

5-아미노살리실산의 結腸標的性 프로드럭 : 덱스트란-5-(4-에톡시카르보닐페닐아조)살리실산 에스테르

정연진 · 이정수 · 김윤택 · 김영미* · 김대덕 · 한석규
부산대학교 약학대학

(Received October 17, 1997)

Dextran-5-(4-ethoxycarbonylphenylazo)salicylic Acid Ester as a Colon-specific Prodrug of 5-Aminosalicylic Acid

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

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

Abstract—Dextran-5-(4-ethoxycarbonylphenylazo)salicylic acid ester (Dextran-5-ESA) was synthesized as a potential colon-specific prodrug of 5-aminosalicylic acid (5-ASA). No free 5-(4-ethoxycarbonylphenylazo) salicylic acid (5-ESA) was detected when the chemical stability of dextran-5-ESA was tested at pH 1.2, or pH 6.8 bath solution. Effects of the degree of substitution (DS) and molecular weight of dextran on the depolymerization by dextranase was investigated. Depolymerization (%) decreased with increasing DS, and was not affected by M.W. of dextran. The extent of prodrug conversion after incubation in the contents of various G.I. tract segments of rats was evaluated. 5-ASA was released in the cecal contents, but not in the contents of proximal small intestine (PSI) or distal small intestine (DSI). No significant prodrug conversion was observed in the cecal contents of rats pretreated with kanamycin sulfate, which indicated that microbial enzymes were responsible for the cleavage of the prodrug.

Keywords □ Colon-specific delivery, 5-aminosalicylic acid prodrug, dextran, inflammatory bowel disease.

結腸에 선택적으로 藥物을 送達하고자 하는 연구가 최근 많은 연구자들에 의해 활발하게 진행되고 있다. 경구 투여한 藥物을 선택적으로 結腸에 送達하고자 하는 목적은 크게 두 가지로 구분된다. 첫째, 藥物의 작용 부위가 結腸인 경우(結腸내에 발생한 질환, 예컨대 Crohn's disease, 궤양성 結腸炎, 과민성 腸증후군, 結腸癌 등), 病巢인 結腸에 藥物을 선택적으로 送達 함으로서 전신적인 부작용을 줄이고 치료 효과를 높이기 위함이다.¹⁾ 둘째, 結腸이 藥物의 吸收 부위인 의약품을 개발하고자 하는 경우이다. 이러한 경우는 小腸에서 吸收가 여의치 못한 藥物의 吸收를 結腸에서 일어나도록 하

는 경우와 경구투여한 藥物의 吸收 시간대를 지연시킬 필요가 있는 경우를 들 수 있다.^{2,3)} 경구 투여된 藥物의 대사는 腸 粘膜의 효소와 腸內 微生物의 효소에 의해 일어난다. 사람의 GI tract는 호기성 및 혐기성 微生物들이 복잡한 ecosystem을 이루고있어서 영양물질이나 藥物의 대사에 중요한 역할을 하고 있다.⁴⁾ 大腸의 가장 독특한 특성은 微生物 함량이 매우 높다는 점이며(大腸 내용물의 약 30% 정도), 小腸에서 소화되지 않는 여러 종류의 기질들이 bacteria에 의해서 대사된다. 大腸내의 bacteria 群은 세포기능을 위한 에너지원으로서 小腸에서 소화되지 않는 여러 유형의 기질을 이용하는데, 내인성 mucopolysaccharide 이외에도 소위 식이성 섬유로 알려진 cellulose, hemicellulose, pectin 그리고 dextran같은 nonstarch polysaccharide들이 대표적

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

인 물질이다.⁵⁾ 이들은 보통 소화효소의 작용을 받지 않지만 結腸 內의 微生物들에 의해 분해 될 수 있기 때문에 고분자성 colon-specific drug carrier로 활용할 수 있다.⁶⁻⁸⁾

