

새로운 피라졸로피리미디논 유도체 DA-8159의 일반약리작용

오태영 · 김동환 · 손문호 · 김동성 · 안병옥 · 김순희* · 김원배
동아제약(주) 연구소

General Pharmacology of DA-8159, a New Pyrazolopyrimidinone Derivative

Tae Young OH, Dong Hwan KIM, Moon Ho SON, Dong Sung KIM, Byoung Ok AHN,
Soon Hoe KIM* and Won Bae KIM

(Received Feb. 18, 2003 ; accepted Mar. 18, 2003)

Abstract—General pharmacological properties of DA-8159, a new pyrazolopyrimidinone derivative were examined in laboratory animals to investigate its safety profile. The oral administration of DA-8159 (1, 5 or 30 mg/kg) in mice and rats had no effect on general behaviors and central nervous system of the animals in test systems, such as hexobarbital-induced sleeping time, motor coordination, normal body temperature, writhing syndromes induced by 0.75% acetic acid solution, chemo-shock produced by pentetrazole solution and rotar rod test. Anesthetized cats treated intravenously with DA-8159 (0.1, 0.3, 1, 3 or 10 mg/kg) showed transient and mild decrease in blood pressure. However, heart rate, respiration rate and tidal volume were not changed by intravenous DA-8159. In the isolated organs including ileum, heart (sinus rate of atria and contractility of papillary muscle), trachea of guinea pigs and phrenic nerve of rats, DA-8159 (10^{-8} ~ 10^{-5} mg/L) did not elicit any effect or inhibitory action on the chemically or electrically stimulated contraction. DA-8159 did not influence gastric secretion, pH and total acid output in rats and intestinal propulsion in mice. The administration of DA-8159 in rats had no effect on the platelet aggregation induced by ADP in rabbit plasma, urinary volume and electrolyte ion (Na^+ , K^+ , Cl^-) excretion in rats. Prothrombin time (PT) of the rats showed a mild but significant increase after administration of DA-8159. Activated partial thromboplastin time (APTT), however, was not affected by DA-8159. These results indicate that DA-8159 does not exert any of serious pharmacological effects.

Keywords □ DA-8159, Erectile Dysfunction, Phosphodiesterase 5 inhibitor, General pharmacology

I. 서 론

발기부전(erection dysfunction)은 만족할 만한 성행위에 필요한 발기상태를 이루거나 유지할 수 없는 상태로 정의될 수 있으며, 40대 이상의 남성 중 50% 이상이 발기부전 환자인 것으로 알려지고 있다(Korenman, 1995). 국내의 발기부전 환자는 정확한 통계가 발표되어 있지 않으나, 최근 인구의 고령화 및 생활수준의 향상으로 향후 발기부전 환자가 급증할 것으로 예상되어지고 있다. 현재 발기부전의 치료는 국소주입법, 요도삽입법, 경구복용법 및 수술 등의 방법이 행해지고 있다. 국소주사로는 papaverine, phentolamine, prostaglandin E_1 등이 사용되어지고 있으나 전반적인 만족도가 낮으며, 이러한 주사제에 대한 거부감을 해결하기 위하여 요도내로 약물을 직접 주입하는 Muse® (alprostadil)가 Vivus사에 의해 개발

되었으나 효과가 기대에 미치지 못하고 있다. 이에 1998년에 Pfizer사가 개발한 경구용 발기부전 치료제인 Viagra® (sildenafil)가 현재는 발기부전 치료제 시장을 주도하고 있으나, 심혈관계의 부작용이 문제점으로 지적되고 있다.

DA-8159는 동아제약주식회사에서 경구용 발기부전 치료제제로 개발중인 sildenafil 유도체 화합물로서 작용기전이 sildenafil과 유사하며, sildenafil의 작용기전은 음경해면체에 고농도로 분포하는 phosphodiesterase type 5 (PDE 5)를 억제함으로써 cyclic guanine monophosphate (cGMP)의 분해를 막아주기 때문에 발기를 유지시키는 것으로 밝혀졌다(Wagner *et al.*, 1998). DA-8159는 sildenafil과 유사한 작용기전을 갖는 약물이지만(Doh *et al.*, in press), 전임상 독성시험 결과 sildenafil 보다 안전한 약물로 확인된 바 있으며(미발표 자료), rat·rabbit·dog 등에서의 약효시험 결과 sildenafil과 동등 이상의 효과가 있는 것으로 확인되었다(Oh *et al.*, in press). 본시험에서

*To whom correspondence should be addressed.

는 DA-8159의 경구투여시 발현 가능한 부작용을 예견하고 기타 특이한 약리작용의 유무를 조사하기 위해 일반 약리 작용을 검토하였다.

II. 시험방법

1. 시험물질 및 시약

시험에 사용한 DA-8159 (5-{2-propyloxy-5-(1-methyl-2-pyrrolidinylethyl-amidosulfonyl) phenyl}-1-methyl-3-propyl-1,6-dihydro-7H-pyrazolo-(4,3-d)-pyrimidine-7-one)와 sildenafil citrate (이하 sildenafil로 표기)는 모두 pyrazolo-pyrimidinone계 물질로 동아제약(주) 연구소 합성연구팀에서 공급받았으며, NMR 및 IR에 의해 구조를 확인하였고, HPLC 순도는 각각 98% 이상이었다. 경구투여시 1% HPMC (hydroxypropylmethylcellulose)에 현탁하였으며, vehicle로서 1% HPMC를 투여하였다. Chlorpromazine, haloperidol, hexobarbital, pentetrazole, acetic acid glacial, naproxen, carbachol, d-tubocurarine, acetylcholine, pentobarbital, α -chloralose, borax, isoproterenol, charcoal, atropine, ranitidine, sodium citrate, adenosine 5'-diphosphate (ADP), furosemide 등은 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 실험동물

체중 25~30 g의 ICR계 웅성 마우스, 180~200 g 전후의 웅성 SD (Sprague-Dawley)계 랫드, 2.8~3.3 kg의 NZW (New Zealand White)계 웅성 토끼, 330~350 g의 Hartley 계의 웅성 기니픽 및 2.7~3.3 Kg의 고양이를 광산실험동물로부터 공급받아 순화기간을 거친 후 사용하였다. 순화기간과 실험기간중의 동물 사육환경은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 15\%$, 조명시간 12시간(07:00~19:00)의 조건을 유지하였으며, 사료와 물은 자유롭게 섭취시켰다. 시험물질을 경구투여하는 경우 18시간 절식시킨 후 실험에 사용하였다.

