

토끼의 수종 점막 추출액중 [D-Ala²]-Methionine Enkephalinamide의 분해 및 안정화

전인구[†] · 양윤정

동덕여자대학교 약학대학
(1992년 9월 3일 접수)

Degradation and Stabilization of [D-Ala²]-Methionine Enkephalinamide in Various Rabbit Mucosa Extracts

In Koo Chun[†] and Yoon Jeong Yang

College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea
(Received September 3, 1992)

To study the feasibility of transmucosal delivery of [D-ala²]-methionine enkephalinamide (YAGFM), its enzymatic degradation and stabilization in various rabbit mucosal extracts were investigated by HPLC method. The degradation of YAGFM was observed to follow the first-order kinetics and the half-lives of YAGFM in the nasal, rectal and vaginal mucosal extracts were found to be 25.7, 3.0 and 7.8 hr, respectively. However, there was no significant difference in degradation rates of YAGFM between the mucosal and serosal extracts obtained from the same mucosal membrane. This finding suggests that even a synthetic enkephalin analog, which is designed to be resistant to aminopeptidases, needs to be fully protected from the enzymatic degradation in mucosal sites for the delivery of the analog through mucosal routes. To inhibit the degradation of YAGFM in various mucosal extracts, effects of enzyme inhibitors such as bestatin (BS), amastatin (AM), thiorphan (TP), thimerosal (TM) and EDTA, alone or in combination, and modified cyclodextrins were observed by assaying YAGFM staying intact during 24 hr-incubation at 37°C. It was found from the results that mixed inhibitors such as TM (0.5 mM)/EDTA (5 mM) or AM (50 µM)/TM (0.5 mM)/EDTA (5 mM) provided very useful means for the stabilization in various mucosal extracts. The latter was found to protect YAGFM from the degradation in the nasal, rectal, and vaginal mucosal extracts by 90.9, 90.4 and 91.3%, respectively, after 24 hr-incubation, suggesting almost complete inhibition of YAGFM-degrading enzymes present in the incubation mixture. However, BS (50 µM), AM 50 (50 µM) or TP (50 µM) alone did not reveal sufficient inhibition except TM (0.5 mM) or EDTA (5 mM). The addition of 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (10%) to the nasal mucosal extract, and dimethyl-β-cyclodextrin (10%) to the rectal and vaginal mucosal extracts reduced the first-order rate constants for the degradation of YAGFM by 5.8, 17.3 and 8.9 times, respectively, compared to those with no additive.

Keywords—[D-Ala²]-methionine enkephalinamide, Transmucosal delivery, Nasal, rectal and vaginal mucosa extracts, Degradation, Enzyme inhibitors, Modified cyclodextrins, Stabilization

엔케팔린은 천연 opiate receptor agonist로서 2종의 펜타펩타이드, 즉 메치오닌엔케팔린(Met-Enk)과 로이신엔케팔린(Leu-Enk)이 있으며 1975년 Hu-

ghes 등¹⁾에 의해 확인되었다. Met-Enk 및 Leu-Enk의 sequence는 양, 돼지, 사람의 뇌하수체에서 단리된 β-lipotropin의 61-65의 잔기에 존재하며 체

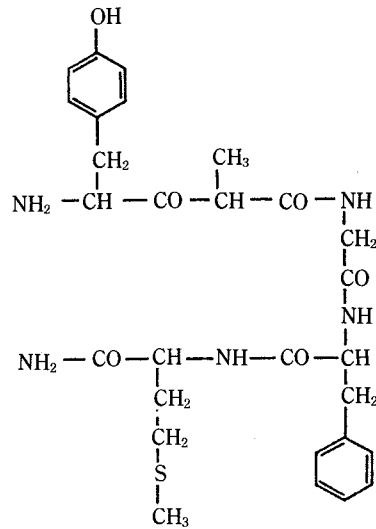
[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

내 엔케팔린은 중추 및 말초신경계, 혈장 및 후각 신경 등에 분포되어 있다. 이들은 통증전달에 있어서 신경전달물질 또는 신경조절인자로 진통, 혈압조절 및 장관 운동성변화 등의 약리학적 효과가 있는 것으로 알려져 있다.^{2,3)} 더욱 이들의 진해작용 및 지사작용과 함께 불편양 작용에도 불구하고 탐닉성이 없고⁵⁾ 마약복용 중단시의 금단증상을 경감시킨다는 보고⁶⁾가 있다. 그러나, 이러한 효과는 생물학적 반감기가 1분 이내로 매우 짧아 뇌실내 주사시에도 진통작용이 일시적이다.⁷⁾ 이와 같이 천연 엔케팔린류가 체내에서 급격히 불활성화되는 것은 혈장,^{8,9)} 뇌¹⁰⁾에 존재하는 여러 종류의 효소에 의한 분해에 기인하는 것으로 알려져 있다.

더욱 이들 생리활성 펩타이드류 및 단백질류는 경구투여시 위장관에 존재하는 펩타이드 및 단백질의 분해효소류에 의해 신속하게 분해되어 생물학적 이용율이 극도로 낮기 때문에 주로 정맥주사에 의존하고 있는 실정이다. 이와 같이 경구투여시의 매우 낮은 이용율과 비경구 투여시의 동통과 불편함을 극복하기 위하여 이들의 대체 투여경로로 비강,¹¹⁻¹⁴⁾ 직장,^{15,16)} 구강,¹⁷⁾ 질^{18,19)} 및 안점막²⁰⁾과 같은 점막을 이용하는 연구가 많이 진행되고 있다. 이들 투여경로는 주사를 필요로 하지 않고 간 및 위장관 초회 통과효과를 피할 수 있기 때문에 투여부위로서의 이점이 크다.

Schwartz 등²¹⁾은 엔케팔린류의 분해에 있어서 aminopeptidase류가 주된 역할을 하며 enkephalinase A와 B가 분해에 다소 관여하고 있음을 기술하고 있다. 이 효소들은 생체부위에 따라 그 활성에 차이가 있으며 엔케팔린 분해에 대한 상대적인 기여가 다르다고 알려져 있다. 토끼점막의 균등질중 엔케팔린류의 분해는 직장과 구강점막의 균등질에서 가장 신속하고 비강과 질점막의 순서로 분해되었지만 분해속도에는 큰 차이가 없었다.²²⁾ 또한 저자 등은 토끼의 비강, 직장 및 질점막 추출액에서도 Met-Enk의 심한 효소적 분해로 그 반감기가 각각 약 74, 14 및 46분인 것으로 보고하였다.²³⁾

