

## 토끼의 각막 추출액 중 메치오닌엔케팔린 및 [D-알라<sup>2</sup>]- 메치오닌엔케팔린아미드의 분해 및 안정화

이치호† · 이경진 · 전인구\* · 성영기\*\* · 신영희\*\*

부산대학교 약학대학, \*동덕여자대학교 약학대학, \*\*경성대학교 약학대학  
(1994년 1월 17일 접수)

### Degradation and Stabilization of Methionine Enkephalin and [D-Ala<sup>2</sup>]-methionine Enkephalinamide in the Corneal Extracts of Rabbits

Chi Ho Lee, Kyoung Jin Lee, In Koo Chun\*, Young Gi Sung\*\* and Young Hee Shin\*\*

College of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

\*College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

and \*\*College of Pharmacy, Kyungsoo University, Pusan 608-736, Korea

(Received January 17, 1994)

In order to study systemic peptide delivery through the ocular route, the stabilities of methionine enkephalin (Met-Enk) and [D-ala<sup>2</sup>]-methionine enkephalinamide (YAGFM) in the corneal extracts of rabbits were investigated using reversed phase HPLC. Met-Enk was found to be hydrolyzed most rapidly in the corneal epithelium, but YAGFM was relatively stable. Aminopeptidases appeared to contribute over 60% to the degradation of Met-Enk and the degradation rate of Met-Enk followed the first order kinetics. The half-lives of Met-Enk in the extracts of the corneal epithelium and endothelium were 36 and 673 min, respectively. From the effects of enzyme inhibitors, it was found that the application of the mixture of amastatin, thimerosal and EDTA was very useful for the inhibition of peptide degradation.

**Keywords**—Methionine enkephalin, [D-Ala<sup>2</sup>]-methionine enkephalinamide, Rabbit cornea, Stabilization, Degradation, Enzyme inhibitors.

최근 생체내에서 현저한 생리활성작용을 나타내는 펩타이드 또는 단백질들이 알려지고 있고, 단백질 공학의 발달로 대량 생산이 가능하게 되면서 이들의 생체내 전신수송에 대한 관심이 급속히 증가되고 있다.<sup>1,2)</sup> 이들 물질의 생체내 투여 방법으로는 주사에 의한 투여방법이 일반적인 방법으로 이용되고 있다. 그러나 주사제에 의한 장기 투여는 환자의 불편뿐만 아니라 주사부위에 통증이나 여러가지 병변을 야기하는 등의 단점이 있으므로 대체 투여경로의 개발이 요구되어 왔다. 우선 경구투여 경로를 고려할 수 있으나 펩타이드나 단백질은 위장관에서의 물리화

학적 및 효소적 불안정성과 위장관에서의 매우 낮은 투과성으로 인하여 생체내 흡수를 거의 기대하기 어려운 물질이다. 또 한편으로 주사제가 아닌 비경구 투여경로로 최근 활발히 연구가 진행되고 있는 코점막, 구강점막, 직장점막, 질점막, 피부, 안구점막 및 폐점막 등의 경로를 고려할 수 있으며, 이들 각각의 경로에 대하여 많이 연구된 펩타이드는 인슐린과 gonadotropin 유리호르몬의 유사체인 leuprolide 등을 들 수 있다. 이들 물질의 점막을 통한 투여방법에도 점막의 저항, 프로테아제에 의한 분해, 저장부위에서의 급속한 배설 등 많은 어려운 점이

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

보고되고 있다.

최근 생체내에서 현저한 물핀양 진통효과를 나타내는 것으로 알려진 내인성 pentapeptide로 천연 엔케팔린인 메치오닌엔케팔린과 로이신엔케팔린 또 효소 분해에 저항성을 가지도록 합성된 여러가지 합성유사체의 점막부위에서의 분해특성과 생체내 수송에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이에 본 연구에서는 엔케팔린류 중 천연의 메치오닌엔케팔린<sup>3-5)</sup>과 아미노펩티다제류에 저항성을 가지고 있는 합성유사체 [D-알라<sup>2</sup>]-메치오닌엔케팔린아미드<sup>6-8)</sup>를 사용하여 안구 점막<sup>9-12)</sup>에서의 효소적 안정성을 검토하고, 또 효소억제제류<sup>13-16)</sup>를 적용함으로써 분해억제 효과를 검토하였다.

## 실험 방법

### 실험 동물

체중 2-3 kg의 건강한 New Zealand White계의 웅성 토끼를 실험동물로 사용하였다.

### 재료 및 시약

천연 엔케팔린으로서는 메치오닌엔케팔린(Met-Enk, Tyr-Gly-Gly-Phe-Met)을, 합성 유사체로는 [D-알라<sup>2</sup>]-메치오닌엔케팔린아미드(YAGFM)를, 그리고 각기의 대사체로 Des-Tyr-Met-Enk, Des-Tyr-YAGFM, Tyr, Tyr-Gly, Tyr-Gly-Gly, Phe-Met을, 효소억제제로 아마스타틴(AM), 치오르판(TP), 치메로살(TM) 및 에데트산이나트륨(EDTA)을, 기타 테트라플루오로초산(TFA)은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다. 아세트니트릴 및 물은 Merck Co.(Germany)의 HPLC용을 사용하였고 기타 시약은 시판 특급품을 사용하였다.

