

암로디핀의 베실레이트염과 신규 염들의 항고혈압작용 비교평가

이병호^{1*} · 서호원¹ · 김맹섭²

¹한국화학연구원 생명약부, ²한미약품(주) 중앙연구소

Antihypertensive Effects of Amlodipine Besylate and Its New Salts.

Byung Ho LEE^{1*}, Ho Won SEO¹ and Maeng Sup KIM²

¹Medicinal Science Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon, 305-343, Korea

²Central Research Institute, Hanmi Pharm Co., Ltd., Sungnam, 463-400, Korea

(Received April 10, 2003; Accepted May 7, 2003)

Abstract—The vascular relaxant and antihypertensive effects of newly developed salts of amlodipine - malcate and camsylate - were evaluated on isolated aorta from rats and in spontaneously hypertensive rats, and compared with those of amlodipine besylate, a standard drug. Amlodipine besylate concentration-dependently inhibited Ca²⁺-induced contraction in depolarised rat aorta(IC₅₀: 4.17 nM), with a very slow onset of action. Amlodipine malcate and amlodipine camsylate also showed vascular relaxant effect with a pattern and a potency similar to those of amlodipine besylate(IC₅₀: 3.62 and 3.28 nM, respectively). Amlodipine besylate produced a dose-dependent and long-lasting(> 10~24 h) antihypertensive effect with a slow onset of action(ED₂₀: 2.31 mg/kg) in spontaneously hypertensive rats. Amlodipine maleate and amlodipine camsylate also exerted antihypertensive effects with a pattern and a potency similar to those of amlodipine besylate(ED₂₀: 2.09 and 2.21 mg/kg, respectively). These results suggest that amlodipine maleate and amlodipine camsylate are not statistically differ with amlodipine besylate in relaxant effect of Ca²⁺-induced contraction in depolarised rat aorta and in antihypertensive effect in spontaneously antihypertensive rats.

Keywords □ antihypertension, amlodipine besylate, calcium antagonist

칼슘통로 차단제들은 그 유용성을 높이 평가받아, 현재에도 고혈압을 포함한 여러 순환기계 질환 치료에 광범위하게 사용되고 있다. 그러나, nifedipine을 포함한 개발 초기의 칼슘통로 차단제들은 일반적으로 작용시간이 짧기 때문에 1일 2~3회 복용해야하는 불편함이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해 개발된 amlodipine besylate는 nifedipine과 비슷한 구조를 가진 1,4-dihydropyridine 유도체군에 속하고 있지만, 혈중 반감기가 실험견에서 30시간, 그리고 사람에서는 35~50시간으로서 초기의 칼슘통로 차단제들과는 달리 아주 긴 혈중농도를 유지함으로써, 1일 1회 투여가 가능해지게 되었고(Stopher 등, 1988; Meredith와 Elliott, 1992; Burges와 Moiscy, 1994; Phillips 등, 2003), 이러한 장점 때문에 현재까지도 높은 시장점유율을 보이고 있다. 한편, amlodipine이 nifedipine과 비슷한 정도의 칼슘 유발성 수축 억제 효과를 나타내면서도 불구하고(흰쥐 대동맥에서 IC₅₀, 1.9 nM), 그 약효가 상상 이상으로 지속적인 것은 amlodipine이

칼슘통로의 1,4-dihydropyridine 결합부분과 diltiazem 결합부분에 매우 느리게 결합함과 동시에 아주 느리게 해리하는 특성 때문이라고 보고 되고 있다(Burges 등, 1989; Yamanaka 등, 1991). 또한 amlodipine은 선천성 고혈압쥐에서 항고혈압 효과가 nifedipine과 비슷하였으나(p.o. ED₃₀, 2.3 mg/kg), 약효지속 측면에서 볼때는 nifedipine은 최대 효과가 1시간째 나타난 반면, amlodipine은 최대효과가 투여 4~6시간 후에 나타났으며 이 항고혈압 작용은 10~24시간 이상 유지된다고 알려져 있다(Yamanaka 등, 1991). 이와 같은 현상은 고양이 및 개를 이용한 실험(마취 및 비마취)에서도 비슷하게 나타나고 있는데, amlodipine이 기본적으로는 다른 1,4-dihydropyridine 유도체들과 유사한 혈류동력학적 변화를 보이나, 작용 개시점이 아주 늦고, 작용시간이 긴 것이 특징이다(Dodd 등, 1989; Burges 등, 1989; Mathur 등, 2002).