Nonstarch polysaccharide인 dextran은 약간의 α -1,3-결합의 分枝가 있는 α -1,6-glucopyranose 결합으로 이루어진 직선형 polysaccharide로서 독성, 면역성이 없고 생체적합성이 뛰어나서 혈장확장제로서 널리 사용되어 왔으며, 비경구용 고분자 藥物送達體로서 연구되었다.⁹⁾ Dextran 분해 효소인 dextranase는 結腸 內에서 살고 있는 bacteriodes에 의해서 생산되며 이들의 造成이나 효소 활성은 개체 間 또는 개체 內의 차이가 적은 것으로 알려져 있다.^{6,9)} 이러한 특성은 colon-specific drug delivery system으로서 매우 중요한 성질이라 하겠다. Dextran prodrug는 matrix의 입체장애로 인해서 상부 소화관에서는 결합된 藥物이 가수분해되지 않고 bacterial count가 높은 空腸이나 結腸에서 dextranase에 의해 dextran matrix가 먼저 빠른 속도로 분해되어 분자 크기가 작아진 후 藥物이 가수분해되어 유리되는 것으로 알려져 있다.^{6,9,10)}

5-Aminosalicylic acid는 Crohn's disease 같은 염증성 腸질환 치료에 유효 하지만 상부 소화관에서 吸收되거나 대사 불활성화 되기 때문에 그 자체로는 환부인 小腸 말단 또는 결장에 잘 도달하지 못하며, 흡수된 5-aminosalicylic acid는 nephrotic syndrome을 일으키는 것으로 알려져 있으므로 inflammatory bowel disease의 치료에 적합하지 못하다.^{11,12)} 따라서 5-aminosalicylic acid의 azo prodrug인 sulfasalazine, olsalazine 등이 개발되어 사용되고 있는데, 이 藥物들은 위나 小腸을 그대로 통과한 후 結腸에서 大腸 內의 微生物에 의해 azo 결합이 환원되어 5-aminosalicylic acid가 유리되어 작용하는 것으로 알려져 있다.¹³⁾ 최근에는 5-aminosalicylic acid의 고분자 prodrug,^{14,15)} brush-border enzyme-mediated amino acid prodrugs¹⁶⁾ 또는 glycoside 유도체¹⁷⁾가 개발되어 보고된 바 있다.

본 연구에서는 Crohn's disease, 궤양성 結腸炎에 사용하는 5-aminosalicylic acid의 새로운 結腸標的性 prodrug의 개발을 목적으로 dextran-5-ESA를 합성하고 이의 상부 소화관에서의 화학적 안정성, dextranase에 의한 depolymerization에 영향을 미치는 요인, 腸관 부위 별 내용물에 의한 藥物의 유리정도를 조사하

고자 한다. Dextran-5-ESA는 結腸에서 dextranase에 의하여 matrix가 분해되면서 5-ESA가 유리되고 a-zoreductase에 의하여 azo group이 환원되면서 5-aminosalicylic acid가 유리 될 것으로 예상된다.

실 험

시약 및 기기

Dextran, dextranase(*Penicillium* sp.), carbonyldiimidazole, salicylic acid, ethyl-p-aminobenzoate, sulfamic acid, kanamycin sulfate 및 2,4-dinitrosalicylic acid(DNS)는 Sigma 제품을, HPLC용 시약은 Merck 제품을, Sephadex LH-20은 Pharmacia제품을, sodium nitrite, 용매 및 기타 시약은 특급을 사용하였다.

IR spectra는 Bomem MB100 FT-IR spectrophotometer를 사용하였다. 약물의 정량 및 분석은 Shimadzu UV 2101-PC UV/VIS spectrophotometer와 Gilson HPLC로 하였다. pH는 Orion 320 pH meter를, 시료는 OHAUSE Analytical Plus를 사용하여 평량하였다. 시료의 원심분리는 Hanil Supra K-22 centrifuge를 사용하였다. TLC는 Kieselgel 60 F₂₅₄를 사용하였다.

완충액 - USP의 규정에 따라 조제하여 사용하였다.

완충액 A : 염산완충액(pH 1.2)

완충액 B : .1 M 초산완충액(pH 5.4)

완충액 C : 등장성 인산완충액은 0.1 M sod. phosphate dibasic용액과 0.15 M sod. phosphate monobasic 용액을 pH 6.8이 되도록 혼합하여 조제하였다.

완충액D : 5.0 mM 인산완충액은 5 mM sod. phosphate dibasic 용액과 phosphoric acid를 pH 6이 되도록 혼합하여 조제하였다.

HPLC를 이용한 5-ASA의 정량

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 μ m)를 사용하였고, 약물은 254 nm, AUFS 0.01에서 검출하였으며, 자료의 처리는 Gilson사의 712 software로 하였다. 이동상은 0.5 mM tetrabutylam-

monium chloride가 포함된 완충액D의 10% MeOH 용액을 0.45 μm membrane filter로 여과하여 사용하였고, 유속은 1.5 ml/min으로 2000 psi 정도의 압력에서 사용하였다.