한편 엔케팔린의 주 분해효소인 aminopeptidase류에 대해 저항성을 높이하고자 엔케팔린의 두번째 아미노산인 glycine을 D-alanine으로 치환한 D-[ala²]-methionine enkephalinamide와 [D-ala²]-leucine enkephalinamide가 설계되게 이르렀다. D-[Ala²]-



Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Met-NH₂
C₂₈H₃₈N₆O₆S Mol. wt. 586.7

Chart 1—Molecular structure and sequence of YA-GFM

methionine enkephalinamide의 점막 균등질중 가수분해는 주로 enkephalinase A가 일차적인 분해 효소이며 그 분해정도와 분해경로는 Met-Enk과 다르다고 보고되어 있다.²⁴⁾ 또 이의 안점막 및 비강 점막을 통한 전신 흡수율이 각각 36.1 및 13.6%이었지만 역시 투과장벽 이외에 점막투과중 이의 대사가 전신 이용율을 제한하는 또 다른 장벽임이 제시되었다.²⁵⁾ 최근 엔케팔린 및 그 유사체류의 체내 수송을 위해 비강,^{25,26)} 안점막,⁷⁾ 소장²⁷⁾ 및 피부²⁸⁾ 등을 이용한 연구가 보고되었으나 점막부위에서의 분해정도와 안정화에 관한 보고는 별로 없다.

이와 같이 생리활성 엔케팔린 및 그 유사체류가 비강, 직장, 질 및 눈 등 그 투여부위가 점막이라 할지라도 투과도중 심한 효소적 분해를 받기 때문에 체내 수송을 위해서는 점막부위에서의 효소적 분해로부터 안정화가 요구되고 있다. 이러한 관점에서, 본 연구에서는 aminopeptidase류에 대해 보다 저항성이 크도록 설계된 [D-ala²]-methionine enkephalinamide(Chart 1)를 모델 펩타이드 약물로 하여 토끼의 비강, 직장 및 질점막 추출액 중에서의 효소적 분해특성을 검토하고 더 나아가 점막 추출액중 효소적 분해로부터 안정화시키기 위하여 수중 효소

억제제류의 영향을 검토하였다.

실험 방법

실험동물

체중 2.5-3.5 kg의 건강한 New Zealand White계 자성 토끼를 사용하였다.

시료 및 시약

D-[ala²]-methionine enkephalinamide (YAGFM), L-tyrosyl-D-alanylglycine, L-phenylalanine, amastatin(AM), bestatin(BS), DL-thiorphan(TP), 디메틸-β-시클로텍스트린(DM-β-CyD), 우혈청알부민은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였고, 치메로살(TM), 헵탄설폰산나트륨 등은 Janssen Chem.에서, L-tyrosine 및 glycine 등은 Junsei Chemical Co., Ltd.에서, 2-히드록시프로필-β-시클로텍스트린(HP-β-CyD)은 Pharmatec Inc.(Florida, USA)에서 제공받았다. 메탄올, 아세토니트릴 및 물(Hayashi Pure Chem. Ind. Ltd.)은 HPLC용을 사용하였고 기타 시약은 시판 특급품을 썼다.

기기 및 장치

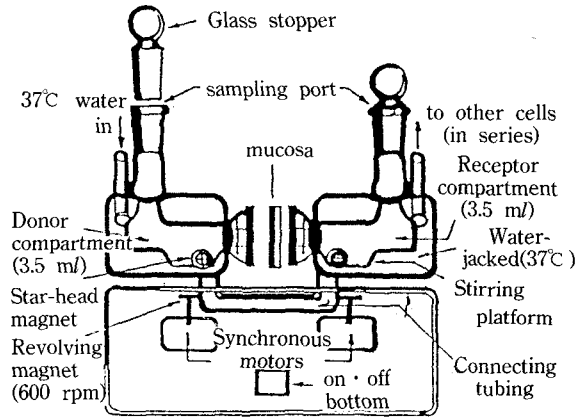
기기로는 흡광도측정기(UV-240, Shimadzu, Japan), 고속액체크로마토그래프장치(LC-3A, Shimadzu, Japan)를 사용하였고 항온진탕수욕장치(Dai Han Scientific Co., Korea), pH측정기(Ion Analyzer 250, Corning, Switzerland), 정밀자동천칭 및 프로그래밍 저온항온기(IN 81, Yamato, Japan) 등을 썼으며 점막 추출액의 제조에는 Valia-Chien 투과시스템(Scheme 1)을 이용하였다.

점막 추출액중 YAGFM의 정량

HPLC장치로는 LC-3A, 검출기로는 SPD-1을, 데이터 처리장치로는 Chromatopac C-R1B를 사용하고 칼럼으로는 Zorbax® C₈(5 μm, 4.6×250 mm)을, 이동상으로는 0.05 M 인산염완충액(pH 3.0)·아세토니트릴 혼합액(70 : 30 v/v, 0.1% 헵탄설폰산나트륨 함유)을 사용하여 유속 1.0 ml/min, 파장 214 nm에서 시료용액 40 μl를 주입하여 분석하였다. 따로 YAGFM의 농도를 순차로 달리 하여 만든 표준액을 주입하여 얻은 피크 면적을 써서 검량선을 작성하고 이로부터 시료중의 YAGFM을 정량하였다.

점막 추출액중 YAGFM의 효소적 안정성 시험

점막의 적출-토끼의 귀정맥에 공기를 주입하여



Scheme 1—Diagram of the Valia-Chien permeation system used for the preparation of mucosa extracts

치사시킨 후 먼저 질 및 직장점막을 절취한 다음 비강 연골의 상단, 기저 및 하단 부위를 수술용 칼(#10)로 잘라내고 장갑을 착용한 엄지손가락으로 표면에 부착된 비점막을 조심스럽게 박리하였다. 적출 및 절제조작은 토끼를 치사시킨 후 30분 이내에 완료하고 적출된 점막을 생리식염수로 가볍게 씻어 다음 조작에 따라 점막을 추출하였다.

점막 추출액의 제조—Valia-Chien 투과시스템을 이용하여 제조하였다. 신선하게 적출한 점막을 half-cell 사이에 점막층이 donor cell을 향하도록 하고 장막층은 receptor cell을 향하도록 하여 마운팅하고, donor 및 receptor cell측에 각각 생리 등장인산염 완충액(비강점막 : pH 8.2, 직장점막 : pH 7.2, 질점막 : pH 6.0) 3.5 ml씩을 넣어 채우고 37°C를 유지하면서 8시간 동안 교반하여 추출하였다. 이 조작을 3회 반복하였다. 각각의 cell로부터 3회에 걸쳐 얻은 추출액을 합하여 냉장고에 보존하고 최종추출이 끝난 후 30분 이내에 사용하였다.