3. 용량설정 및 약물처리

마우스와 랫드에는 DA-8159를 0 (vehicle), 1, 5, 30 mg/kg/10 mL 용량으로 1% HPMC에 녹여 경구로 투여하였으며, 고양이에는 0 (vehicle), 0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg/mL 용량으로 citrate buffer (pH 4.0)에 용해하여 정맥내로 투여하였다.

4. 중추신경계에 미치는 영향

(1) 일반증상 및 행동에 대한 작용

일반증상의 관찰은 Irwin의 다차원관찰법(Irwin, 1968)을 변형하여 체중, 체온, locomotor activity, stereotyped

behavior, convulsion, tremor, exophthalmosis, ptosis, pilo-erection, tail elevation, traction, motor incoordination, muscle tone, analgesia, abdominal tone, catalepsy, righting reflex, pinna reflex, pupil reflex, skin color, respiration, lacrimation, salivation, urination, diarrhea, death 등의 행동 변화, 신경증상, 자율신경증상 및 중독증상을 관찰하였다. 약물을 마우스에 경구투여 0.5, 1, 3, 6 시간 후에 일반증상을 관찰하였으며, 대조약물로는 sildenafil 30 mg/kg과 haloperidol 10 mg/kg을 경구로 투여하였다.

(2) Hexobarbital 수면에 대한 작용

마우스를 군당 6마리씩 사용하였으며, 약물을 경구투여하고 1시간 후에 sodium hexobarbital 80 mg/kg을 복강내로 투여하여 수면유도시간과 수면시간을 측정하였다. Sodium hexobarbital 투여 시부터 정향반사 소실까지를 수면유도시간으로 판정하였으며, 정향반사 소실부터 회복까지의 시간을 수면시간으로 하였다. 대조약물로는 sildenafil 30 mg/kg과 chlorpromazine 20 mg/kg을 경구로 투여하였다.

(3) 자발운동에 대한 작용

절식시킨 마우스에 약물을 투여하고 0, 10, 30, 60, 120, 150 분 후에 방음실내에서 Opto-Varimax (Columbus Instruments, Columbus, USA)를 이용하여 5분간씩 자발운동량을 측정하였다. 측정시기에 따른 오차를 줄이기 위해 용매 투여군에 대해서도 동일 시간대에 자발운동량을 측정하였으며, 대조약물로는 sildenafil 30 mg/kg을 경구로 투여하였다.

(4) 항경련 작용

마우스를 군당 6마리씩 사용하여 약물을 경구투여하고 30 분 후에 pentetrazole을 80 mg/kg으로 복강투여하고 최초 경련시간, 간대성 경련, 강직성 경련의 발생 유무 및 사망 여부를 관찰하였다(Swinyard *et al.*, 1952). 대조약물로는 sildenafil 30 mg/kg을 경구로 투여하였다.

(5) 정상체온에 대한 작용

랫드를 군당 6마리씩 실험에 사용하였으며, 약물투여 직전과 약물투여 0.5, 1, 2, 3 시간 후에 온도계를 항문으로부터 약 3 cm 삽입하여 직장체온을 측정하였다. 대조약물로는 sildenafil 30 mg/kg과 chlorpromazine 20 mg/kg을 경구로 투여하였다.

(6) 초산 writhing 진통작용

마우스를 군당 13~15 마리씩 사용하였으며, 약물투여 1시간 후에 0.7% acetic acid-saline 용액을 마우스 체중 10 g당 0.1 mL의 용량으로 복강 내에 투여하였다(Whittle, 1964). 초산투여 10분 후에 10분간의 writhing 발생수를 측정하였으며, 대조약물로는 sildenafil 30 mg/kg과 naproxen 50 mg/kg을 경구로 투여하였다.

(7) 회전봉 시험

Rotarod treadmill (Letica)을 사용하여 직경 3 cm인 회전봉을 5 rpm으로 회전시킬 때, 3회 연속 test 중 1회 이상을 2분 이상 회전봉에 매달려 있는 개체만을 선별하여 군당 7마리의 마우스로 실험하였다(Dunham *et al.*, 1957). 약물 투여 0.5, 1, 2, 3 시간 후에 각각 3회 test하여 1회라도 2분 이상을 견디면 음성, 3회 모두 2분 이내에 떨어지면 양성반응으로 하여 개체수를 측정하였다. 대조약물로는 sildenafil 30 mg/kg과 chlorpromazine 10 mg/kg을 경구로 투여하였다.

5. 적출장기에 대한 반응

(1) 적출회장

체중 350 g 전후의 기니퓰을 방혈 치사시켜 회장을 적출한 후, Krebs-Henseleit 액에 담그고 맹장에서 약 10 cm되는 부위는 버리고 그 윗부분을 1.5 cm 취하여 표본을 작성하였다. 표본을 37°C의 Magnus 장치에 현수한 뒤 isotonic transducer에 연결하였으며, 500 mg의 정지장력을 걸어주었다. 1 시간동안 15분 간격으로 씻어주면서 안정화시켰다. 약물은 10⁻⁸~10⁻⁵ mg/L 까지 누적적으로 가하였으며, 대조약물로는 carbachol 10⁻⁹~10⁻⁵ mg/L을 사용하여 실험하였다. 실험에 나타나는 수축력의 변화는 carbachol 1차 농도 반응곡선의 최대값에 대한 %로 나타내었다.

