

특집: 생리활성물질의 최근 연구동향(VII)

미생물로부터 식후혈당상승 억제제, CKD711의 개발

전형식 · 권영인 · 홍청일
종근당 종합연구소

Blood glucose level은, 간에 있어서의 glucose 생산과, 말초 조직(뇌, 근육, 지방 등)에 있어서의 glucose의 흡수 사이의 balancing에 의해 결정된다. 정상적으로는, 췌장에서 분비되는 인슐린(insulin)의 작용으로 이 균형 상태가 매우 안정적(80-85 mg/dl)으로 유지되게 된다. 즉 음식물 섭취후의 blood glucose level이 급격한 증가를 보이게 되면, insulin은 말초 조직에서의 glucose의 흡수를 촉진시켜 결과적으로 glycogen 합성을 증가시키는 한편, 간에서의 glycogenolysis와 gluconeogenesis를 저해하므로써, 이들 상승된 혈당치를 낮추게 하는 것이다. 이러한 작용은 안정된 혈당 농도를 회복시키는 이른바 glucose homeostasis를 유지하게 해주게 된다.

당뇨병(diabetes mellitus)은 heterogeneous한 질환으로서, 이러한 glucose homeostasis가 파괴된 상태, 즉 고혈당증(hyperglycemia)이 common syndrome으로 나타나는 만성 대사성 질병이며, 이러한 hyperglycemia는 식후뿐 아니라 공복시에도 관찰되고 있다.

당뇨병은 크게 나누어 인슐린 의존형 당뇨병(insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM)과 인슐린 비의존형 당뇨병(non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM)으로 구분되는데, 전체 당뇨병 환자의 90-95%가 인슐린 비의존형 당뇨병, 즉 NIDDM에 속한다고 알려져 있다. Insulin 의존형 당뇨병은 인체내 insulin 생성의 이상에 기인한다고 알려져 있으며, insulin의 적절한 투여에 의하여 증상을 관리하므로써 합병증을 예방할 수 있다. 그러나, Insulin 비의존형 당뇨병은 원인이 아직 분명하지는 않으나, 거의 모든 NIDDM 환자들이 insulin 분비의 이상과 insulin sensitivity의 감소, 즉 insulin resistance를 공통적인 특징으로 가지고 있다고 알려져 있으며, 이렇게 insulin resistance가 과다하게 나타나는 경우에는 적절한 치료법이 부족한 것이 현실이다.

당뇨병은 기원전부터 알려진 오래된 질병임에도 불구하고 insulin, sulfonylurea 제제 및 biguanide 제제 이외에는 마땅한 치료제가 없는 실정이다. 현재 미국에만 1,400만명(전 국민의 6.6%)의 당뇨병 환자가 있는 것으로 추정되고, 그 치료 경비는 월 920억달러에 달하는 것으로 알려져 있다. 최근에는 풍족해진 음식, 문명의 서구화(소위 말하는 "Cocacolonization")와 운동 부족 등의 이유로 선진국 뿐만 아니라 개발국 및 개발 도상

국에서도 발병률이 높아지고 있으며, 이에 따른 NIDDM 환자수의 향후 예측은 2000년에 1억5천만, 2010년에는 2억을 넘을 것으로 예상되며, 이에 따른 전체 경구용 당뇨병 치료제의 시장도 지속적으로 증가하여 2010년에는 40억 달러를 넘을 것으로 추정되고 있으므로, 획기적인 치료제의 개발이 절실히 필요하다고 하겠다.

식후 blood glucose level의 급격한 상승, 즉 식후 고혈당증(postprandial hyperglycemia)은, 공복시에는 아직 hyperglycemia가 나타나지 않는 경미한 당뇨병에서도 관찰되는 증상이다. 당뇨병 환자에 있어서의 postprandial hyperglycemia는 insulin의 분비를 저하시키고, 또 insulin sensitivity를 감소시키게 되어, 결과적으로 당뇨병의 상태를 더 악화시키게 되고, 고혈당증, 즉 hyperglycemia가 지속되게 하는 것이다. 이러한 악순환을 소위 glucose toxicity[1]라 하는데, 이것은 당뇨병의 복합 증세들, 특히 neuropathy, nephropathy 그리고 retinopathy 등과 같은 합병증의 직접적인 원인이 되어(Fig. 1) 전체 사망 원인 질환 중 3위에 달하고 있으므로, 식후 혈당상승을 조절 또는 억제하는 것이 당뇨병 치료를 위하여 매우 중요하다고 하겠다.

