

흰쥐에서 JG-381의 단회경구독성시험

오우용 · 이상호 · 김형진¹ · 주상섭² · 박형근² · 함광수³ · 조장섭³ · 이선미*

성균관대학교 약학대학, ¹한국화학연구원 안전성연구센터,
²서울대학교 약학대학, ³(주)태평양제약 중앙연구소

Single Oral Toxicity of JG-381 in Rats

Woo-Young OH, Sang-Ho LEE, Hyung-Jin KIM¹, Sang-sup JEW², Hyeung-geun PARK²,
Kwang-Su HAM³ Jang-Sup CHO³ and Sun-Mee LEE*

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

¹Korea Research institute of Chemical technology, Taejon 305-600, Korea

²College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

³Central Research Institute, Pacific Pharm. Co., Ltd., Anseong 456-370, Korea

(Received August 27, 2001; accepted September 14, 2001)

Abstract – The single oral toxicity of JG-381 was studied in Sprague-Dawley rats of both sexes. In this study, rats were administrated orally with dosages of 267, 400, 600, 900 and 1350 mg/kg of JG-381. We daily examined number of deaths, clinical signs, body weights and gross findings for 14 days after JG-381 administration. When we administered different doses of 267, 400, 600, 900 and 1350 mg/kg, we found 1, 4, 4, 5 and 5 male rats died and 3, 5, 4, 5 and 5 female rats died within 1 day after administration, respectively. Some clinical signs (decrease locomotor activity, salivation, soft stool, prone position, lacrimation, crouching position, convulsion, ataxic gait, incontinence of urine) were also observed during the experimental period. Our findings suggest that oral LD_{50s} (95% confidence limit) for male and female rats are 327 mg/kg (270~396 mg/kg) and 250 mg/kg (236~264 mg/kg), respectively.

Key words □ JG-381, antidiabetic, acute toxicity, LD₅₀, rat

당뇨병은 세계적인 평균 수명의 연장과 식생활의 변화로 그 발생빈도가 꾸준히 증가하고 있는 난치병 중의 하나이다. 당뇨병 치료제로는 인슐린이 가장 이상적이고 효능적이거나 그 지속시간이 짧고 경구적으로는 작용을 나타내지 못하므로 주사제로 사용하여야 하는 단점이 있다. 현재까지 사용되고 있는 경구용 혈당강하제로는 설폰요소계(sulphonylurea) 및 biguanid계 약물이 있다. 그러나 설폰요소계 약물은 간독성 및 저혈당을 야기하며(Karam 등, 1995; Davis와 Granmer, 1996), biguanid계 약물도 역시 산중(lactic acidosis)을 유발하는 부작용을 가지고 있다(Assan 등, 1976). 따라서 이러한 부작용을 감소시킬 수 있는 다른 기전의 경구용 당뇨치료제 개발이 필요하게 되었다.

당뇨병은 생체내 주 에너지원인 당의 대사 장애가 주요인이며 또한 생체내 또 다른 에너지원인 지방의 대사와 함께 조절된다. 지방은 지방산의 산화(fatty acid oxidation)를 통해 생체내 에너지원으로 이용되며, 최근 이 지방산의 산화를 억제

하여 혈당을 조절할 수 있음이 밝혀졌다(Collier 등, 1993). 한편 Ho 등(1986)은 글리시드산(alkylglycidic acid)유도체를 합성하였고 이들이 흰쥐의 혈당을 낮출 뿐 아니라 생체내 실험에서 지방산 산화를 현저히 억제하며 미토콘드리아 내 지방산 산화에 필요한 요소인 carnitine palmitoyl transferase(CPT) 활성을 억제함을 보고하였다. 즉 지방산 산화의 억제는 CPT 활성을 억제함으로써 가능하며, 이는 CPT 억제제가 혈당을 저하시킬 수 있음을 의미한다(Martin 등, 1991). 이러한 기전의 경구용 혈당강하제로 개발이 시도된 대표적인 물질로는 etomoxir(ethyl 2-(6-(4-chlorophenoxy) hexyl) oxirane-2-carboxylate, Byk Gulden, Constance, Germany; Fig. 1)가 있

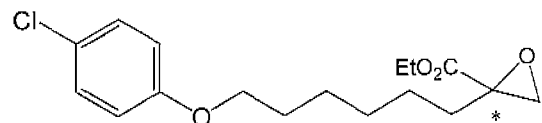


Fig. 1. Chemical structure of etomoxir(Byk Gulden, Constance, Germany). *Chiral center.