본 연구는 현재 besylate 염으로 판매되고 있는 amlodipine의 특허만료와 함께, 한미약품(주)에서 새로이 개발한 2종류의 amlodipine 염(maleate 및 camsylate)의 심

*To whom correspondence should be addressed.

장순환계 약리작용을 측정하여, 그 효과를 besylate 염과 비교평가하기 위하여 수행되었다. 실험 항목으로서는 흰쥐의 적출대동맥에 있어서 Ca^{2+} 유리에 의한 혈관수축의 정도를 측정하는 in vitro 활성 측정법과, 선천성 고혈압 쥐에서의 항고혈압작용을 측정하는 in vivo 활성 측정법을 사용하였다.

실험방법

시험물질 및 시약

표준약물 amlodipine besylate(M.W. 567.05) 및 시험물질 amlodipine maleate(M.W. 524.95)와 amlodipine camsylate(M.W. 641.17) 등은 한미약품(주)에서 제공한 것을 사용하였으며, 이들은 증류수에 용해한 다음 사용되었다. 혈관실험에 사용되는 Krebs-Henseleit (K-H) buffer를 위한 각종시약들은 일본의 Junsei 사로부터 구입하여 사용하였다. 그리고, 실험에 사용된 모든 약물 및 시약들은 사용직전에 조제하였다.

실험동물

Sprague-Dawley 계(S.D., 웅성) 흰쥐는 Biogenomics사(서울, 한국)로부터, 선천성 고혈압쥐(SHR, 웅성, 13~14주령)는 일본의 Charles River사로부터 구입하였으며, 항온($22.5 \pm 1^\circ C$), 항습($55 \pm 5\%$) 및 12시간 간격으로 명암이 자동 조절되는 청정 동물 사육실에서 안정화된 후 실험에 사용되었다.

흰쥐 적출혈관 실험

S.D.계 흰쥐의 후두부를 강타하여 기절시킨 후 경동맥을 잘라 혈액을 유실시켰다(Burges 등, 1987; Shin 등, 1998; Lee 등, 2001). 흉곽을 절개한 다음 하행성 대동맥을 신속하게 적출하고 내피가 손상되지 않도록 조심스럽게 지방조직 및 주위조직을 제거하였다. 이어 혈관을 2~3 mm 길이로 잘라 K-H buffer가 담긴 tissue chamber내에 현수하였다. 본 실험에 사용된 K-H buffer는 Ca^{2+} -free depolarising solution으로서, Ca^{2+} 이 없는 동시에 K^+ 농도가 45 mM 인 것을 제외하면 일반적인 K-H buffer와 동일하다(NaCl 118.0, KCl 45 mM, $MgSO_4$ 1.2, KH_2PO_4 1.2, $NaHCO_3$ 25.0, glucose 11.0 mM, 이하 K-H buffer). 이때 chamber내의 온도는 $37^\circ C$ 를 유지하였으며, O_2/CO_2 mixture gas로 포화시켜 pH를 7.4로 유지시켰다. 2 g의 초기장력으로 1시간동안 equilibration 시켰으며, 15분 간격으로 K-H buffer를 교환하여 주었다. Isometric tension은 force displacement transducer(Grass FT03, Grass사, 미국)를 통해 chart recorder(Multicorder MC 6625, Hugo Sachs 사, 독일)로 기록하였다.

적출혈관에 있어서 Ca^{2+} 유발성 수축을 억제하는 약물의 효과를 측정하기 위해서, 2 mM $CaCl_2$ 에 의한 수축을 기준으로 삼았으며, 이 수축을 30분 간격으로 연속하여 유발시켰다. 즉, 적출혈관을 2 mM $CaCl_2$ 에 15분간 노출시켜 수축시킨 후, 다음 15분 동안은 K-H buffer($CaCl_2$ 가 없는)로 세척해주어 수축에서 회복되도록 해주었다. 이때 $CaCl_2$ 에 의한 최초의 반응은 제외하고, 다음 2번째와 3번째의 수축반응을 평균하여 control로 삼았으며, 다음부터는 시험약물(1, 3, 10 nM)이 들어 있는 K-H buffer로 세척해주면서, 30분 간격으로 3.5시간까지 연속하여, $CaCl_2$ 에 의한 수축반응을 측정하였다. 약물의 효과는 control 수축반응에 대한 억제율로서 나타내었다.