탄수화물은 인간의 diet중 주요한 부분을 차지하고 있다. 이것은 단당류, 이당류, 다당류 등 다양한 형태로써 공급되어지며, 에너지 공급의 주된 원천이기도 하다. 그러나, 오직 glucose, fructose 등과 같은 단당류만이 소장내에서 흡수될 수 있

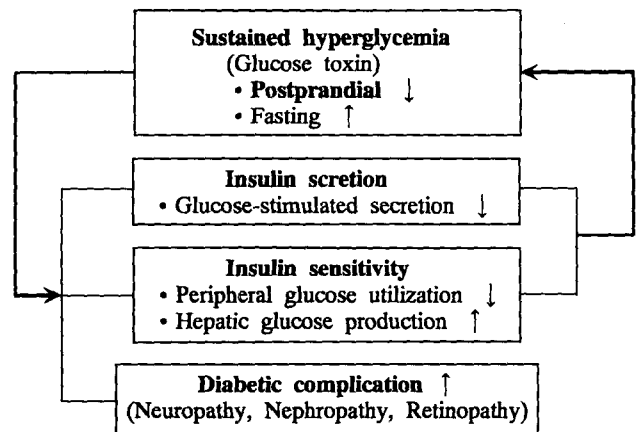


Fig. 1. Glucose toxicity and diabetic problems.

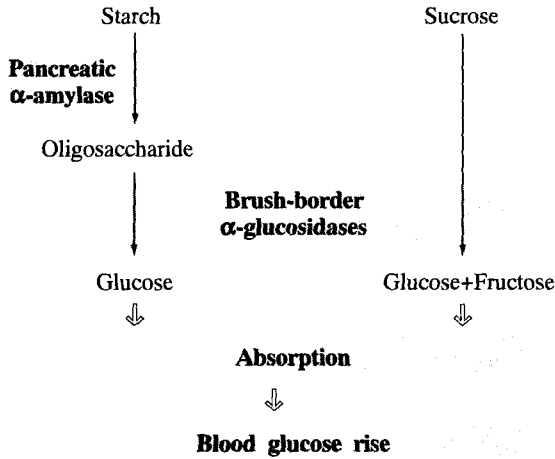


Fig. 2. Schematic diagram of enzymatic degradation of dietary carbohydrates by intestinal α -glucosidases.

Table 1. Various α -glucosidases on brush-border from human small bowel biopsies[2]

Enzyme	U/g protein
Maltase	378 ± 50 (n=8)
Sucrase	103 ± 15 (n=8)
Isomaltase	114 ± 25 (n=8)
Glucoamylase	40 ± 9 (n=3)
Trehalase	28 ± 8 (n=8)
Lactase	35 ± 7 (n=8)

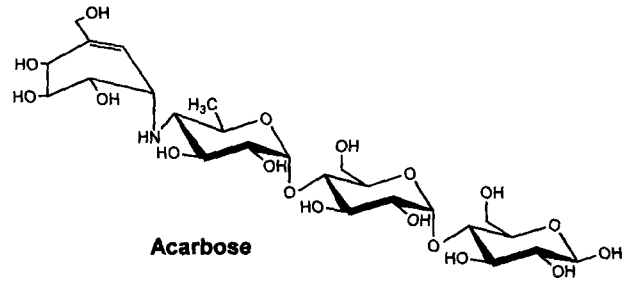
다. 음식물중 탄수화물의 주된 부분은, starch와 sucrose인데, 소장에서 흡수되기 위하여 pancreatic α -amylase와 소장내 brush-border의 membrane에 bound되어 있는 α -glucosidase들과 같은 효소들에 의해 분해되어야 한다(Fig. 2). 참고로, 사람의 소장부위 biopsy에 있어서, 효소활성(enzyme units/g-protein)으로 나타낸 소장내 α -glucosidases들의 분포를 Table 1에 비교하였다[2].