(2) 신경근 표본에 미치는 영향

랫드를 pentobarbital 마취하에서 개복하여 혈액을 제거한 후 개흉하고 좌측 phrenic nerve가 좌측 횡격막에 부착된 상태로 표본을 적출하여 37°C Krebs-Henseleit 용액이 담긴 organ bath에 넣었다. Isometric transducer에 연결한 후 2 g의 정지장력을 가하였으며, phrenic nerve에 전기자극장치를 이용하여 신경을 자극하였다(0.2 Hz, 0.5 msec, 20 volts). 약 1시간 안정화시킨 후 DA-8159 또는 sildenafil을 가하고, 약물 투여 전 수축력에 대한 변화를 %로 나타내었다. 약물반응(1, 10, 100, 1000, 10000 nM)을 확인한 후 d-tubocurarine을 추가로 가하여 수축이 억제되는 것을 확인함으로써 신경자극에 의한 수축이 골격근에 대한 acetylcholine의 작용임을 확인하였다.

6. 호흡 및 순환기계에 미치는 영향

(1) 혈압, 심박수, 호흡수 및 호흡량에 대한 작용

고양이를 군당 5마리씩 사용하였다. 고양이를 먼저 pentobarbital 30 mg/kg을 복강내로 투여하여 마취시킨 후, 수술대에 고정, α-chloralose (in saturated Borax) 60 mg/kg을 대퇴근육으로 주사하여 마취를 유지하였다. 대퇴동맥, 정맥과 기관지에 캐놀라를 삽입하여 Signal Processor (Modular Instruments, USA)를 사용하여 혈압

(MBP)과 심박수(HR), 호흡수, 호흡량(tidal volume)을 측정하였고, 대퇴부 정맥 캐놀라를 통하여 약물을 투여하였다. 수술이 끝난 후 1~2시간 정도 안정화시킨 후 약물을 투여하고 10분 간격으로 연속적으로 투여하여 혈압, 심박수, 호흡수 및 호흡량을 측정하였다.

(2) 적출 심장에 대한 영향(적출심방 및 유두근에 대한 작용)

체중 350 g 전후의 기니퓰을 방혈치사시키고 신속히 심장을 적출하여 Krebs-Henseleit 액에 넣고 폐를 비롯한 주변조직을 제거하였다. 우심방 및 우심실 유두근 표본을 제작하여 Magnus 장치에 현수하고 isometric transducer에 연결하였다. 심방표본에 750 mg, 유두근 표본에 0.4 g의 정지장력을 가하였으며, 유두근 표본에는 전기가극(3 Hz, 5 ms)을 가하였다. 이후 1 시간동안 15분 간격으로 씻어주면서 안정화시켰다. 시험약물은 10⁻⁸ ~10⁻⁵ mg/L까지 누적적으로 가하였으며, 대조약물로는 isoproterenol 1×10⁻⁷ M을 사용하였다.

(3) 적출 기관에 대한 영향

체중 350 g 전후의 기니퓰을 방혈 치사하고 기관을 적출하여 Krebs 액에 넣고 기관표본을 제작하여 Magnus 장치에 현수하고 isometric transducer에 연결하였다. 표본에 2.0 g의 정지장력을 가하였으며, 이후 1 시간동안 15분 간격으로 씻어주면서 안정화시켰다. 시험약물은 10⁻⁸~10⁻⁵ mg/L까지 누적적으로 가하였으며, 대조약물로는 carbachol을 사용하였다.

7. 소화기계에 미치는 영향

(1) 장관 수송능에 대한 작용

마우스를 군당 8마리씩 사용하였으며, 약물을 경구투여하고 30분 후에 5% charcoal meal (0.5% CMC-Na로 현탁)을 마리당 0.3 mL씩 경구투여 하였다. 30분 후에 마우스를 치사시켜 위장관을 적출하고 유문부에서 직장까지의 charcoal의 이동거리를 측정하였다(Takagi and Lee, 1972). 소장길이에 대한 charcoal 이동거리의 비율을 구하여 이동율로 하였다.

(2) 위액 분비에 대한 작용

군당 6마리의 랫드를 에테르를 이용하여 흡입마취시키고, 복부중양선을 따라 절개하였다. 핀셋을 이용하여 위를 들추어낸 후 유문부와 십이지장의 접합부를 봉합사로 결찰한 후 절개부위를 봉합하였다(Shay *et al.*, 1954). 봉합 직후에 DA-8159 (1, 3, 10 mg/kg), sildenafil (30 mg/kg)과 ranitidine (30 mg/kg)을 꼬리 정맥내로 투여하고, 5시간 후 단두치사시켜 위를 적출하고 위액을 모았다. 위액을 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취하고 부피와 pH를 측정후, 이 중 2 mL을 취하여 0.02 N NaOH로 적정하여 pH 3.0이 될 때까지 소요된

NaOH의 volume과 pH 7.0이 될 때까지 소요된 volume (ml)을 측정하여 총산도를 계산하였다. 대조약물로 sildenafil 30 mg/kg 및 ranitidine 30 mg/kg을 꼬리 정맥내로 투여하였다.

8. 기타

(1) 혈액응고계에 대한 작용

군당 6마리의 랫드에 시험물질을 경구 투여한 다음 1시간 경과 후 복대정맥에서 채혈하고 3.8% sodium citrate 용액과 채혈한 혈액을 1:10의 volume으로 혼합하였다. 원심분리 후 상등액을 취하여 자동응고시간 측정기(Automated Coagulation Laboratory, Instrumentation Laboratory)를 이용하여 prothrombin time (PT)과 activated partial thromboplastin time (APTT)을 측정하였다.

(2) 혈소판 응집능에 대한 작용

토끼의 혈액을 채취해서 sodium citrate를 처리한 후 1,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 PRP (platelet rich plasma)를 취하고 나머지 혈액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 PPP (platelet poor plasma)를 취하였다. PRP의 혈소판수가 $5 \times 10^5/\mu\text{L}$ 이 되도록 PPP를 이용해서 희석한 후 약물을 가하고 5분 후에 ADP (adenosine 5'-diphosphate) 3 μM 을 가하여 혈소판 응집율을 aggregometer (Bio/ Data Corporation, Horsham, PA)를 이용하여 측정하였다.