선천성 고혈압쥐에서의 항고혈압작용

SHR은 수축기혈압이 170 mmHg 이상인 것만을 사용하였으며, 1군당 6~8마리로 하였다(Yamanaka 등, 1991; Lee 등, 1998; Lee 등, 1999). 혈압 및 심박동수의 측정은 실험동물의 꼬리로부터 혈압을 측정하는 방법인 tail-cuff method를 이용하여, Multichannel 8000(TSE사, 독일)으로 측정하였다. 혈압을 원활하게 측정하기 위하여, 실험동물을 $37^\circ C$ 의 항온 box에서 약 10분간 warming하였다. 표준물질 및 시험물질 1, 3 및 10 mg/kg 용량을 증류수(0.5 ml/100 g rat)에 용해하여 경구투여 하였다. 혈압 및 심박동수의 측정은 약물 투여 전, 약물투여 2, 4, 6, 8, 10, 24시간 후에 이루어졌다.

통계분석

모든 실험결과는 $mean \pm S.E.M.$ 으로 표시하였고, 실험결과의 통계분석은 미국 Jandel Co.사의 Sigma Stat 프로그램을 이용하여, unpaired t-test 및 one-way analysis of variance(ANOVA)로 처리하였고, 2차검정은 Dunnett multiple comparisons test로 하였다.

실험결과

흰쥐 적출혈관 실험

흰쥐 적출혈관의 Ca^{2+} 유발성 수축에 대한 표준약물(amlodipine besylate) 및 2종류의 시험물질(amlodipine maleate, amlodipine camsylate)의 억제효과를 측정된 실험결과를 Fig. 1에 나타내었다. Amlodipine besylate(Fig. 1A), amlodipine maleate(Fig. 1B) 및 amlodipine camsylate(Fig. 1C) 모두다 Ca^{2+} 유발성 수축을 농도 의존적으로 억제하였으며, 시간이 흐름에 따라 서서히 효과가 나타나는 지속성을 보였다. 1 nM의 저농도에서는 투여 1.5~2시간 후 부터, 3 nM 농도에서는 0.5~1.5시간 후 부