점막 추출액중 YAGFM의 효소적 분해시험—YAGFM 1.116 μg을 1 ml의 생리식염수에 녹여 시료원액(1.6×10⁻³ M)으로 하였다. 시료원액 50 μl를 각 추출액 950 μl에 넣어 8.0×10⁻⁵ M로 조제한 후 60 rpm으로 흔들면서 37°C에서 incubation하였다. 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24시간에 각각 100 μl씩 취하여 pH 2.2 인산염완충액 400 μl에 넣어 효소반응을 정지시키고 이 액 40 μl를 HPLC에 주입하고 YAGFM의 잔존량을 산출하였다. 위의 실험을 3회 반복하였다.

점막 추출액중 단백질함량 측정

Schosinsky 등²⁹⁾의 방법을 이용하여 추출액중 단백질함량을 측정하였다. 2l 용량플라스크에 증류수 1.6l를 넣고 글리신 34.52g을 녹인 후 sodium azide 200mg을 첨가하고 5M 염산으로 pH를 3.0으로 조절한 후 표선까지 희석시켜 230mM(pH 3.0) 글리신 완충액을 제조하였다. 따로 3ml의 0.1M NaOH에 브롬페놀블루(BPB) 125.7mg을 녹이고 증류수를 사용하여 150ml로 희석시켜 1.25M BPB 원액을 제조하였다. 다음 1l 용량플라스크에 글리신 완충액 약 800ml를 넣고 BPB 원액 150ml를 넣어 섞은 다음 계면활성제용액(Brij-35) 4ml를 첨가하고 글리신 완충액으로 표선까지 채워 0.188M BPB 용액으로 하였다. 비강, 직장 및 질의 생리등장 인산염완충액 각각에 우혈청 알부민을 녹여 1mg/ml의 농도로 제조한 후 20-200 µg/ml로 희석시키고 각각에 BPB 용액을 넣어 섞고 공시험액을 대조로 파장 610nm에서 흡광도를 측정하여 각각의 검량선을 작성하였다. 비강, 직장 및 질점막의 점막추출액과 장막추출액 각 2.0ml에 BPB 용액 500 µl를 넣어 섞고 610nm에서 흡광도를 측정하여 미리 작성한 검량선으로부터 추출액 중의 총단백량을 측정하였다.

점막 추출액중 YAGFM의 분해 억제

Enkephalinase A 억제제, aminopeptidase 억제제 및 이들의 혼합효소억제제를 사용하여 생리식염수로 각각의 원액을 만들고 이들의 점막 추출액중 농도를 BS 100 µM, AM 50 µM, DL-TP 50 µM, TM 0.5 mM, EDTA 5 mM, DM-β-CyD 10% 및 HP-β-CyD 10%가 되도록 적절히 희석하였다.

미리 추출해 놓은 비강, 직장 및 질점막 추출액 각 800 µl에 BS, AM, TP, TM, EDTA, DM-β-CyD 및 HP-β-CyD 원액을 각각 50 µl씩 넣고 YAGFM 원액(1,116 µg/ml) 50 µl씩을 넣은 다음 등장 인산염 완충액(비강 pH 8.0, 직장 pH 7.2 및 질 pH 6.0)으로 채워 1,000 µl로 하였다. 37°C에서 60 rpm으로 흔들면서 24시간 incubation하면서 2, 4, 6, 8, 12, 16 및 24시간에 100 µl씩을 취하여 인산염완충액(pH 2.2) 400 µl에 넣어 효소반응을 정지시키고 이 중 40 µl를 HPLC에 주입하여 정량하고 YAGFM의 잔존량을 구하였다. 위의 실험을 3회 반복하였다. 따로 YAGFM의 초기농도 영향을 관찰하기 위해 등장인산염완충액(pH 7.2)에 YAGFM을 녹여 1,000 µg/ml의

원액으로 한 후 직장점막 추출액을 사용하여 YAGFM의 농도를 30-200 µg/ml까지 변화시켜 시험액을 조제하고 농도가 분해속도에 미치는 영향을 검토하였다.

점막투과중 YAGFM의 분해실험

직장점막을 Valia-Chien 투과장치에 마운팅하고 등장인산염완충액(pH 7.2) 3,150 µl와 YAGFM 원액(1,116 µg/ml) 350 µl를 점막추출액 donor cell에 넣어 약물의 농도를 111.6 µg/ml(160 µM)로 하고 receptor cell에는 완충액(pH 7.4) 3.5 ml를 넣어 24시간 동안 교반하면서 37°C 항온을 유지하였다. 일정 시간마다 점막추출액 및 장막추출액에서 각각 50 µl씩을 취하여 pH 2.2 인산염완충액 450 µl를 넣어 효소반응을 정지시키고 이 액 40 µl를 HPLC에 주입하고 YAGFM의 donor측 잔존량과 receptor측 투과량을 측정하였다.

결과 및 고찰

점막 추출액중 YAGFM의 효소적 분해

토끼의 비강, 직장 및 질점막을 적출하여 점막추출액과 장막추출액을 등장인산염완충액으로 8시간씩 3회 추출하여 얻은 추출액중 단백질 함량을 BPB 색소법으로 정량하여 알부민의 양으로 산출하였다. 각 점막 추출액중 단백질함량을 Table I에 나타내었다. 점막 추출액중 단백질함량은 직장>질>비강점막의 순이었으며 같은 점막의 점막추출액과 장막추출액중의 단백질함량은 대체적으로 유사하였다.

비강, 직장 및 질점막 추출액 중에서의 YAGFM의 경시적 분해정도를 잔존율로 표시하여 Fig. 1에 나타내었다. 이에서 보면 각 점막의 추출에 쓴 완충액 중에서는 pH에 관계없이 24시간까지 거의 안정하였으나 점막추출액 중에서는 YAGFM이 심하게 분

Table I—Protein Contents in Various Rabbit Mucosa Extracts

Mucosa	Extract	Protein conc. ^{a)} (µg/ml)
Nasal	Mucosal	47.1
	Serosal	81.0
Rectal	Mucosal	195.7
	Serosal	128.5
Vaginal	Mucosal	108.2
	Serosal	111.1

^{a)} Expressed as mean of three determinations.