시료액 중의 5-ASA의 측정은 Chungi 등의⁸⁾ 방법을 참고하여 행하였으며, 자세한 내용은 투고중인 논문에 있다.¹⁹⁾

UV spectrophotometer를 이용한 약물의 정량

0.1N NaOH 100 ml에 약물 100 mg을 넣고 60°C에서 1시간 반응시킨 후 반응액 중의 5-ESA의 농도가 1 $\mu\text{g/ml}$ ~20 $\mu\text{g/ml}$ 되도록 0.1N NaOH로 희석하고 358 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하고 미지시료의 흡광도를 측정하여 검량선으로부터 약물의 농도를 측정하였다.

DNS법에 의한 환원당의 정량

DNS 시액은 dinitrosalicylic acid 5 g에 2N NaOH 100 ml와 증류수 250 ml를 가하여 완전히 녹인 후, sodium potassium tartrate tetrahydrate 150 g을 용해시키고 증류수를 넣어 500 ml가 되게 조제하고 차광용기에 보관하였다.

Maltose 표준액(0.093 mg/ml~0.75 mg/ml) 200 μl 를 DNS 시액 600 μl 와 섞은 후 5분간 수욕상에서 끓이고 얼음에서 10분간 냉각후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하고 미지시료의 흡광도를 측정하여 검량선으로부터 환원당의 농도를 측정하였다.

5-(4-Ethoxycarbonylphenylazo)salicylic acid (4, 5-ESA)의 합성

Ethyl *p*-aminobenzoate(1, 4.13 g, 25 mmole)을 18% 염산 13 ml에 현탁시키고 4°C로 냉각시킨 후, sodium nitrite(1.9 g, 27.5 mmole) 3.5 ml에 용해시킨 용액을 가하여 30분간 반응시켰다. 과량의 nitrous acid는 sulfamic acid(0.25 g, 2.5 mmole)를 가하여 분해시키고, 냉각한 후 salicylic acid(3, 3.45 g, 27.5 mmole)을 20% sodium carbonate 용액에 용해시킨 용액을 가하여 pH 9~10을 유지시키면서 4°C에서 1시간 교반하면서 반응시켰다. 생성된 화합물 4의 sodium 염을 여과하고 EtOH/H₂O(1:7) 용액으로 재결정시켜 분리하고 진한 염산으로 중화하여 5.5 g(69%)의 결정을 얻었다. mp 216~217°C, IR(nujol) cm⁻¹:

1690(C=O, acid), 1720(C=O, ester).

Dextran-5-(4-ethoxycarbonylphenylazo)salicylic acid ester(7, Dextran-5-ESA)의 합성

화합물(4, 0.5 g, 1.6 mmole)을 DMF 3.5 ml에 녹여 benzene 17 ml를 가하고 carbonyldiimidazole(5, 0.52 g, 3.2 mmole)을 가한 후 한 시간 반응시켰다. 여기에 benzene 18 ml를 가하고 Sephadex LH-20 550 mg을 가하여 1시간 반응시켜 과량의 carbonyldiimidazole를 제거한 후 Sephadex LH-20은 여과하고 benzene을 증발시킨 후, dextran(MW 70,000) 3 g을 DMSO 60 ml에 녹인 용액을 적가하고 triethylamine 5.25 ml를 가하여 55°C에서 3시간 반응시켰다. 반응물을 과량의 EtOH/Et₂O(1:5) 용액에 가하여 생성된 침전을 분리한 후 다시 DMSO에 용해하고 과량의 EtOH/Et₂O(1:5) 용액에 가하여 침전시키는 조작을 몇 번 반복하여 분말상의 침전을 얻었다. TLC에서 유리상태의 화합물 4는 검출되지 않았다.

약물의 치환도(Degree of substitution : DS)의 측정

Dextran-5-ESA 100 mg을 0.1N NaOH 용액 100 ml와 60°C에서 1시간 반응시켜 유리되는 sodium 5-(4-carboxylphenylazo)salicylate를 358 nm에서 UV로 정량하고 이 값(mg)을 DS로 하였다. 즉 DS는 Dextran-5-ESA 100 mg에 결합된 화합물 4의 mg 수로 정의하였다.

