

## 5-아미노살리실산의 결장표적성 프로드럭 : 5-아미노살리실-L-글루타민산과 5-아미노살리실-L-아스파틸산의 합성 및 성상

정연진 · 이정수 · 김학현 · 김영미\* · 김대덕 · 한석규  
부산대학교 약학대학

(Received October 17, 1997)

### Synthesis and Properties of 5-Aminosalicyl-L-Aspartic Acid and 5-Aminosalicyl-L-glutamic Acid as Colon-specific Prodrugs of 5-Aminosalicylic Acid

Yun Jin Jung, Jeoung Soo Lee, Hak Hyun Kim, Young Mi Kim\*  
Dae Duk Kim and Suk Kyu Han

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

**Abstract**—5-Aminosalicyl-L-aspartic acid (5-ASA-Asp) and 5-aminosalicyl-L-glutamic acid (5-ASA-Glu) were synthesized as new colon-specific prodrugs of 5-aminosalicylic acid (5-ASA), their apparent partition coefficients, and the extent of conversion in the homogenates of tissue and contents of various G. I. tract segments of rats were evaluated. These prodrugs were stable in the homogenate of tissue and contents of stomach, proximal small intestine (PSI) or distal small intestine (DSI). Release of 5-ASA from 5-ASA-Asp after incubation with the cecal and colonic contents for 8 hrs at 37°C was 18%, and 8%, respectively. No significant conversion of prodrug was observed in the cecal and colonic contents of rats pretreated with kanamycin sulfate, which indicated that microbial enzymes were responsible for the cleavage of these prodrugs.

**Keywords** □ 5-Aminosalicyl-L-aspartic acid, 5-Aminosalicyl-L-glutamic acid, Colon-specific prodrug, 5-aminosalicylic acid, Ulcerative colitis Crohn's disease, Inflammatory bowel disease.

結腸에 발생한 질환의 치료를 위하여 藥物을 病巢인 結腸에 선택적으로 送達함을 치료 효과를 높이고 전신적인 부작용을 줄이기 위하여 필수적이다.<sup>1)</sup> 궤양성 대장염(ulcerative colitis)과 크론씨병(Crohn's disease)으로 분류되는 염증성 대장염(inflammatory bowel disease: IBD)은, 난치이고 치료 후 재발 빈도가 높은 질병으로서 구미에서 주로 발병되는 질병으로 인식되어 왔으나, 1980년 말부터 아시아와 한국에서도 증가 추세에 있다. 현재까지 이들의 정확한 병인이 밝혀지지 않아 대증요법으로서 corticosteroids나 salicylates를 사용해 왔는데, corticosteroids는 상부소화관에서 吸收

되기 때문에 小腸 말단 또는 結腸에 藥物이 잘 도달하지 못하며, 궤양성 大腸炎의 공격요법(attack therapy)에 다량 투여하면 유효하지만, 장기적으로 다량을 투여한다면 골다공증, 고혈압, 부종, 면역성 저하, 당뇨 등의 심각한 부작용으로 재발방지를 위한 유지요법에는 효과적이지 못하다.<sup>2,3)</sup> 장기 유지요법에 사용되고 있는 5-ASA는 상부 소화관에서 吸收되거나 대사 불활성화 되기 때문에 환부인 小腸 말단 또는 結腸에 藥物이 잘 도달하지 못하며, 흡수된 5-ASA는 腎중후균을 일으키는 것으로 알려져 있으므로<sup>2,4)</sup> 그 자체로는 IBD 치료에 적합하지 못하다. 따라서 5-ASA의 azo prodrug인 sulfasalazine, olsalazine 등이 개발되어 사용되고 있는데, 이 藥物들은 胃나 小腸을 그대로 통과한 후 大腸 內의 微生物에 의해 azo 결합이 환원되어 5-ASA가 유리되어 작용하는

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 051-510-2807 (팩스) 051-513-6753

것으로 알려져 있다.<sup>5)</sup> 최근에는 5-ASA의 고분자 pro-drug<sup>6,7)</sup>, brush-border-enzyme-mediated amino acid prodrugs<sup>8)</sup> 또는 glycoside 유도체<sup>9)</sup>가 개발되어 보고된 바 있다.