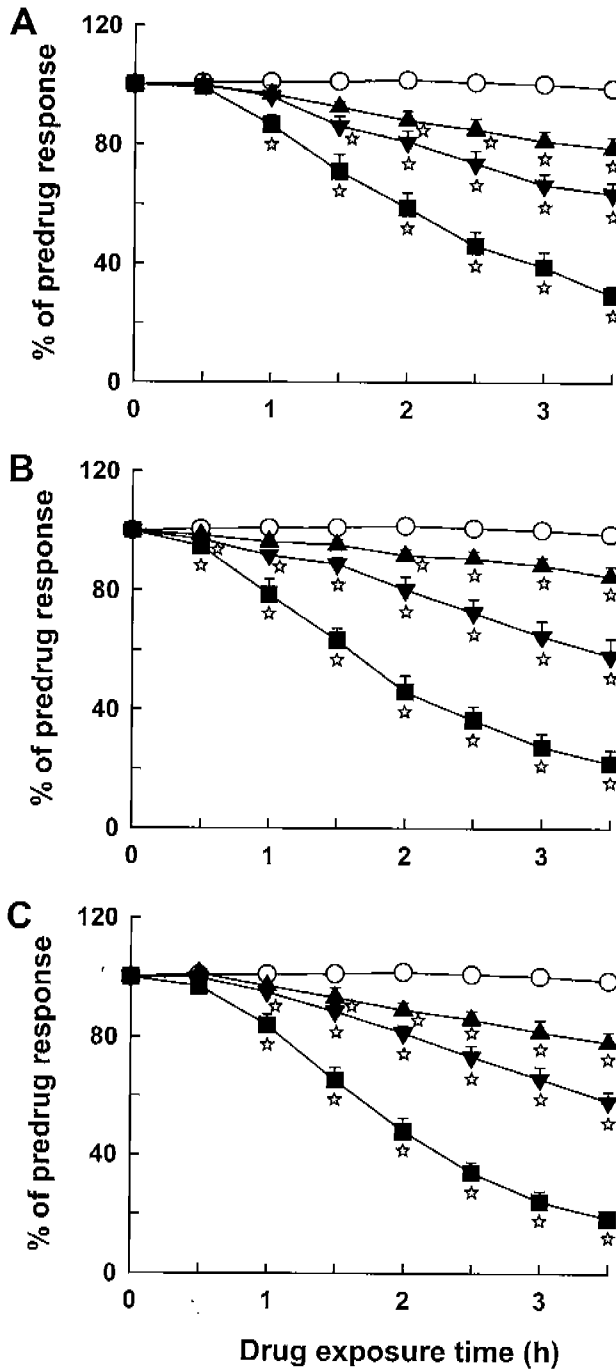


Fig. 1. Time-course of the inhibition by amlodipine besylate (A), amlodipine maleate (B) and amlodipine camsylate (C) of contractions of the rat aorta induced by addition of 2 mM Ca^{2+} to tissues depolarised with 45 mM K^+ . Vehicle (\circ), 1 (\blacktriangle), 3 (\blacktriangledown), 10 nM (\blacksquare). Values are mean percentage \pm S.E.M. (n = 5-18).

터, 그리고 10 nM의 고농도에서는 0.5~1시간 후 부터 유의성 있는 억제효과를 나타내기 시작하여, 투여 후 3.5시간째에 최대억제효과를 나타냈다. 3.5시간째 각 투여용량

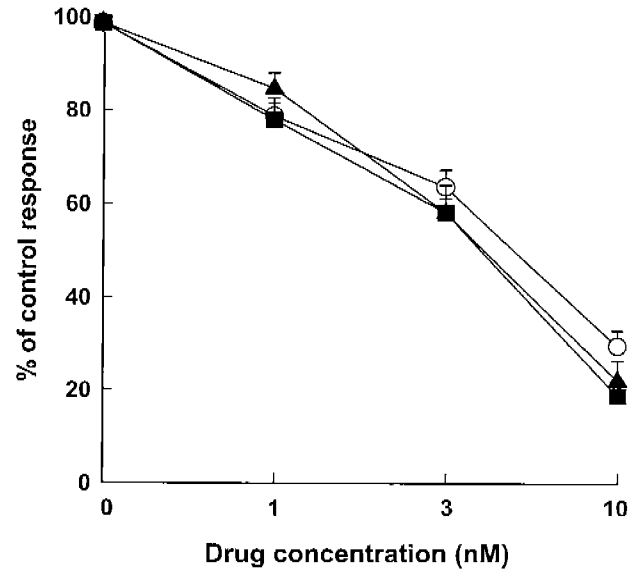


Fig. 2. Concentration-response curves for the inhibition of responses to Ca^{2+} in the rat aorta by amlodipine besylate (\circ), amlodipine maleate (\blacktriangle) and amlodipine camsylate (\blacksquare), derived from the 3.5 h data points (See Fig. 1). Values are mean percentage \pm S.E.M. (n = 5-18).

에 대한 혈관수축 반응률을 Fig. 2에 나타내었는데, 이때 1 nM 농도에서 amlodipine besylate, amlodipine maleate 및 amlodipine camsylate의 Ca^{2+} 유발성 수축은 각각 78.8 ± 3.79 , 84.7 ± 3.33 , $78.0 \pm 3.52\%$ 이었고, 3 nM 농도에서는 각각 63.5 ± 3.64 , 58.1 ± 5.90 , $58.1 \pm 3.10\%$ 이었으며, 10 nM의 고농도에서는 각각 29.3 ± 3.31 , 21.8 ± 4.32 , $18.5 \pm 2.05\%$ 로서, 각 농도에서 투여물질군간에 서로 통계학적인 차이가 없었다. Ca^{2+} 유발성 수축에 대한 약물의 억제정도를 비교하기 위하여 IC_{50} 수치(Ca^{2+} 유발성 수축을 50% 억제하는 농도, 95% 신뢰구간)를 구하였는데, 이때 amlodipine besylate, amlodipine maleate 및 amlodipine camsylate의 IC_{50} 수치는 각각 4.17 ± 0.97 , 3.62 ± 0.76 , 3.28 ± 0.53 nM로 나타나, 각 약물군간에 큰 차이가 있어 보이지 않았다.