소장내에서의 탄수화물의 분해(소화·흡수)는 보통 소장 상부(upper jejunum)에서 신속히 이루어 지게 되며 결과적으로 이러한 신속한 소화 속도 때문에 식후 혈당치의 상승도 급격하게 나타나게 되는 것이다. 그러므로, pancreatic α -amylase 또는 maltase나 sucrase와 같은 α -glucosidase들을 적절히 저해함으로써, 당뇨병 환자, 특히 insulin resistance가 과다하게 나타나는 NIDDM 환자들에 있어서 식후의 급격한 혈당상승을 억제하는 것이 당뇨병 치료를 위하여 매우 중요한 것이다.

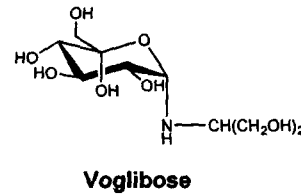
그러나 이때, 이러한 소화 효소들, 특히 pancreatic α -amylase를 과다하게 저해하게 되면, 소화되지 않은 carbohydrate들이 대장내로 과량 유입되게 되어 장내 이상발효를 유발시키므로써, abdominal flatulence나 심한 경우 설사 등의 심각한 부작용을 일으키게 되므로, 효소저해의 선택성이 무엇보다 중요한 요소가 되게 된다[3].

생물산업

A. Acarviosine derivative



B. Valiolamine derivative



C. 1-Deoxynojirimycin derivative

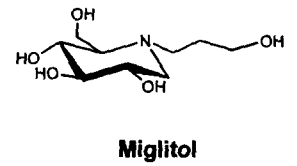


Fig. 3. Structural formula of various α -glucosidase inhibitors.

이러한 점에 착안하여 Puls 등[4]은 1977년에, sulfonylurea 제제나 인슐린 등에 의해서는 식후 고혈당증(postprandial hyperglycemia)이 조절되지 못하는 NIDDM 환자에 있어서의 새로운 치료법을 제안하게 되었다. 즉, 소장내 탄수화물 분해효소들의 저해에 의해 starch나 sucrose의 소화를 조절하므로써, hyperglycemia, hyperinsulinemia 및 hypertriglyceridemia를 위한 식이요법과 비슷한 효과를 얻고자 하는 시도가 이루어 졌다. 이들은 처음, pancreatic α -amylase의 저해 활성에 주목하여 연구를 수행하였으나, 후에 sucrose와 starch의 소화·흡수 저해에 선택성을 갖는, 보다 개선된 inhibition spectrum의 저해제에 주목하게 되었다. 개발이 완료된, 또는 개발중인 α -glucosidase 저해제들의 구조식을 Fig. 3에 보였다.

Acarbose(BAY g 5421, Bayer)가 처음으로 이들 효소들을 효과적으로 저해하는 물질로서 보고되었다[2]. 이것은 NIDDM 치료의 새로운 지평을 여는 계기가 되었는데, 1989년 독일에서 발매된 이래 세계시장에서 급격한 성장을 보여 왔고, 1994년에는 미국 FDA의 approval(Precose[®]; NDA 20-482)을 획득했다. Acarbose는 방선균의 한 속인 Actinoplanes strain SE 50에 의해 생산되는 여러 homologues들 중 하나로서, pseudo-tetrasaccharide 구조를 갖고 있으며, pancreatic α -amylase 및 glucoamylase, dextrinase, maltase, sucrase 등의 활성을 생체내·생체의 실험에서 강력하게 저해하였다.

Acarbose는 sucrase에 대하여, 기질인 sucrose보다 10^4 내지 10^5 배의 강한 affinity를 가지며, 동시에 reversible한 결합을 하는 것으로 밝혀졌다. 효소저해 kinetic constant 중, 효소의 기질 친화도인 K_m 과, 저해제와의 친화도인 K_i 의 ratio를 비교하

였을 때, acarbose의 sucrose 및 maltose에 대한 K_m/K_i 는 10^4 의 매우 높은 수치를 나타내었다. Rat에서의 starch 및 sucrose 부하 실험시, acarbose의 식후 혈당상승 억제용량(ED_{50})은 1.0-1.5 mg/kg-체중이었으며, 용량 의존적인 저해 경향을 보였다. 또한, 식후의 glucose-stimulated 인슐린 분비도 효과적으로 억제하였으며, 이러한 효과는 hyperinsulinemia 모델에서 더욱 현저하게 나타났다[3].