*To whom correspondence should be addressed.

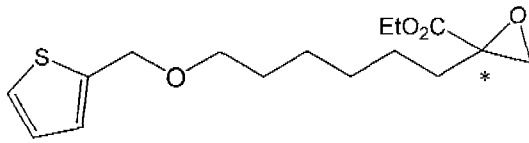


Fig. 2. Chemical structure of JG-381($C_{16}H_{24}O_4S$, M.W. 312).
*Chiral center.

다(Ratheiser 등, 1991; Wolf, 1992). 그러나 etomoxir의 경우 심장비대독성이 있는 것으로 확인되었고(Turcani와 Rupp, 1999), 이로 인해 임상시험 중 당뇨치료제로서의 개발이 중단되었다. 그러므로 본 연구자들은 글리시드산계 화합물이 가진 특징에 착안하여 이의 여러 유도체들을 합성하였고 그중 우수한 혈당강하작용이 있는 JG-381(ethyl 2-[6-(2-thienylmethoxy)hexyl] oxirane-2-carboxylate)을 얻게 되었다(Fig. 2).

따라서 본 연구실에서는 당뇨병치료제로 개발중인 JG-381의 흰쥐에서 치사율 및 독성증상 등의 안전성 자료를 확보하기 위하여 식품의약품안전청, 의약품등의 독성시험기준(식품의약품 안전청 고시 제 1998-116호) 및 의약품 안전성 시험 관리기준(식품의약품안전청고시 제 1998-17호)에 따라 단회경구독성시험을 실시하였다.

실험방법

시험물질

본 연구의 시험물질인 JG-381은 서울대학교 약학대학 박형근 교수로부터 HPLC 분석결과 98.5%이상인 시험물질을 제공받았으며, 약간 미황색을 띠는 투명한 oil상의 액체로서 실온에 보관하여 시험에 사용하였다. 매체 대조군은 JG-381의 현탁용매로 사용된 0.5% CMC(carboxymethyl cellulose) 용액을 사용하였다.

실험동물 및 사육환경

4주령의 흰쥐를 한국화학연구소 안전성 연구센터 실험동물육종실에서 SPF(특정 병원체 부재) Sprague-Dawley계 흰쥐를 공급받아 온도 $23 \pm 3^\circ C$, 상대습도 $50 \pm 10\%$ 및 150~300 Lux의 조도로 12시간 간격(오전 8시~오후 8시)으로 조절되는 동물실험실에서 순화, 검역기간 및 군분리 후 투여 관찰기간 동안 스테인레스제 망 사육상자(220W×410L×200H mm)에 5마리씩 사육하였다. 14일간 순화사육 기간에 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(제일사료(주))를 자유로이 공급하였으며, 음수는 자외선살균기로 소독한 상수도를 자유롭게 섭취시켰다.

투여량 및 시험군의 구성

순화기간중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측

정하고 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 군분리를 실시하였다. 동물의 개체식별은 피모색소마킹법 및 개체식별카드 표시법으로 실시하였다. 투여량은 예비시험으로 수행한 1000 및 2000 mg/kg 용량에서는 암수 모든 동물이 사망하였고, 500 mg/kg 투여군에서는 수컷은 2레가 전부 생존하였으나 암컷은 2레중 1레가 사망하였으며 125 mg/kg 투여군에서는 암수 모두 사망동물은 관찰되지 않았다. 따라서 위의 예비시험 결과를 근거로 하여 최고 용량을 1350 mg/kg으로 하고 공비 1.5의 간격으로 아래의 4용량 900, 600, 400, 267 mg/kg과 매체대조군을 설정하였다.