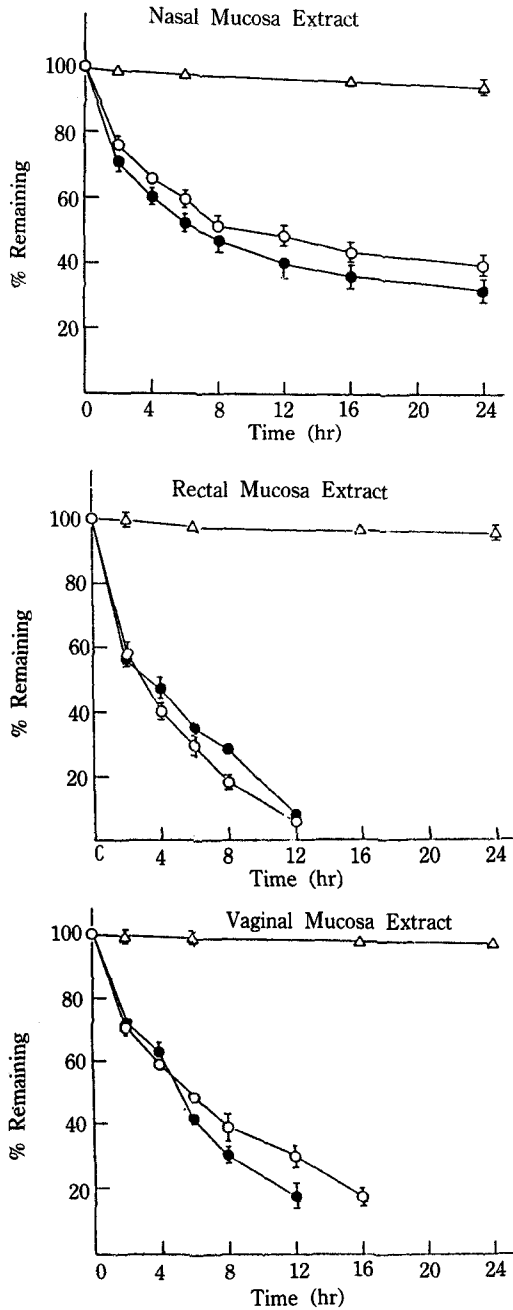


Figure 1—Time courses for the disappearance of YAGFM in various mucosa extracts at 37°C. Error bar indicates standard error (n=3).

Key: Δ , buffer solution alone; \circ , mucosal extract; \bullet , serosal extract

해되었다. 이는 추출액중 YAGFM의 분해가 주로 효소적 분해인 것을 나타낸다. 직장점막 추출액중

Table II—Apparent First-Order Rate Constant (k)^{a)} and Half-Lives ($t_{1/2}$) for the Degradation of YAGFM in Various Absorptive Mucosa Extracts^{b)} of NZW Rabbits at 37°C

Mucosa	Extract	k (hr ⁻¹ , ×10 ³)	t _{1/2} (hr)
Nasal	Mucosal	34.54	25.7
	Serosal	35.32	19.6
Rectal	Mucosal	226.52	3.0
	Serosal	191.86	3.6
Vaginal	Mucosal	96.63	7.8
	Serosal	136.16	5.1

^{a)} Expressed as mean of the results obtained from three rabbits

^{b)} Mucosal and serosal surfaces of each mucosa were separately exposed to the isotonic phosphate buffer solution adjusted to the physiologic pH's for each mucosa: pH 8.0 for nasal, pH 7.2 for rectal and pH 6.0 for vaginal.

에서의 분해가 가장 빨라 15시간 이내에 거의 모두 분해되었으며 비점막 추출액에서의 분해가 가장 느렸다. 경시적 잔존율을 가지고 first-order에 따라 플롯트하여 분해속도정수와 반감기를 구하여 Table II에 나타내었다. 같은 점막에서는 점막측과 장막측 추출액 사이에 분해속도정수가 유사하였고, YAGFM의 분해속도의 크기는 직장>질>비장점막 추출액의 순이었다. 이러한 결과는 추출액중 단백질량의 순서와 잘 일치된다.

각종 점막의 균등질에서의 엔케팔린의 분해²²⁾ 및 돼지 간의 esterase에 의한 hexapeptide(Me)인 Arg-Lys-Pro-Trp-tert-Leu-Leu-OEt의 가수분해³⁰⁾도 1차 속도식에 따른다고 보고되었다. Met-Enk의 비강, 직장 및 질점막 추출액에서의 분해속도정수²³⁾가 각각 0.56, 2.95 및 0.90 hr⁻¹인 것에 비하여 YAGFM이 각각 16.2, 13.0 및 9.3배 안정하지만 Met-Enk의 합성 유사체라 하더라도 점막추출액 중에서 상당히 불안정한 것으로 나타났다.

따로 직장점막 추출액을 이용하여 YAGFM의 초기농도가 그 분해에 미치는 영향을 검토한 결과 Fig. 2에서의 같이 초기농도가 높을수록 분해속도가 작아짐을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Fig. 1에서의 같이 YAGFM의 분해가 효소적 분해라는 점과 분해에 포화현상이 있음을 의미한다.

효소억제제를 이용한 점막 추출액중 YAGFM의 분해 억제

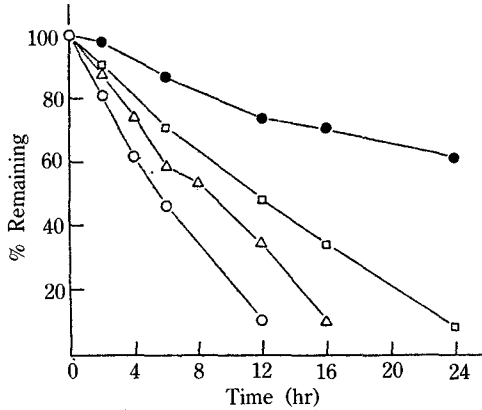


Figure 2—Effect of the initial concentration of YAGFM on its degradation in the rectal mucosal extract at 37°C. Key: ○, 30 µg/ml; △, 50 µg/ml; □, 100 µg/ml; ●, 200 µg/ml

Aminopeptidase 억제제, enkephalinase 억제제 및 이들의 혼합 효소억제제를 이용하여 비강, 직장 및 질점막의 추출액 중에서의 YAGFM 분해억제효과를 검토하였다. 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 비강, 직장 및 질점막 추출액중에서 YAGFM의 분해를 억제시키는 데는 AM, TM 및 EDTA 혼합효소억제제가 가장 효과적이었고 비강점막에서는 10.2배, 직장점막에서는 62.1배, 질점막에서는 25.0배 안정화시켰으며 24시간 후 추출액중 잔존율은 각각 90.9, 90.4 및 91.3%이었다. 한편 TM/EDTA의 혼합억제제도 약 80% 이상의 분해억제효과를 나타내었다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 aminopeptidase의 억제제인 BS 및 AM은 YAGFM을 그다지 안정화시키지 못하였다. YAGFM이 aminopeptidase류에 대한 저항성이 크도록 설계된 화합물임을 고려할 때 BS 및 AM의 안정화 효과가 낮게 나타난 것은 Met-Enk나 Leu-Enk의 경우 aminopeptidase가 이들의 분해에 80% 이상을 기여하고 있음²⁹⁾과는 달리 YAGFM의 분해에서는 enkephalinase A 또는 B와 같은 endopeptidase가 주로 분해에 관여하고 있음을 나타낸다. 또 이러한 결과는 AM이 D-alanine으로 치환된 엔케팔린 유사체의 안정화에 영향을 주지 못하였다는 보고와 일치된다³¹⁾. 또 Gly-Phe 결합을 가수분해하는 enkephalinase A의 선택적인 억제제인 TP의 효과는 비점막 추출액에서 다소 크게 나