Dextran-5-ESA의 화학적 안정성

Dextran-5-ESA 1 g을 완충액 A 50 ml와 완충액 C 50 ml에 각각 넣고 37°C에서 6시간 반응시켰다. 반응액 0.1 ml에 MeOH 0.9 ml를 가하여 2분간 혼합하고 10,000×g에서 5분간 원심분리한 상등액에서 dextran-5-ESA로부터 유리된 화합물 4를 358 nm에서 UV로 정량하였다.

Dextranase에 의한 depolymerization에 미치는 dextran 분자량의 영향

분자량이 9,000 및 70,000인 dextran을 사용하여 합성한 DS 10인 dextran-5-ESA를 dextran 양으로 2.52 mg/ml 되도록 완충액 B에 녹이고, dextranase를 15 dextranase unit(DU)/ml가 되도록 가하여, 37°C에서 일정시간 반응시킨 후, 생성된 환원당을

DNS법으로 측정하여 분자량이 depolymerization에 미치는 영향을 조사하였다.

Dextranase에 의한 depolymerization에 미치는 DS의 영향

분자량 70,000인 Dextran을 사용하여 DS가 각각 43, 20, 15, 10, 9, 6인 dextran-5-ESA를 합성하고 depolymerization에 미치는 DS의 영향을 조사하였다. Dextran-5-ESA를 dextran량으로 2.52 mg/ml가 되도록 각각 완충액 B에 녹이고 dextranase를 15 DU/ml가 되도록 가하여 37°C에서 일정시간 반응시킨 후 생성된 환원당을 DNS법으로 정량하여 depolymerization 정도를 측정하였다.

쥐 맹장 내용물의 dextranase 활성 측정

Dextran을 완충액 C에 녹인 용액(25 mg/ml) 1 ml를 일정량의 dextranase(*Penicillium* sp.)와 37°C에서 30분간 배양시킨 후, 즉시 끓는 물에 1분간 넣어 효소를 불활성화시키고 생성된 환원당을 DNS법으로 측정하였다. Dextranase 사용량 0.5 DU/ml에서 4.5 DU/ml 범위에서 검량선을 얻었다. 雄性 Sprague-Dawley rat를 Et₂O로 마취하여 개복한 후 맹장 부위의 양쪽을 봉합사로 묶고 그 바깥 쪽을 절단한 후 질소로 치환되어 있는 장치 내에서 절개하여 그 내용물을 0.1 g씩 평량하여 마이크로튜브에 넣고 여기에 dextran을 녹인 완충액 C(25 mg/ml) 1 ml를 가한 후 37°C에서 30분간 배양하고 즉시 끓는 물에 1분간 넣고, 배양액내의 환원당을 DNS법으로 측정하여 검량선으로부터 맹장 내용물 1g 당 dextranase 활성을 측정하였다.

쥐의 소장상부 및 소장하부 내용물과 배양한 dextran-5-ESA로부터 유리되는 5-ASA의 측정

쥐를 개복 후 위의 말단과 회장의 말단부위를 절단하고 그 중간을 기준으로 상부를 소장상부(PSI), 하부를 소장하부(DSI)라 하였다. PSI 및 DSI 내용물을 완충액 C로 두배 희석한 용액 0.2 ml를 취하여 마이크로튜브에 넣고 여기에 dextran-5-ESA(DS 10; 5-ESA로서 110 µg/0.4 ml)를 완충액 E에 녹인 용액 0.4 ml를 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 혼합하고 10,000×g에서 5분간 원심분리하여 상등액 20 µl를

취하여 유리된 약물의 양을 HPLC로 분석하였다.

