

Conformation이 고정된 Sulfonylurea 유도체의 혈당상승작용

박혜영* · 김연경 · 권진숙 · 김화정

이화여자대학교 약학대학

Hyperglycemic Effect of Conformationally Rigid Sulfonylurea Derivatives

Hea-Young PARK, Yun-kyung KIM, Jinsuk KWON and Hwa-Jung KIM

Ewha Womans University, School of Pharmacy

(Received November 18, 1996; accepted December 22, 1996)

Abstract - 3,4-Dihydro-3-oxo-2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxides were synthesized as conformationally rigid analogues of sulfonylurea hypoglycemic agents. All the compounds prepared showed hyperglycemic activity. The hyperglycemic activity was enhanced for the diabetic rats in which the blood glucose level was increased by 30-70%.

Keywords □ hyperglycemic effect, conformationally rigid sulfonylurea derivatives

경구용 혈당강하제인 sulfonylurea 유도체는 당뇨병 환자의 대부분을 차지하는 인슐린 비의존성 당뇨의 치료에 널리 사용되고 있으며, 췌장의 베타세포에 작용하여 인슐린의 분비를 촉진시킨다. 이 작용은 sulfonylurea 유도체가 췌장의 베타세포막에 존재하는 ATP-의존성 K⁺-channel에 결합해서 이 channel을 차단함으로써 세포밖으로 K⁺ ion의 이동이 감소되고 그로 인한 베타세포의 탈분극과 Ca²⁺-channel의 자극에 따른 세포내 Ca²⁺ 농도의 증가로 유도된다고 알려져 있다(Philipson, 1995). 췌장의 베타세포막에 존재하여 sulfonylurea 수용체로 작용하는 ATP-의존성 K⁺-channel은 매우 최근에 클론되었다(Aguilar-Bryan, 1995). Sulfonylurea 유도체들은 Ar-SO₂-NH-CO-NH-R 의 일반구조를 가진다. Tolbutamide, acetohexamide 등의 1세대 약물과 비교하여 1,000배 정도 약효가 강력한 glyburide 등 2세대 약물은 Ar 부분에 amide 기를 더 갖는다. 이들은 췌장의 베타세포 표면에 있는 receptor와 결합하여 인슐린의 분비를 자극시키며 receptor에는 2개의 결합부위가 존재하는 것으로 추정되고 있다(Brown, 1984).

한편 혈관 확장제로서 고혈압 치료제로 사용되는 diazoxide는 혈당상승 기능도 함께 가지고 있는 것으로 잘 알려져 있다. Diazoxide는 sulfonylurea의 유도체와는 반대로 췌장의 베타세포로부터의 인슐린 분비 작용을 방해하며 이

효과 역시 diazoxide가 ATP-sensitive K⁺-channel에 작용하여 이 channel이 닫히는 것을 막거나 또는 열려있는 시간을 증가시키는 작용과 연관되리라 생각된다. Diazoxide의 구조를 살펴보면 sulfonylurea와 유사하여 Ar-SO₂-N-C-N의 골격을 가지고 있으며 각 원소의 혼성오르비탈 종류도 일치한다. 그러나 diazoxide의 경우에는 카르보닐기의 산소와 질소에 연결된 알킬기가 없으며 SO₂-N-C-N기가 고리로 이루어져 있으므로 sulfonylurea계 혈당강하제와는 달리 직선의 conformation을 이룰 수 없다.

본 연구에서는 혈당강하제와 같이 sulfonylurea구조를 가진 SO₂-N-C-N 기의 conformation이 diazoxide와 유사한 sulfonylurea계 물질을 합성하여 혈당상승 효과를 확인하고자 하였다.

실험재료 및 방법

화합물합성

합성된 화합물의 구조는 Fig. 1에 제시되었으며 그 합성 방법은 본실험실에서 발표된 방법(Park, 1995)과 동일하다. 화합물 1: Ice bath상에서 nitromethane 50 ml에 chlorosulfonyl isocyanate 1.35 ml (10 mmol)를 녹인 후 m-toluidine 1.07 g (10 mmol) 5 ml nitromethane aluminum chloride 1.5 g (10 mmol)을 가했다. 혼합물을 30분 동안 가열환류시켰다. 반응물을 얼음물에 부은 후 생긴 침전을 ethanol

* To whom correspondence should be addressed.