### 기기 및 장치

μ-Bondapak C<sub>18</sub> 칼럼(3.9×300 mm), 펌프(Model 510), injector(Model U6K) 및 a fixed-wavelength 검출기(Model 481)을 장착한 고속액체크로마토그래프장치(Waters Associates, Milford, MA), 항온진탕 수욕장치(동경이화학), 정밀자동천칭(Mettler AE 160) 및 pH 측정기(pH/ion Meter 150, Corning, Switzerland) 등을 사용하였으며, 점막 추출용으로는 특수 주문 제작한 side-by-side diffusion cell(Fig. 1)을 이용하였다.

### 안구 각막의 추출

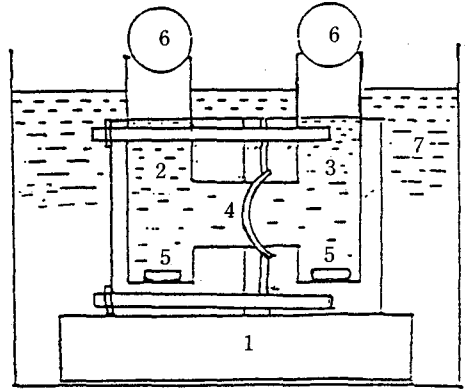


Figure 1—Schematic diagram of methacrylate diffusion cell for corneal permeability.

Key: 1; stirrer, 2; tear side, 3; aqueous humor side, 4; cornea, 5; magnetic bar, 6; glass ball, and 7; water bath (35°C).

건강한 웅성 토끼의 귀정맥에 공기를 주입하여 희생시킨 후 출혈 및 각막의 손상이 없도록 주의하여 안구를 적출하였다. 95% 산소(5% 탄산가스 함유)로 포화한 37°C의 생리식염수로 채운 파라핀 왁스판에 적출한 안구를 편으로 고정된 다음 수술용 가위로 동공 주위를 따라 각막을 분리하였으며, 이 조작은 토끼를 희생시킨 후 20분 이내에 완료하였다.<sup>17)</sup>

### 점막 추출액의 제조

적출한 각막은 95% 산소(5% 탄산가스 함유)로 포화한 생리식염수로 가볍게 세척하고 donor 및 receiver cell의 접합부위가 안구의 곡률반경과 거의 같도록 제작된 side-by-side diffusion cell에 마운팅하였다. Donor 및 receiver cell측에 각각 pH 7.4 등장인산염완충액 3.5 ml씩 가하고 37°C에서 8시간 교반하여 추출하였으며, 이 추출조작을 3회 반복하였다. 각각의 donor 및 receiver cell로부터 얻은 추출액은 따로따로 합하여 각각 표피측 및 내피측 추출액으로서 냉장고에 보관하였으며, 최종 추출이 끝난 다음 30분 이내에 시험에 사용하였다.

### 안구 각막 추출액중의 Met-Enk과 YAGFM의 효소적 분해 및 분해 억제

안구 각막 추출액중 Met-Enk 및 YAGFM의 1차 대사 분해로 생성가능한 분해산물의 생성속도를 검토함으로써 분해경로를 추적하였다. 우선 Met-Enk과 YAGFM을 각각 pH 7.4 등장 인산염완충액에 용해하여 1 mg/ml의 원액을 시험 직전에 조제하였

다. 따로 AM, TP, EDTA 및 TM을 생리식염수에 녹여 각각 1, 1, 100 mM 및 0.2% 농도가 되도록 효소억제제 원액을 제조하였다. 실험 직전 추출을 완료한 안구 각막의 표피층 및 내피층 추출액 각각을 800  $\mu$ 씩 취하여 3.5 ml의 마개가 달린 시험관에 넣고 효소억제제 원액 50  $\mu$ 씩을 단독, 2중 또는 3중으로 혼합하여 넣고 생리식염수를 가하여 전량 1000  $\mu$ 가 되도록 하였다. 모든 시험관을 가볍게 vortexing한 후 37°C의 항온 진탕수조에 넣고 고정된 다음 60 rpm으로 가볍게 진탕하면서 24시간 동안 incubation하였다. 경시적으로 100  $\mu$ 씩 시료를 취한 다음 pH 2.2 등장 인산염완충액 400  $\mu$ 씩을 가하여 vortexing 하여 효소반응을 정지시켰다. 이를 HPLC 분석방법에 의하여 미리 작성한 검량선으로부터 잔존 펩타이드의 양과 대사산물인 각 fragment들을 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**HPLC 정량분석 조건**

Met-Enk, Des-Tyr-Met-Enk 및 Phe-Met의 분리 분석-HPLC를 사용하여 Met-Enk, Des-Tyr-Met-Enk 및 Phe-Met의 분석은 이동상으로서 pH 3.0 인산염완충액·아세트니트릴혼합액을 79 : 21 v/v로, 유속 1.2 ml/min, 감도 0.1 aufs을 이용하여 214 nm에서 측정하였을 때 각각의 유지시간은 9.7, 6.5 및 5.4분으로 양호하게 분리되었으며, 1-10  $\mu$ g/ml의 농도범위에서 양호한 직선성을 나타내었다.

Tyr, Tyr-Gly, Tyr-Gly-Gly 및 Phe의 분리 분석-HPLC 분석용 이동상으로서 0.05% TFA를 함유하는 아세트니트릴 용액(A용액)과 90% 아세트니트릴용액(B용액)을 이용하여 8분까지는 A용액을 100%로, 8분부터 10분까지는 A용액 89%와 B용액 11%로, 이후는 다시 A용액을 100%로 하는 gradient elution을 실시하였으며, 유속 1.2 ml/min, 감도 0.1 aufs 및 214 nm에서 측정하였으며, Tyr, Tyr-Gly, Tyr-Gly-Gly 및 Phe의 유지시간이 7.4, 8.2, 9.6 및 11.0분으로 각각 양호하게 동시 분리되었으며, 1-5  $\mu$ g/ml의 농도 범위내에서 직선성을 나타내었다.