쥐의 맹장 내용물과 배양한 dextran-5-ESA로부터 유리되는 5-ASA의 측정

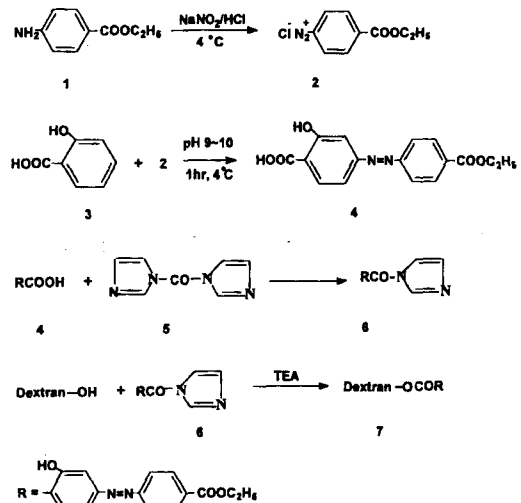
雄性 Sprague-Dawley rat를 Et₂O로 마취하여 개복한 후 맹장 부위의 양쪽을 봉합사로 묶고 그 바깥 쪽을 절단한 후 질소로 치환되어 있는 장치 내에서 절개하여 그 내용물을 0.1 g씩 평량하여 마이크로튜브에 넣고 여기에 Dextran-5-ESA(DS 10; 5-ESA로서 110 µg/0.5 ml)를 완충액 C에 녹인 용액 0.5 ml를 각각 가하여 6시간 동안 37°C에서 배양하였다. 그 후 적절한 시간 간격에서 시료를 5,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 얻은 상등액 0.1 ml에 MeOH 0.9 ml를 가하여 2분간 혼합하고 10,000×g에서 5분간 원심분리하여 상등액 20 µl를 취하여 유리된 5-ASA의 양을 HPLC로 분석하였다.

Kanamycin sulfate(5×200 mg/rat)를 2일 동안 하루 2회 그리고 실험을 시작하기 4시간 전에 경구투여한²⁰⁾ 쥐의 맹장 내용물을 사용하여 위와 같은 방법으로 dextran-5-ESA 부터 유리되는 5-ASA의 양을 HPLC로 분석하였다.

결과 및 고찰

Dextran-5-ESA (7)의 합성

Dextran과 5-ASA의 결합은 Scheme I에 나타난 것



Scheme I — Synthesis of 5-ASA and dextran-5-ESA.

과 같이 먼저 5-ASA의 아미노기를 봉쇄하기 위하여 ethoxycarbonylphenylazo기를 도입하여 화합물 4를 합성하고 이것을 dextran과 반응시켰다. 화합물 4의 합성은 화합물 1를 디아조화시켜 화합물 2를 얻은 후 화합물 3과 반응시켜 얻었으며, 용점과 IR data가 문헌치와 일치하였다.¹⁵⁾ 화합물 4와 dextran의 결합반응은 Scheme I에 나타낸 바와 같이 carbonyldiimidazole (5)를 사용하여 이들을 화합물 6로한 후 triethylamine를 촉매로 하여 dextran과 반응시켰다. 화합물 6의 생성반응을 촉진시키기 위하여 두 배 과량의 화합물 5를 사용하였으며, 이때 반응액 중에 존재하는 과잉의 화합물 5에 의해 dextran의 cross-linking이 일어나는 것을 방지하기 위하여 Sephadex LH-20을 가하여 과잉의 화합물 5를 제거한 후 dextran과 반응시켰다.²¹⁾ Fig. 1에 dextran-5-ESA의 IR spectrum을 나타내었으며, 반응물질인 화합물 4 및 dextran에 기인하는 peak들이 관찰되며 약물과 dextran의 결합에 의해 생긴 ester carbonyl기의 peak가 1690 cm^{-1} 전후에서 나타남을 관찰할 수 있었다.

Dextran 일정량에 대하여 화합물 4의 사용량을 달리 하여 DS가 다른 생성물을 얻을 수 있었으며, 그 결과를

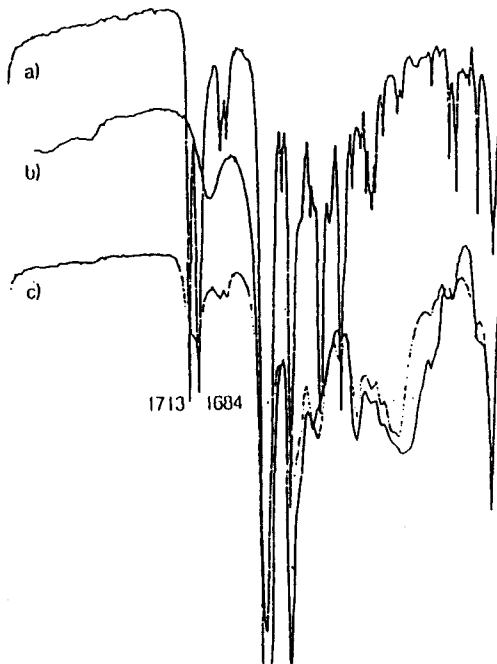


Fig. 1 — IR spectra of a) 5-ESA, b) Dextran, c) Dextran-5ESA.

