

## 토끼의 비강, 직장 및 질 점막을 통한 로이신엔케팔린과 [D-알라<sup>2</sup>]-로이신엔케팔린아미드의 투과 증진

곽혜선 · 박인숙 · 전인구\*  
동덕여자대학교 약학대학

## Enhanced Permeation of Leucine Enkephalin and [D-Ala<sup>2</sup>]-leucine Enkephalinamide across Nasal, Rectal and Vaginal Mucosae of Rabbit

Hye Sun Gwak, In Sook Park and In Koo Chun\*

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

(Received May 18, 2002 ; accepted June 2, 2002)

**Abstract** – The effects of enzyme inhibitors and penetration enhancers on the permeation of leucine enkephalin (Leu-Enk) and its synthetic analog, [D-ala<sup>2</sup>]-leucine enkephalinamide (YAGFL) across the nasal, rectal and vaginal mucosae were evaluated. Enzyme inhibitors and penetration enhancers employed for Leu-Enk permeation study were amastatin (AM), thimerosal (TM) and ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA), and sodium taurodihydrofusidate (STDHF). Those for YAGFL permeation study were TM, benzalkonium chloride (BC) and EDTA, and STDHF, sodium deoxycholate (SDC), sodium glycholate (SGC), glycyrrhizic acid ammonium salt (GAA), L- $\alpha$ -lysophosphatidylcholine (LPC) and mixed micelle (MM, STDHF : linoleic acid = 15 mM : 5 mM). The addition of TM alone on the donor and receptor solutions for Leu-Enk permeation study across all the three kinds of mucosae failed to inhibit the degradation; it completely degraded in 6 hrs, and no permeation occurred. However, with addition of three kinds of inhibitors together, the fluxes across nasal, rectal and vaginal mucosae were  $20.7 \pm 2.5$ ,  $0.3 \pm 0.05$  and  $1.4 \pm 0.5$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ , respectively. Moreover, the addition of STDHF in the presence of the above three inhibitors enhanced permeation across nasal, rectal and vaginal mucosae 1.3, 15 and 1.3 times, respectively. YAGFL also degraded in the donor and receptor solutions rapidly as time went. With mixed inhibitors of TM and EDTA, the percents of YAGFL remaining in the donor solutions facing nasal, rectal and vaginal mucosae were 69.7, 69.8 and 79.8%, respectively; the percent permeated increased to 10, 2.1 and 5.7%, respectively. The addition of STDHF in the presence of either BC/EDTA or TM/EDTA increased the permeation 2.2, 11.0 and 2.9 times, and 2.21, 14.0 and 2.7 times for nasal, rectal and vaginal mucosae, respectively. With SDC, SGC, GAA, LPC and MM in the presence of TM/EDTA increased permeation; especially, they increased permeation across vaginal mucosae effectively, and the enhancement factors were 12.5, 7.6, 8.7, 5.7 and 5.5, respectively. The degradation extent of YAGFL was correlated with protein concentrations in the epidermal and serosal extracts. The flux of YAGFL across nasal mucosa increased dose-dependently.

**Key words** □ Degradation, Enzyme inhibitors, Leucine enkephalin, [D-Ala<sup>2</sup>]-leucine enkephalinamide, Penetration enhancers, Permeation flux.

유전자 재조합 및 생명공학의 발전에 따라 여러 가지 생리활성 펩타이드와 단백질 약물이 용이하게 생산되어 신규 의약품 후보물질로 주목 받게 되었다. Opiate 수용체에 작용하는 enkephalin은 methionine enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met)과 leucine enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu)의 두개의 펜타펩타이드의 혼합체이다(Hughes *et al.*, 1975). 이들은 통증 전달에 있어서 신경전달물질 또는 신

경조절인자로 진통, 혈압 조절 및 장관 운동성 변화 등의 약리학적 효과가 있다(Brownstein, 1980; Olsen *et al.*, 1981; Dzolijic and Dzolijic, 1989). 또한 진해 및 지사작용과 함께 몰핀양 작용에도 불구하고 탐닉성이 없다는 사실은 마약류의 오남용이 심각한 현실을 고려할 때 마약중독 치료제로서의 개발가치가 매우 크다고 하겠다.