시험물질의 조제 및 투여

JG-381을 0.5% CMC 용액에 현탁시켜 조제한 후, 이를 다시 매체를 이용하여 단계 희석하면서 아래 단계의 투여 시험물질을 조제하였다. 시험물질의 투여는 하룻밤 절식시킨 흰쥐에게 경구투여용 바늘을 이용하여 1회 강제 경구투여 시켰다. 투여 용량은 투여 당일 측정된 체중을 기준으로 산출하였다.

관찰 및 검사항목

일반증상 및 사망동물의 관찰

모든 시험동물에 대하여 투여일에는 투여후 6시간 동안 매 시간, 투여 익일부터 14일까지는 매일 1회 일반증상의 변화, 독성증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다. 14일간 일반상태의 변화와 증독증상, 사망동물의 유무 및 시험물질에 의해 나타날 가능성이 있는 증상에 대하여 주의하여 관찰하였다.

체중측정

모든 시험동물의 체중은 시험물질 투여개시전과 투여 후 1, 3, 7 및 14일에 측정하였다.

부검

시험 종료 후 모든 생존동물을 CO_2 마취 하에서 개복한 후에 복대동맥을 절단하여 방혈치사 시키고 육안적으로 내부 장기를 관찰하였다.

통계학적 분석

한국화학연구소 안전성연구센터의 SOP에 따라 Lab-cat module(ver. 4326)에서 제공된 방법으로 체중의 경우 평균과 표준편차를 구하였고, LD_{50} 값의 산출은 Weil 법을 이용하여 실시하였다.

실험결과

사망에 및 LD_{50} 값

시험물질 투여에 의한 사망동물은 수컷의 경우 267, 400, 600, 900 mg/kg 투여군에서 각각 1, 3, 3 및 5 마리에서,

Table I. Mortality of rats orally treated with JG-381

Sex	Dose (mg/kg)	Days after treatment														Final mortality ^{a)}	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
Male	267	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/5
	400	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4/5
	600	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4/5
	900	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5/5
	1350	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5/5
Female	267	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3/5
	400	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5/5
	600	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4/5
	900	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5/5
	1350	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5/5

^{a)}Values are expressed as dead number/total number of animals.

암컷의 경우 267, 400, 600, 900 및 1350 mg/kg 투여군에서 각각 2, 5, 4, 5 및 5마리에서 투여 후 약 4시간째에서 6시간사이에 관찰되었고, 투여 1일째의 수컷의 경우 400, 600, 및 1350 mg/kg 투여군에서 1, 1, 및 5마리에서, 암컷의 경우 267 mg/kg 투여군에서 1마리 관찰되었다(Table I). 따라서 본 시험에서 Weil 법에 의해 산출된 LD₅₀값은 수컷 327(95% 신뢰한계 : 270~396) mg/kg, 암컷 250(95% 신뢰한계 : 236~264) mg/kg으로 산출되었다.

일반증상

본 시험에서 관찰된 일반증상은 자발운동감소(decreased locomotor activity), 유연(salivation), 연변(soft stool), 복와(prone position), 유루(lacrimation), 웅크린 자세(crouching position), 경련(convulsion), 보행실조(ataxic gait) 또는 뇨실금(incontinence of urine)이 관찰되었다(Table II). 수컷의 경우 1350 mg/kg 투여군에서는 투여 후 3~4시간 쯤에 자발운동 감소가 관찰되기 시작하였고 6시간째에 유연이 추