선천성 고혈압쥐에서의 항고혈압작용

선천성 고혈압쥐에 대한 표준약물(amlodipine besylate) 및 2종류의 시험물질(amlodipine maleate, amlodipine camsylate)의 항고혈압효과를 측정된 실험결과를 Fig. 3에 나타내었다. Amlodipine besylate (Fig. 3A), amlodipine maleate (Fig. 3B) 및 amlodipine camsylate (Fig. 3C) 모두 다 용량 의존적으로 혈압을 강하시켰으며, 이때 혈압강하 양상은 모든 투여군에서 비슷하게 나타났다. 시험물질 투여 2시간 후부터는 유의성 있는 항고혈압효과가 나타나기 시작하여, 투여 2~6시간 사이에 최대효과

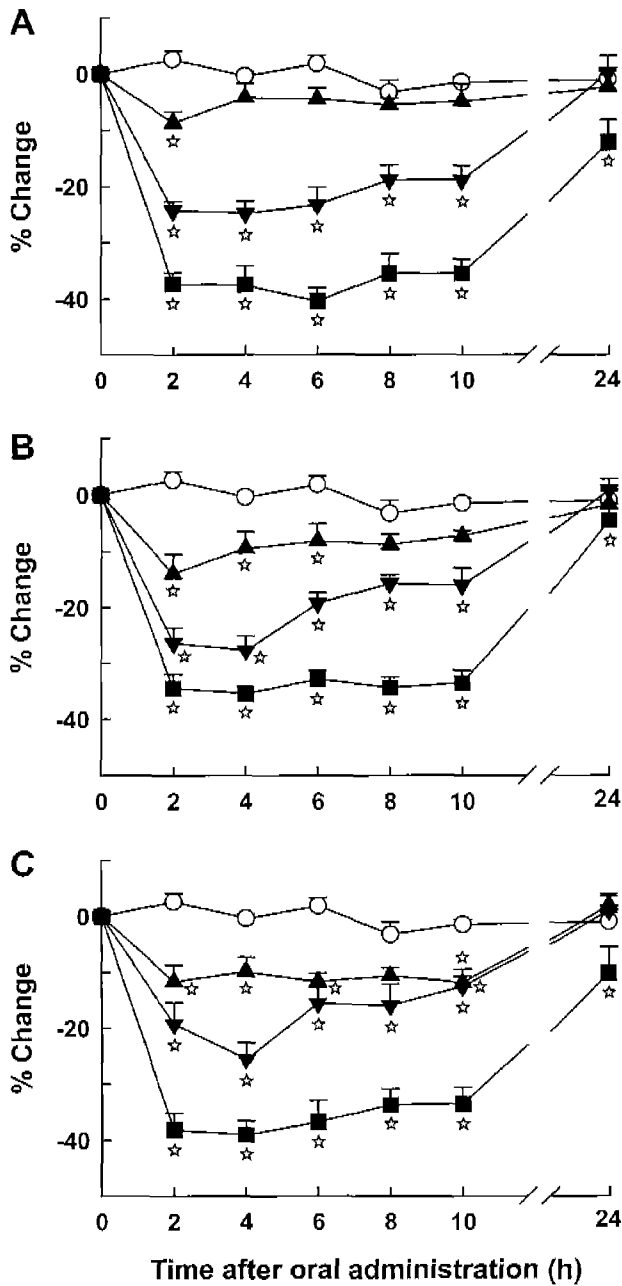


Fig. 3. Effects of amlodipine besylate (A), amlodipine maleate (B) and amlodipine camsylate (C) on systolic blood pressure in conscious spontaneously hypertensive rats. Vehicle (○), 1 (▲), 3 (▼), 10 mg/kg (■). Values are mean percentage \pm S.E.M. (n = 6-8).