그러나 천연 엔케팔린류는 체내에서 급격히 불활성화되어 생물학적 반감기가 1분 이내로 작용 지속시간이 매우 짧고(Frederickson and Geary, 1982) 뇌실 내 주사시에

\*To whom correspondence should be addressed.

도 진통작용이 일시적인데, 이는 여러 종류의 효소에 의한 분해에 기인한다(Hambrook *et al.*, 1976; Hersh and Mc-Kelvy, 1981). 이러한 엔케팔린류를 분해시키는 주된 효소류 중 하나인 아미노펩티다제류의 경우에는 Try(1)-Gly(2) bond에 작용하여 엔케팔린을 불활성시킨다(Schwartz *et al.*, 1981). 따라서 이 Leu-Enk의 두번째 아미노산인 glycine을 D-alanine으로 치환시킨 [D-ala<sup>2</sup>]-methionine enkephalin-amide (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Met amide)와 [D-ala<sup>2</sup>]-leucine enkephalinamide (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Amide, YAGFL)가 설계되었다(Coy *et al.*, 1976; Pert *et al.*, 1976). 그리고 이러한 엔케팔린 및 그 유사체류의 체내 수송을 위해 비강(Faraj *et al.*, 1990), 안점막(Stratford *et al.*, 1988), 소장(Kerchner and Geary, 1983; Friedman and Amidon, 1991), 구강(Lee and Kellaway, 2000) 및 피부 등(Choi *et al.*, 1990)을 이용한 연구가 보고되어 있고 엔케팔린의 효소적 분해특성과 효소억제제를 이용한 안정화 연구가 보고되었다(Chun and Yang, 1992; Chun and Chien 1993; Chun and Park, 1994; Chun *et al.*, 1996).

따라서 본 연구에서는 엔케팔린류의 분해억제효과가 있는 것으로 보고된 효소억제제류의 존재하에 Leu-Enk과 그 합성 유사체인 YAGFL의 비강, 직장 및 질 점막 투과성을 검토하고 투과촉진제의 첨가에 의해 점막 투과를 증진시키고자 하였다.

### 실험방법

#### 실험동물

체중 2.5-3.0 kg의 건강한 New Zealand White (NZW) 계 자성토끼를 명진기계상사(서울)로부터 구입하여 사용하였다.

#### 재료 및 시약

Leucine enkephalin acetate salt (Leu-Enk), [D-ala<sup>2</sup>]-leucine enkephalinamide acetate salt (YAGFL), tyrosine (Tyr), phenylalanine (Phe), 내부표준물질인 L-phenylalanyl-l-leucine (Phe-Leu), 효소억제제로 amastatin hydrochloride (AM), thimerosal (TM), benzalkonium chloride (BC), ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA), 흡수 촉진제로 sodium deoxycholate (SDC), sodium glycocholate (SGC), glycyrrhizic acid ammonium salt (GAA), L- $\alpha$ -lysophosphatidylcholine (LPC) 등은 Sigma Chemical Co. (U.S.A.)에서 구입하였고 sodium taurodihydrofusidate (STDHF)는 California Biotechnology Inc. (Mountainview, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 아세트니트릴은 HPLC 급(Lab-Scan Ltd., Analytical Sciences)을 사용하고, 물은 정제수를 초순수 제조장치(ELGASTAT, UHQPS,

England)를 통과시켜 18 M $\Omega$  이상인 것을 사용하였고 기타 시약은 시판 특급을 사용하였다. Leu-Enk 및 YAGFL 원액(4000  $\mu$ g/ml)은 이들 펩타이드를 용시 각각 물에 녹여 만들었다. 혼합미셀(MM)은 STDHF와 linoleic acid를 15:5의 물비로 제조하여 사용하였다.