방향족 카르복실산의 아마이드결합은 상부소화관의 효소에 안정한 것으로 보고되어 있고<sup>10)</sup> 담즙산의 glycine 및 taurine conjugate는 대장의 미생물에 의하여 분해된 후 재흡수되는 腸·肝 순환을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>11)</sup> 이러한 점을 고려하면, 방향족 카르복실기를 가진 약물인 5-ASA를 친수성 아미노산의 아미노기와 아마이드 유도체로 하면 화합물이 친수성을 띠게 되어 상부소화관에서는 흡수가 억제될 것으로 예상되며, 아마이드결합은 대장에서 미생물의 작용으로 분해되어 약물이 유리될 것으로 생각된다. 본 연구에서는 이러한 점에 착안하여 5-ASA의 새로운 結腸標的性-prodrug의 개발을 목적으로 5-aminosalicyl-L-aspartic acid(5-ASA-Asp)와 5-aminosalicyl-L-glutamic acid(5-ASA-Glu)를 합성하고 이들의 결합표적성을 조사하고자 한다.

## 실험방법

### 시약 및 기기

5-Nitrosalicylic acid(5-NSA), 5-aminosalicylic acid(5-ASA), *N, N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 10% Pd/C, benzyl chloroformate, L-glutamic acid dimethyl ester, L-aspartic acid dimethyl ester 및 kanamycin sulfate는 Sigma 제품을, thionyl chloride, NMR 용매 및 HPLC용 시약은 Merck 제품을, 무수초산, 용매 및 기타 시약은 특급을 사용하였다.

NMR spectra는 Brucker사의 AC-200 FT-NMR spectrometer를, IR spectra는 Bomem사의 MB100 FT-IR spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. 약물의 정량 및 분석은 Gilson사의 HPLC로 하였다. pH는 Orion 320 pH meter로 측정하였고, 용점은 Mel Tem II 용점측정장치를 사용하여 측정하였으며, 이에 대한 보정은 하지 않았다. 접촉환원반응은 Parr 4562 pressure reactor를 사용하였다. 쥐의 위·장관 조직의 homogenation은 Eyla Mazela-Z tissue homogenizer를 사용하였고, 시료의 원심분리는 Han-il의 Supra K-22 centrifuge를 사용하였다. TLC는

Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, RP-8 F<sub>254s</sub>를 사용하였다. Silica gel open column은 silica gel 70~230 mesh와 230~400 mesh를 사용하였고, 분취용 C<sub>8</sub> column은 Lichroprep RP-8 size B를 사용하였다.

### 완충액의 조제

**완충액 A** - 등장성 초산완충액은 0.15 M sod. acetate 용액과 0.3 M acetic acid 용액을 pH 4.5가 되도록 혼합하여 조제하였다.

**완충액 B** - 등장성 인산완충액은 0.1 M sod. phosphate dibasic 용액과 0.15 M sod. phosphate monobasic 용액을 pH 6.8이 되도록 혼합하여 조제하였다.

**완충액 C** - 5.0 mM 인산 완충액은 5 mM sod. phosphate dibasic 용액과 phosphoric acid를 pH 6.0이 되도록 혼합하여 조제하였다.

### HPLC의 구성 및 조건

HPLC는 2 pump system(model 305, 306), variable UV detector(model 117), autoinjector(model 234), manometric module(model 805), dynamic mixer(model 811C)로 구성된 Gilson사의 제품을 사용하였다. Column은 Gilson사의 Synchropac ODS(250×4.6, 5 μm)를 사용하였고, 약물은 254 nm, AUFS 0.01에서 검출하였으며, 자료의 처리는 Gilson사의 712 software로 하였다. 이동상은 0.5 mM tetrabutylammonium chloride가 포함된 완충액 C의 10% MeOH 용액을 0.45 μm membrane filter로 여과하여 사용하였고, 유속은 1.5 ml/min으로 2000 psi 정도의 압력에서 사용하였다.

### 표준액의 조제

5-ASA 또는 *N*-acetyl-5-ASA의 표준액은 5-ASA 또는 *N*-acetyl-5-ASA를 250 μg/ml가 되도록 MeOH에 녹여 원 용액으로 하고 이것을 50 μg/ml 되도록 MeOH로 희석하여 working 용액으로 사용하였다. 맹장·결장 내용물, 위·PSI·DSI 조직과 내용물을 10% (w/v) 되도록 완충액 B로 희석하여 그 100 μl에 working 용액 10 μl, 50 μl, 100 μl, 200 μl를 각각 넣고 MeOH을 가해 1 ml가 되게 하였다.