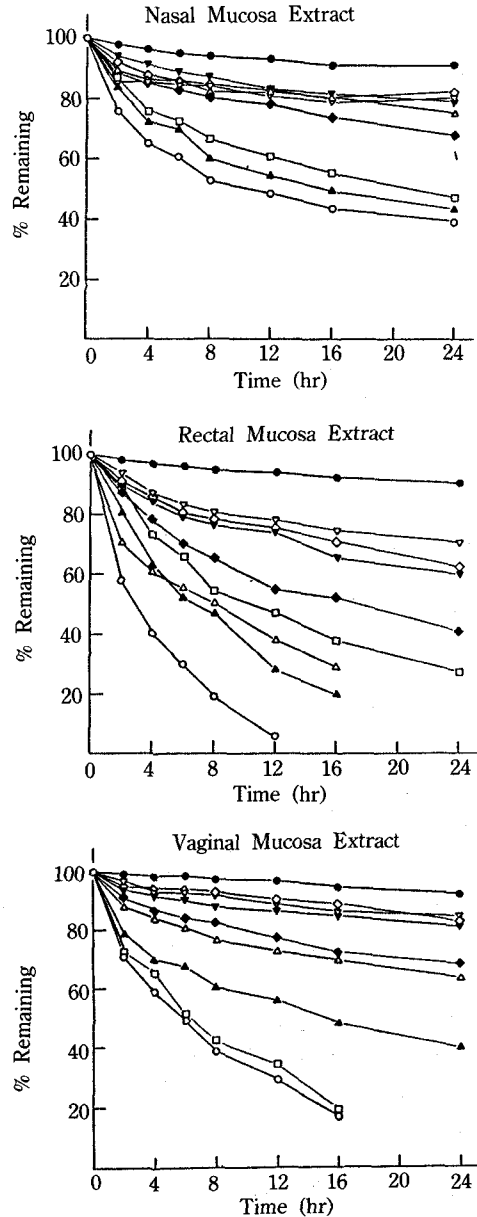


Figure 3—Time course inhibition profiles for the degradation of YAGFM in various mucosal extracts in the absence and presence of various inhibitors at 37°C. Key: ○, without inhibitor; ▲, 100 µM BS; □, 50 µM AM; △, 50 µM TP; ▼, 0.5 mM TM; ◆, 5 mM EDTA; ▽, 0.5 mM TM/50 µM TP; ◇, 0.5 mM TM/5 mM EDTA; ●, 50 µM AM/0.5 mM TM/5 mM EDTA

타났으나 직장이나 질점막 추출액에서는 BS보다 크게 나타났을 뿐 그 효과는 미약하였다. 한편 meta-

Table III—Effect of Enzyme Inhibitors on the Degradation of YAGFM in Various Rabbit Mucosal Extracts at 37°C

Inhibitor	First-order rate constant ^{a)} (hr ⁻¹ , ×10 ³)		
	Nasal	Rectal	Vaginal
None	34.5	226.5	96.6
BS (100 μM)	28.6	98.9	25.7
AM (50 μM)	26.0	50.9	92.1
TP (50 μM)	7.4	62.8	14.5
EDTA (5 mM)	11.5	33.5	13.1
TM (0.5 mM)	8.4	17.6	7.0
TM (0.5 mM)+EDTA (5 mM)	4.6	15.7	6.7
TM (0.5 mM)+TP (50 μM)	4.1	11.8	6.2
AM (50 μM)+TM (0.5 mM) +EDTA (5 mM)	3.4	3.7	3.9
k ₀ /k _{min} ^{b)}	10.2	62.1	25.0

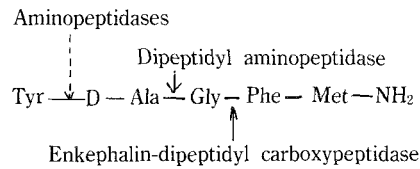
^{a)} Expressed as mean of the results obtained from three rabbits

^{b)} Ratios of rate constants for None to those for the maximum inhibition

lloenzyme의 억제제인 EDTA는 대체적으로 BS, AM 및 TP보다 안정화효과가 컸다. 이러한 효과는 aminopeptidase와 enkephalinase가 Zn²⁺을 필요로 하는 효소라는 점³²⁾과 잘 일치한다.

Chun 등²³⁾은 점막추출액중 Met-Enk의 분해억제 실험에서 TM이 강력한 enkephalinase B 억제제로 작용하는 동시에 enkephalinase A와 aminopeptidase에 대해서도 다소의 억제효과가 있음을 보고하였다. YAGFM의 분해억제를 위해 TM의 효과를 검토한 바 0.5 mM 농도에서 Fig. 3에서와 같이 BS, AM, TP 및 EDTA보다도 훨씬 우수하였으며 24시간 후 비강, 직장 및 질점막 추출액에서의 YAGFM의 잔존율이 각각 78.3, 60.0, 80.7%이었다.

그러나 효소억제제를 단독으로 쓰는 경우는 YAGFM의 분해효소 모두를 억제할 수 없으므로 일부의 분해효소활성이 여전히 분해에 관여하여 충분한 안정화를 도모할 수 없다. 이러한 관점에서 단독으로 분해억제 효과가 가장 우수하였던 TM과 TP 또는 EDTA와 혼합하여 억제효과를 관찰하였다. 그 결과 혼합효소억제제가 TM 단독 사용시보다도 YAGFM이 더욱 안정화되었으며 TM, AM 및 EDTA의 3종 혼합억제제를 썼을 때 최대의 안정화효과를 나타내



Scheme 2—Breakdown mode of YAGFM and enzyme activities involved

었다.

효소억제제 첨가시 YAGFM의 경시적 분해거동(잔존율)을 first-order에 따라 속도정수를 구하여 정리한 결과를 Table III에 나타내었다. AM (50 mM)/TM (0.5 mM)/EDTA (5 mM)의 3종 혼합효소 존재시 비강, 직장 및 질점막 추출액중 YAGFM의 분해를 효소억제제가 첨가되지 않은 경우와 비교하여 각각 10.2, 62.1 및 25.0배 분해속도정수를 감소시켰으며 24시간 후 모든 추출액에서 90% 이상 YAGFM을 안정화시켰다.