Table II. Clinical signs in rats orally treated with JG-381

Sex	Dose (mg/kg)	Observations	Range
Male	267	Appears normal	DAY 0 (11:38)-DAY 14(10:37)
		Decrease of locom. activity	DAY 0 (14:09)-DAY 0 (16:50)
		Soft stool	DAY 0 (14:10)-DAY 0 (16:50)
	400	Appears normal	DAY 0 (11:38)-DAY 14(10:39)
		Prone position	DAY 0 (14:19)-DAY 0 (14:45)
		Crouching position	DAY 0 (15:43)
		Decrease of locom. activity	DAY 0 (14:18)-DAY 0 (16:57)
		Salivation	DAY 0 (14:18)-DAY 0 (14:45)
		Incontinence of urine	DAY 0 (15:43)-DAY 0 (16:57)
	600	Appears normal	DAY 0 (11:38)-DAY 14(10:39)
		Decrease of locom. activity	DAY 0 (14:24)-DAY 0 (16:58)
		Ataxic gait	DAY 0 (14:25)-DAY 0 (15:46)
		Lacrimation	DAY 0 (16:58)
		Salivation	DAY 0 (14:25)-DAY 0 (14:45)
		Soft stool	DAY 0 (14:25)-DAY 0 (14:45)
	900	Incontinence of urine	DAY 0 (15:45)-DAY 0 (16:58)
		Appears normal	DAY 0 (11:38)-DAY 0 (12:39)
		Decrease of locom. activity	DAY 0 (14:27)-DAY 0 (14:45)
	1350	Salivation	DAY 0 (14:27)-DAY 0 (14:45)
		Soft stool	DAY 0 (14:27)-DAY 0 (14:45)
Appears normal		DAY 0 (11:38)-DAY 0 (12:39)	
	1350	Decrease of locom. activity	DAY 0 (14:28)-DAY 0 (17:01)
		Salivation	DAY 0 (17:00)-DAY 0 (17:01)

Table II. Continued

Sex	Dose (mg/kg)	Observations	Range
Female	267	Appears normal	DAY 0 (11:38)-DAY 14(10:38)
		Decrease of locom. activity	DAY 0 (14:12)-DAY 0 (16:52)
		Convulsion	DAY 0 (14:16)-DAY 0 (14:45)
		Lacrimation	DAY 0 (14:11)-DAY 0 (14:45)
		Salivation	DAY 0 (14:11)-DAY 0 (14:45)
	400	Appears normal	DAY 0 (11:38)-DAY 0 (12:39)
		Decrease of locom. activity	DAY 0 (14:23)-DAY 0 (15:44)
		Ataxic gait	DAY 0 (15:45)
		Lacrimation	DAY 0 (14:23)-DAY 0 (14:45)
		Salivation	DAY 0 (14:23)-DAY 0 (14:45)
	600	Appears normal	DAY 0 (11:38)-DAY 14(10:39)
		Decrease of locom. activity	DAY 0 (14:26)-DAY 0 (15:46)
		Lacrimation	DAY 0 (14:26)-DAY 0 (14:45)
		Soft stool	DAY 0 (14:26)-DAY 0 (15:47)
	900	Appears normal	DAY 0 (11:38)-DAY 0 (12:39)
		Decrease of locom. activity	DAY 0 (14:28)-DAY 0 (14:45)
		Salivation	DAY 0 (14:28)-DAY 0 (14:45)
		Soft stool	DAY 0 (14:28)-DAY 0 (14:45)
	1350	Appears normal	DAY 0 (11:38)-DAY 0 (12:39)

가적으로 관찰되다가 투여후 1일째 모든 동물이 사망하였다. 900 mg/kg 투여군에서는 투여 후 약 4시간째에 자발운동감소, 유연 및 연변이 관찰되기 시작하여 증상이 심화되어 전례가 사망하였다. 600 mg/kg 투여군에서는 투여 후 3~4시간째에 자발운동감소, 유연 및 연변이 관찰되기 시작하여 투여 후 4시간째에 추가적으로 보행실조와 뇨실금이 관찰된 후 증상이 심화된 동물에서는 사망하였고 생존한 1례의 동물에서는 투여 후 1일째부터는 회복되어 정상으로 관찰되었다. 400 mg/kg 투여군에서는 투여 후 3~4시간째부터 자발운동감소, 유연, 복와, 웅크린자세 및 뇨실금이 관찰되어 투여 후 6시간째까지 관찰되다가 증상이 심화된 동물에서는 사망하였고 생존한 1례의 동물에서는 투여 후 1일째부터는 정상적으로