5-ASA-Asp와 5-ASA-Glu의 표준액은 완충액 B에 각각의 prodrug을 250 μg/ml가 되도록 녹이고 증류수로 희석하여 50 μg/ml로 하고, 이 용액 10 μl, 50 μl,

100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l를 각각 microtube에 담고 이것을 centrifugal evaporation한 후, 맹장·결장 내용물, 위·PSI·DSI 조직과 내용물을 10%(w/v) 되도록 완충액 B로 희석하여 100  $\mu$ l씩을 위의 microtube들에 가하고 MeOH을 가해 1 ml가 되게 조제하였다.

### 검량선의 작성 및 약물의 정량

앞에서 조제한 표준액(0.5  $\mu$ g/ml~10  $\mu$ g/ml)과 공시료를 2분간 교반하고 10,000 $\times$ g로 5분간 원심분리한 후 상등액을 0.45  $\mu$ m filter를 통과시키고 20  $\mu$ l를 column에 주입하였다. 표준액의 peak 면적과 농도로 부터 검량선을 작성하였다. 표준액과 동일한 방법으로 조제한 시료액 중의 약물의 농도를 검량선을 이용하여 계산하였다.

### 5-[N-(Benzyloxycarbonyl)amino]salicylic acid(2)의 합성

5-ASA(1, 15 g, 100 mmole)을 고체 NaHCO<sub>3</sub> 5 g을 포함한 포화 NaHCO<sub>3</sub> 용액 250 ml에 현탁시키고 benzyl chloroformate(18.5 g, 110 mmole)을 사용하여 20분에 걸쳐서 적가하고 0°C에서 5시간 동안 기계 교반장치로 교반하였다. 생성된 침전을 여과하고 Et<sub>2</sub>O 25 ml로 3회 세척한 여액과 같이 3N HCl로 산성으로 한 후 여과하여 총 26 g(수득률 90%)의 화합물 2를 얻었다. mp 224~225°C: <sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 5.17(s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 7.00~8.05(m, 8H, ArH), 9.80(s, 1H, COOH).

### 5-[N-(Benzyloxycarbonyl)amino]-2-acetoxysalicylic acid(3)의 합성

화합물(2, 10 g, 35 mmole)을 초산 52 ml에 현탁시키고 무수초산(6.7 g, 60 mmole)과 pyridine 0.3 ml를 가한 후 실온에서 24시간 반응시키고 생성되는 침전 9.5 g(수득률 83%)을 실온에서 진공건조하여 화합물 3을 얻었다. mp 202~204°C, <sup>1</sup>H NMR(MeOH-d<sub>4</sub>)  $\delta$ : 2.15(s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 5.10(s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 6.90~8.00(m, 8H, ArH).

### 5-[N-(Benzyloxycarbonyl)amino]-2-acetoxysalicylchloride(4)의 합성

화합물(3, 10 g, 30 mmole)을 benzene 40 ml에 현탁시키고 SOCl<sub>2</sub>(7.5 g, 60 mmole)을 가하고 pyrid-

ine 0.3 ml를 가한 후 3시간 동안 질소 하에서 환류 반응시켰다. 냉각 후 생성된 침전을 여과하여 benzene으로 용출시키고 용매를 제거한 후 실온에서 진공건조하여 4.2 g(수득률 41%)의 화합물 4를 얻었다.

### 5-Aminosalicyl-L-glutamic acid(10, 5-ASA-Glu)의 합성

L-Glutamic acid dimethyl ester 염산염(10 g, 47.4 mmole)을 MeOH에 녹인 용액에 triethylamine(11 g, 108.6 mmole)을 서서히 가하고 0°C에서 2시간 반응시킨 후 여과하고 여액을 감압 농축하여 기름상의 L-glutamic acid dimethyl ester를 얻었다. 여기에 화합물(4, 14.3 g, 47.4 mmole)를 사염화탄소에 용해시킨 액을 가하고 질소 하에서 12시간 환류 반응시킨 후 냉각하여 생긴 침전을 여과하고 그 잔사를 소량의 Et<sub>2</sub>O로 TLC에서 한 점이 될 때까지 세척하여 5-benzyloxycarbonylamino-2-acetoxysalicyl-L-glutamic acid dimethyl ester(6, mp 102~105°C)를 얻고 10% Pd/C로 50 psi 수소 하에서 환원시켜 5-amino-2-acetoxysalicyl-L-glutamic acid dimethyl ester를 얻었다. 이것을 1N NaOH(반응물의 10당량)를 가하여 질소 하에서 5시간동안 실온에서 반응시킨 후 3N HCl로 pH 4~5로 조정후 prepaced C<sub>8</sub> column으로 용출용매를 몰로 하여 화합물 10을 얻었다.