(3) 신장기능에 대한 작용(노량 및 이온배설)

군당 6마리의 랫드에 시험물질을 경구투여 한 다음 5시간 동안 대사 케이지를 이용하여 채뇨하였다(Gilman and Goodman, 1937). 외관, 침사, 노량 등은 육안검사로 실시하였고, glucose, bilirubin, ketone body, 비중, pH, protein, urobilinogen, nitrate, 잠혈, 백혈구 등은 노분석기

Table I. Effect of DA-8159 on general behaviors in mice

	Time after administration																		
	30 min						1 hr						2 hr						
	Group						Group						Group						
	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F	
Locomotor activity	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	4
Stereotyped behavior	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tremor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Exophthalmosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ptoxis	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1
Piloerection	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tail elevation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Traction	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Motor incoordination	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muscle tone	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Analgesia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Abdominal tone	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Catalepsy	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
Righting reflex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pinna reflex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pupil reflex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Skin color	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Respiration	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
Lacrimation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Urination	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dianrhea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A: Vehicle, B: DA-8159 1 mg/kg, C: DA-8159 5 mg/kg, D: DA-8159 30 mg/kg, E: Sildenafil 30 mg/kg, F: Haloperidol 10 mg/kg

(Clinitek 100, Ames)를 이용하였으며, Na⁺, K⁺, Cl⁻ 등의 이온분석에는 이온분석기(Dri-Chem 800, Fuji)를 사용하였다.

9. 통계처리

모든 실험결과는 Mean ± S.E.M.으로 나타내었으며, 각 군간의 유의성 검증은 SigmaStat Program을 이용하여 One-way ANOVA test 실시 후 Dunnett's test로 비교하였으며, vehicle 투여군과 비교하여 p<0.05일 때를 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

III. 실험결과

1. 중추신경계에 미치는 영향

(1) 일반증상 및 행동에 대한 작용

Vehicle 투여군과 DA-8159 1, 5, 30 mg/kg 투여군에서는 관찰기간동안 이상행동이나 증상이 관찰되지 않았으나, haloperidol 10 mg/kg을 투여한 양성대조군에서는 30분 후 1~2 마리에서 보행이상, ptosis, traction 이상, 협조 운동상실, catalepsy 및 pinna reflex 상실 등이 나타났으며, 1시간 후 1~6 마리, 2시간 후 1~5 마리에서 상기와 유사한 증상이 나타났다(Table I). 그러나 4시간 경과 후에는 모든 양성대조군에서 정상적인 행동양태를 나타내었다. 한편 대조물질로 사용한 sildenafil 30 mg/kg 투여군

에서는 30분 후에는 이상 행동이나 증상이 관찰되지 않았으나, 1시간과 2시간 경과 후에 haloperidol 투여군과 유사한 증상이 1~4마리에서 나타났다.

(2) Hexobarbital-Na 수면에 대한 작용

DA-8159는 투여용량에서 hexobarbital에 의한 수면유도 시간과 수면시간에 대해 vehicle 투여군과 비교시 전혀 영향을 주지 않았으며(Table II), 양성대조군인 chlorpromazine 투여군은 수면유도시간에는 영향을 주지 않았으나, 수면시간은 평균 1시간 이상 유의하게 지연시켰다.

(3) 자발운동에 대한 작용

DA-8159 1, 5, 30 mg/kg 투여군 모두에서 유의적인 자

Table II. Effect of DA-8159 on hexobarbital-induced sleeping time in mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Sleep-inducing Time (min)	Sleeping Time (min)
Vehicle	-	1.7 ± 0.67	39.3 ± 6.05
DA-8159	1	2.3 ± 0.67	34.0 ± 6.24
	5	1.3 ± 0.37	41.2 ± 10.64
	30	2.0 ± 0.98	46.7 ± 12.54
Sildenafil	30	1.5 ± 0.93	50.5 ± 9.10
Chlorpromazine	20	1.2 ± 0.18	118.3 ± 20.25*

*: Statically significant when p<0.05 compared with the vehicle-treated group.

Table III. Effect of DA-8159 on spontaneous activity in mice

Group	Dose (mg/kg)	Distance traveled (cm)					
		0	10 min	30 min	1 hr	2 hr	3 hr
Control	-	5738 ± 369.7	5771 ± 324.8	4271 ± 892.7	3280 ± 542.1	2287 ± 1000.1	3273 ± 757.4
DA-8159	1	6288 ± 205.2	4529 ± 549.6	3600 ± 726.2	2820 ± 602.5	3006 ± 671.7	2860 ± 626.9
Control	-	6466 ± 375.0	3895 ± 510.3	3454 ± 583.2	2889 ± 616.9	1564 ± 747.5	1093 ± 288.1
DA-8159	5	6640 ± 497.1	4396 ± 389.6	3688 ± 509.1	2138 ± 439.9	1714 ± 509.0	2055 ± 566.6
Control	-	5802 ± 377.4	457.5 ± 600.3	2871 ± 523.0	3345 ± 836.8	2021 ± 533.4	1489 ± 485.6
DA-8159	30	6733 ± 354.0	5784 ± 669.7	4839 ± 702.9	3655 ± 865.2	3305 ± 398.4	2554 ± 682.0
Control	-	6606 ± 422.0	3908 ± 630.5	4031 ± 543.4	3140 ± 625.1	2935 ± 420.9	2246 ± 605.7
Sildenafil	30	5870 ± 241.8	2750 ± 578.9	4131 ± 670.2	2851 ± 528.4	2466 ± 344.9	2143 ± 527.0

Table IV. Effect of DA-8159 on pentetrazole-induced convulsions in mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Incidence of convulsion			Latency to colonus (min)
		Clonic	Tonic	Death	
Vehicle	-	6 / 6	6 / 6	6 / 6	106.7 ± 22.21
DA-8159	1	6 / 6	5 / 6	5 / 6	94.2 ± 13.45
	5	6 / 6	6 / 6	6 / 6	109.2 ± 23.77
	30	6 / 6	5 / 6	5 / 6	83.3 ± 11.55
Sildenafil	30	6 / 6	5 / 6	5 / 6	107.5 ± 23.74