가 나타났다. 이들 항고혈압효과는 투여 10시간 이상 지속되었고, 특히 10 mg/kg의 고용량에서는 투여 24시간 후에도 여전히 유의성 있는 항고혈압효과를 나타내는 지속성을 보였다. 각 투여용량에 대한 최대 항고혈압효과만을 따로 Fig. 4에 나타내었는데, 이때 1 mg/kg 용량에서의 amlodipine besylate, amlodipine maleate 및

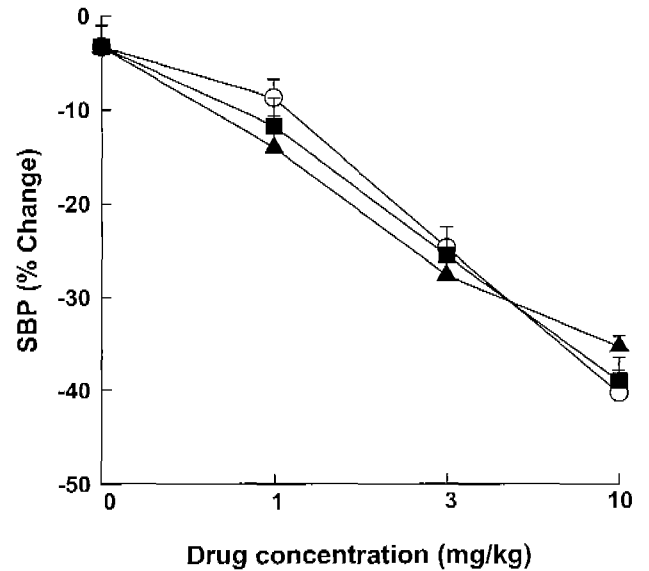


Fig. 4. Dose-response curves for the maximal changes of systolic blood pressure in conscious spontaneously hypertensive rats (See Fig. 3). Amlodipine besylate (○), amlodipine maleate (▲), amlodipine camsylate (■). Values are mean percentage \pm S.E.M. (n = 6-8).

amlodipine camsylate의 최대 항고혈압효과는 각각 -8.7 ± 1.96 , -14.0 ± 3.38 , $-11.7 \pm 3.01\%$ 이었고, 3 mg/kg 용량에서는 각각 -24.8 ± 2.22 , -27.7 ± 2.59 , $-25.6 \pm 3.03\%$ 이었으며, 10 mg/kg의 고용량에서는 각각 -40.4 ± 2.43 , -35.4 ± 1.14 , $-39.1 \pm 2.55\%$ 로 나타나, 각 농도에서 투여물질군간에 서로 통계학적인 차이가 없었다. 한편, ED₂₀ 수치(혈압을 20% 억제하는 용량, 95% 신뢰구간)는 amlodipine besylate, amlodipine maleate 및 amlodipine cam sylate가 각각 2.31 ± 0.46 , 2.09 ± 0.74 , 2.21 ± 0.61 mg/kg로서 세 약물군이 모두 비슷하게 나타났다.

Amlodipine besylate(Fig. 5A), amlodipine maleate (Fig. 5B) 및 amlodipine camsylate(Fig. 5C) 모두 다 용량 의존적으로 심박동수를 증가시켰으며, 이때 심박동수 증가양상은 모든 투여군에서 비슷하게 나타났다. 최대효과는 투여 2시간 후에 나타났으며, 시간이 지남에 따라 서서히 회복되는 양상을 보여, 3 mg/kg 용량에서는 4시간까지, 10 mg/kg용량에서는 10시간까지 유의성 있는 증가를 나타내었다. 이때 3 mg/kg 용량에서 amlodipine besylate, amlodipine maleate 및 amlopine camsylate의 최대 심박동수 증가는 각각 16.6 ± 2.40 , 19.5 ± 5.23 , $12.1 \pm 1.89\%$ 이었고, 10 mg/kg 용량에서는 각각 27.2 ± 3.68 , 27.7 ± 5.90 , $24.7 \pm 3.62\%$ 로 나타나, 각 투여군 사이에 서로 통계학적인 차이는 없었다.