로 재결정하여 황색의 고체(1) 1.69 g을 얻었다. 화합물 2: m-Toluidine 2.14 g (20 mmol), K_2CO_3 4.866 g (35.2 mmol) 및 butyl bromide 2.74 g (20 mmol)를 acetone 120 ml에 넣고 28시간 가열환류시켰다. 불용성물질을 여과하고 용매를 감압증발한 후 컬럼크로마토그래피(n-hexane: ethyl acetate) 하였다. 여기에 chlorosulfonyl isocyanate 0.849 ml (9.76 mmol)와 aluminum chloride 1.336 g (10.02 mmol)을 넣어 cyclization시키는 방법은 화합물 1과 동일하다. 화합물 3: P_2O_5 2.314 g (16 mmol), 1,2-ethylene dichloride 5 ml, hexamethyldisiloxane 4.3 ml, cinnamic acid (20 mmol) 및 5-chloro-2-aminobenzylsulfonamide (20 mmol)을 순서대로 가한 후 5시간 가열환류시켰다. 용매를 감압증발 한 후 ethanol로 재결정하였다.

실험동물 및 시약

몸무게 200-270 g Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 제일시 실험동물사육소에서 구입하여 일주일 이상 동물실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 고형사료와 물을 충분히 공급하였고 온도는 20-22 °C, 습도는 50-60%로 유지하였으며 12시간 간격으로 명암을 자동조절하였다. 당뇨유발에 사용한 streptozotocin은 Sigma사(St. Louis, USA) 제품을 사용하였다.

당뇨유도 및 혈중당농도 측정

합성 화합물이 혈당에 미치는 영향은 streptozotocin (STZ)으로 당뇨를 유발시킨 당뇨군과 당뇨를 유발시키지 않은 정상군에서 모두 조사하였다. 당뇨군은 웅성 흰쥐를 당뇨 유도전 하루밤 동안 절식 시킨 후 0.1 M citrate buffer (pH 4.5)에 녹인 STZ를 꼬리 정맥에 주사하고 일주일 후 혈액을 채취하여 측정된 혈중 당농도가 350 mg/dl 이상인 쥐만을 당뇨병 쥐로 간주하여 사용하였다. 당뇨군 및 정상군의 쥐에 5% ethanol-saline에 용해시킨 합성물질들을 경구투여(50 mg/kg) 하였고 투여 후 90분과 150분에 혈액을 채취하였다. 또 연속하여 3일간 투여한 후 4일 째에 혈액을 한번 더 채취하여 glucose oxidase 방법에 따른 kit(영동제

약, 서울)을 사용하여 혈중 포도당 농도를 측정하였다.

결과 및 고찰

합성된 화합물(1~3)의 혈당에 대한 효과는 Table I과 Table II에 나타난 바와 같이 이들은 정상군의 쥐에서는 혈당의 변화가 거의 없거나 미약한 (15-20%) 증가를 보인 반면 (Table II), streptozotocin으로 유도된 당뇨쥐의 혈당치는 30~75% 정도로 유의성 있게 증가하였다 (Table I). 즉, 당뇨유도 후 saline을 3일간 투여한 쥐에서는 혈당의 변화가 없었으나 합성화합물들을 투여한 쥐들은 투여 2시간만 후와 3일 연속투여시 투여전보다 높은 혈당치를 보였다. 화합물 3은 sulfonylurea기를 갖지않고 1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide의 모핵 구조를 가지므로 diazoxide와 구조적으로 더욱 유사하며 이물질도 비슷한 혈당증가형태를 보였다. 한편 1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide 유도체들의 혈당상승 효과는 Wales등의 연구에서도 보고되었다. Wales 등 (1968)은 이노작용을 갖지않는 혈당상승제 연구에서 3-치환-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide 유도체들이 40-100% 혈당상승시킴을 관찰하였다. 그러나 모핵의 3번과 4번 위치에 이중결합이 없는 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide 유도체들은 혈당상승 효과가 훨씬 적은 것으로 보고되었다.