Table V. Effect of DA-8159 on rectal temperature in rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Time (hr)				
		0	0.5	1	2	3
Vehicle	–	37.1 ± 0.20	37.3 ± 0.19	37.5 ± 0.17	37.2 ± 0.13	37.1 ± 0.13
DA-8159	1	37.5 ± 0.11	37.1 ± 0.07	37.2 ± 0.20	37.5 ± 0.14	37.5 ± 0.31
	5	37.3 ± 0.21	37.7 ± 0.22	37.7 ± 0.20	37.7 ± 0.20	37.6 ± 0.19
	30	37.4 ± 0.11	37.7 ± 0.14	37.7 ± 0.20	37.7 ± 0.28	37.3 ± 0.11
Sildenafil	30	37.3 ± 0.13	37.2 ± 0.11	37.3 ± 0.34	37.4 ± 0.10	37.3 ± 0.13
Chlorpromazine	10	37.3 ± 0.51	37.1 ± 0.27	36.2 ± 0.36*	35.7 ± 0.46*	35.6 ± 0.40*

*: stastically significant when $p < 0.05$ compared with 0 hr

발운동량의 변화를 보이지 않았다(Table III). Sildenafil도 vehicle 투여군에 대해 유의적인 자발운동량의 변화가 관찰되지 않았다.

(4) 항경련 작용

DA-8159와 sildenafil은 투여군에서 vehicle 투여군에 비하여 유의적인 항경련 작용을 보이지 않았으며, latency time에도 변화가 관찰되지 않았다(Table IV).

(5) 정상체온에 대한 작용

Table V와 같이 vehicle, DA-8159 및 sildenafil 투여군에서는 0.5, 1, 2, 3 시간 후까지 실험 시작시의 체온에 대해 변화가 없었으며, chlorpromazine 투여군은 1시간 후부터 체온이 유의적으로 감소하였으며, 체온감소는 3시간 후까지 지속적으로 유의적인 체온감소가 관찰되었다.

(6) 초산 writhing 진통작용

DA-8159는 모든 용량군에서 초산에 의해서 유발된 writhing 횟수가 vehicle 투여군과 유사한 정도의 횟수가 관찰되었고, sildenafil 투여군도 변화가 없었다(Table VI). Vehicle 투여군의 writhing 횟수는 평균 11회이었으며, DA-8159와 sildenafil의 writhing 횟수는 유사하였지만, 양성대조군인 naproxen 50 mg/kg 투여군의 writhing 횟수는 평균 5회로 vehicle 투여군에 비하여 유의적으로

Table VI. Effect of DA-8159 on writhing syndrome induced by acetic acid in mice

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of writhing syndrome for 10 min
Vehicle	–	11.3 ± 1.07
DA-8159	1	10.4 ± 1.86
	5	11.5 ± 1.49
	30	10.4 ± 1.89
Sildenafil	30	13.9 ± 2.76
Naproxen	50	5.3 ± 1.01*

*Stastically significant when $p < 0.05$ compared with the vehicle-treated group.

Table VII. Effect of DA-8159 on rotarod test in mice

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of positive			
		30 min	1 hr	2 hr	3 hr
Vehicle	–	0/7	0/7	0/7	0/7
DA-8159	1	0/7	0/7	0/7	0/7
	5	0/7	0/7	0/7	0/7
	30	0/7	0/7	0/7	0/7
Sildenafil	30	0/7	0/7	0/7	0/7
Chlorpromazine	10	7/7	7/7	7/7	7/7

writhing 횟수의 감소를 보였다.

(7) 회전봉 시험

Vehicle, DA-8159 및 sildenafil 투여군에서는 0.5, 1, 2, 3시간 까지 모든 용량에서 2분 이내에 떨어지는 개체가 관찰되지 않았다(Table VII). 그러나, chlorpromazine 투여군은 0.5 시간부터 3시간까지 모든 개체가 2분 이내에 회전봉에서 떨어져 양성반응을 보였다.

2. 적출장기에 미치는 영향

(1) 적출회장

Carbachol은 1, 3, 10, 30, 100, 300 µg/L의 농도에서 수축반응을 보였으며(Fig. 1), DA-8159는 모든 농도(1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 µg/L)에서 수축작용이 거의 관찰되지 않았으며, 10 mg/L에서 수축력은 carbachol의 2% 미만으로 확인되었다.

(2) 횡격막 수축 시험

Phrenic nerve의 전기자극에 의한 횡격막 표본의 수축은 DA-8159와 sildenafil 투여 농도에서 유의한 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 2).

3. 호흡 및 순환기계에 미치는 영향

(1) 혈압, 심박수, 호흡수 및 호흡량에 대한 작용

DA-8159는 0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg 투여 용량군 모두

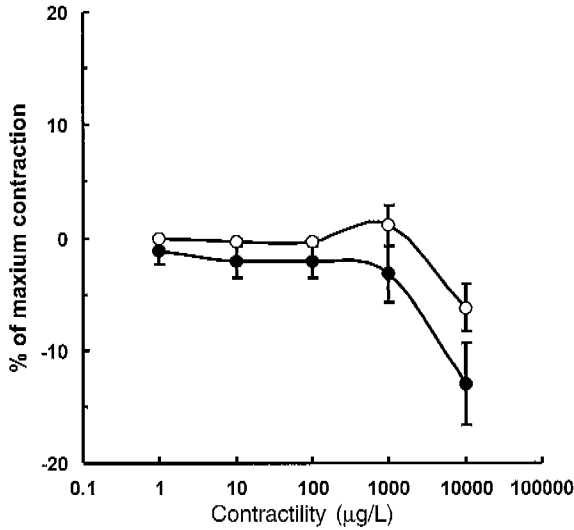


Fig. 1. Effects of DA-8159 (●) and carbachol (○) on the contractility of isolated ileum in guinea pigs.