#### 기기 및 장치

고속액체크로마토그래프(Perkin-Elmer series 310, 검출기로 Perkin-Elmer LC 90 UV detector 및 기록장치로 Varian model 4290 integrator 장착), Valia-Chien 투과시스템(cell opening 면적: 0.64 cm<sup>2</sup>, 수평식, Crown Bio Scientific, Inc., USA)을 이용하였다.

#### Leu-Enk의 점막 투과실험

##### 투과시험 중 donor cell에서의 Leu-Enk의 분해 및 점막투과

신선하게 적출된 비강, 직장 및 질 점막을 half-cell 사이에 mounting하고 donor cell에는 각각 Leu-Enk 원액을 175  $\mu$ l씩 넣고 등장 인산염 완충액(비강 pH 8.0, 직장 pH 7.2 및 질 pH 6.0) 3325  $\mu$ l를 넣어 donor측의 농도를 200  $\mu$ g/ml로 하였다. Receptor cell에는 pH 7.4 생리등장 인산염완충액 3.5 ml를 넣고 37°C 항온을 유지하면서 양측 cell을 star-head magnetic bar로 600 rpm으로 교반하였다. 모든 완충액은 효소억제제인 TM을 0.25 mM 농도로 함유시켰다. 양측 cell로부터 0.5, 1, 2, 4, 6 및 8 시간에 50  $\mu$ l씩 취하여 Phe-Leu을 12.5  $\mu$ g/ml 농도로 함유하는 pH 2.2 인산염 완충액(내부표준액, IS) 950  $\mu$ l를 넣고 vortexing하여 효소반응을 정지시켰다. 이 액 20  $\mu$ l를 HPLC에 주입하여 미리 작성한 검량선으로부터 Leu-Enk의 잔존량 및 투과량을 산출하였다.

##### 혼합 효소억제제의 첨가가 Leu-Enk의 점막투과에 미치는 영향

Donor cell에 효소억제제로서 2 mM AM, 10 mM TM과 0.2 M EDTA 용액을 각각 175  $\mu$ l씩 넣고 등장 인산염 완충액 2800  $\mu$ l, Leu-Enk 원액 175  $\mu$ l를 넣어 3.5 ml로 하고 receptor cell에는 2 mM AM, 10 mM TM과 0.2 M EDTA를 각각 175  $\mu$ l씩 넣고 pH 7.4 생리등장 인산염 완충액 2975  $\mu$ l를 넣은 다음 37°C 항온을 유지하면서 양측 cell을 star-head magnetic bar로 600 rpm으로 교반하였다. 양측 cell로부터 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 및 24 시간에 50  $\mu$ l씩 취하여 IS 950  $\mu$ l를 넣어 섞고 앞에서와 같이 조작하여 Leu-Enk의 잔존량 및 투과량을 산출하였다.

##### 혼합 효소억제제의 존재 시 STDHF가 Leu-Enk의 점막투과에 미치는 영향

Donor cell에 효소억제제로서 2 mM AM, 10 mM TM과 0.2 M EDTA 용액을 각각 175  $\mu$ l씩 넣고 등장 인산

염 완충액 1050  $\mu$ l을 넣고 여기에 투과촉진제로 30 mM STDHF 용액 1750  $\mu$ l를 각각 첨가하고 Leu-Enk 원액 175  $\mu$ l를 넣었다. Receptor cell에는 2 mM AM, 10 mM TM과 0.2 M EDTA 용액을 각각 175  $\mu$ l씩 넣고 pH 7.4 생리 등장 인산염 완충액 2975  $\mu$ l를 넣은 다음 37°C 항온을 유지하면서 양측 cell을 star-head magnetic bar로 600 rpm으로 교반하였다. 이하 앞에서와 같이 조작하여 Leu-Enk의 잔존량 및 투과량을 산출하였다.