일본의 Takeda사에 의해 개발된 AO-128(voglibose)[5]는 *Streptomyces hygroscopicus*가 생산하는 valiolamine의 N-substitution 유도체로서, sucrase, maltase 및 isomaltase에 대하여 매우 강력한 저해 활성을 보였으며 1994년 9월부터 일본에서 marketing되고 있다. Voglibose는 acarbose에 비하여 100배 정도 더 강한 IC_{50} 치를 나타냈으나, 경구투여시 많은 양이 체내로 흡수되는 만큼, 체내에 흡수되어 나타날 수 있는 간이나 근육조직에서의 glycogen 대사 및 glycoprotein의 생합성 저해의 위험성이 남아 있다.

Acarbose에 이어서 miglitol(BAY m 1099)과 emiglitate(BAY o 1248)가 추가로 보고되었다[6]. 이들은 모두 1-deoxynojirimycin의 N-substitution 유도체로서, pseudo-monosaccharide 구조를 가지고 있다. Miglitol과 emiglitate 공히 소화 효소들과의 결합은 reversible한 것으로 나타났다. 그러나, emiglitate는 acarbose와는 다르게 효소 저해 활성이 너무 장시간 지속되는 특성을 보였다. 즉 rat에서의 시험 결과, emiglitate 투여 후 7시간 뒤에도 여전히 저해 효과가 나타나는 등, 효소와 매우 tight한 결합을 하는 것으로 밝혀져, 실용화에는 아직 연구가 더 필요한 것으로 보여진다. Miglitol은 1996년 가을에 EU 회원국 및 미국 FDA의 승인을 받았다.

이상에서 살펴 본 α -glucosidase 저해제들은 모두 공통적으로 secondary 또는 quaternary amine 부위를 구조중에 갖고 있다는 특징이 있는데, 이러한 부위가 바로 각 효소들의 기질, 예컨대 maltose unit의 α -(1,4)-결합과 효소의 활성 부위에 대하여 경쟁적으로 결합하므로써 약효활성을 나타내는 것으로 추측된다.

이들 기존 제품들의 주된 adverse effect는 공히 abdominal disorder로서, 복부팽만, flatulence, meteorism, 그리고 경우에 따라서는 diarrhea 등이 나타나고 있다. 또 경구투여 후 체내로 흡수되는 약물의 경우, 간독성 및 근육 무력증을 유발하고 있다. 따라서, 효소 저해의 우수한 선택성으로 이러한 부작용을 완화시키는 새로운 치료제의 개발이 절실히 요구되고 있다.

자연 생태계에서의 미생물의 역할은 매우 다양하여, 생태계의 평형유지에 기여하는 바가 매우 크다. 미생물이 이처럼 다양한 기능을 수행할 수 있는 것은 이들이 갖는 대사활성의 다양성, 여러 가지 환경변화에 대한 적응능력 등에 기인한다. 이러한 미생물의 다양한 능력은 일찍부터 인류의 생활에 도움을 주었고, 특히 유용한 생리활성 물질의 개발에 있어 매우 중요

한 위치를 차지하여 왔다는 것은 주지하는 바이다. 더욱 생물체 내에서의 대사 반응은 특이적이고 mild하여, 산업적 응용시 화학반응에 비해 잇점이 많다. 토양은 자연 생태계 중에서도 유기물들이 잘 농축되어 있고 미생물의 생육을 원활하게 하는 환경조건을 구비하고 하고 있다. 특히 호기성 filamentous bacteria인 방선균(Order Actinomycetales)에게는 매우 적절한 서식처를 제공해 주고 있는 바, 이들 방선균이 아직까지도 유용 생물활성 물질의 제일 빈번한 source로 자리매김 되고 있다는 사실을 볼 때, 토양이야말로 신규 의약품 개발을 위한 중요한 원천이라 하겠다. 토양 미생물을 대상으로 신규의 약활성 후보물질을 탐색(screening)하는데는 배양 기술, assay 방법의 uniqueness, 분리 및 정제기술 등도 중요하지만, 무엇보다도 미생물 source의 다양한 확보가 주요 관건이라 하겠다. 이를 위해서는 가능한 diverse한 생태계, extreme ecosystem에의 접근, rhizosphere에의 주목 등이 중요하다.