### 5-Aminosalicyl-L-aspartic acid(11, 5-ASA-Asp)의 합성

화합물 10의 합성방법에 준하여 5-amino-2-acetoxysalicyl-L-aspartic acid dimethyl ester(5, mp 97~100°C)를 얻고 가수분해하여 화합물 11을 합성하였다.

### 5-Nitrosalicyl-L-glutamic acid dimethyl ester(8)의 합성

5-Nitrosalicylic acid(7, 5 g, 27.3 mmole)를 무수 EtOAc 170 ml에 녹인 용액에 DCC(6.2 g, 30.0 mmole)를 소량씩 가하고 0°C에서 1시간 교반하여 활성화시킨 후 L-glutamic acid dimethyl ester(4.75 g, 27.3 mmole)를 가하여 0°C에서 3시간 교반하고 실온에서 72시간 반응시킨 후 여과하였다. 여액을 감압 농축하여 얻은 기름상의 잔류물을 NaHCO<sub>3</sub> 포화 수용액으로 세척하고, 그 세척액을 3N HCl을 가하여 산성으로 한 다음 EtOAc로 추출하여 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 탈수시키고 용

매를 증발제거하여 얻은 잔류물을 chloroform/MeOH (100/1.5)를 용출용매로 하여 silica gel open column에서 정제하여 화합물 **8**을 4.9 g(수율 53%) 얻었다.

#### 5-Nitrosalicyl-L-aspartic acid dimethyl ester(**9**)의 합성

화합물 **8**의 합성방법에 준하여 합성하여 5.1 g(수율 58%)를 얻었다.

#### 5-Aminosalicyl-L-glutamic acid(**10**, 5-ASA-Glu)

MeOH 20 ml에 녹인 화합물(**9**, 1 g, 2.95 mmole)에 10% Pd/C 200 mg을 가하고 50 psi 수소와 고압 반응조에서 1시간 반응 후 MeOH을 제거하고, 1N NaOH 30 ml를 가하여 실온, 질소 하에서 5시간 반응시킨 후 3N HCl로 pH 4~5 조정하고 물을 제거한 후 분취용 prepacked C<sub>8</sub> column으로 용출용매를 물로 하여 화합물 **10**을 0.52 g(수율 63%)을 얻었다.

#### 5-Aminosalicyl-L-aspartic acid(**11**, 5-ASA-Asp)의 합성

화합물 **10**의 합성방법에 준하여 합성하여 0.58 g(수율 70%)을 얻었다.

#### N-Acetyl-5-aminosalicylic acid의 합성

화합물(**1**, 3 g)에 무수 초산 5 g, 초산 10 ml를 가하고 10분 동안 환류 반응시키고 반응액을 냉증류수 30 ml에 섞어 방치하여 생긴 침전을 여과하고 이 침전 1 g에 1N NaOH 20 ml를 넣고 실온에서 1시간 가수분해시킨 후 3N HCl로 산성화하고 EtOAc로 추출하여 N-acetyl-5-ASA를 얻었다. mp 222~225°C, IR(nujol) cm<sup>-1</sup>: 1630(C=O).

#### 겔보기 분배계수의 측정

5-ASA(155 µg/ml), 5-ASA-Asp 및 5-ASA-Glu(5-ASA로서 155 µg/ml)를 녹인 완충액 B 10 ml에 동일 완충액으로 미리 포화시킨 chloroform 10 ml를 가하여 37°C에서 진탕하면서 24시간 방치시킨 후 수층에 남아있는 conjugate의 양을 HPLC로 측정하였다. 겔보기 분배계수는(C<sub>0</sub>-C<sub>w</sub>)/C<sub>w</sub>의 식을 적용하여 계산하였다(C<sub>0</sub>, C<sub>w</sub>는 각각 수층에서의 초기와 평형에서의 약물의 농도). n-Octanol을 유기상으로 한 겔보기 분배계수를 같은 방법으로 측정하였다.