### YAGFL의 점막 투과실험

#### 투과시험 중 donor cell에서의 YAGFL의 분해 및 점막투과

신선하게 적출된 비강, 직장 및 질 점막을 half-cell 사이에 mounting하고 donor cell에는 각각 YAGFL 원액을 150  $\mu$ l씩 넣고 등장 인산염 완충액 2,850  $\mu$ l를 넣어 donor 측의 농도를 200  $\mu$ g/ml로 하였다. Receptor cell에는 pH 7.4 생리 등장 인산염 완충액 3.0 ml를 넣고 37°C 항온을 유지하면서 양측 cell을 star-head magnetic bar로 600 rpm으로 교반하였다. 이하 앞에서와 같이 조작하여 YAGFL의 잔존량 및 투과량을 산출하였다.

#### 혼합 효소억제제의 첨가가 YAGFL의 점막투과에 미치는 영향

Donor cell에 효소억제제로서 10 mM TM과 0.2 M EDTA 용액을 각각 150  $\mu$ l씩 넣고 등장 인산염 완충액 2550  $\mu$ l, YAGFL 원액 150  $\mu$ l를 넣어 3.0 ml로 하였다. Receptor cell에는 10 mM TM과 0.2 M EDTA 용액을 각각 150  $\mu$ l씩 넣고 pH 7.4 생리 등장 인산염 완충액 2,700  $\mu$ l를 넣은 다음 37°C 항온을 유지하면서 양측 cell을 star-head magnetic bar로 600 rpm으로 교반하였다. 이하 앞에서와 같이 조작하여 YAGFL의 잔존량 및 투과량을 산출하였다.

#### 혼합 효소억제제의 존재 시 투과촉진제가 YAGFL의 점막투과에 미치는 영향

Donor cell에 효소억제제로서 10 mM TM과 0.2 M EDTA 용액을 각각 150  $\mu$ l씩 넣고 등장 인산염 완충액 1050  $\mu$ l 및 YAGFL 원액 150  $\mu$ l를 넣고 여기에 투과촉진제로(30 mM STDHF, 30 mM SGC, 30 mM SDC, 30 mM GAA 또는 1% LPC) 1.5 ml를 각각 첨가하였다. Receptor cell에는 10 mM TM과 0.2 M EDTA 용액을 각각 150  $\mu$ l씩 넣고 pH 7.4 생리 등장 인산염 완충액 2700  $\mu$ l를 넣은 다음 37°C 항온을 유지하면서 양측 cell을 star-head magnetic bar로 600 rpm으로 교반하였다. 이하 앞에서와 같이 조작하여 YAGFL의 잔존량 및 투과량을 산출하였다.

또 0.5% LPC의 존재 하에 YAGFL의 donor 농도를 100 및 400  $\mu$ g/ml로 변화시켜 농도가 투과속도에 미치는 영향을 검토하였다.

### Donor 및 Receptor 액 중 단백 함량 측정

Schosinsky 등(1987)의 방법을 준용하여 YAGFL의 24 시간 투과시험 후 donor 및 receptor 액 중의 단백량을 측정하였다. 등장 인산염 완충액 각각에 토끼 혈청 albumin을 녹여 100  $\mu$ g/ml로 제조하고 이 액 500  $\mu$ l에 BPB 용액 2.0 ml를 넣어 섞어 파장 610 nm에서 공시험액을 대조로 표준액의 흡광도를 측정하였다. 24시간 투과시험 후 비강, 직장 및 질 점막의 점막측 및 장막측 추출액 각 500  $\mu$ l에 BPB 용액 2.0 ml를 각각 넣어 섞고 흡광도를 측정하여 표준액의 흡광도로부터 각 donor 및 receptor 액 중의 단백량을 정량하였다.

### 펩타이드류의 HPLC 분석조건

$\mu$ Bondapak C18 (Waters, 3.9 $\times$ 300 mm) 또는 Ultrasphere C8 (5  $\mu$ m, 4.6 $\times$ 150 mm)칼럼을 사용하고 이동상으로는 0.05 M 인산염 완충액(pH 3.0)·아세트니트릴 혼합액(74:26 v/v, 0.1% 헵탄설폰산나트륨 함유)을 사용하여 유속 1.0 ml/min, 파장 214 nm에서 검액 20  $\mu$ l를 주입하였다. 따로 Leu-Enk 및 YAGFL의 농도를 순차로 달리하여 만든 표준액과 IS로 Phe-Leu를 사용하여 얻은 피크 높이 비로부터 검량선을 작성하고 검량선을 작성하고 검액으로부터 얻은 IS에 대한 펩타이드의 피크 높이비를 가지고 정량하였다.