토양 미생물을 대상으로 screening을 지속적으로 수행하던 중, 제주도 산림 토양으로부터 분리된 방선균의 한 균주가 몇 종류의 α -glucosidase inhibitor를 생산하고 있는 것을 발견하였다. 전자현미경(SEM) 등을 이용한 형태학적 관찰과 배양학적 특성 및 whole-cell hydrolysates를 이용한 cell wall 분석 등의 결과로부터 본 균주는 genus *Streptomyces*에 속하는 것으로 밝혀졌으며, *Streptomyces* sp. CK-4416으로 명명하였다.

배양액으로부터 분리·정제된 active principles들 중 CK-4416a와 CK-4416b물질에 관하여 구조해석을 수행한 결과, High-Resolution MS-MS spectrum으로부터 CK-4416a와 CK-4416b의 분자량이 각각 1001.89($C_{37}H_{63}NO_{30}$) 및 677.61($C_{25}H_{43}NO_{20}$)임을 알게 되었다. Nuclear magnetic resonance spectroscopy(NMR)를 이용한 chemical structure의 분석 결과, CK-4416a와 CK-4416b는 신규한 aminooligosaccharide의 구조를 가지고 있음이 밝혀졌다.

Porcine intestinal α -glucosidases와 pancreatic α -amylase에 대한 CK-4416a와 CK-4416b의 *in vitro* 저해활성을 시험하였다(Table 2).

CK-4416b는 CK-4416a에 비하여 이들 효소들에 대하여 약 3배 정도 강한 저해활성을 나타내었다. 한편, acarbose와 비교하였을 때 CK-4416b는 porcine intestinal α -glucosidases에 대

Table 2. Inhibitory activity of CK-4416 compounds against porcine intestinal enzymes *in vitro*

	IC_{50} (μ g/ml)		
	CK-4416a	CK-4416b	Acarbose
α -Amylase	104	78	36
Maltase	6.5	2.5	2.5
Sucrase	1.5	0.5	0.6

a) As a company code for the development, CK-4416b compound is nominated as CKD711.

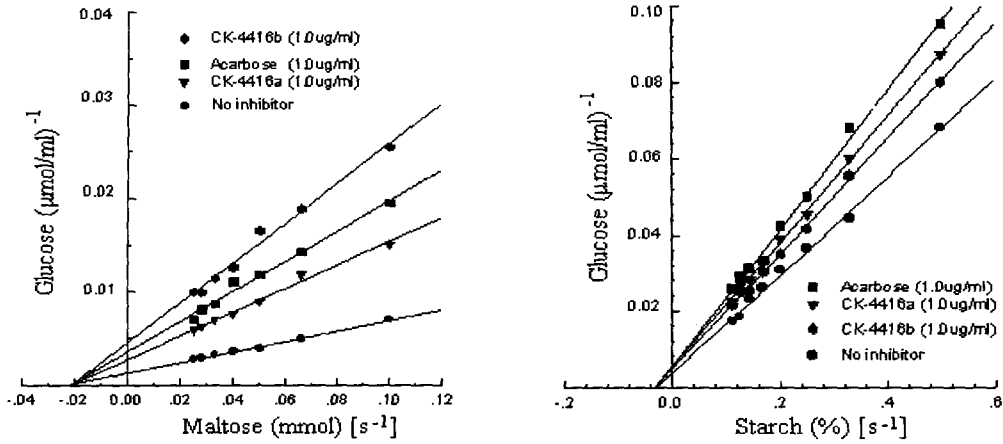


Fig. 4. Comparison of the V_{max} values.

해서 동등한 정도의 활성을 보인 반면, pancreatic α -amylase에 는 1/2 이하의 약한 활성을 보였다(Table 2).

Porcine intestinal maltase와 pancreatic α -amylase에 대한 효 소저해의 kinetic study 후, V_{max} 값의 비교를 위하여 실험 결과 를 재구성하여 보았다. Fig. 4에서 보인 바와 같이 maltase에 대한 CK-4416b의 V_{max} value는 acarbose 및 CK-4416a에 비하 여 작은 것으로 나타났으며(순서대로 200, 238 및 333; blank 는 667), pancreatic α -amylase에 대한 실험에서는 이와는 반대 로 CK-4416b가 가장 큰 V_{max} 값을 보였다(순서대로 200, 167 및 182; blank는 250). 이러한 결과로부터, *in vivo*에서 소화관 내에 과량의 기질(예를 들어 starch)이 유입되었을 때, CK- 4416b가 acarbose에 비하여 starch의 소화를 less effective하게 저해하는 반면, starch의 소화물인 maltose의 분해는 가장 효과적으로 저해할 것으로 예상되었다. CK-4416b 물질 은 company code로서 CKD711로 명명하였다.