#### 쥐의 위, 소장상부(PSI) 및 소장하부(DSI) 조직과 내용물 homogenate에 의해 5-ASA-amino acid conjugate로부터 유리되는 5-ASA의 측정

雄性 Sprague-Dawley rat를 Et<sub>2</sub>O로 마취하여 개복한 후 위 조직과 내용물은 완충액 A로 두배 희석하여 homogenation 시키고, PSI 및 DSI 조직과 내용물은 완충액 B로 두배 희석하여 homogenation시킨 후 0.2 g씩 평량하여 microtube에 넣고 여기에 5-ASA로서 140 µg/0.8 ml가 되도록 완충액 B에 녹인 5-ASA-Asp 및 5-ASA-Glu의 용액 0.8 ml씩을 가하여 6시간 동안 37°C에서 배양하였다. 그 후 적절한 시간 간격에서 시료를 5,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 얻은 상등액 0.1 ml에 methanol 0.9 ml를 가하여 2분간 교반하고 10,000×g에서 5분간 원심분리하여 상등액 20 µl를 취하여 유리된 약물의 양을 HPLC로 분석하였다.

#### 쥐의 맹장 및 결장 내용물에 의해 5-ASA-amino acid conjugate로부터 유리되는 5-ASA의 측정

雄性 Sprague-Dawley rat를 Et<sub>2</sub>O로 마취하여 개복한 후 맹장 및 결장 부위의 양쪽을 봉합사로 묶고 그 바깥 쪽을 절단한 후 질소로 치환되어 있는 장치 내에서 절개하고, 그 내용물을 0.1 g씩 평량하여 microtube에 넣고 여기에 5-ASA로서 140 µg/0.9 ml가 되도록 완충액 B에 녹인 5-ASA-Asp와 5-ASA-Glu의 용액 0.9 ml씩을 가하여 6시간 동안 37°C에서 배양하였다. 그 후 적절한 시간 간격에서 시료를 5,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 얻은 상등액 0.1 ml에 MeOH 0.9 ml를 가하여 2분간 교반하고 10,000×g에서 5분간 원심분리하여 상등액 20 µl를 취하여 유리된 5-ASA의 양을 HPLC로 분석하였다.

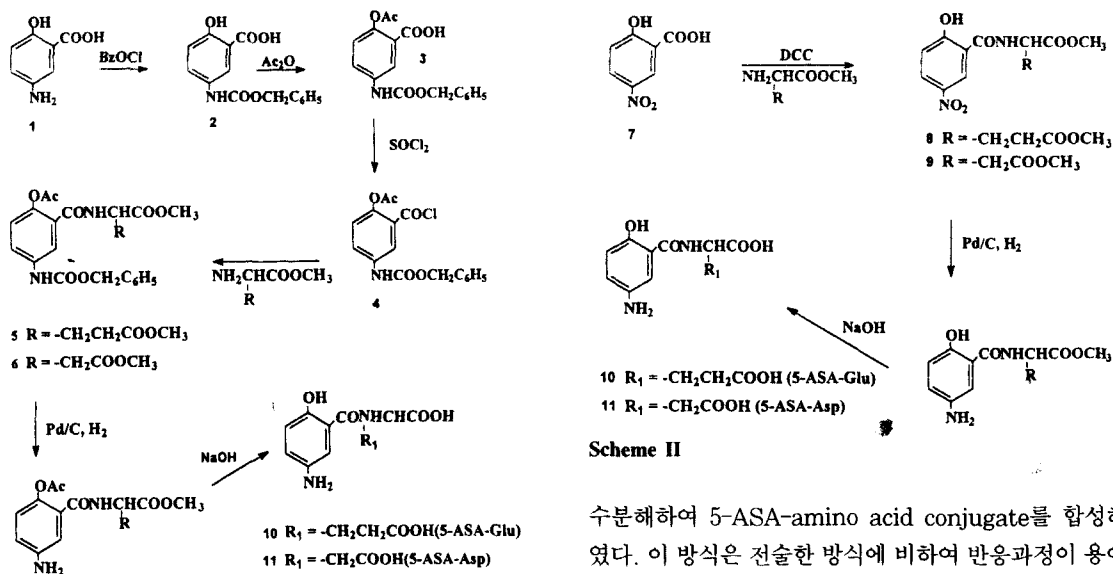
#### Kanamycin sulfate로 전처리한 쥐의 맹장 및 결장 내용물에 의해 5-ASA-amino acid conjugate로부터 유리되는 5-ASA의 측정

Kanamycin sulfate(5×200 mg/rat)를 쥐에 2일 동안 하루 2회 그리고 실험을 하기 4시간 전에 경구투여하고<sup>12, 2)</sup>의 실험과 같이 조작하였다.