### 결과 및 고찰

#### 토끼의 수종 점막을 통한 Leu-Enk의 투과

##### 점막투과시험 중 donor cell에서의 Leu-Enk의 분해 및 receptor cell로의 투과

투과시험 중 donor 및 receptor 액에서의 미생물 증식과 점막의 부식을 억제시키기 위해 TM (0.25 mM)을 첨

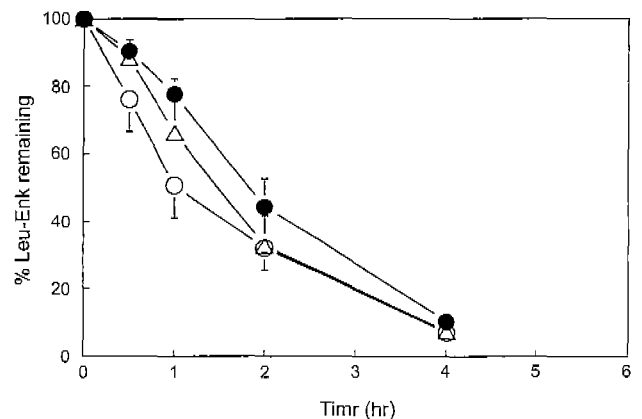


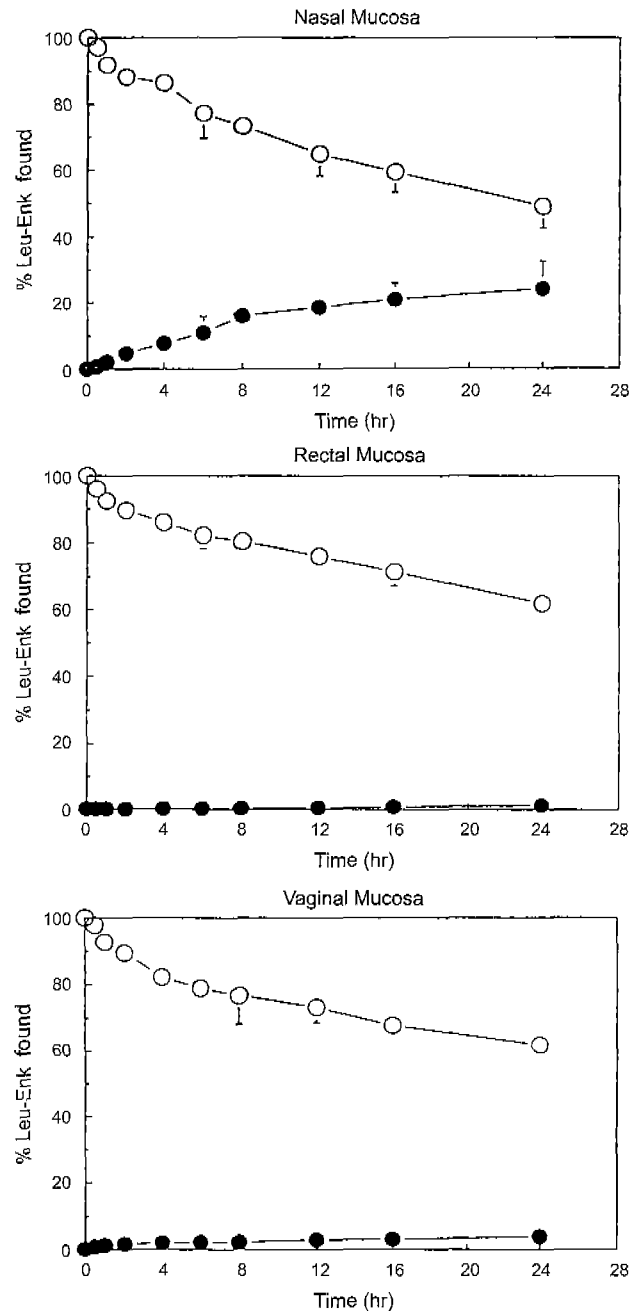
Fig. 1. Disappearance of Leu-Enk (200 $\mu$ g/ml) in donor solutions (0.25 mM TM) facing nasal ( $\circ$ ), rectal ( $\bullet$ ) and vaginal ( $\triangle$ ) mucosae (n=3).

