034이었고 쥐(Rat)에 대한 경구 독성치(LD_{50}(mg/kg)는 **1**; 458 및 **2**; 525.9 그리고 FDA가 규정한 설치류 발암성(RC: Rodent carcinogenicity)은 **1**; 0.001 및 **2**; 0.993이었다. 설치류 발암성의 경우, 0.3 이하는 발암성이 없으며 0.7 이상이면 발암 가능성이 있으나 0.3-0.7 사이의 값을 나타내는 경우에는 발암 확율이 50%로 간주된다.[17]

착 화합물 중에서는 특히, Cu(II) 착 화합물, **4**는 Cis-platin과 비슷한 수준으로 결장암(HCT15)을 제외한 나머지 4종의 종양 세포주에 대하여 비교적 높은 세포독성(ED_{50}: 1.25~2.36 ppm)을 나타내었다. 이러한 결과를 나타내는 이유중 하나는 이 화합물이 금속 착물임에도 불고하고 유의할만한 정도의 소수성(logP = 1.799)을 나타내기 때문으로 설명된다. 또한, **5**는 결장암에 대하여 가장 높은 세포독성을 나타내는 특징을 보였다. 그리고 6'-methyl 치환체인 **2**가 **1**보다 활성이 낮은 이유는 2개의 methyl group이 가지는 소수성(ΔlogP = 0.648)과 세포독성 발현시의 입체장애 때문으로 짐작될 뿐이다. 왜냐하면, 분배계수인 소수성은 가수분해 반응에는 영향을 미치지 않으나 약물의 생체내 흡수와 수송에는 매우 크게 관여하므로 생물 활성에는 큰

Table 1. The hydrophobicities of the ligand compounds and transition metal complexes and their net growth inhibition activities (ED_{50}: ppm) *in vitro* against various human cancer cell lines

No.	logP	A	B	C	D	E
1	2.070	5.24	4.77	6.05	1.88	3.79
2	2.783	12.26	17.80	13.08	16.44	16.02
3	-0.298	29.73	17.24	26.47	18.84	20.42
4	1.799	<1.25	<1.25	2.36	<1.25	25.27
5	0.164	17.93	21.07	14.88	17.25	5.26
6	-4.636	>40.00	22.04	26.18	23.77	>40.00
CP[a)]	-0.980	1.24	0.83	0.79	0.88	2.13

A: Lung cancer (A549), B: uterine cancer (SKOV-3), C: skin cancer (SK-MEL-2), D: brain cancer (XF498), E: colon cancer (HCT15), [a)]Cis-platin.

영향을 미치는 요소이기 때문이다.[24] 따라서 리간드 화합물과 착 화합물 각각의 활성 메카니즘이 금속이온의 존재 유무에 따라 상이하게 다른 까닭은 금속 이온들이 DNA의 phosphodiester backbone과 착 화합물을 형성하기 때문이라고 알려져 있다.[20]

Cis-platin과 4의 세포독성 비교. 인체 암 세포주들에 대한 화합물 4의 세포독성이 다른 착 화합물에 비하여 두드러진 특성을 나타냄에 따라 Table 2에서는 앞에서 다룬 암 세포주 이외에 선암(adenocarcinoma; DLD-11), 피부암(SK-MEL-5, SK-MEL-28, LOXIMVI, MALME-3M 및 M14), 뇌암(SNB-19, SNB-75, SNB-78, U251 및 SF-298) 및 결장암(SW620) 등, 4종의 인체암과 그 세포주 12종에 대한 착 화합물, 4와 Cis-platin의 세포독성(ED_{50}: ppm)을 각각 측정하여 정리하였다. 여기에서 선암은 위장, 기관지, 자궁 및 담낭 등의 점막을 위시하여 전립선, 고환, 난소, 갑상선 및 이자의 선 조직이나 배설관에서 발생하는 암이다. 측정된 자료를 검토한 결과, **4**는 Cis-platin에 비하여 선암(DLD-11), 피부암(SK-MEL-28), 뇌암(SNB-19) 및 결장암(SW620) 세포주 등에 대하여 유의할만 한 세포독성을 발현하였다. 그 중에서 특히, 뇌암 세포주(ED_{50}(ppm) = 0.67)와 결장암 세포주(ED_{50}(ppm) = 1.74)에 대한 세포독성은 Cis-platin보다 약 1 : 2의 비율로 매우 양호하였으나 그 이외의 것들은 Cis-platin이 4보다 크거나 비슷한 정도의 수치를 나타내었다.