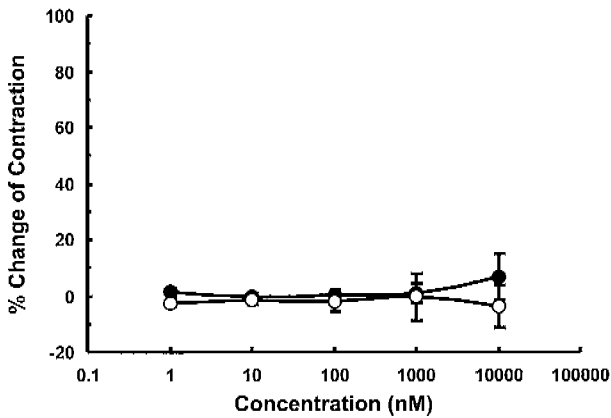


Fig. 2. Effects of DA-8159 (●) and sildenafil (○) on the contractility of isolated diaphragm and phrenic nerve in rats.

에서 평균혈압의 일시적인 감소가 관찰되었으며, 심박수, 호흡수 및 호흡량의 경우는 vehicle 투여군과 비교시 유사한 것으로 관찰되었다(Fig. 3). 그러나, 평균혈압의 하강은 3분 이내에 빠르게 회복되었다.

(2) 적출 심장에 대한 영향(적출심방 및 유두근에 대한 작용)

DA-8159는 심실 유두근의 수축력과 우심방의 박동수에 영향을 주지 않았으나(Fig. 4), $1 \times 10^4 \mu\text{g/L}$ 의 농도에서는 심실 유두근의 수축력은 13.0%, 우심방의 박동수는 6.2% 감소하는 것으로 확인되었다.

(3) 적출 기관에 대한 영향

Carbachol은 $1 \times 10^{-8} \sim 3 \times 10^{-5} \text{ mg/L}$ 의 농도에서 농도-수축반응이 관찰되었으며, DA-8159는 투여 농도($1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mg/L}$)에서 수축반응이 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 5).

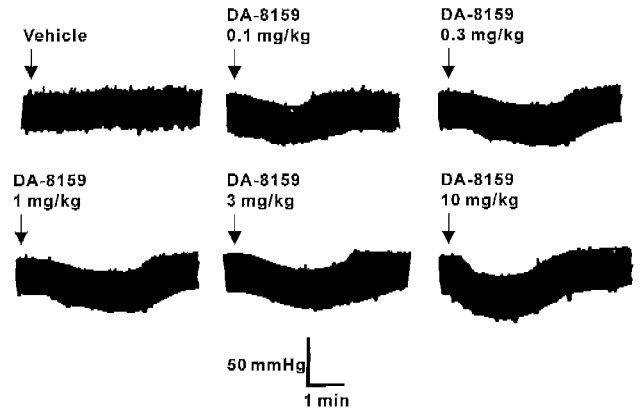


Fig. 3. Effects of DA-8159 on mean blood pressure (MBP) in anesthetized cats.

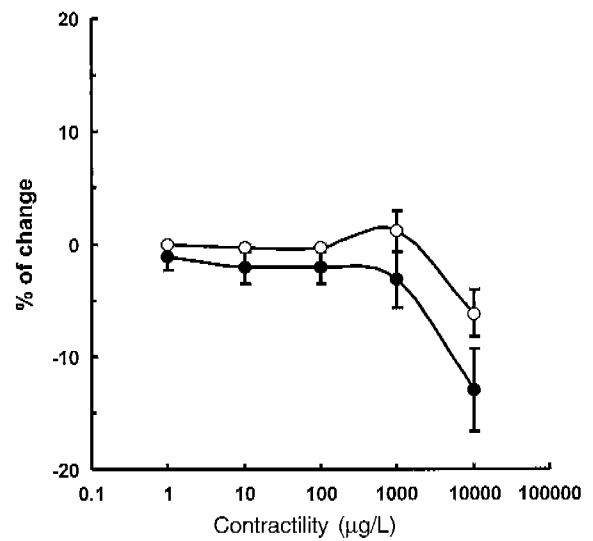


Fig. 4. Effects of DA-8159 on the contractile force of sinus rate (●) and isolated papillary muscle (○) of isolated atrium in guinea pigs.

4. 소화기계에 미치는 영향

(1) 장관 수송능에 대한 작용

DA-8159는 모든 투여 용량군에서 vehicle 투여군에 비해 charcoal 이동율에 차이가 없었으며, sildenafil도 vehicle 투여군과의 차이를 관찰할 수 없었다(Table VIII). 그러나, atropine 투여군은 charcoal 이동율이 vehicle 투여군에 대해 유의적으로 감소하였다.

(2) 위액 분비에 대한 작용

DA-8159 1, 3, 10 mg/kg 용량의 정맥내 투여는 위액량, pH, 총산도 등에 영향을 나타내지 않았으며, sildenafil 30 mg/kg 정맥내 투여군도 위액분비에 어떠한 영향을 주지 않았다(Table IV). 산분비억제제인 ranitidine 투여군은 위액량과 총산도를 유의적으로 억제하였고, pH는 vehicle 투여군에 비해 유의한 증가를 나타내었다.

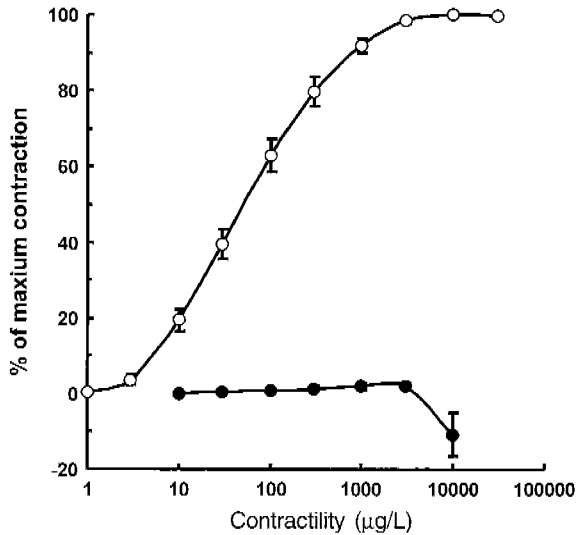


Fig. 5. Effects of DA-8159 (●) and carbachol (○) on the contractility of isolated trachea in guinea pigs.