가하고 비강, 직장 및 질 점막 투과시험 중 donor 액 중 Leu-Enk의 잔존율을 Fig. 1에 나타내었다. 이에서 보는 바와 같이 천연 Leu-Enk은 donor cell 내에서 급속히 소실되어 6시간 후에는 전혀 검출되지 않았으며 점막에 따른 소실속도는 비강 > 질 > 직장의 순이었다. 이러한 소실은 효소적 분해, 점막 내 잔류 및 투과 등에 기인할 수 있다. 그러나 receptor 액을 분석한 결과 전 시간대에서 Leu-Enk은 전혀 검출되지 않았고 단지 분해산물인 Phe와 Tyr만이 최대 5% 이하로 검출되었다. 이는 TM 한 종류의 효소억제제만으로는 Leu-Enk의 안정화와 점막투과에 별다른 영향을 주지 못함을 나타낸다. TM은 엔케팔리나제류를 강력히 억제하며 아미노펩티다제류도 어느 정도 억제하는 것으로 보고되었다(Chun and Chien, 1995). 따라서 donor cell 중 Leu-Enk의 소실은 주로 점막으로부터 추출된 아미노펩티다제류의 활성에 의해 대부분 신속히 분해되어 Leu-Enk의 점막투과가 이루어지지 못한 것으로 생각된다(Sayani *et al.*, 1993). 더욱 점막을 통해 receptor 액으로 투과되었다고 하더라도 receptor 액으로 추출되어 나온 분해효소에 의해 급속히 분해되어 Leu-Enk의 정확한 투과량을 측정할 수가 없다. 따라서 양측 cell에 혼합 효소억제제를 첨가한 조건에서 Leu-Enk의 점막투과시험을 행하였다.

**혼합 효소억제제의 첨가가 Leu-Enk의 점막투과에 미치는 영향**

점막 추출액 중 Leu-Enk의 분해 억제효과가 가장 뛰어난 것으로 보고된 AM, TM 및 EDTA 3종 혼합 효소억제제(Chun *et al.*, 1996)를 각각 0.1 mM, 0.5 mM 및 10 mM 농도로 양측 cell에 첨가하고 Leu-Enk의 donor cell에서의 잔존량과 receptor cell로의 투과량을 측정하였다. Receptor cell에 혼합 효소억제제를 첨가한 것은 아미노펩티다제류와 엔케팔리나제류에 의해 급속히 분해되어 버리는 천연 Leu-Enk를 효소분해로부터 보호함으로써 투과량을 측정할 수 있도록 하기 위함이다. 또 양측 cell에 첨가된 효소억제제류는 점막면과 장막면 조직에 침투되어 Leu-Enk가 투과 과정 중 점막 내부에서 분해되는 것도 보호할 수 있을 것으로 기대된다.

비강, 직장 및 질 점막 투과 프로파일을 Fig. 2에 나타내었다. 이에서 보는 바와 같이 비강, 직장 및 질 점막의 donor cell에 TM (0.25 mM)만을 첨가한 경우(Fig. 1)와 비교하여 분해가 매우 서서히 일어났으며, 24시간 후 잔존율은 비강 점막은  $49.0 \pm 6.6\%$ , 직장 점막은  $62.0 \pm 3.5\%$ , 질 점막은  $61.8 \pm 1.1\%$  이었다. Receptor cell로의 투과율도 24시간대에 비강 점막은  $24.1 \pm 8.5\%$ , 직장 점막은  $1.3 \pm 0.7\%$  및 질 점막은  $4.0 \pm 2.3\%$ 로 나타났으며, 점막별 투과율의 크기는 비강 > 질 > 직장의 순이었다. Fig. 2의 투과 프로파일로부터 steady state permeation flux를 구한 결



**Fig. 2.** Disappearance of Leu-Enk (200µg/ml) in donor solutions, and its permeation across nasal, rectal and vagina mucosae in the presence of AM (0.1mM), TM (0.5mM) and EDTA (10 mM) as mixed inhibitors (n=3). Key: ○, donor; ●, receptor.