YAGFM의 분석조건-pH 3.0 인산염완충액·아세트니트릴혼합액(75 : 25 v/v)을 이동상으로 하여, 유속 1.0 ml/min, 감도 0.1 aufs로 하여 214 nm에서

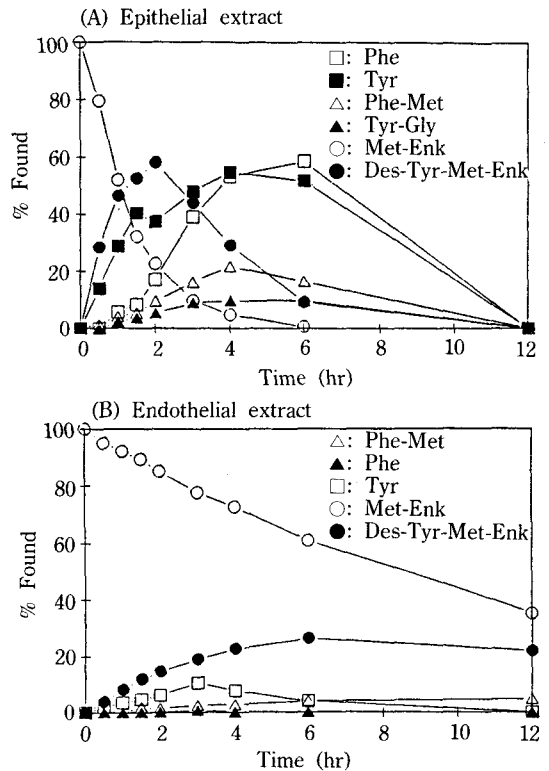


Figure 2—Time course for the degradation of Met-Enk and appearance of its metabolites in the corneal extract of rabbit at 37°C.

측정하였으며, 1-10  $\mu$ g/ml의 농도범위에서 양호한 직선성을 나타내었다.

**안구 각막 추출액중의 Met-Enk 및 YAGFM의 분해 특성**

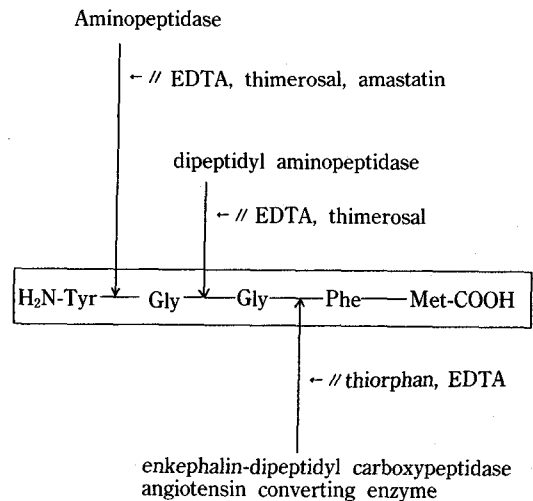
안구 각막 추출액중 Met-Enk의 분해-Met-Enk의 안구 각막을 통한 전신 수송체계를 검토하기 위하여서는 투여부위에서의 Met-Enk의 효소적 분해에 대한 안정성을 우선적으로 검토해야 할 필요가 있다. 그러므로 먼저 안구 각막의 표피층 추출액과 내피층 추출액을 각각 조제하여 각각의 추출액중에서의 Met-Enk의 분해정도와 그 경로를 추적하였다. 이를 위하여 Met-Enk과 그 대사산물의 생성 및 소실을 경시적으로 분석 검토하였다. Fig. 2는 안구 각막의 표피층 및 내피층의 추출액중에서 Met-Enk의 분해거동을 나타낸 것이며 이를 1차 분해속도식으로 검토한 결과, Fig. 3에 나타난 바와 같이 좋은 직선의 관계를 나타내므로 Met-Enk의 효소적 분해는 1차 분해속도식에 따른다고 해석할 수 있

**Table I**—First-order Rate Constants ( $hr^{-1} \times 10^2$ ) for the Degradation of Met-Enk and YAGFM in the Corneal Extract of Rabbit at 37°C in the Absence and Presence of Various Enzyme Inhibitors

Inhibitor	Epithelial	Endothelial
<b>Met-Enk</b>		
none	65.4	8.5
+ 50 $\mu$ M amastatin (AM)	17.3	6.4
+ 5 mM EDTA	4.6	1.6
+ 0.5 mM thimerosal (TM)	28.8	3.7
+ 50 $\mu$ M thiorphan (TP)	115.8	10.4
+ AM+EDTA	2.5	1.1
+ AM+TP	15.7	6.2
+ AM+TM+EDTA	1.3	0.8
<b>YAGFM</b>		
none	3.9	0.2

으며 그 분해속도정수는 Table I에 나타내었다. Met-Enk의 분해속도는 표피층에서는 반감기가 35.9분으로 매우 빠르며 내피층에서는 672.8분으로 비교적 안정함을 알 수 있었다. 이 결과로부터 안구 각막을 통한 약물수송체계를 검토할 경우 일단 각막을 통하여 흡수된 Met-Enk은 효소적 분해에 비교적 안정하므로 표피층에서의 안정성에 관한 것을 우선적으로 고려할 필요가 있다. Met-Enk의 분해에 관여하는 효소들은 주로 아미노펩티다제류, 디펩티달아미노펩티다제 및 디펩티달카르복시펩티다제(예를 들면, 엔케팔리나제 또는 angiotensin 전환효소) 등이 있다고 보고<sup>18-24)</sup>되어 있다(Scheme 1).