관찰되었다. 267 mg/kg 투여군에서는 자발운동감소 및 연변이 투여후 3~4시간째부터 투여후 6시간째까지 관찰되었고 투여후 6시간째에 1례가 사망하였다. 암컷의 경우에는 1350 mg/kg 투여군에서 투여 후 약 4시간째부터 전례가 사망하였고 900 mg/kg 투여군에서 1례의 경우 투여후 3~4시간째부터 자발운동감소, 유연 및 연변의 증상이 관찰된후 증상이 심화되어 사망하였고 4례의 경우는 투여후 4시간째 모두 사망하였다. 600 mg/kg 투여군에서는 투여 후 4~5시간째에 자발운동감소와 유루 및 연변이 관찰된후 증상이 심화된 동물에서는 사망하였고 생존한 1례의 경우에는 투여후 5시간째부터는 회복되어 정상으로 관찰되었다. 400 mg/kg 투여군에서는 투여후 4~5시간째에 자발운동감소, 유연, 유루

Table III. Body weight of rats orally treated with JG-381

Sex	Dose (mg/kg)	Days after treatment				
		0	1	3	7	14
Male	267	151.8 ± 8.6(5) ^{a)}	172.7 ± 11.4(4)	185.7 ± 10.7(4)	235.8 ± 14.0(4)	297.0 ± 20.7(4)
	400	146.5 ± 10.6(5)	161.7(1)	188.6(1)	228.1(1)	287.4(1)
	600	149.9 ± 7.3(5)	164.8(1)	189.1(1)	226.6(1)	288.7(1)
	900	149.9 ± 6.3(5)	- ^{b)}	-	-	-
	1350	181.8 ± 4.4(5)	-	-	-	-
Female	267	122.2 ± 7.4(5)	147.6 ± 12.3(2)	161.0 ± 14.2(2)	181.4 ± 25.0(2)	190.1 ± 12.7(2)
	400	125.6 ± 7.8(5)	-	-	-	-
	600	126.8 ± 8.5(5)	158.0(1)	170.6(1)	178.3(1)	199.3(1)
	900	123.1 ± 6.6(5)	-	-	-	-
	1350	125.6 ± 9.3(5)	-	-	-	-

^{a)}(n)=number of animals, ^{b)}-Data unavailable

Table IV. Gross observation of necropsy in rats orally treated with JG-381

Sex	Dose (mg/kg)	Observation	Frequency	
			Decedents	Survivors
Male	267	N.G.F. ^{a)}	1/1 ^{b)}	4/4
	400	N.G.F.	4/4	1/1
	600	N.G.F.	4/4	1/1
	900	N.G.F.	5/5	0/0
	1350	N.G.F.	5/5	0/0
Female	267	N.G.F.	3/3	2/2
	400	N.G.F.	5/5	0/0
	600	N.G.F.	4/4	1/1
	900	N.G.F.	5/5	0/0
	1350	N.G.F.	5/5	0/0

^{a)}No gross Findings. ^{b)}Values are expressed as animal numbers.

및 보행실조가 관찰되어 증상이 심화되어 전례가 사망하였다. 267 mg/kg 투여군에서는 투여후 3~4시간째부터 자발운동감소, 유루, 유연 및 경련이 관찰된 후 증상이 심화된 동물에서는 사망하였고 생존한 3례의 경우는 투여후 6시간째부터는 회복되어 정상으로 관찰되었다.

체중변화

체중의 변화의 경우, 암수의 모든 투여군에서 생존한 대부분의 동물들은 정상적인 체중의 증가를 나타내었다(Table III).

부검소견

부검소견에서는 암수의 모든 투여군의 사망동물 및 계획도살된 동물에서 이상소견은 관찰되지 않았다(Table IV).