Table I — Weight of 5-(4-ethoxycarbonylphenylazo) salicylic acid (5-ESA) per gram of dextran used for the coupling of 5-ESA to dextran to prepare dextran-5-ESA and the DS* of the resulting product

5-EAS	1.8	0.6	0.35	0.25	0.17
DS	43	21	15	10	6

* DS : mg of 5-ESA bound per 100 mg of dextran-ESA.

Table I에 나타내었다. DS 값은 dextran-5-ESA를 0.1N NaOH 용액에서 1시간 반응시켜 유리되는 약물을 UV로 측정하여 dextran-5-ESA 100 mg당 결합된 약물의 mg 수로 정하였다.

Dextran-5-ESA의 화학적 안정성

결장표적성 prodrug는 경구투여 한 후 상부소화관을 거치는 동안 물리화학적으로 안정해야 하므로 이를 검증하기 위하여 dextran-5-ESA를 37°C 에서, 위 또는 소장의 pH를 고려하여 pH 1.2 또는 pH 6.8 수용액에서 6시간 동안 반응시켰으나 DS값에 관계없이 화합물 4는 검출되지 않았으므로 위 또는 소장에서 화학적으로는 안정한 것으로 생각되었다.

Dextran-5-ESA의 dextranase에 의한 depolymerization

Depolymerization 정도는 dextran이 dextranase에 의하여 분해되어 생성되는 isomaltose를 DNS법에 따라 정량하여 측정하였다. 분자량이 다른 dextran을 사용하여 얻은 dextran-5-ESA(DS 10)의 depolymerization 결과를 Table II에 나타내었으며, dextran의 분자량에 따른 영향은 나타나지 않았다. DS가 다른 시료들의 depolymerization 정도를 시간

Table II — Influence of variation in molecular weight (MW) of dextran on the depolymerization (%) of dextran-5-ESA by dextranase^a

MW	Time			
	0.5 min	0.5 hr	1 hr	3 hr
9000	42	60	94	100
70000	38	58	94	100

^a The amount of sample (DS 10) containing 2.52 mg equivalent of dextran was incubated with dextranase (15 DU/ml) at 37°C and the degree of depolymerization was determined by DNS method at specified time interval.

Table III—Influence of DS on the depolymerization (%) of dextran-5-ESA by dextranase determined by DNS method^a

DS	Time	0.5 min	0.5 hr	1 hr	3 hr	5 hr	8 hr	24 hr	72 hr
	43	—	—	—	—	—	—	3	6
20	—	—	—	—	1.5	—	7.4	9.7	27.0
15	6.0	34.0	45.0	79.0	3.0	100	—	—	—
10	38.0	58.0	94.0	100	95.0	—	—	—	—
9 ^b	40.0	72.0	78.0	88.0	—	—	—	—	—
6	41.0	100	—	—	—	100	—	—	—
Dextran	—	100	—	—	—	—	—	—	—

^a The amount of sample containing 2.52 mg equivalent of dextran was incubated with dextranase (15 DU/ml) at 37°C and the degree of depolymerization was determined by DNS method at specified time interval.

^b Sephadex LH-20 non-treated product.

별로 측정하여 그 결과를 Table III에 나타내었다. Dextran은 30분 이내에 완전히 분해되었으며 DS가 클수록 분해가 잘 일어나지 않았고 DS가 20 이상이 되면 분해가 거의 일어나지 않아서 화합물 4의 유리 나아가서는 5-aminosalicylic acid 및 benzocaine (1)의 방출이 제한적일 것으로 생각된다.

쥐의 장관 내용물에 의한 dextran-5-ESA의 활성화

Dextran-5-ESA의 활성화 과정은 상부소화관에서는 dextran의 입체 장애로 인하여 esterase의 작용을 받지 않아 결합된 약물이 가수분해되지 않고 bacterial count가 높은 colon에서 미생물에 의해 유래된 endodextranase에 의해 dextran matrix가 먼저 빠른 속도로 분해되어 분자 크기가 작아진 후 소화관 어디에나 존재하는 esterase에 의해 약물이 가수분해되어 유리된다고 보고되어 있다. 따라서, dextran-5-ESA를 경구 투여하면, 결장에서 미생물의 작용으로 dextran 골격이 먼저 분해되고 ester결합의 가수분해와 azo기의 환원으로 활성 약물인 5-ASA가 유리될 것으로 예상하며, 이때 보호기로 이용한 benzocaine이 어느 정도 안정하게 남아서 작용한다면 통증의 완화에도 도움이 될 것으로 기대하였다. 쥐의 장관 dextran 분해효소의 개체간의 활성 차이를 조사하기 위하여 일정 과량의 dextran을 dextranase(*Penicillium* sp.)와 배양한 후 depolymerization되는 정도를 dextranase의 양을 변화시키면서 DNS법으로 조사하여 검량선을 만들고, 같은 양의 dextran을 쥐의 맹장 내용물 일정량과 배양하여 depolymerization 정도를 측정된 결과로부터 검량선을 이용하여 맹장 내용물의 dextranase의 활성을 측정하였고 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 쥐의 맹장내의 평균 dextranase activity(DA)는 7.4 ± 0.11 , (n =