표피층에서는 주로 아미노펩티다제의 작용에 의하여 Tyr-Gly bond가 급속히 분해되어 Tyr의 생성량이 높은 농도로 증가되었으며 Des-Tyr-Met-Enk은 Tyr 보다는 낮은 농도이기는 하나 120분대에 최대농도를 나타낸 다음 더 작은 fragment로 분해되면서 시간에 따라 감소되었다. 또 Gly-Gly bond의 분해로 생성된 Tyr-Gly fragment의 양은 상대적으로 낮은 농도를 나타내었다. 또 다른 한편 주로 디펩티달카르복시펩티다제에 의하여 생성되는 Phe-Met fragment는 낮은 농도이기는 하지만 240분대에서 최대농도를 나타낸 다음 더 작은 fragment로 분해되면서 감소되었다. 그러나 Fig. 2(B)에 나타낸 것처럼 내피층에서는 표피층에 비하여 효소분해에 비교적 안정하여 360분대에서도 60% 이상의 잔존률을



**Scheme 1**—Mode of breakdown of enkephalins and enzyme activities involved in the corneal extracts of rabbits.

보여 주고 있다. 그 분해산물도 Des-Tyr-Met-Enk만이 소량 생성되었으며 그 외의 다른 fragment는 측정범위내에서는 나타나지 않으므로 내피층의 추출액에는 아미노펩티다제류 이외의 Met-Enk 분해 효소는 거의 존재하지 않는 것으로 추정할 수 있다.

안구 각막 추출액중 YAGFM의 분해—천연 메치오닌엔케팔린의 합성유사체인 YAGFM은 Met-Enk의 Tyr을 D-알라닌으로 치환함으로써 아미노펩티다제류에 대하여 저항성이 크도록 설계된 물질이다. 그러나 이 합성유사체도 엔도펩티다제류에 의하여 분해를 받기 때문에 안구 각막 추출액중의 안정성에 대한 검토는 천연 엔케팔린과 동일한 방법으로 실시하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 경시적으로 측정된 결과는 12시간까지 표피층 및 내피층 추출액 모두에서 약 95% 이상 잔존하여 매우 안정함을 알 수 있었다. 이들 결과로부터 안구각막에 존재하는 엔케팔린 분해효소는 주로 아미노펩티다제류인 것으로 추정된다.

안구 각막 추출액중 Met-Enk의 효소의 분해 억제 효소억제제 단독의 분해억제효과—Fig. 5-8에서 보는 바와 같이 각막 추출액에서 효소적 분해 억제제의 효과는 EDTA, AM, TM의 순으로 나타났으며 TP는 별다른 억제효과를 나타내지 않았다. 따라서 아미노펩티다제류에 억제작용을 나타내는 대표적 효소억제제인 AM을 적용한 결과를 Fig. 5에

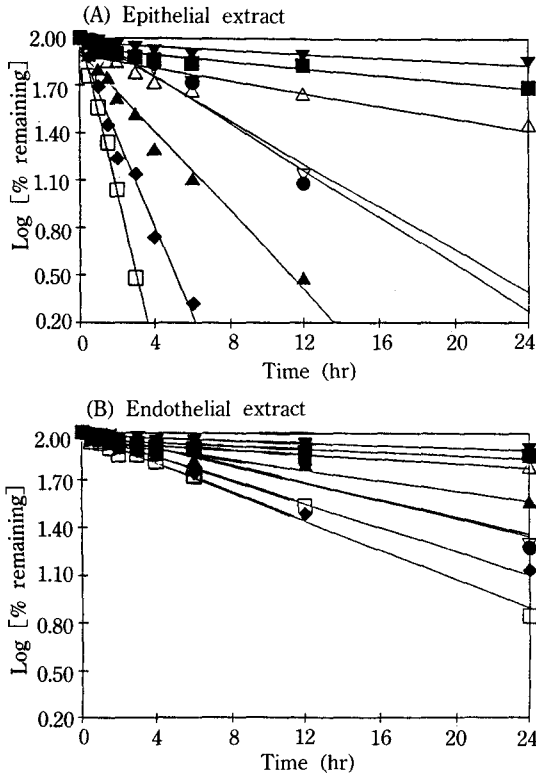


Figure 3—Disappearance of Met-Enk in the corneal extract of rabbit at 37°C in the absence and presence of various enzyme inhibitors.

Key: ◆; without inhibitor; ●; 50 μM AM; △; 5 mM EDTA, ▲, 0.5 mM TM; □; 50 μM TP; ■; 50 μM AM/5 mM EDTA; ▽; 50 μM AM/0.5 mM TM; ▼; 50 μM AM/0.5 mM TM/5 mM EDTA.