#### 결과 및 고찰

##### Amino acid prodrug의 합성

Amino acid prodrug의 합성과정은 Scheme I에 나



Scheme I—

타낸 바와 같이 화합물 1을 출발물질로 하여 화합물 1의 아미노기를 benzyloxycarbonyl기로, phenolic OH를 acetyl기로 보호하여 화합물 3을 얻고 이것의 acid chloride(4)를 amino acid methyl ester와 작용시켜 아마이드로 하고, 10% Pd/C과 수소를 사용하여 benzyloxycarbonyl기를 제거하고 가수분해하여 5-ASA-amino acid conjugate를 합성하였다. 이 방법은 화합물 4의 합성과정과 환원에 의한 benzyloxycarbonyl기의 탈보호 과정에서 부산물이 많고 수득률이 낮았다. Scheme II에는 화합물 7을 출발물질로 하여 amino acid methyl ester와 작용시켜 아마이드로 하고, 10% Pd/C과 수소를 사용하여 nitro기를 환원하고 가

수분해하여 5-ASA-amino acid conjugate를 합성하였다. 이 방식은 전술한 방식에 비하여 반응과정이 용이하고 수득률이 향상되었다. 생성물의 physical data를 Table I에 나타내었다. NMR 용매는 5-NSA-amino acid methyl ester amide는  $\text{CDCl}_3$ 를 사용하였고 5-ASA-amino acid amide는  $\text{DMSO-d}_6$ 를 사용하였다.

#### Amino acid prodrug의 겔보기 분배계수

5-ASA, 5-ASA-Asp 및 ASA-Glu의 분배계수를  $37^\circ\text{C}$ 에서 chloroform/완충액 B와 *n*-octanol/완충액 B를 용매계로 하여 측정한 결과와 이들의 HPLC retention time(이동상: tetrabutylammonium chloride 0.5 mM을 포함한 MeOH/완충액 C(1/9)용액, 유속: 1.5 ml/min, column: Synchropak ODS ( $4.5 \times 250, 5 \mu\text{m}$ ))을 Table II에 나타내었다. 5-ASA에 비하여 5-ASA-amino acid prodrug의 겔보기 분

**Table I**—Physical data of amino acid methyl ester of 5-nitrosalicylic acid (5-NSA) and amino acid of 5-Aminosalicilic acid (5-ASA)

Data	Sample	Compd. 8	Compd. 10	Compd. 9	Compd. 11
IR (nujol): $\text{cm}^{-1}$	Carbonyl:		Carbonyl:	Carbonyl:	Carbonyl:
	Amide: 1650 Ester: 1745, 1717		Amide: 1640 Acid: 1731	Amide: 1640 Ester: 1749, 1725	Amide: 1640 Acid: 1690
NMR ( $\delta$ )	2.2 (m, 2H):	2.1 (m, 2H):	2.9~3.2 (2H):	2.8 (d, 2H):	
	2.5 (t, 2H):	2.3 (t, 2H):	3.7 (s, 3H):	4.7 (q, 1H):	
	3.7 (s, 3H):	4.4 (m, 1H):	3.8 (s, 3H):	6.0~7.2	
	3.8 (s, 3H):	6.6~7.5	5.0 (m, 1H):	(m, 3H)	
	4.7 (q, 1H):	(m, 3H)	7.0~8.8		
	7.0~8.5 (m, 3H)		(m, 3H)		
mp ( $^\circ\text{C}$ )	75~77	230~232	149~150	260 (decomp.)	

**Table II**—Partition coefficients (PC) and retention time (HPLC) of 5-ASA-amino acid conjugates

Sample	5-ASA-Glu	5-ASA-Asp	5-ASA
PC-1 <sup>a</sup>	0.045	0.23	1.85
PC-2 <sup>b</sup>	<0.001	0.51	1.30
Retention time (sec.) <sup>c</sup>	470	360	285

<sup>a</sup> Values were determined at 37°C. Solvent system: CHCl<sub>3</sub>/isotonic phosphate buffer (pH 6.8).