CKD711(CK-4416b의 개발 code)과 효소와의 결합양상과 해 리정도를 확인하고자, BIA(Bio-molecular Interaction Analysis) 기법[7]을 사용하여, SPR(Surface Plasmon Resonance)이라는 광학현상으로 측정된 효소-저해제 반응의 kinetic analysis를 수행하였다. 일반적으로 carbohydrate hydrolase에 대한 저해 제들의 결합상수(k_a)와 해리상수(k_d)값의 확인은 저해효과의 임상적 예측을 위하여 중요하다. 이때, 효소저해 반응의 조건 을 최대한 생체 모델과 유사하게 구성하여, 인체 소장 내에서 의 실제 반응양상을 예측할 수 있어야 한다. 본 연구에서는, 저해물질을 matrix(센서칩) 표면에 고정화시키고, analyte로써 탄수화물 분해효소를 연속적으로 흘려주면서 반응시켰다. 그 결과, α -amylase 및 isomaltase(sucrase-isomaltase complex)에 대한 결합과 해리상수가 Table 3과 같이 나타났다.

Isomaltase에 대한 association 반응에 있어서 CKD711은 acarbose보다 다소 높은 결합력을 나타냈고, dissociation 반응 에서는 반대로 해리가 다소 delay됨을 알 수 있었다. 한편,

생물산업

Table 3. Binding affinities of CKD711 and acarbose to carbo- hydrate hydrolases

Enzyme	Inhibitor	Association constant (k_a)	Dissociation constant (k_d)
α -Amylase	CKD 711	1.48×10^6	8.47×10^{-3}
	Acarbose	1.55×10^5	7.80×10^{-3}
Isomaltase	CKD 711	2.26×10^5	5.13×10^{-4}
	Acarbose	1.91×10^5	7.53×10^{-4}

human α -amylase에 대한 association 및 dissociation 반응은 공 히 CKD711이 acarbose보다 높은 결합력과 빠른 해리 상수를 나타내었다. 이상에서 CKD711은, 탄수화물의 소화단계를 대 조물질인 acarbose보다 짧은 시간에 효과적으로 저해하여, 소 화되지 않은 과량의 고분자 탄수화물이 소장내로 유입되는 것 을 적절히 조절하고, 소화된 이당류의 흡수저해는, 소장내 유 입과 동시에 시작되어, 더 오래 지속될 것으로 사료되었다.

Wistar rat을 이용한 sugar loading test에서 CKD711의 식후 혈당 억제효과를 시험하였다(Table 4). 6주령의 male rats를 20시간 절식시킨 후, starch는 체중-kg당 1.5 g을, maltose와 sucrose는 각 2 g씩을 각각의 저해제와 함께 ingestion시켰다. 그 결과, maltose와 sucrose loading시 CKD711은 acarbose와 유사한 혈당상승 억제효과를 나타내었지만, starch 부하시에는 낮은 억제효과를 나타내었다.

3주간에 걸친 feeding test를 6주령, male의 Sprague-Dawley

Table 4. Inhibition of the blood glucose increment in Wistar rats, ingested with each carbohydrate

Loaded carbohydrates	Inhibition(%)	
	CKD711 (4 mg/kg)	Acarbose (5 mg/kg)
Starch	54	87
Maltose	40	45
Sucrose	79	79

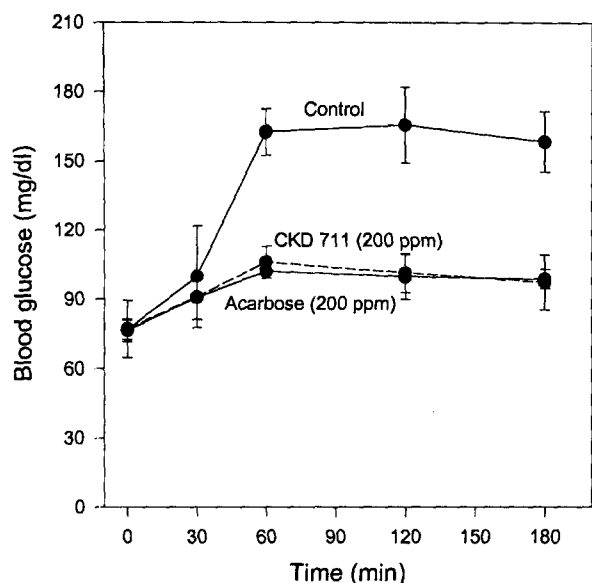


Fig. 5. Postprandial blood glucose profile in Sprague-Dawley rat (Rats were fed on high-starch diet for 3 weeks before experiments).