나타내었다. 아미노펩티다제류에 의하여 주로 생성되는 Des-Tyr-Met-Enk 또는 Tyr의 생성은 매우 낮으나 아미스타틴에 의하여 억제되지 않는 디펩티딜아미노펩티다제에 의한 Gly-Gly bond의 분해산물인 Tyr-Gly는 상당히 높은 농도로 나타났다. Fig. 6은 아미노펩티다제류 뿐만 아니라 디펩티딜아미노펩티다제에도 억제작용을 나타내는 것으로 알려진 TM을 적용한 결과를 나타낸 것이다. 아미노펩티다제류의 작용은 AM에 비하여 다소 약한 억제작용을 나타내었으나 디펩티딜아미노펩티다제의 작용은 상당히 억제되어 그 분해산물인 Tyr-Gly의 생성은 현저히 저하되었다. 또 Fig. 7은 엔케팔린디펩티딜카르복시펩티다제류 및 angiotensin 전환효소의 작용을 억제하는 것으로 알려진 TP를 적용한 결과로서

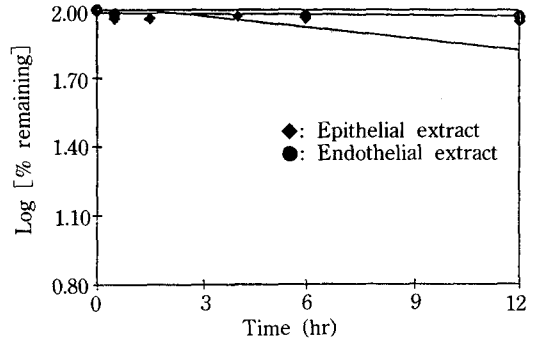


Figure 4—Disappearance of YAGFM in the corneal extract of rabbit at 37°C.

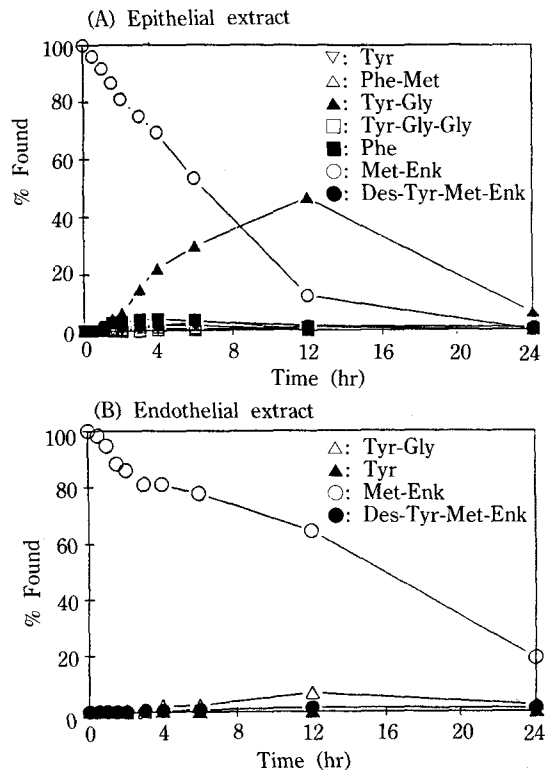


Figure 5—Time course for the degradation of Met-Enk and appearance of its metabolites in the corneal extract of rabbit at 37°C in the presence of enzyme inhibitor, 50 μM AM.

Phe의 생성은 다소 억제되었으나 Met-Enk의 분해 속도는 치오르판을 적용한 경우가 오히려 빠른 결과를 나타냄으로 이 원인에 관한 것은 보다 더 연구할 필요가 있다고 사료된다. 한편 Met-Enk의 분해에 관여하는 전체 효소의 작용을 억제하는 것으로

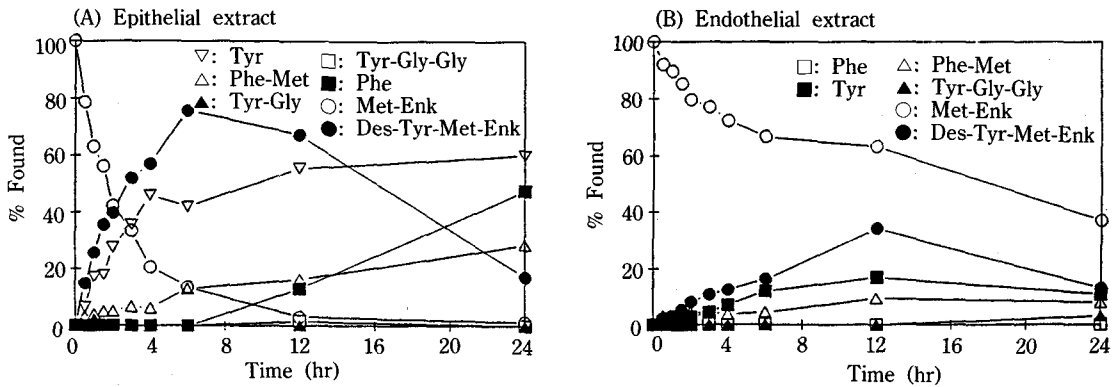


Figure 6—Time course for the degradation of Met-Enk and appearance of its metabolites in the corneal extract of rabbit at 37°C in the presence of enzyme inhibitor, 0.5 mM TM.