이러한 효소억제제의 영향의 검토로부터 여러가지 점막 추출액중 YAGFM 분해효소의 활성은 직장>질>비강의 순이며 점막부위에 따른 분해효소의 종류는 유사한 것으로 생각된다. 또 YAGFM의 분해는 주로 endopeptidase에 의해 이루어지며 aminopeptidase류도 일부 관여하고 있음이 추정된다. 여러 효소들에 의한 YAGFM의 분해 및 효소억제제에 의한 분해억제기구를 Scheme 2에 나타낸다.

최근 비강점막이 뇌내 약물수송의 투여부위로 관심이 집중되고 있으며³³⁾ 코로부터 뇌척수액으로의 약물수송경로가 존재한다는 보고가 있다. 프로케스 테론과 에스트라디올이 정맥주사에 비해 비강투여시 뇌척수액중 농도가 높았고 도파민에서도 같은 결과가 얻어졌다. 또 뇌의 말초혈관 부위와嗅葉(olfactory lobe)의 蜘蛛膜下 부위(subarachnoid space)가 코의 점막하 조직층과 연결되어 있음을 고려할 때 경비투여가 뇌내 약물수송의 유망한 경로로 생각된다. 세팔렉신과 설파제의 비강으로부터 뇌내 이행에 직접적인 수송경로가 있음이 밝혀졌고 설파제의 경우 지용성이 클수록 뇌내 이행량이 많았다고 보고되었다. 그러므로 비강이 뇌로 통하는 수송경로를 가지고 있다는 점과 YAGFM의 분해효소활성이 상대적으로 낮다는 점에서 비강이 장차 뇌에 작용부위가 있는 엔케팔린류의 뇌내 약물수송에 있어서

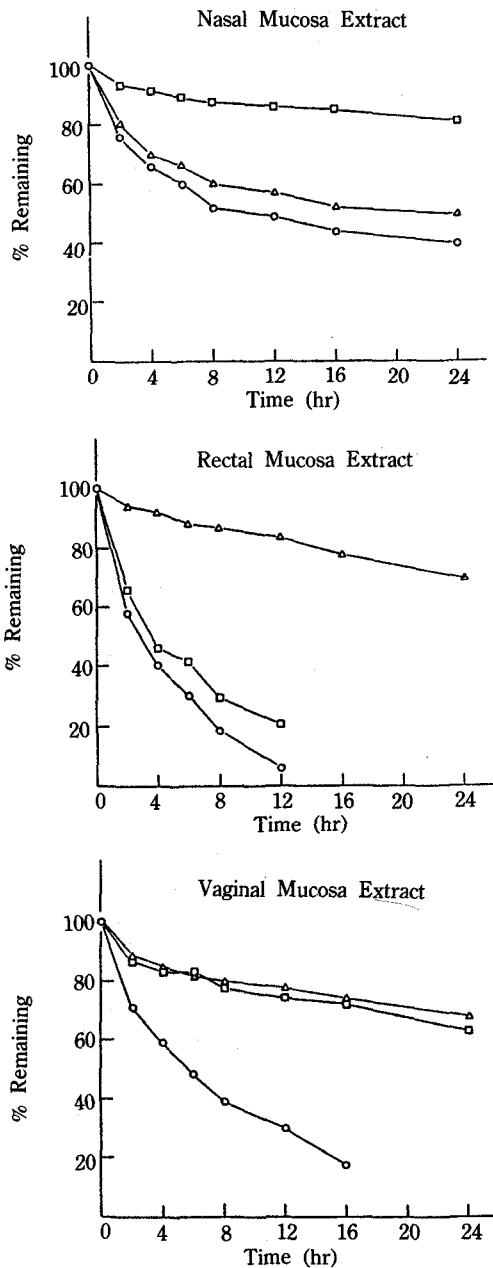


Figure 4—Effect of modified cyclodextrins on the stability of YAGFM in various mucosal extracts at 37°C. Key: ○, without CyD; △, with DM-β-CyD; □, with HP-β-CyD

매우 유망한 투여부위라고 생각된다.

시클로덱스트린류가 점막 추출액중 YAGFM의 분해에 미치는 영향

Table IV—Effect of Modified Cyclodextrins on the Degradation of YAGFM in Various Rabbit Mucosa Extracts at 37°C

Cyclodextrin ^{a)}	First-order rate constant (hr ⁻¹ , × 10 ³)		
	Nasal	Rectal	Vaginal
None	34.5	226.5	96.6
DM-β-CyD	25.7	13.1	10.8
HP-β-CyD	5.9	113.3	13.6
k_o/k_{min} ^{b)}	5.8	17.3	8.9

^{a)} The concentration of modified cyclodextrins added was 10.0%.

^{b)} Ratios of rate constants for None to those for the maximum inhibition.

최근 불안정한 펩타이드성 약물의 안정화에 관심이 집중되고 있는 화학수식된 시클로덱스트린 유도체들로 DM-β-CyD과 2-HP-β-CyD를 이용하여 점막 추출액중 YAGFM의 분해에 미치는 영향을 검토하였다. CyD류의 존재시 비강, 직장 및 질점막 추출액중 YAGFM의 경시적 잔존율을 Fig. 4에 나타내었다. 비강점막 추출액 중에서는 HP-β-CyD이 YAGFM의 안정화에 효과가 컸으며 직장점막에서는 DM-β-CyD이 우수한 효과가 있었고, 질점막에서는 DM-β-CyD와 HP-β-CyD이 비슷하게 큰 효과를 나타내었다. 경시적 잔존율로부터 first-order에 따라 분해속도정수를 구하여 Table IV에 나타내었다. 비강, 직장 및 질점막 추출액중 CyD 존재시 24시간 후 YAGFM이 각각 84.5, 70.4 및 68.6% 잔존하였으며 점막 추출액 단독에 비해서 그 분해속도정수를 각각 5.8, 17.3 및 8.9배 감소시켰다.