Table 2. The net growth inhibition activities (ED_{50}: ppm) *in vitro* against various human cancer cell lines of Cis-platin and Cu(II) complex (4)[a)]

Cancer cells	Cis-platin	4
DLD-11[b)]	3.23	2.46
SK-MEL-5[c)]	1.16	1.33
SK-MEL-28[c)]	1.94	1.37
LOXIMVI[c)]	0.23	1.00
MALME-3M[c)]	1.06	3.28
M14[c)]	1.19	1.48
SNB-19[d)]	1.12	0.67
SNB-75[d)]	1.20	2.83
SNB-78[d)]	1.12	1.85
U251[d)]	0.99	0.97
SF-298[d)]	0.87	1.60
SW620[e)]	3.26	1.74

[a)]Papent pending (2005), [b)]Adenocarcinoma, [c)]skin cancer, [d)]brain cancer, [e)]colon cancer.

앞서 언급한 바와 같이, 착 화합물은 DNase와 같이 금속원자에 의하여 물 분자가 활성화 된 친핵체인 hydroxyl group이 phosphate diester를 가수분해하는 양상으로 활성 반응성을 나타낼 것이지만 리간드 화합물은 구조적으로 착 화합물과 같은 반응 양상을 나타낼 수 없다. 그러므로 항암제로서 기능을 가지려면 치료지수(TI = LD_{50}/ID_{90})가 Cis-platin(TI = 11)보다 높아야 하며[25] 수용체 중에서 용해도와 안정성이 우수하고 흡수가 용이하도록 적정한 소수성을 유지하여야 한다. 뿐만 아니라, 기존에 사용중인 제제와 교차내성이 없음으로써 항암활성 범위가 보다 높아야 할 것이다. 그러므로 Cis-platin의 경우에는 항암성 작용이 있는 반면에 trans-platin은 항암작용이 작다는 사실로부터 Cis-platin과 DNA간의 결합은 bifunctional chelation mode로 예상된다.

초 록

6종의 인체 암(폐암, 피부암, 결장암, 자궁암, 선암 및 뇌암)과 그의 17가지 세포주들에 대한 리간드 화합물 3,6-bis(2'-pyridyl)pyridazine(1)과 3,6-bis(6'-methyl-2'-pyridyl)pyridazine(2) 그리고 그들의 전이금속(Ni(II), Cu(II) 및 Zn(II)) 착 화합물들(**3**~**6**)의 세포독성을 각각 측정하였다. 그 결과, 특히 Cu(II) 착 화합물, bis-[3,6-bis-(6'-methyl-2'-pyridyl)pyridazine-k^2N^2,N^3] chlorocopper(II)perchlorate (4)는 뇌암(SNB-19)과 결장암(SW-62) 세포주에 대하여 제1세대 항암제인 Cis-platin보다 높은 세포독성을 나타내었다.

Key words: 3,6-bis(6'-methyl-2'-pyridyl)pyridazine, 전이금속 착 화합물, 세포 독성효과, 인체 암 세포주

감사의 글

본 연구는 한국과학재단(KOSEF) 우수연구센터(ERC) 지원 연구비(No. R11-2002-100-03005)에 의하여 이루어 진 것입니다.

참고문헌

1. Rosenberg, B. (1978) Platinum complexes for the treatment of cancer. *Interdisc. Sci. Rev.* **3**, 134-147.
2. Marzano, C., Trevisan, A., Giovagnini, L. and Fregona, D. (2002) Synthesis of new platinum(II) complex: anticancer activity and nephrotoxicity in Vitro. *Toxicology in Vitro.* **16**, 413-419.
3. Kleinerman, E. S., Zwelling, L. A. and Muchmore, A. V. (1980) Enhancement of naturally ocuring human spontaneous monocyte-mediated cytotoxicity by cis-diaminedichloroplatinum (II). *Cancer Res.* **40**, 3099-3102.
4. Lichtenstein, A. K. and Pendde, D. (1986) Enhancement of natural killer cytotoxicity by cis-diaminedichloroplatinum(II) *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res.* **46**, 639-644.