5. 기타

(1) 혈액응고능에 대한 작용

Prothrombin time (PT)는 DA-8159 및 sildenafil을 투여한 군에서 vehicle 투여군에서 vehicle 투여군에 비해 용량의존적으로 유의성있는 증가를 나타내었으며(Table X),

Table VIII. Effect of DA-8159 on intestinal propulsion in mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Percentage traversed by charcoal (%)
Vehicle	—	54.6 ± 3.40
DA-8159	1	56.2 ± 4.62
	5	59.9 ± 2.74
	30	54.5 ± 2.20
Sildenafil	30	57.6 ± 6.30
Atropine	10	43.8 ± 4.77*

*Statically significant when $p < 0.05$ compared with the vehicle-treated group.

Table IX. Effect of DA-8159 on gastric secretion in pylorus-ligated rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Volume	pH	Total acidity (mEq/L)
Vehicle	—	10.9 ± 0.52	1.27 ± 0.016	116.6 ± 3.30
DA-8159	1	10.4 ± 0.75	1.29 ± 0.022	105.2 ± 8.65
	3	11.3 ± 0.94	1.29 ± 0.014	118.1 ± 4.59
	10	11.0 ± 1.00	1.29 ± 0.022	116.4 ± 13.03
Sildenafil	30	10.9 ± 0.43	1.28 ± 0.008	118.8 ± 5.53
Ranitidine	30	4.3 ± 0.32*	1.72 ± 0.066*	66.6 ± 3.46*

*Statically significant when $p < 0.05$ compared with the vehicle-treated group.

또한 fibrinogen은 DA-8159 30 mg/kg 및 sildenafil 30 mg/kg 투여군에서 유의성 있게 감소하였다. APTT (activated partial thromboplastin time)는 vehicle 투여군과 비교하여 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

(2) 혈소판 응집에 대한 작용

DA-8159와 sildenafil은 1 nM 까지 ADP에 의한 혈소판 응집에 영향이 없었다. Sodium nitroprusside (SNP)는 3 µM 농도에서 혈소판 응집을 33.8% 저해하였는데, 이때 DA-8159를 동시에 처치하면 10~10000 nM에서 농도의존적으로 ADP에 의한 혈소판응집이 감소하였다(Table XI). Sildenafil에서도 동일한 결과가 관찰되었다.

(3) 심장기능에 대한 작용(노량 및 이온배설)

약물투여 후 5시간 동안 채뇨한 노량을 측정한 결과 DA-8159 및 sildenafil을 투여한 군에서는 대조군에 비해 유의한 변화가 인정되지 않았다(Table XII). 그러나, 양성 대조물질인 furosemide 10 mg/kg을 투여한 군에서는 유의성있는 노량의 증가가 인정되었다. 또한 Na^+ , K^+ , 및 Cl^- 이온배설량에 있어서도 시험물질 및 sildenafil을 투여한 군에서는 vehicle 투여군에 대해 유의한 차이가 인정되지 않았으나 양성 대조군에서는 Na^+ 증가 경향이 관찰되었으며, K^+ 및 Cl^- 이온의 경우는 vehicle 투여군에 비해 약간 감소하는 경향을 나타내었다.

Table X. Effect of DA-8159 and sildenafil on PT (prothrombin time), fibrinogen and APTT (activated partial thromboplastin time) in rats

Treatment	Dose (mg/kg)	PT (min)	Fibrinogen	APTT (min)
Vehicle	—	11.7 ± 0.09	291.5 ± 14.37	17.9 ± 0.38
DA-8159	1	12.2 ± 0.16*	281.2 ± 13.22	17.4 ± 0.59
	5	12.7 ± 0.20*	267.0 ± 13.42	18.0 ± 0.67
	30	12.9 ± 0.26*	231.8 ± 26.59*	18.8 ± 0.74
Sildenafil	30	13.0 ± 0.25*	260.3 ± 9.33*	18.4 ± 1.08

*Statically significant when $p < 0.05$ compared with the vehicle-treated group.

Table XI. Inhibitory effect of DA-8159 and sildenafil on ADP-induced platelet aggregation in the presence of sodium nitroprusside 3 μ M

Concentration (nM)	% of inhibition	
	DA-8159	Sildenafil
Vehicle	33.8 \pm 10.8	
0.1	38.0 \pm 4.95	33.5 \pm 9.30
1	44.5 \pm 8.00	42.7 \pm 7.56
10	56.0 \pm 8.57*	51.4 \pm 6.14*
100	69.4 \pm 7.54*	70.6 \pm 3.91*
1,000	76.2 \pm 6.32*	77.4 \pm 4.77*
10,000	80.8 \pm 6.80*	81.3 \pm 4.27*

*stastically significant when $p < 0.05$ compared with the vehicle-treated group.

IV. 고 찰

DA-8159는 pyrazolopyrimidinone계의 phosphodiesterase type 5 inhibitor의 기전을 갖는 발기부전 치료제로 개발 중인 물질이며, 본 시험은 DA-8159의 일반약리작용에 관하여 검토하고자 실시하였다.