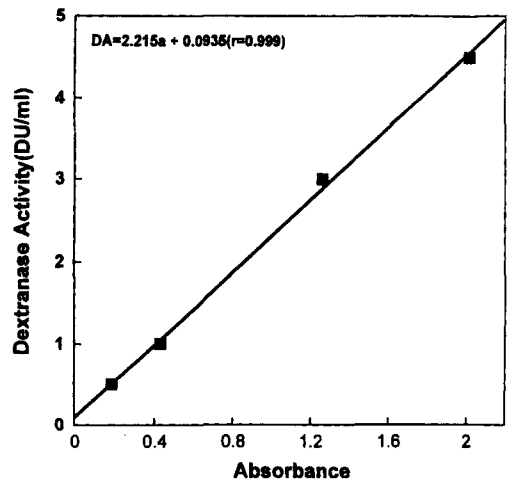


Fig. 2—Calibration of dextranase activity (DA) and determination of DA in rat cecum contents. Dextran (25 mg in 1 ml of phosphate buffer) was incubated with dextranase at 37°C for 30 min and the degree of depolymerization was determined by measuring the absorbance at 540 nm. Calibration curve was constructed at a range of 0.5~4.5 DU/ml of DA. DA of cecum contents was deduced from the calibration after incubation of dextran and cecum contents (0.1 g wet weight) by the same procedure.

10)로 측정되었다.

맹장 내에는 많은 종류의 효소가 존재하고 그 중에는 dextranase에 의해 생성된 환원당을 분해시키는 것도 있는 것으로 알려져 있다는 점을 고려하면,²²⁾ 실제 쥐의 맹장 내의 dextranase activity는 본 실험에서 DNS법으로 측정된 값보다 클 것으로 생각된다.

Dextran-5-ESA(DS 10)를 쥐의 맹장 내용물과 37°C에서 배양한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Dextran-5-ESA는 8시간 경과했을 때 약 50%(26.45 μg)의

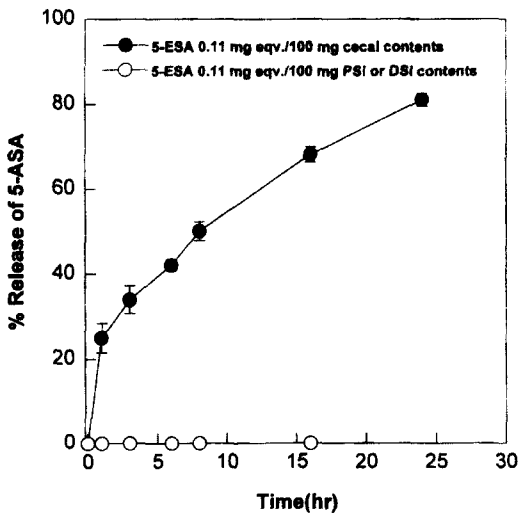


Fig. 3—Release of 5-ASA in contents of 0.6 ml of six-fold dilution in isotonic phosphate buffer (pH 6.8) of cecum (w/v), PSI (v/v) and DSI (v/v) during incubation of dextran-5-ESA (DS 10, 110 μ g equiv. of 5-ESA). Data are mean \pm S.E. (n=5).

5-ASA가 유리되었고, 24시간이 지나서는 80%(42.3 μ g) 이상이 유리되었다. 소장 내용물(PSI 와 DSI)을 사용하여 동일한 방식으로 행한 실험에서는 5-ASA가 유리되지 않았다(Fig. 3).

Kanamycin sulfate를 전처리한 실험동물의 맹장내용물에서는 prodrug의 활성도가 거의 관찰되지 않았는데(5-ASA농도가 0.1 μ g/ml 이하) 이는 prodrug의 활성도가 대장내 미생물의 효소에 기인됨을 보여준다.