5. Paxton, R. J., Beatty, B. G., Hawthorne, M. F., Varadarajan, A., Williams, L. E., Curtis, F. L., Knobler, C. B., Beatty, J. D. and Shively, J. E. (1991) A transition metal complex (Venus flytrap cluster) for radioimmunosdetection and radioimmuno-therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3387-3391.
6. Shrivastav, A., Singh, N. K. and Singh, S. M. (2002) Synthesis, characterization and antitumor studies of Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes of N-salicyloyl-N'-O-hydroxythiobenzhydrazide. *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 887-895.
7. Sung, N. D., Seo, J. S., Rosemary, C. H. and Chin, J. (1996) Structure and reactivity of a dinuclear cobalt(III) complex with a bridging phosphate monoester. *Inorg. Chem.* **35**, 7472-7473.
8. Sung, N. D., Seo, J. S., Rosemary, C. H., Williams, D. and Chin, J. (1998) Structure and reactivity of a dinuclear cobalt(III) complex with peroxide and phosphate diester analogues bridging the metal ions. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 9943-9944.
9. Liu, C., Wang, M., Zhang, T. and Sun, H. (2004) DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes. *Coordination Chem. Rev.* **248**, 147-168.
10. Williams, N. H. (2004) Models for biological phosphoryl transfer. *Biochem. Biophys. Acta* 279-287.
11. Cowan, J. A. (2001) Chemical nucleases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 634-642.
12. Sung, N. D., Yun, K. S., Kim, J. G. and Suh, I. H. (2000) μ-Aqua-pentaaqua[μ-3,6-bis(6-methyl-2-pyridyl)pyridazine] chlorodinickel(II) trichloride trihydrate. *Acta. Cryst.* **C56**, e370-e371.
13. Choi, K. Y., Sung, N. D., Yun, K. S., Park, Y. S., Kim, J. G. and Suh, I. H. (2001) Bis[3,6-bis(6'-methyl-2'-pyridyl) pyridazine-k^2N^2,N^3]chlorocopper(II) perchlorate. *Acta. Cryst.* **C57**, 47-48.
14. Kim, M. J., Lee, J. H., Lee H. J. and Sung, N. D. (1999) The crystal structure of [3,6-bis(6'-methyl-2'-pyridyl)pyridazine] $ZnCl_2$,$C_{16}H_{16}N_4$. $ZnCl_2$. *Kor. J. Crystall.* **10**, 119-124.
15. Sung, N. D., Yun, K. S., Kim, T. Y., Choi, K. Y., Suh, M., Kim, G. J., Suh, I. H. and Chin, J. (2001) Synthesis and characterization of a novel tetranuclear nickel(II) complex: $[Ni_4(\mu\text{-}OH)_2(\mu\text{-}dppn)_4(\mu\text{-}H_2O)_2](Cl)(ClO_4)_5$ $9H_2O$, (dppn = 3,6-bis(2'-pyridyl)pyridazine). *Inorg. Chem. Comm.* **4**, 377-380.
16. Choi, S. U., Choi, E. J., Kim, K. H., Kim, N. Y., Kwon, B. M., Kim, S. U., Bok, S. H., Lee, S. Y. and Lee, C. O. (1996) Cytotoxicity of trichlorothecenes to human solid tumor cells *in vitro*. *Arch. Pharm. Res.* **19**, 6-11.
17. TOPKAT (The open practical knowledge acquisition toolkit). Accelrys Inc., Web: http:/www.accelrys.com
18. Sung, N. D. and Yoon, K. S. (2005) The roles of metal ions and water molecules in the hydrolysis of bis(*p*-nitrophenyl)-phosphate as a DNA model catalyzed by dinuclear Ni(II) complex. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**, 115-119.
19. Sung, N. D., Kim, D. W., Kwon, B. M., Kim, T. Y. and Suh, I. H. (2000) Biological activities of some organometallic compounds as artificial nuclease. *Kor. J. Pestic. Sci.* **4**, 32-37.
20. Rosenberg, B. (1980) In *Nucleic-Metal Ion Interactions: Platium Complexes for the Treatment of Cancer.* Spiro, T. G. (ed.). Ch. 1., John Wiley & Sons, New York.
21. Dugas, H. (1989) In *Bioorganic Chemistry: A chemical approach to enzyme action* (3rd Ed.). Ch. 3, Springer-Verlag, New York. pp. 128-132.
22. Wall. M., Hynes, R. C. and Chin, J. (1993) Double Lewis acid activition in phosphate diester clavage, *Angew, Chem. Int. Ed. Engl.* **32**, 1633-1635.
23. Sung, N. D. (1998) The transition state analog for metal catalized hydrolysis an ester, *Agric. Chem. Biotech.* **4**, 410-411.
24. Fujita, T. (1983) In *Progress in Physical Organic Chemistry Substitution effects in the partition coefficient of disubstituted benzenes: Bidirectional Hammett-type relationships*. Vol. 14, Taft, R. W.(ed.). John Wiley & Sons., Toronto. pp. 75-113.
25. Sherman, S. E. and Lipoard, S. J. (1987) Structural aspects of plantinum anticancer drug interactions with DNA. *Chem. Rev.* **87**, 1153-1181.