이와 같이 CyD류에 의해 YAGFM이 안정화된 것은 주로 CyD가 YAGFM을 포접하여 분해효소로부터 보호된 때문으로 추정되나 그 상호작용에 대해서는 더욱 검토되어야 할 것이다. 한편 종래의 β-CyD는 물에 대한 용해도(1.85 g/100 ml, 25°C)가 낮고 정맥주사시의 신장독성으로 인하여 주사가 가능한 β-CyD의 유도체들이 개발되었다. 이들 중 β-CyD의 수산기를 메칠화한 DM-β-CyD는 용해성(50%)과 포접능이 향상되었으나 높은 지용성과 표면활성작용으로 콜레스테롤과 단백질을 추출하여 낮은 농도에서도 용혈을 일으키며 점막과 근육에 자극이 있다. 이에 대해 β-CyD를 히드록시알킬화한 2-HP-β-CyD는 수많은 이성체들의 무정형 화합물로 수용

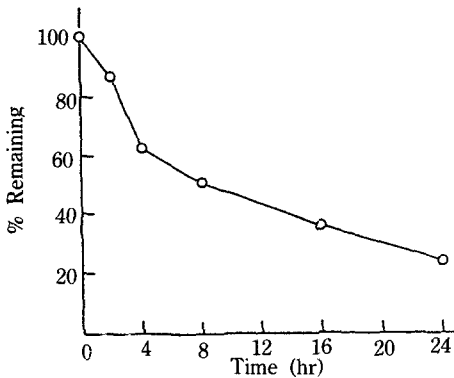


Figure 5—Degradation profile for YAGFM (160 μM) in the donor cell mounted with rectal mucosa at 37°C. Receptor cell did not show the appearance of the parent peptide.

성이 매우 높고 포접능은 보통 β-CyD보다 같거나 크다.³⁴⁾ HP-β-CyD은 ovine 성장호르몬, interleukin-2, 종양괴사인자, macrophage-colony stimulating factor를 가용화시켰으며 인슐린의 응집과 분해를 억제시켰다. 또 수용액중 aspartame 분해가 HP-β-CyD에 의해 억제되었다.³⁵⁾ 또 secretin, immunoglobulin G, LHRH, 인슐린, thyroxin releasing hormone, ACTH 등이 CyD류에 의해 생체막 흡수성이 향상되었다.³⁴⁾ 이러한 보고들과 본 연구에서의 CyD 유도체들에 의한 YAGFM의 효소분해억제효과로 볼 때 CyD류가 점막투여부위에서 생리활성 펩타이드류의 분해억제, 가용화 및 흡수촉진 등 제제화에 있어서 유용한 첨가제로 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

점막 투과중 YAGFM의 분해

투과셀에 직장점막을 마운팅하고 donor 및 receptor cell로부터 경시적으로 시료를 취하여 잔존 YAGFM을 정량하고 donor측 cell 중 YAGFM의 잔존율을 Fig. 5에 나타내었다. 이에서 보는 바와 같이 donor측에서는 시간의 경과에 따라 YAGFM이 점차 감소되어 24시간 후에는 24.3%가 잔존한 반면 receptor cell에서는 YAGFM이 전혀 검출되지 않았다. 이러한 결과는 직장점막이 YAGFM에 대해 투과성이 매우 낮음을 의미하며 투과과정중 효소적으로 심하게 분해됨을 나타낸다. 따라서 엔케팔린의 유사체라 하더라도 점막 투과를 도모하기 위해서는 효소억제제와 점막투과촉진제의 병용에 관한 검토가 이루어

져야 한다고 생각된다.

결 론

생리활성 펩타이드로 메치오닌엔케팔린의 유사체인 D-[ala²]-methionine enkephalinamide(YAGFM)를 모델 펩타이드 약물로 하여 토끼의 비강, 직장 및 질점막 추출액 중에서의 분해 및 안정화를 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. YAGFM은 생리등장 인산염완충액 중에서는 37°C에서 24시간 동안 분해가 거의 없었지만 토끼의 점막추출액에서는 직장>질>비강 순으로 신속히 분해되었으며 각 점막의 점막측 및 장막측 추출액 간에는 YAGFM의 분해속도에 현저한 차이가 없었다.

2. 각 점막 추출액에 bestatin, amastatin, thiorphan, 치메로살, EDTA 등의 효소억제제를 단독 또는 혼합하여 첨가하고 YAGFM의 분해억제 정도를 검토한 결과 모든 점막추출액에서 amastatin, 치메로살 및 EDTA의 3종 혼합효소억제제가 YAGFM의 안정화에 가장 효과적이었으며 24시간 후에도 90% 이상 YAGFM을 안정화시킬 수 있었다.

3. 수종 점막 추출액중 시클로덱스트린 유도체가 YAGFM의 분해에 미치는 영향을 검토한 결과 비강 추출액에서는 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CyD)이, 직장 추출액에서는 dimethyl-β-cyclodextrin(DM-β-CyD)이 안정화 효과가 컸으며 질점막 추출액에서는 HP-β-CyD 및 DM-β-CyD 모두 안정화 효과가 컸다.

4. 이상의 사실로 보아 혼합효소억제제와 시클로덱스트린 유도체가 점막부위에서 효소적으로 불안정한 YAGFM의 안정화에 유용한 첨가제로 생각되며 흡수촉진제의 응용과 함께 장차 비강, 직장, 질 등의 점막수송이 가능할 것으로 기대된다.