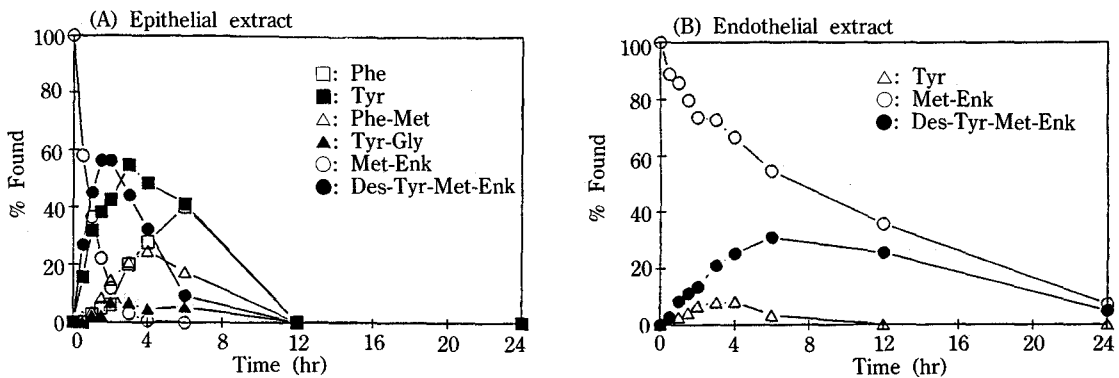


Figure 7—Time course for the degradation of Met-Enk and appearance of its metabolites in the corneal extract of rabbit at 37°C in the presence of enzyme inhibitor, 50  $\mu$ M TP.

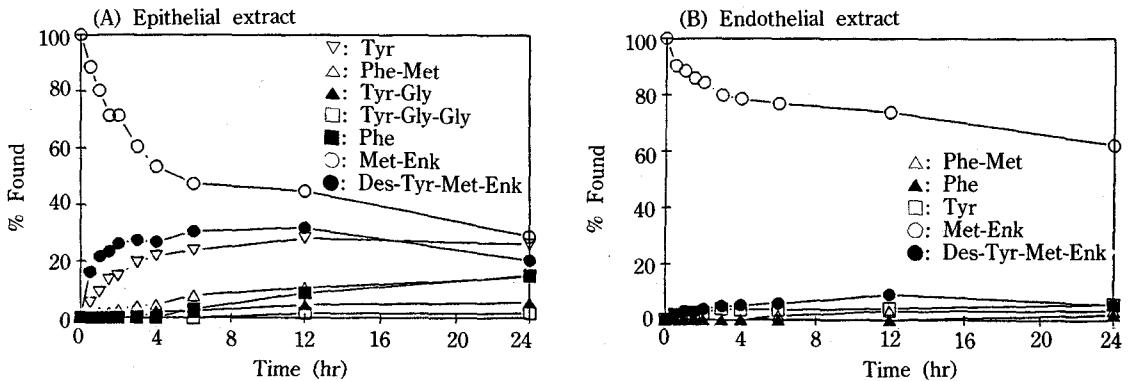


Figure 8—Time course for the degradation of Met-Enk and appearance of its metabolites in the corneal extract of rabbit at 37°C in the presence of enzyme inhibitor, 5 mM EDTA.

알려진 EDTA를 적용시킨 결과를 Fig. 8에 나타내었다. Fig. 8에서 보는 것처럼 위의 AM 및 TM을 적용한 것보다 Met-Enk의 분해가 현저히 억제된 것을 볼 수 있다.

혼합효소억제제의 분해억제효과—효소억제제 단독으로는 효과적인 억제효과를 나타낼 수 없으므로 이들 억제제를 2종 또는 3종을 병용 적용하여 그 억제효과를 살펴보았다. 먼저 Fig. 9는 AM과

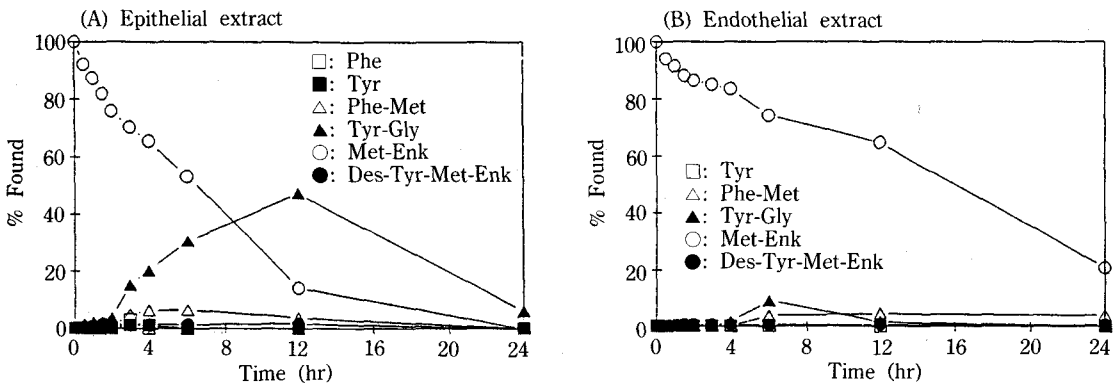


Figure 9—Time course for the degradation of Met-Enk and appearance of its metabolites in the corneal extract of rabbit at 37°C in the presence of enzyme inhibitor (50 μM AM/50 μM TP).

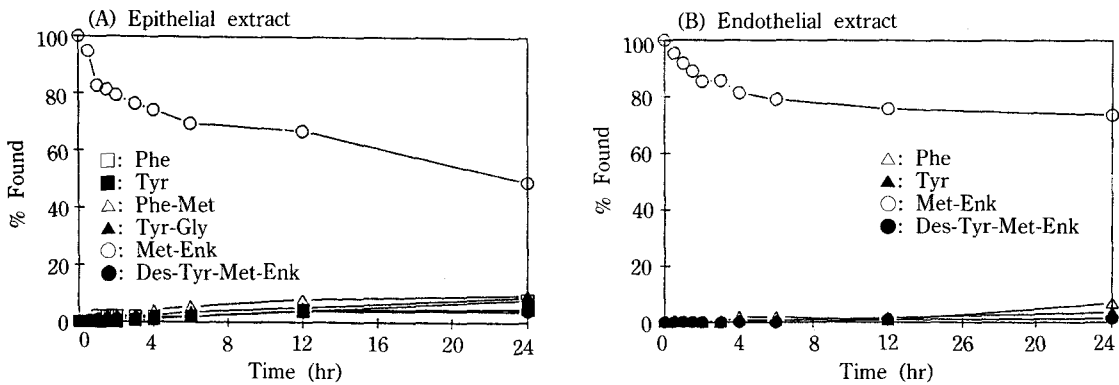


Figure 10—Time course for the degradation of Met-Enk and appearance of its metabolites in the corneal extract of rabbit at 37°C in the presence of enzyme inhibitor (50 μM AM/5 mM EDTA).