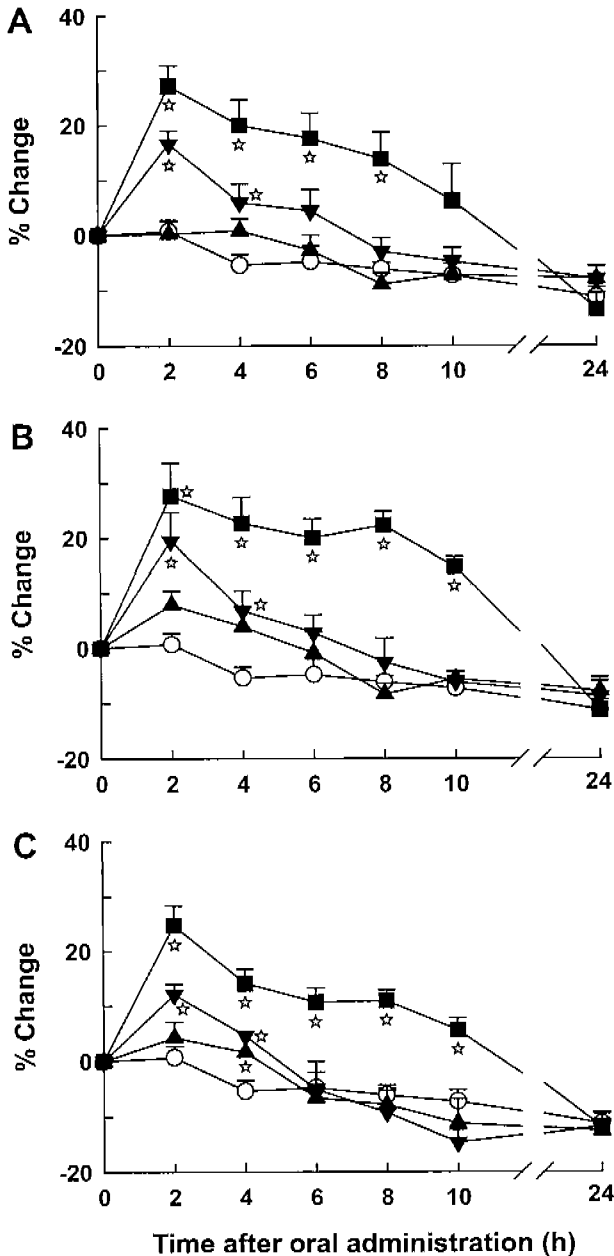


Fig. 5. Effects of amlodipine besylate (A), amlodipine maleate (B) and amlodipine camsylate (C) on heart rate in conscious spontaneously hypertensive rats. Vehicle (○), 1 (▲), 3 (▼), 10 mg/kg (■). Values are mean percentage \pm S.E.M. (n = 6-8).

고찰

표준약물(amlodipine besylate)과 2종류의 시험물질(amlodipine maleate, amlodipine camsylate)의 항고혈압작용을 비교 평가하기 위하여, Ca^{2+} 유리에 의한 혈관수축 억제효과와 선천성 고혈압쥐에서의 항고혈압작용을 측정하였다. 우선, amlodipine besylate는 흰쥐 적출 대동맥의

Ca^{2+} 유발성 수축을 농도 의존적으로 억제하였으며 (IC_{50} : 4.17 nM), 시간이 흐름에 따라 서서히 효과를 나타내는 약효지속성을 보였는데, 이것은 같은 농도에서 비슷한 실험을 수행한 Burges 등 (1987)의 실험결과와 아주 비슷함을 보였다. 시험물질인 amlodipine maleate 및 amlodipine camsylate도 표준약물인 amlodipine besylate와 아주 비슷한 양상을 나타냈으며, 각 농도에서의 최대효과를 비교해 볼 때도 amlodipine besylate와 통계학적으로 차이가 없었고, 또한 혈관수축 억제효과에 대한 IC_{50} 수치도 서로 비슷하게 나타났다. 한편, 선천성 고혈압쥐에서 amlodipine의 항고혈압 효과는 nifedipine 과 비슷하지만, 약효지속성은 nifedipine보다 훨씬 길다고 알려져 있는데 (Yamanaka 등, 1991), 본 실험에서도 선천성 고혈압쥐에 amlodipine besylate 및 시험물질인 amlodipine maleate와 amlodipine camsylate를 경구투여했을 때, 모두다 투여 2-6 시간 사이에 혈압이 최대로 강해졌으며, 이때 항고혈압효과는 투여 후 10-24시간 이상 지속되었다. 각 농도에서의 최대 항고혈압효과를 비교해볼 때, 세 물질사이에 통계학적 차이를 찾아 볼 수 없었으며, 혈압강하에 대한 ED_{20} 수치도 서로 비슷하게 나타났다(ED_{20} : 각각 2.31 ± 0.46 , 2.09 ± 0.74 , 2.21 ± 0.61 mg/kg). 이상의 실험결과, amlodipine maleate 및 amlodipine camsylate는 표준약물인 amlodipine besylate와 Ca^{2+} 유리에 의한 혈관수축 억제작용 및 선천성 고혈압쥐에 있어서 차이가 나지 않는다고 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 한미약품(주)의 지원을 받아 한국화학연구원 생명약부 약리활성연구팀에서 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