Table 5. Some parameters related with abdominal side effects

	CKD 711	Acarbose	Control
Cecal volume	10,829 mm ³	14,865 mm ³	3,039 mm ³
Intestinal transport of charcoal	69.2%	58.7%	71.0%

rats에서 수행하였다. 시험기간 동안 각각의 저해제를 섞어준 high-starch diet를 자연섭취 시키면서, 일주일 마다 혈액을 채취하여 혈중 insulin 농도를 측정하였다. 그리고, 3주 후에는 다시 20시간 절식시킨 후, 각각의 저해제를 섞어준 high-starch diet를 ingestion시키고, 이후 3시간 동안 혈액을 채취하면서 blood glucose level을 측정하였다. 먼저, 3주후 postprandial blood glucose profile 실험에서는 Fig. 5에 보인 바와 같이, control 그룹이 높은 혈당치를 나타내고 있을 때, CKD711 및 acarbose 공히 식후의 혈당상승을 효과적으로 억제하였다.

그러나, cecum의 부피 측정과 charcoal을 이용한 intestinal transport 실험에서는 서로 큰 차이를 나타냈다(Table 5). 즉, acarbose 투여군의 경우, 장내 수송능력이 크게 저하되었고, cecum의 부피가 control 보다 5배 가량 증가되어 있어 장관내의 gas 생성이 심각함을 알 수 있었다. 그러나, CKD711 투여군에서는 이러한 현상이 크게 완화되어, 임상에서의 abdomi-

nal flatulence나 meteorism 등과 같은 부작용을 acarbose보다 훨씬 경감시킬 수 있을 것으로 사료되었다.

이상의 3주간 feeding 실험 결과, CKD711은 임상에서 장기간 사용할 때, 식후 혈당 상승 억제효과 및 abdominal side effects 측면에서 acarbose보다 우수한 효과를 나타내리라 기대되었다.

Conclusion

CKD711은 토양 분리 방선균인 *Streptomyces* sp. CK-4416가 생산하는 신규의 aminooligo saccharide 물질임이 밝혀졌다. CKD711은 *in vitro*에서 porcine intestinal α -glucosidases를 강력하게 저해하였고, pancreatic α -amylase의 저해활성은 미약하여, 탄수화물 분해효소들을 선택적으로 저해함을 알 수 있었다. CKD711은 rat에서 식후의 급격한 혈당상승을 효과적으로 억제하였고, 3주간 feeding 실험에서 acarbose보다 abdominal side effects가 크게 완화될 수 있음이 밝혀졌다.

CKD 711은 향후 임상에서, 부작용의 개선과 함께 당뇨병에서의 glycemic response의 치료에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대되었다.

참고문헌

- Rosetti, L. et al. 1990. Glucose toxicity. *Diabetes Care* **13**: 610-630.
- Caspary, W. F. et al. 1990. Inhibition of human intestinal α -glucoside-hydrolases by a new complex oligosaccharide. *Res. Exp. Med.(Berl.)* **175**: 1-6.
- Bischoff, H. 1994. Pharmacology of glucosidase inhibitor. *European J. Clinical Investigation* **24**(Suppl.3): 3-10.
- Puls, W. et al. 1977. Glucosidase inhibition: a new approach to the treatment of diabetes, obesity and hyperlipoproteinemia. *Naturwissenschaften*. **64**: 536-537.
- Odaka, H. et al. 1992. Effect of disaccharidase inhibitor, AO-128, on postprandial hyperglycemia in rats. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* **45**: 27.
- Bischoff, H. et al. 1985. Pharmacological properties of the novel glucosidase inhibitors BAY m 1099 (miglitol) and BAY o 1248. *Diabetes Res. Clin. Prac.* **1**(Suppl.): S53.
- R. Karlsson. 1993. A new methodology to measure interactions with low molecular weight ligands. 3rd European BIA symposium. pp. 2-8.