<sup>b</sup> Values were determined at 37°C. Solvent system: *n*-octanol/isotonic phosphate buffer (pH 6.8).

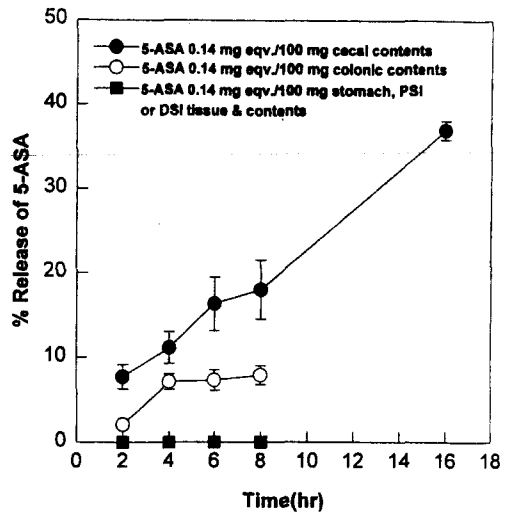
<sup>c</sup> Mobile phase: Methanol/5 mM, pH 6 phosphate buffer (1/9) solution with 0.5 mM tetrabutylammonium chloride. Flow rate: 1.5 ml/min. Column: Synchronpak ODS (4.5×250, 5 μm).

배계수가 낮은 것은 결합된 아미노산의 극성이 크기 때문일 것으로 생각되지만 구조상 methylene기 한 개의 차이가 있는 aspartic acid와 glutamic acid의 겉보기 분배계수가 크게 다른 것은 분자내 수소결합 등의 구조적 변화가 있음을 시사하고 있다. 5-ASA-amino acid prodrug들이 5-ASA에 비하여 겉보기 분배계수가 낮으므로 이들의 장관에서의 흡수는 5-ASA 보다 낮을 것으로 예상된다.

**Amino acid prodrug의 활성화**

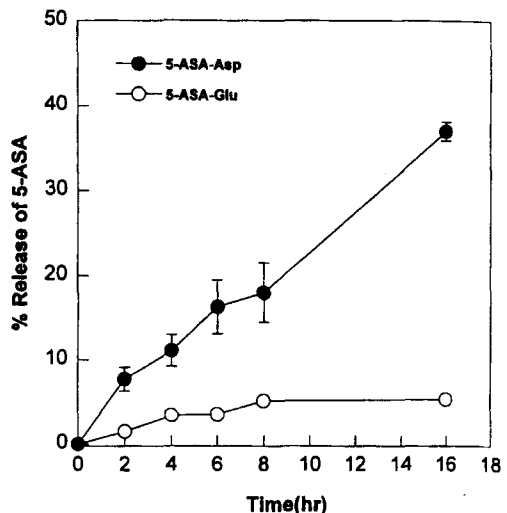
5-ASA-Asp를 쥐의 위·장관 부위별 내용물과 37°C에서 배양했을 때, 시간에 따라서 5-ASA가 유리되는 정도를 Fig. 1에 나타내었다. 맹장 내용물과 8시간 배양했을 때 5-ASA가 약 20% 정도 유리되었고, 16시간 경과했을 때 약 37% 정도가 유리되었다. 결장에서는 8시간 경과했을 때 약 8%가 유리되어 미생물의 수가 높고, 사람의 결장과 유사한 환경을 가진 쥐의 맹장에서 약물의 활성화가 높게 나타났다. PSI, DSI의 장 점막에는 peptidase가 많이 분포하고 있는 것으로 알려져 있으므로 조직과 내용물의 homogenate를 함께 사용하였으나 5-ASA가 전혀 유리되지 않았고, 위의 조직과 내용물의 homogenate를 사용한 경우도 같은 결과를 나타내어, 상부소화관에서는 prodrug이 안정한 것으로 나타났다.

Fig. 2에는 5-ASA-Asp 및 5-ASA-Glu를 맹장 내용물과 37°C에서 배양했을 때 시간에 따라서 5-ASA가 유리되는 정도를 비교하여 나타내었으며, 맹장 내용물에서 5-ASA-Asp ≫ 5-ASA-Glu의 순으로 나타났다. 이러한 결과는 분해효소의 기질특이성 때문이라고 추정되지만 정확한 이유에 대해서는 향후 더 많은 연구가



**Fig. 1**—Release of 5-ASA in contents of 1.0 ml of ten-fold dilution in isotonic phosphate buffer (pH6.8) of cecum (w/v), colon (w/v), tissue homogenate and contents of stomach (w/v), PSI (w/v) and DSI (w/v) during incubation of 5-ASA-Asp (140 μg equiv. of 5-ASA). Data are mean±S.E.(n=5).