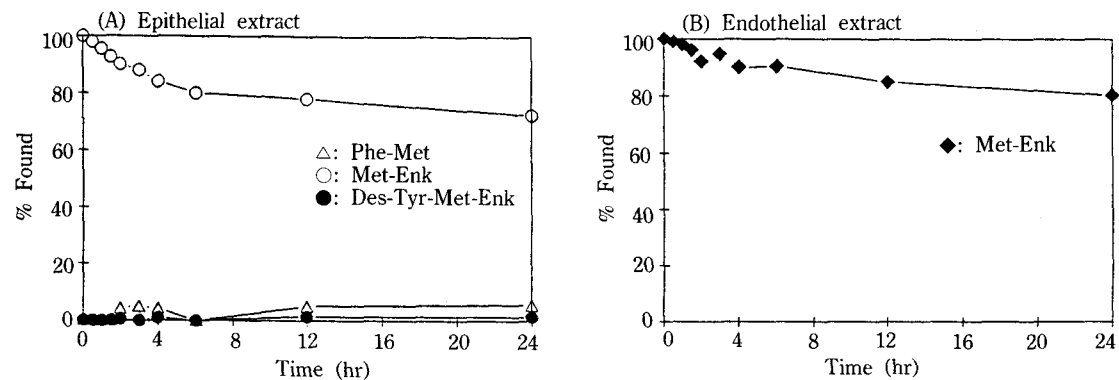


Figure 11—Time course for the degradation of Met-Enk and appearance of its metabolites in the corneal extract of rabbit at 37°C in the presence of enzyme inhibitor (50 μM AM/0.5 mM TM/5 mM EDTA).

TP를 병용 적용한 결과로서 AM을 단독 적용한 것과 거의 유사한 결과를 보여 주고 있다. 이 결과로 Fig. 7에서도 살펴보았지만 Met-Enk의 분해에 관여하는

안구각막의 효소 작용의 억제에는 TP는 유의성 있는 효과가 없는 것으로 추정할 수 있다. Fig. 10은 AM과 EDTA를 병용 적용한 것으로 AM 및 EDTA를 각각

단독 적용한 것에 비하여 현저한 억제효과를 나타내었다. 한편 AM, TM 및 EDTA 3종을 병용 적용한 결과를 Fig. 11에 나타내었으며, 이로부터 Met-Enk의 분해가 현저히 억제되어 24시간까지 약 70% 이상이 유지되는 것을 알 수 있었다. 이들 효소억제제를 단독 또는 2종, 3종 병용하여 나타난 결과를 1차분해속도식에 적용하여 그린 것이 Fig. 3이며, 그 결과는 Table I에 표시하였다. 이로부터 효소분해억제제, 즉 AM, TM 및 EDTA 3종을 병용 적용하였을 경우 Met-Enk의 분해속도는 효소억제제를 적용하지 않은 경우와 비교할 때 표피층의 경우 약 50배, 그리고 내피층의 경우에는 약 13배 정도로 현저한 분해억제효과를 나타내었다. 이러한 분해억제효과는 Scheme 1에서와 같이 이들 3종 억제제가 Met-Enk 또는 YAGFM의 분해에 관여하는 여러 종류의 효소활성을 동시에 억제하였기 때문으로 생각된다.

한편 Fig. 4 및 Table I에 나타낸 바와 같이 아미노펩티다제류에 저항성이 크도록 제조된 합성유사체인 YAGFM은 표피층 및 내피층 추출액 모두에서 효소적 분해에 대하여 대단히 안정한 결과를 나타내므로 효소억제제의 적용은 검토하지 않았다.

## 결 론

본 연구에서는 생체내에서 강력한 물핀양 진통효과를 나타내는 Met-Enk와 아미노펩티다제류에 저항성을 갖도록 제조된 합성유사체인 YAGFM을 사용하여 안구 각막을 통한 전신수송 체계를 검토하기 위한 선결과제로서 안구 각막에서의 안정성에 관하여 검토하였다. 안구 각막의 표피층 및 내피층의 추출액중에서 Met-Enk은 표피층에서는 현저히 빠른 속도로 분해되었으며, 내피층에서는 비교적 안정하였다. YAGFM의 경우에는 표피층 및 내피층 모두에서 상당한 안정성을 나타내었으며 두 물질 모두 효소적 분해반응은 1차분해속도식에 따라 분해되었다. 또한 효소적 분해에 의하여 생성되는 각 fragment들의 분석으로 안구 각막의 추출액중에는 아미노펩티다제류가 주로 존재하여 효소분해에 관여하는 것으로 밝혀졌다. 한편 효소억제제류가 안구 각막 추출액중에서의 효소분해억제에 미치는 영향을 검토한 결과 각각 단독으로 적용한 것보다 2종 또는

3종을 함께 적용한 경우에 분해억제효과가 현저하였으며, 아마스타틴, 치메로살 및 EDTA 3종을 함께 적용하였을 경우 표피층 추출액에서 24시간후 약 70% 이상의 Met-Enk를 잔존시켰다. 이상의 결과는 Met-Enk와 YAGFM의 안구각막 투과시험의 토대가 마련되었다고 생각된다.