합성된 화합물 1과 2는 sulfonylurea기를 함유하고 있으며 치환기가 tolbutamide와 거의 유사하나 고리로 된 구조

Table I. Effect of compounds 1~3 on blood glucose level in diabetic group

Compounds	blood glucose level (mg/dl)			
	before administration	90 min	150 min	consecutive administration
Control	453.4±26.4	428.2± 29.0	456.6± 7.0	386.8± 32.6
1	415.0±34.2	542.0± 76.0	724.3±50.1*	647.3±112.0*
2	427.2±34.0	610.0±101.0	614.0±85.4*	654.3±139.0*
3	461.4±20.6	708.4± 46.5*	789.0±72.0*	647.0±159.0*

Data are represented as mean ± S.E. from 4-9 rats.

Control: 5% ethanol-saline.

*P<0.05 relative to both before administration and control.

Table II. Effect of compounds 1~3 on blood glucose level in normal group

Compounds	blood glucose level (mg/dl)			
	before administration	90 min	150 min	consecutive administration
1	121.4± 6.0	121.2±17.4	124.4±12.6	140.8±15.1
2	120.4±10.3	134.0±11.0	149.0± 7.0*	146.2± 7.8*
3	132.2±18.4	132.4± 5.7	140.0±12.6	137.6± 8.6

Data are represented as mean ± S.E. from 4-5 rats.

*P<0.05 relative to before administration.

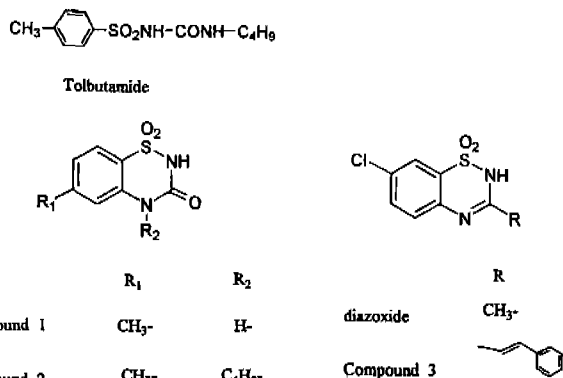


Fig. 1. Structures of Tolbutamide, Diazoxide and synthesized compounds.

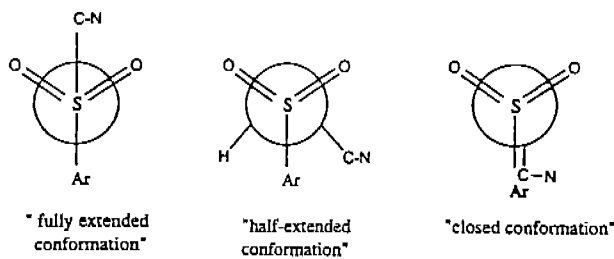


Fig. 2. The three conformations of sulfonylurea group.

를 가지므로 혈당상승 효과를 보였다. Sulfonylurea계 혈당 강하제에 의한 인슐린 분비 촉진은 위에서 언급한 대로 췌장의 베타세포내에 칼슘이 축적되어 세포외유출(exocytosis)을 항진시키기 때문인 것으로 알려져 있다. 실제로 sulfonylurea계 약물에 의한 칼슘 uptake 및 인슐린 분비는 suloctidil과 같은 칼슘 antagonist로 차단되었다. 칼슘의 이동은 glyclazide를 써서 자세히 연구되었는데(Winters, 1994) glyclazide 2분자가 1분자의 칼슘과 결합하여 complex를 형성한 다음 베타세포의 세포막을 통과하는 것으로 보고되었다. 특히 complex는 두분자의 glyclazide가 평행으로 있고 그 가운데에 칼슘 이온이 들어가는 형태인 것으로 밝혀졌다. 이러한 형태의 complex를 형성하기 위하여는 glyclazide의 conformation이 중요하였다. Winters 등은 sulfonylurea계의 conformation을 "fully extended", "half extended" 및 "closed" conformation으로 분류하였으며 이 중에서 fully extended conformation으로 있어야만 칼슘과의 결합이 가능한 것으로 보고하였다. X-ray 구조결정에서 얻은 torasemide, glyburide, glyclazide의 경우에는 질소 원자가 방향족 고리와 수직인 상태로써 "half-extended conformation"이 알려져 있다(Byrn, 1986; Winters, 1994). 그러나 이 물질들은 회전이 자유로우므로 생체 내에서 "fully-extended conformation"으로 될 수 있는 반면 고리로 묶여져 conformation이 rigid 한 화합물 1과 2의 경우에는 이러한 "fully-extended conformation"을 이룰 수 없다. 각 conformation에 따른 $\text{SO}_2\text{-N-C-N}$ 기 및 치환기의 모습을 Newman projection으로 나타내면 Fig.2와 같다. 결론적으로 "fully-extended conformation"을 형성할 수 있는 물질은 칼슘과의 결합이 잘 진행되므로써 인슐린의 분비를 촉진하여 혈당 강하작용을 나타내나 closed conformation이 되는 diazoxide 및 화합물 1~3은 칼슘결합불능으로 인한 인슐린 분비 차단 효과에 의해 혈당상승효과를 일으킨 것으로 추정된다. 또한 이것은 Anjaneyulu 등이 glyclazide는 인위적인 실험조건에서 Na-Ca countertransport를 유발시키나 diazoxide는 Ca translocation에 관여하지 않는다고 보고한 것 과도 잘 일치한다(Anjaneyulu, 1980). 본 연구에서 합성된