감사의 말씀

이 논문은 1991년도 교육부 지원 학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의해 연구되었다. 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) J. Hughes, T.W. Smith, H.W. Kosterlitz, L.T. Fothergill, B.A. Morgan and H.R. Horries, Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, **158**, 295-308 (1975).
- 2) M.J. Brownstein, Peptidergic pathways in the central nervous system. *Proc. R. Soc. B.*, **210**, 133-149 (1980).
- 3) G.A. Olsen, R.D. Olsen, A.L. Kastin and D.H. Coy, Endogenous opiates. *Peptides*, **2**, 349-369 (1981).
- 4) R.J. Miller and P. Cartresas, The enkephalins: Peptides with morphine-like activity. *Naturwissenschaften*, **65**, 508-514 (1978).
- 5) J. Szekeley et al., Pharmacological and human studies with a highly potent opioid peptides, D-Met², Pro⁵-enkephalinamide. *Pol. J. Pharmacol.*, **38**, 641-656 (1987).
- 6) E.D. Dzolijic and M.R. Dzolijic, Modification of morphine withdrawal in rats by alterations of the endogenous opioid system: Effects of actinonin and GEMSA. *Drug Dev. Res.*, **18**, 255-261 (1989).
- 7) J. Hughes, Centrally Acting Peptides (1977).
- 8) J.C.A. Frederickson and L.E. Geary, Endogenous opioid peptides: Review of physiological, pharmacological and clinical aspects. *Prog. Neurobiol.*, **19**, 16-69 (1982).
- 9) J.M. Hambock, B.A. Morgan, M.J. Rance, and L.F.C. Smith, Mode of deactivation of the enkephalins by rat and human plasma and rat brain homogenates. *Nature*, **262**, 782-783 (1976).
- 10) L.B. Hersh and J.F. Mckelvy, An aminopeptidase from bovine brain which catalyzes the hydrolysis of enkephalin. *J. Neurochem.*, **36**, 171-178 (1981).
- 11) S.T. Anik, G. McRae, C. Nerenberg, A. Worde, J. Foreman, J. Hwang, S. Kushinsky, R.E. Jones and B. Vickery, Nasal absorption of nafarelin acetate, the decapeptide (D-ala(2)⁶) LHRH, in rhesus monkey I. *J. Pharm. Sci.*, **73**, 684-685 (1984).
- 12) A.L. Daugherty, H.D. Liggitt, J.G. McCabe, J.A. Moor and J.S. Patton, Absorption of recombinant methionyl-human growth hormone(Met-hGH) from rat nasal mucosa. *Int. J. Pharm.*, **45**, 197-206 (1988).
- 13) L. Illum, N.F. Faraj, H. Critchley, B.R. Johansen and S.S. Davis, Enhanced nasal absorption of insulin in rats using lysophosphatidylcholine. *Int. J. Pharm.*, **57**, 49-54 (1989).
- 14) P.A. Baldwin, C.K. Klingbeil, C.J. Grim and J.P. Longenecker, The effect of sodium tauro-24,25-dihydrofusidate on the nasal absorption of human growth hormone in the animal models. *Pharm. Res.*, **7**, 547-552 (1990).
- 15) E.J. van Hoogdalem, C.D. Heijlingers-Feijen, A.G. de Boer, J.C. Verhoef and D.D. Breimer, Rectal absorption enhancement of des-enkephalin- γ -endorphin (DE γ E) by medium-chain glycerides and EDTA in conscious rats. *Pharm. Res.*, **6**, 91-85 (1989).
- 16) E.J. van Hoogdalem, C.D. Heijlingers-Feijen, J.C. Verhoef, A.G. de Boer and D.D. Breimer, Absorption enhancement of rectally infused insulin by sodium tauro-24,25-dihydrofusidate (STDHF) in rats. *Pharm. Res.*, **7**, 180-183 (1990).
- 17) M. Ishida, Y. Machida, N. Nambu and T. Nagai, New mucosal dosage form of insulin. *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 810-816 (1981).
- 18) K. Morimoto, T. Takeeda, Y. Nakamoto and K. Morisaka, Effective vaginal absorption of insulin in diabetes rats and rabbits using polyacrylic and aqueous gel bases. *Int. J. Pharm.*, **12**, 107-111 (1982).
- 19) H. Okada, I. Yamazaki, Y. Ogawa, S. Hirai, T. Yashiki and H. Mima, Vaginal absorption of a potent leuteinizing hormone analog (leuprolide) in rats I: Absorption by various routes and absorption enhancement. *J. Pharm. Sci.*, **72**, 1367-1372 (1982).
- 20) R.E. Stratford, L.W. Carson, S. Dadda-Kashi and V.H.L. Lee, Systemic absorption of ocularly administered enkephalinamide and insulin in the albino rabbit: Extent, pathways and vehicle effects. *J. Pharm. Sci.*, **77**, 838-842 (1988).
- 21) J.C. Schwartz, B. Malfroy and S. De La Baume, Biological inactivation of enkephalins

- and the role of enkephalin dipeptidyl-carboxypeptidase ("enkephalinas") as neuropeptidase. *Life Sci.*, **9**, 1715-1740 (1981).
- 22) S. Dodda-Kashi and V.H.L. Lee, Enkephalin hydrolysis in homogenates of various absorptive mucosae of the albino rabbit: Similarities in rates and involvement of aminopeptidases. *Life. Sci.*, **38**, 2019-2028 (1986).
- 23) I.K. Chun and Y.W. Chien, Transmucosal delivery of methionine enkephalin I. Kinetics of degradation in buffered solution and metabolism in various mucosal extracts. *J. Pharm. Sci.*, accepted (1992).
- 24) S. Dodda-Kashi and V.H.L. Lee, Hydrolysis of enkephalins in homogenates of anterior segment tissues of the albino rabbit eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **27**, 1300-1303 (1986).
- 25) K.S.E. Su, K.M. Campanale, L.G. Mendelsohn, G.A. Kerchner and C.L. Gries, Nasal delivery of peptides I: Nasal absorption of enkephalins in rats. *J. Pharm. Sci.*, **74**, 768-770 (1985).
- 26) J.A. Faraj, A.A. Hussain, Y. Aramaki, K. Iseki, M. Kagoshima and L.W. Dittert, Mechanism of nasal absorption of drugs. IV: Plasma levels of radioactivity following intranasal administration of (³H) leucine enkephalin. *J. Pharm. Sci.*, **79**, 768-770 (1990).
- 27) G.A. Kerchner and L.E. Geary, Studies on the transport of enkephalin-like oligopeptides in rat intestinal mucosa. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **226**, 33-38 (1983).
- 28) H.K. Choi, G.L. Flynn and G.L. Amidon, Transdermal delivery of bioactive peptides: The effects of decylmethyl sulfoxide and pH on enkephalin transport. *Pharm. Res.*, **7**, 1099-1106 (1990).
- 29) K.H. Schosinsky, M. Vargas, A.L. Esquivel and M.A. Chavarria, Simple spectrophotometric determination of urinary albumin by dye-binding with use of bromphenol blue. *Clin. Chem.*, **33**, 223-226 (1987).
- 30) T. Tokumura, T. Tanaka, A. Sasaki, Y. Tsuchiga, K. Abe and R. Machida, Stability of a novel hexapeptide, (Me)Arg-Lys-Pro-Trp-tert-Leu-Leu-OEt, with neurotensin activity in aqueous solution and in the solid state. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3094-3098 (1990).
- 31) D.I. Friedman and G.L. Amidon, Oral absorption of peptides: Influence of pH and inhibitors on the intestinal hydrolysis of leu-enkephalin and analogues. *Pharm. Res.*, **8**, 93-96 (1991).
- 32) I.K. Chun, Protection of Bioactive Enkephalins from Enzymatic Degradation. in *3rd Int. Symp. on Advances in Pharmaceutical Dosage Form Design*, The Korean Society of Pharmaceutics, April, 1991, pp. 31-56.
- 33) T. Sakane, M. Akizuki, S. Yamashita, T. Nadai, M. Hashida and H. Sezaki, The transport of a drug to the cerebrospinal fluid directly from the nasal cavity: The relation to the lipophilicity of the drug. *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2456-2458 (1991).
- 34) M.E. Brewster, J.W. Simpkins, M.s. Hora, W.C. Stern and N. Bodor, Use of cyclodextrins in parenteral formulations. *J. Parent. Sci. Technol.*, **43**, 231-240 (1989).
- 35) M.E. Brewster, T. Loftsson, J. Baldvinsdottir and N. Bodor, Stabilization of aspartame by cyclodextrins. *Int. J. Pharm.*, **75**, R5-R8 (1991).