## 감사의 말씀

이 연구는 1992년도 보건사회부 신약개발연구 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) V.H.L. Lee, Peptide and protein drug delivery, Marcel Dekker, New York (1991).
- 2) C.G. Gebeleinn and C.G. Carraher, Jr., Bioactive Polymeric Systems, Plenum Press, New York (1985).
- 3) J. Hughes, T.W. Smith, H.W. Kosterlitz, L.T. Fothergil, B.A. Morgan and H.R. Morries, Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, **158**, 295 (1975).
- 4) J.D. Belluzzi, N. Grant, V. Garsky, D. Sarantakis, C.V. Wise and L. Stein, Analgesia induced *in vivo* by central administration of enkephalin in rat. *Nature*, **260**, 625 (1976).
- 5) S.H. Snyder and S.R. Childer, Opiate receptors and Opiate peptides. *Ann. Rev. Neurosci.*, **2**, 35 (1979).
- 6) D.H. Coy, A.J. Kastin, A.V. Schally, O. Morin, N.G. Caron, F. Labrie, J.M. Walker, R. Fertel, G.G. Bertson and C.A. Sandman, Synthesis and opioid activities of stereoisomers and other D-amino acid analogs of methionine-enkephalin. *Life Sci.*, **73**, 632 (1976).
- 7) C.B. Pert, A. Pert, T.K. Chang and B.T.W. Fong, [D-Ala<sup>2</sup>]-met-enkephalinamide; A potent, long-lasting synthetic pentapeptide analgesic. *Science*, **194**, 330 (1976).
- 8) M. Schachter, Enkephalins and endorphins. *Brit. J. Hosp. Med.*, **25**, 128 (1981).
- 9) V.H.L. Lee, R.E. Stratford, L.W. Carson and S. Dodda-Kashi, Effect of ocular aminopepti-



- dases on ocular absorption of enkephalins, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., Suppl.*, **26**, 106 (1985).
- 10) 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 (1986).
  - 11) R.E. Stratford and V.H.L. Lee, Aminopeptidase activity in albino rabbit extraocular tissues relative to small intestine. *J. Pharm. Sci.*, **74**, 731 (1985).
  - 12) R.E. Jr. Stratford, L.W. Carson, S. Dodda-Kashi and V.H.L. Lee, Systemic absorption of ocularly administered enkephalinamide and its inulin in the albino rabbit; Extents, pathways and vehicle effects. *J. Pharm. Sci.*, **77**, 838 (1988).
  - 13) M. Altstein, S. Blumberg and Z. Vogel, Phosphoryl-Leu-Phe; A potent inhibitor of the degradation of enkephalin by enkephalinase. *Eur. J. Pharmacol.*, **76**, 200 (1982).
  - 14) B. Giros, C. Gros, B. Solhonne and J.C. Schwartz, Characterization of aminopeptidases responsible for inactivating endogenous (met 5) enkephalin in brain slices using peptidase inhibitors and anti-aminopeptidase M antibodies. *Mol. Pharmacol.*, **29**, 281 (1986).
  - 15) N. Marks, A. Glybaum and A. Neidle, On the degradation of enkephalins and endorphins by rat and mouse brain extracts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 1552 (1977).
  - 16) B.P. Rogues, M.C. Fournie-Zaluski, E. Soraca, J.M. Lecomte, B. Malfroy, C. Llorens and J.C. Schwartz, The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice. *Nature*, **288**, 286 (1980).
  - 17) C.H. Lee, K.J. Lee, I. Yun and Y.H. Shin, Studies on corneal penetration of *p*-hydroxybenzoic acid esters. *Arch. Pharm. Res.* **14**, 311 (1991).
  - 18) Z. Vogel and M. Altstein, The effect of puromycin on the biological activity of Leu-enkephalin. *FEBS Lett.* **98**, 44 (1979).
  - 19) W.H. Simmons and R.L. Ritzman, An inhibitors of opioid peptide degradation produces analgesia in mice. *Pharm. Biochem. Behav.*, **13**, 715 (1980).
  - 20) R.K. Barclay and M.A. Phillips, Inhibition of the enzymatic degradation of leu-enkephalin by puromycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 1119 (1978).
  - 21) R.K. Barclay and M.A. Phillips, Inhibition of the enzymatic degradation of leu-enkephalin by puromycin, *ibid.*, **96**, 1732 (1980).
  - 22) M.L. Cohen, L.E. Geary and K.S. Eiley, Enkephalin degradation in the guinea pig ileum; Effect of aminopeptidase inhibitors, puromycin and bestatin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **224**, 379 (1983).
  - 23) K. Aoki, M. Kajiwara and T. Oka, The role of bestatin-sensitive antipeptidase, angiotensin converting enzyme and thiorphan-sensitive enkephalinase in the potency of enkephalin in the guinea-pig ileum. *Jpn. J. Pharmacol.*, **36**, 59 (1984).
  - 24) K.S. Hui, M.P.P. Hui, N. Ling and Lajtha, Proctolin A potent inhibitor of aminoenkephalinase. *Life Sci.*, **36**, 2309 (1985).