DA-8159의 예상임상용량의 1, 5, 30배 이상의 용량을 설정하여 동물실험에 실시하였다. DA-8159는 일반증상 및 행동에서 행동의 변화, 신경증상, 자율신경증상 및 중독증상을 나타내지 않았고, 수면, rotar rod 및 자발운동량 실험에서는 진정작용을 유발하거나 상호작용을 나타내지 않았다. Pentetrazole에 의한 경련과 초산 writhing에 대한 경련작용에 대해 항경련효과가 관찰되지 않았으며, 정상동물의 체온에 대한 영향이 확인되지 않았다. 이상의 실험에서 부작용이 관찰되지 않은 점으로 보아 중추신경계에 대한 영향은 없다고 사료된다. 또한 기니픽의 적출회장과 횡격막의 phrenic nerve를 적출하여 organ bath 내에서 시험한 결과 수축 및 이완효과가 관찰되지

않는 것으로 보아, DA-8159는 근·골격계 및 자율신경계에도 영향이 없는 것으로 판단되었다. 호흡기 및 순환기계의 영향을 조사한 기니픽의 적출기관 실험, 기니픽의 적출심장에서 적출심방 및 유두근에 대한 작용 및 마취고양이에서의 호흡수, 호흡량 및 심박수에 영향이 없는 것으로 확인되었다. 그러나, 마취 고양이에서의 혈압은 일시적인 혈압강하의 현상이 관찰되었지만, 투여용량에서 3분 이내에 정상 혈압 수준으로 회복되었고, 용량의 존적인 현상은 관찰되지 않았다. 동일한 약효기전을 갖는 sildenafil의 경우도 유사한 혈압강하가 관찰되었으며, 이는 동맥 및 정맥 혈관의 확장에 기인한다고 설명하고 있다(Viagra[®] Drug Information, 1998).

장관 수송능이나 위액분비 등의 소화기계에 대한 DA-8159의 영향을 검토하였으나, vehicle 투여군과 유사한 정도의 변화만이 관찰되었으며, 이상 징후가 확인되지 않았으며, 신장기능(뇨량, 전해질)에 대한 반응도 증가하는 경향이 관찰되었으나 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다. 랫드에서의 혈액응고능에 대한 평가에서는 PT가 정상범위내에서 용량의존적으로 약간 증가하는 경향이 나타났으며, APTT는 영향이 없었다. 토끼 혈액의 혈소판 응집 반응에서는 DA-8159 1 nM까지는 영향이 없었으나, SNP와 병용투여시 농도의존적으로 혈소판 응집이 감소하였으며, sildenafil과도 동일한 결과가 확인되었다(Viagra[®] Drug Information, 1998). PT와 혈소판 응집 반응의 결과는 sildenafil의 결과와 동일하게 측정되었으며, PT의 경우는 DA-8159와 sildenafil 투여군의 경우 정상범위내에 존재하는 것으로 확인되었다. DA-8159와 마찬가지로 혈압 및 혈소판 응집 반응에서 경미한 변화가 관찰되었으나, 신체의 기능에는 영향이 없는 것으로 확인되었다.

이상의 실험에서 보면, DA-8159는 동일한 약효기전을 갖고 있는 sildenafil과 유사한 정도의 일반증상 결과를 나타냈으며, 임상에 적용시 약리작용에 의한 심각한 부작용은 발생되기 어려울 것으로 판단되었다.

Table XII. Effect of DA-8159 on urinary volume and electrolyte in rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Urinary volume (ml)	Urinary Electrolyte Excretion (μ Eq/L)		
			Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
Vehicle	-	1.5 \pm 0.35	96.5 \pm 34.16	163.7 \pm 29.19	169.3 \pm 71.91
DA-8159	1	1.6 \pm 0.17	60.8 \pm 13.94	108.5 \pm 15.90	86.0 \pm 26.81
	5	1.8 \pm 0.39	51.3 \pm 5.30	119.0 \pm 24.51	84.5 \pm 22.21
	30	1.2 \pm 0.14	72.5 \pm 15.01	123.0 \pm 19.95	150.0 \pm 52.79
	Sildenafil	30	1.8 \pm 0.23	76.3 \pm 14.58	102.7 \pm 12.05*
Furosemide	10	6.7 \pm 0.80*	101.7 \pm 12.17	76.1 \pm 14.63*	123.3 \pm 11.43

*Stastically significant when $p < 0.05$ compared with the vehicle-treated group.

V. 참고문헌

- Doh, H., Son, M., Ko, J.I., Yoo, M., Kim, S.H., Chang, M.S. and Kim, W.B. (2002). Erectogenic mechanism of the selective phosphodiesterase type V inhibitor, DA-8159. *Arch. Pharm. Res.* 25, 873-878.
- Dunham, N.W., Miya, T.S. and Edwards, C.D. (1957). Pharmacological activity of a series of basic esters mono- and dialkyl malonic acid. *J. Am. Pharm. Assoc.* 46, 208-209.
- Gilman, A. and Goodman, L. (1937). The secretory response of the posterior pituitary to the need for water conservation. *J. Physiol.* 90, 113-124.
- Irwin, S. (1968). Comprehensive observational assessment; Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacology* 13, 222-257.
- Korenman, S.G. (1995). Clinical review 71: Advances in the understanding and management of erectile dysfunction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 1985-1988.
- Nishimori, T., Kobayashi, F., Nishimura, T., Wakabayashi, K., Ohta, M. and Tsuchiyama, M. (1975). General pharmacological study of BRL14151K and BRL25000. *Chemotherapy* 31, 280-296.
- Oh, T.Y., Kang, K.K., Ahn, B.O., Yoo, M. and Kim, W.B. (2000). Erectogenic effect of the selective phosphodiesterase type V inhibitor DA-8159. *Arch. Pharm. Res.* 23, 471-476.
- Shay, H., Sun, D.C. and Gruenstein, M. (1954). A quantitative method for measuring spontaneous gastric secretion in the rat. *Gastroenterology* 26, 906-913.
- Swinyard, E.A., Brow, W.C. and Goodman, L.S. (1952). Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 106, 319-330.
- Takagi, K. and Lee, E.B. (1972). Pharmacological studies on *Platycodon grandiflorum* A. DC. III: Activities of crude platycodon on respiratory and circulatory systems and its other pharmacological activities. *Yakagaku Zasshi* 92, 969-973.
- Verna, A. and Kulkarni, S.K. (1992). D1/D2 dopamine and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor participation in experimental catalepsy in rats. *Psychopharmacology* 109, 477-483.
- Viagra® Drug Information. (1998). Pfizer Pharmaceutical Corporation, USA.
- Wagner, G. and Saenz de Tajada, I. (1998). Fortnightly review update on male erectile dysfunction. *Br. Med. J.* 316, 678-682.
- Whittle, B.A. (1964). The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. *Br. J. Pharmacol.* 22, 246-253.