고 찰

JG-381에 대한 단회투여 독성시험을 SD 계통 흰쥐 암수를 이용하여 각각 267, 400, 600, 900 또는 1350 mg/kg의 용량으로 경구투여하고 14일간의 사망율, 일반증상, 체중의 변화 및 부검소견을 관찰하여 독성증상의 발현 여부를 관찰하였다. 사망동물은 투여 당일 및 투여후 1일째에 걸쳐 관찰되었고 일반증상들도 투여후 1일 이후부터는 관찰되지 않은 것으로 보아 본 시험물질은 지연독성이 없는 것으로 사료된다. 최저용량인 267 mg/kg 투여군에서 수컷은 1례, 암컷은 3례의 동물이 사망하였는데, 산출된 암수 각각의 LD₅₀ 값과 함께 고려할 때 암컷이 수컷보다 본 시험물질에 대한 감수성이 다소 높은 것으로 사료된다. 한편 1350 mg/kg 투여군에서 수컷 5례가 모두 투여 후 1일째 사망한 것으로 보고하였으나, 실제 사망 시간대는 투여 후 6시간째에서부터 투여 후 1일째 오전 체중 측정 시간 전에 모두 사

망하였다. 이는 수컷 1350 mg/kg 투여군의 투여전 체중이 다른 수컷 용량 시험군에 비해 상대적으로 높은 것과 일부 관련성이 있지 않나 사료된다.

이상의 결과로 보아 암수 흰쥐에 대한 JG-381의 단회 경구투여는 일반증상에서 일부 자발운동의 감소, 유연, 연변, 유루, 경련, 뇨실금, 복와, 웅크린자세 및 보행실조를 나타내며, 단회 경구투여에 의한 LD₅₀값은 수컷이 327(95% 신뢰한계 : 270~396) mg/kg, 암컷 250(95% 신뢰한계 : 236~264) mg/kg으로 산출되었다.

감사의 말씀

본 연구는 1998년도 보건과학기술연구개발사업(HMP-98-D-7-0018)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

Assan, R., Heuclin, C., Girard, J. R. and Attali, J. R. (1976). Lactic acidosis induced by biguanides. *Nouv. Presse. Med.* **31**, 247-249.

Collier, G. R., Traianedes, K., Macaulay, S. L. and O'Dea, K. (1993). Effect of fatty acid oxidation inhibition on glucose metabolism in diabetic rats. *Horm. Metab. Res.* **25**, 9-12.

Davis, S. N. and Granmer, D. K. (1996). Insulin and oral Hypoglycemic Dugs; Glucagon. In *The Pharmacology Basis of Therapeutics* (Hardman, J. G. et al, Ed.), pp. 1487-1517. McGraw-Hill, New York.

Ho, W., Tutwiler, G. F., Cottrell, S. C., Morgans, D. J., Tarhan, O. and Mohrbacher, R. J. (1986). Alkylglycidic acids: potential new hypoglycemic agents. *J. Med. Chem.* **29**, 2184-2190.

Karam, J. (1995). Pancreatic Hormones &-Antidiabetic Drugs. In *Basic and Clinical Pharmacology* (Katzung, B. G., Ed.), pp. 637-654. Appleton & Lange, Connecticut.

Martin, C., Odeon, M., Cohen, R. and Beylot, M. (1991). Mechanisms of the glucose lowering effect of a carnitine palmitoyl transferase inhibitor in normal and diabetic rats. *Metabolism.* **40**, 420-427.

Ratheiser, K., Schneeweiss, B., Waldhausl, W., Fasching, P., Korn, A., Nowotny, P., Rohac, M. and Wolf, H. P. (1991). Inhibition by etomoxir of carnitine palmitoyltransferase I reduces hepatic glucose production and plasma lipids in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* **40**, 1185-1190.

Turcani, M. and Rupp, H. (1999). Modification of left ventricular hypertrophy by chronic etomixir treatment. *Br. J. Pharmacol.* **126**, 501-507.

Wolf, H. P. (1992). Possible new therapeutic approach in diabetes mellitus by inhibition of carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1). *Horm. Metab. Res. Suppl.* **26**, 62-67.

식품의약품안전청 (1998). 의약품등의 독성시험기준, 식품의약품안전청고시 제1998-116호.

식품의약품안전청 (1998). 의약품 안전성시험 관리기준, 식품의약품안전청고시 제1998-17호.