과 비강, 직장 및 질 점막에 대해 각각  $20.7 \pm 2.5$ ,  $0.3 \pm 0.05$  및  $1.4 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 이었다. 이러한 점막 투과는 첨가된 혼합 효소억제제의 엔케팔린 분해효소에 대한 억제효과(Chun *et al.*, 1996)뿐 아니라 EDTA에 의한 점막조직의 금속 이온들의 구속으로 막의 투과성이 높아졌을 것

이라는 점(Aungst *et al.*, 1991)에 기인하였다고 생각된다. 그러나 비강 점막을 제외하고 혼합 효소억제제인 AM, TM 및 EDTA의 첨가만으로는 직장 및 질 점막에 대해서는 투과량 자체를 크게 향상시키지는 못하기 때문에 이 펜타펩타이드의 경점막 수송을 위해서는 흡수촉진제의 검토가 함께 이루어져야 할 것으로 생각되었다.

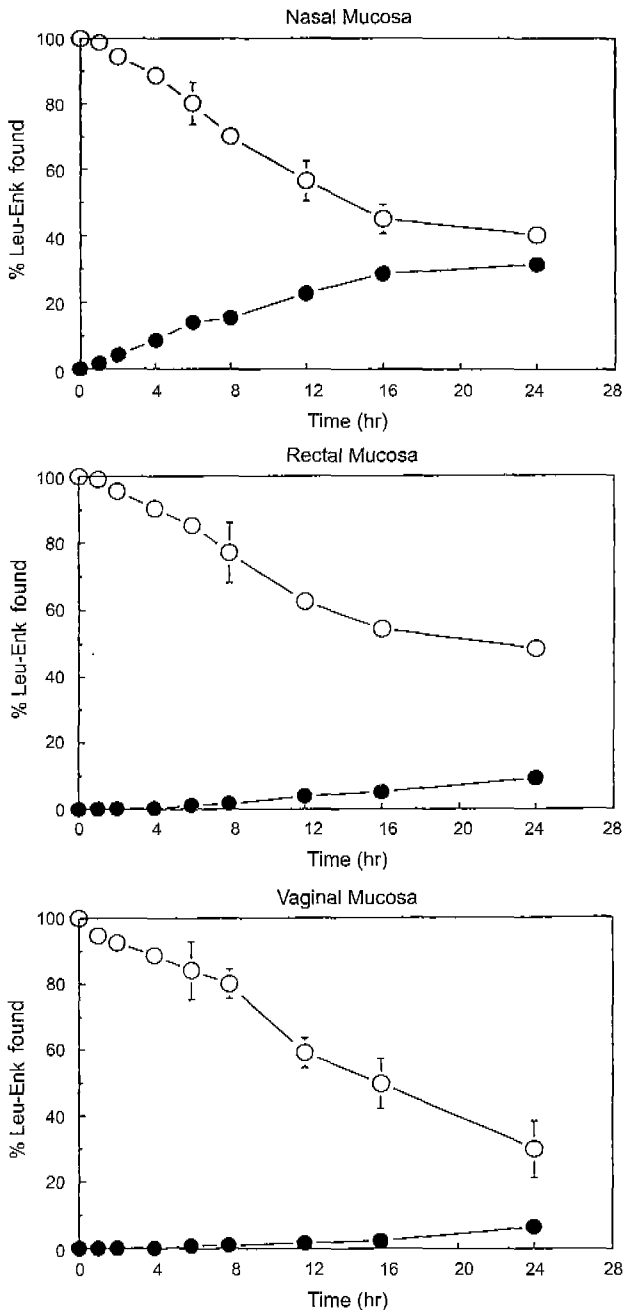


Fig. 3. Effect of STDHF (15 mM) on the permeation of Leu-Enk (200  $\mu$ g/ml) across nasal, rectal and vaginal mucosae in the presence of AM (0.1 mM), TM (0.5 mM) and EDTA (10 mM) as mixed inhibitors ( $n=3$ ). Key:  $\circ$ , donor;  $\bullet$ , receptor.