본 실험결과로 5-aminosalicylic acid의 고분자성 prodrug인 dextran-5-ESA는 상부소화관에서 흡수가 억제되고, 화학적 생물학적으로 안정하며, 대장에 도달하면 미생물 유래의 효소에 의해 분해되어 결장표적성을 가지리라 예상된다.

문 헌

- 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) Mrsny, R. J., Drug absorption in the colon : A critical review, in *Oral Colon Specific Drug Delivery*, Friend, D. R., Ed., CRC press, Boca Raton, FL., 45 (1992)

- 3) Saffran, M., Oral colon-specific drug delivery with emphasis on insulin: A critical review, in *Oral Colon Specific Drug Delivery*, Friend, D. R., Ed., CRC press, Boca Raton, FL., 45 (1992).
- 4) Shamat, M. A. : The role of the gastrointestinal microflora in the metabolism of drugs, *Int. J. Pharm.* **97**, 1 (1993).
- 5) Englysth, N., Hay, s., and Mcfarlane, G. T. : Polysaccharide breakdown by mixed populations of human faecal bacteria, *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**, 163 (1987).
- 6) Andrew D. M. : Dextran prodrugs for colonic-specific drug delivery, in *Oral Colon Specific Drug Delivery*, Friend, D.R., Ed., CRC press, Boca Raton, FL., 213 (1992).
- 7) Rubinstein, A., Nakar, D. and Sintov, A., Chondroitin sulfate : a potential biodegradable carrier for conlon-specific drug delivery, *Int. J. Pharm.* **84**, 141 (1992).
- 8) Ashore, M. Fell, J., Astwood, D., Sharma, H. and Woodhead, P., An evaluation of pectin as a carrier for drug targeting to the colon, *J. Control. Rel.* **26**, 213 (1993).
- 9) Larsen, C., Johansen, M., Dextran as carriers for drug compounds—realized and potential applications, *Arch. Pharm. Chemi.* **92**, 809 (1985).
- 10) McLeod, A. D., Friend, D. R., Tozer, T. N. : Glucocorticoid-dextran conjugate as potential prodrugs for colon-specific delivery: Hydrolysis in rat gastrointestinal tract contents, *J. Pharm. Sci.* **83**, 1284 (1994).
- 11) Crotty, B. and Jewel, J. P. : Drug therapy of ulcerative colitis, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **34**, 189 (1992).
- 12) Novis, B. H., Korzets, J., Chen, P. and Bernheim, J., Nephrotic syndrome after treatment with 5-aminosalicylic acid, *Br. Med. J.* **296**, 1442 (1988).
- 13) 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).
- 14) Brown, J. P., McGarraugh, G. V., Parkinson, T. M., Wingard, R. E., Onderdonk, A. B. : A poly Omeric drug for treatment of inflammatory

- bowel disease, *J. Med. Chem.* **26**, 1300 (1983).
- 15) 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).
 - 16) Pellicciari, R., Garzon-Aburbeh, Nathalini, B., Marinozzi, M. : Brush-border-enzyme-mediated intestine-specific drug delivery. Amino acid prodrugs of 5-aminosalicylic acid, *J. Med. Chem.* **36**, 4201 (1993).
 - 17) Istran, C., Gabor, S. and Ferene, S. : Glycosides of 5-Aminosalicylic acid, *Magy Kem. FOLY.* **97**, 143 (1991).
 - 18) Chungi, V. S., Rekhi, G. S. and Shargel, L. : A simple and rapid liquid chromatographic method for the determination of major metabolites of sulfasalazine in biological fluids, *J. Pharm. Sci.* **78**(3), 235 (1989).
 - 19) 정연진, 이정수, 김학현, 김영미, 한석규 : 5-아미노살리실산의 결장표적성 prodrug : 5-아미노살리실-L-글루타민산과 5-아미노살리실-L-아스파틸산의 합성과 정상. 약학회지, submitted for publication.
 - 20) 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).
 - 21) Robert, C. M. and Gerhard, E. G : A novel method of complete activation by carbonyldiimidazole : application to ester synthesis, *Can. J. Chem.* **66** 1701 (1988).
 - 22) Mortensen, P. B., Hove, H., Clausen, M. R. and Holtug, K. : Fermentation to short-chain fatty acids and lactate in human faecal batch cultures, *Scand. J. Gastroenterol.* **26**, 1285 (1991).