화합물들은 diazoxide와 같이 K-channel의 열림에 관여하리라 추정되며, 또 이물질들이 정상군에서는 혈당상승작용이 미약하게 나타난 반면 당뇨군에서는 혈당상승 효과가 더 크게 나타난 것은 베타세포 파괴에 따른 Ca-K 농도비 변화에 따른 것이라 추정해 볼 수 있으나 더욱 자세한 조사가 필요하다.

감사의 말씀

본 연구는 이화여자대학교 교수연구비 지원에 의해 이루어졌기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Aguilar-Bryan, L., Nichols, C. G., Wechsler, S. W., Clement IV, J. P., Boyd III, A.E., Gonzalez, G., Herrera-Sosa, H., Bguy, K., Bryan, J. and Nelson, D.A. (1995). Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor: A regulator of insulin secretion. *Science* **268**, 423-426.
- Anjaneyulu, R., Anjaneyulu, K., Couturier, E. and Malaisse, W. J. (1980). Opposite effects of hypoglycemic and hyperglycemic sulfonamides upon ionophore-mediated calcium transport. *Biochem. Pharmacol.* **29**, 1879-1882.
- Brown, G. R. and Foubister, A. J. (1984). Receptor binding sites of hypoglycemic sulfonylureas and related [(Acylamino)alkyl]benzoic acids. *J. Med. Chem.* **27**, 79-81.
- Byrn, S. R., McKenzie, A., Hassan, M. M. A. and Al-Badr, A. A. (1986). Conformation of glyburide in the solid state and in solution. *J. Pharmacol. Sci.* **75**, 596-600.
- Melander, A., Bitzen, P.-O., Faber, O. and Groop, L. (1989). Sulfonylurea antidiabetic drugs. An update of their clinical pharmacology and rational therapeutic use. *Drugs* **37**, 58-73.
- Park, H.-Y., Han, Y. and Lee, J. (1995). Synthesis and cytotoxic properties of 3,4-dihydro-3-oxo-2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxides, *Yakhak Hoeji* **39**, 631-635.
- Philipson, L. H. and Steiner, D. F. (1995). Pas de Deux or More: The Sulfonylurea Receptor and K^+ Channels. *Science* **268**, 372-373.
- Rufer, C. and Losert, W. (1979). Blood Glucose Lowering sulfonamides with asymmetric carbon atoms. 3. Related N-substituted carbamoylbenzoic acids. *J. Med. Chem.* **22**, 750-752.
- Wales, J. K., Krees, S. V., Grand, A. M., Viktora, J. K. and Wilff, F. W. (1968). Structure-activity relationships of benzothiadiazine compounds as hyperglycemic agents. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics.* **164**, 421-432.
- Winters, C. S., Shields, L., Timmins, P. and York, P. (1994). Solid-state properties and crystal structure of glyclazide. *J. Pharmacol. Sci.* **83**, 300-303.