필요하리라 생각된다. Kanamycin sulfate로 전처리한 실험동물의 맹장 및 결장 내용물에서는 prodrug의 활성화가 거의 관찰되지 않았는데(5-ASA농도가 0.1 μg/ml 이하) 이는 prodrug의 활성화가 대장내 미생물의 효소에 기인됨을 보여준다.



**Fig. 2**—Release of 5-ASA in contents of 1.0 ml of ten-fold dilution in isotonic phosphate buffer (pH 6.8) of cecum (w/v) during incubation of 5-ASA-Asp and 5-ASA-Glu (140 μg equiv. of 5-ASA). Data are mean±S.E.(n=5).

요약하면, 5-ASA-Asp와 5-ASA-Glu는 *in vitro* 실험결과 상부소화관에서는 안정하고, 대장에서 미생물에 의해 분해되어 5-ASA가 유리되지만, 아미노산의 종류에 따라서 그 정도가 크게 좌우되는 것으로 나타나므로, 본 연구실에서는 아미노산의 종류를 달리한 pro-drug들의 합성과 결장표적성에 관한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 진행 중에 있다.

### 감사의 말씀

이 연구는 학술진흥재단 신진연구 장려금 지원에 의한 결과이며 이에 감사드립니다.

### 문헌

- 1) Mcleod, A. D. and Tozer, N. T. : Kinetic perspectives in colonic drug delivery, in *Oral Colon Specific Drug Delivery*, Friend, D.R., Ed., CRC press, Boca Raton, FL., 85 (1992).
- 2) Crotty, B. and Jewel, J. P. : Drug therapy of ulcerative colitis, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **34**, 189 (1992).
- 3) Danel K., Podolsky, M. D. : Inflammatory bowel disease, *The new England J. Med.* **325(13)**, 928, 1008 (1991).
- 4) Novis, B. H., Korzets, J. : Chen, P. and Bernheim, J., Nephrotic syndrome after treatment with 5-aminosalicylic acid, *Br. Med. J.* **296**, 1442 (1988).
- 5) Ryde, E. M. : Low-molecular-weight azo compounds, in *Oral Colon Specific Drug Delivery*, Friend, D.R., Ed., CRC press, Boca Raton, FL., 143 (1992).
- 6) Brown, J. P., McGarraugh, G. V., Parkinson, T. M., Wingard, R. E., Onderdonk, A. B. : A polymeric drug for treatment of inflammatory bowel disease, *J. Med. Chem.* **26**, 1300 (1983).
- 7) Kopeckova, P. and Kopecek, J. : Release of 5-aminosalicylic acid from bioadhesive N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers by azoreductases in vitro, *Makromol. Chem.* **191**, 2037 (1990).
- 8) Pellicciari, R., Garzon-Aburbbeh A., Nathalini, B. and Marinozzi, M. : Brush-border-enzyme-mediated intestine-specific drug delivery. Amino acid prodrugs of 5-aminosalicylic acid, *J. Med. Chem.* **36**, 4201 (1993).
- 9) Istran, C., Gabor, S. and Ferene, S. : Glycosides of 5-Aminosalicylic acid, *Magy Kem. FOLY.*, **97**, 143 (1991).
- 10) Nakamura, J., Asai, K., Nishida, K. and Sasaki, H. : A novel prodrug of salicylic acid, salicylic acid-glutamic acid conjugate utilizing hydrolysis in rabbit intestinal microorganisms, *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 2164 (1992).
- 11) Martin C. Carey and Michael J. Cahalane, Enterohepatic circulation in *The Liver, Biology and Pathobiology*, 2nd ed., Irwin M. Arias, Hans Popper, David Schachter, and David, A. Shafritz Eds., Raven press, New York, (1988), chap. 33.
- 12) Yamaguchi, T., Sasaki, K., Nakayama, T., and Kimura, T. : Biopharmaceutical evaluation of salicylazosulfanilic acid as a novel colon-targeted prodrug of 5-aminosalicylic acid, **2**, 123 (1994).