Burges, R. A., Gardiner, D. G., Gwilt, M., Higgins, A. J., Blackburn, K. J., Campbell, S. F., Cross, P. E. and Stubbs, J. K. (1987). Calcium channel blocking properties of amlodipine in vascular smooth muscle and cardiac muscle in vitro: evidence for voltage modulation of vascular dihydropyridine receptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **9**, 110-119.
 Burges, R. A., Dodd, M. G. and Gardiner, D. G. (1989). Pharmacologic profile of amlodipine. *Am. J. Cardiol.* **64**, 10I-20I.
 Burges, R. and Moisey, D. (1994). Unique pharmacologic properties of amlodipine. *Am. J. Cardiol.* **73**, 2A-9A.
 Dodd, M. G., Gardiner, D. G., Carter, A. J., Sutton, M. R. and Burges, R. A. (1989). The hemodynamic properties of

- amlodipine in anesthetised and conscious dogs: comparison with nitrendipine and influence of beta-adrenergic blockade. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **3**, 545-555.
- Lee, B. H., Yoo, S. E. and Shin, H. S. (1998). Hemodynamic profile of SKP-450, a new potassium-channel activator. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **31**, 85-94.
- Lee, B. H., Seo, H. W., Kwon, K. J., Yoo, S. E. and Shin, H. S. (1999). In vivo pharmacologic profile of SK-1080, an orally active nonpeptide AT1-receptor antagonist. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **33**, 375-382.
- Lee, B. H., Seo, H. W., Yoo, S. E., Kim, S. O., Lim, H. and Shin, H. S. (2001). Differential action of KR-31378, a novel potassium channel activator, on cardioprotective and hemodynamic effects. *Drug Dev. Res.* **54**, 182-190.
- Mathur, S., Syme, H., Brown, C. A., Elliot, J., Moore, P. A., Newell, M. A., Munday, J. S., Cartier, L. M., Sheldon, S. E. and Brown, S. A. (2002). Effects of the calcium channel antagonist amlodipine in cats with surgically induced hypertensive renal insufficiency. *Am. J. Vet. Res.* **63**, 833-839.
- Meredith, P. A. and Elliott, H. L. (1992). Clinical pharmacokinetics of amlodipine. *Clin. Pharmacokinet.* **22**, 22-31.
- Phillips, R. A., Kloner, R. A., Grimm, R. H. Jr. and Weinberger, M. (2003). The effects of amlodipine compared to losartan in patients with mild to moderately severe hypertension. *J. Clin. Hypertens. (Greenwich)* **5**, 17-23.
- Shin, H. S., Seo, H. W., Yoo, S. E. and Lee, B. H. (1998). Cardiovascular pharmacology of SKP-450, a new potassium channel activator, and its major metabolites SKP-818 and SKP-310. *Pharmacology* **56**, 111-124.
- Stopher, D. A., Beresford, A. P., Macrae, P. V. and Humphrey, M. J. (1988). The metabolism and pharmacokinetics of amlodipine in humans and animals. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **12**(Suppl 7), S55-S59.
- Yamanaka, K., Suzuki, M., Munehasu, S. and Ishiko, J. (1991). Antihypertensive effects of amlodipine, a new calcium antagonist. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **97**, 115-126.