### 혼합 효소억제제의 존재 시 STDHF의 첨가가 Leu-Enk의 점막투과에 미치는 영향

여러 펩타이드류에 대해 투과촉진효과가 있는 것으로 보고된 STDHF (Longenecker, *et al.*, 1989; Van Hoogdalem *et al.*, 1990)를 선택하여 Leu-Enk의 투과에 미치는 영향을 검토하였다. 양측 cell에 위의 3종 효소억제제를 첨가하고 donor cell에 STDHF (15 mM)를 첨가한 조건에서 donor 액 중 Leu-Enk의 경시적 잔존률과 receptor cell로의 투과율을 Fig. 3에 나타내었다. 이에서 보는 바와 같이 receptor cell로의 투과량은 혼합 효소억제제만을 사용한 경우(Fig. 2)에 비하여 현저히 증가되어 24시간대 Leu-Enk의 투과율이 비강 점막은  $31.4 \pm 0.05\%$ , 직장 점막은  $9.2 \pm 0.8\%$ , 질 점막은  $6.6 \pm 0.5\%$ 이었다. 또, 비강, 직장 및 질 점막 투과 flux는 각각  $26.9 \pm 4.5$ ,  $4.5 \pm 0.2$  및  $1.7 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 로 STDHF의 첨가에 의해 비강, 직장 및 질 점막 투과 flux를 각각 1.3, 15.0 및 1.3배 증가시켰다. 비강과 질 점막에서는 유의성 있는 투과 증진효과는 나타나지 않았으나 직장 점막에서의 투과증진효과는 매우 컸다. 그러나 절대적인 투과량으로 볼 때 비강 점막이 Leu-Enk의 경점막 수송경로로 바람직하다고 생각되었다.

### 토끼의 수증 점막을 통한 YAGFL의 투과

#### 점막투과시험 중 donor cell에서의 YAGFL의 분해 및 receptor cell로의 투과

Donor 및 receptor 액에 효소억제제나 투과촉진제를 첨가하지 않은 경우 비강, 직장 및 질 점막에서의 donor 액 중 YAGFL의 잔존률과 투과율을 Fig. 4에 나타내었다. 이에서 보는 바와 같이 비강 점막의 경우 donor 액에서는 시간이 경과함에 따라 YAGFL의 잔존률이 감소하여 16시간 후에는 전혀 검출되지 않았다. Receptor 액에서는 시간이 경과함에 따라 투과량이 약간씩 증가하였으나 8시간대에 2.8%의 투과량을 기점으로 감소하여 24시간대에는 전혀 검출되지 않았다. 비강 점막의 donor 액에서 직장 및 질 점막에 비해 YAGFL이 다소 빨리 줄어드는 이유는 엔케팔리나제류에 의한 분해뿐 아니라 receptor 액으로 투과되기 때문인 것으로 추정된다. 또 투과된 약물은 receptor 액으로 추출된 효소류에 의해 곧 분해되기 때문에 정확한 투과량을 알기가 어렵다. 이에 반해 직장 점막의 경우 donor 액에서는 시간이 경과함에 따라 YAGFL이 점차 감소하여 16시간에 13.0%, 24시간에 0%를 나타내었다. 한편, receptor 액에서는 12시간대부터 검출되기 시작하여 0.5%를 나타낸 후 16시간에 0.7%, 20시간부터는 다시 감소하기 시작하여 24시간에 전혀 검출되지 않았다. 이는 직장 점막이 YAGFL에 대해 투과성이 매우 낮고 투과과정 중 효소에 의해서 또는 receptor액 중 추출효소에 의해 분해되기 때문인 것으로 보인다. 질 점막

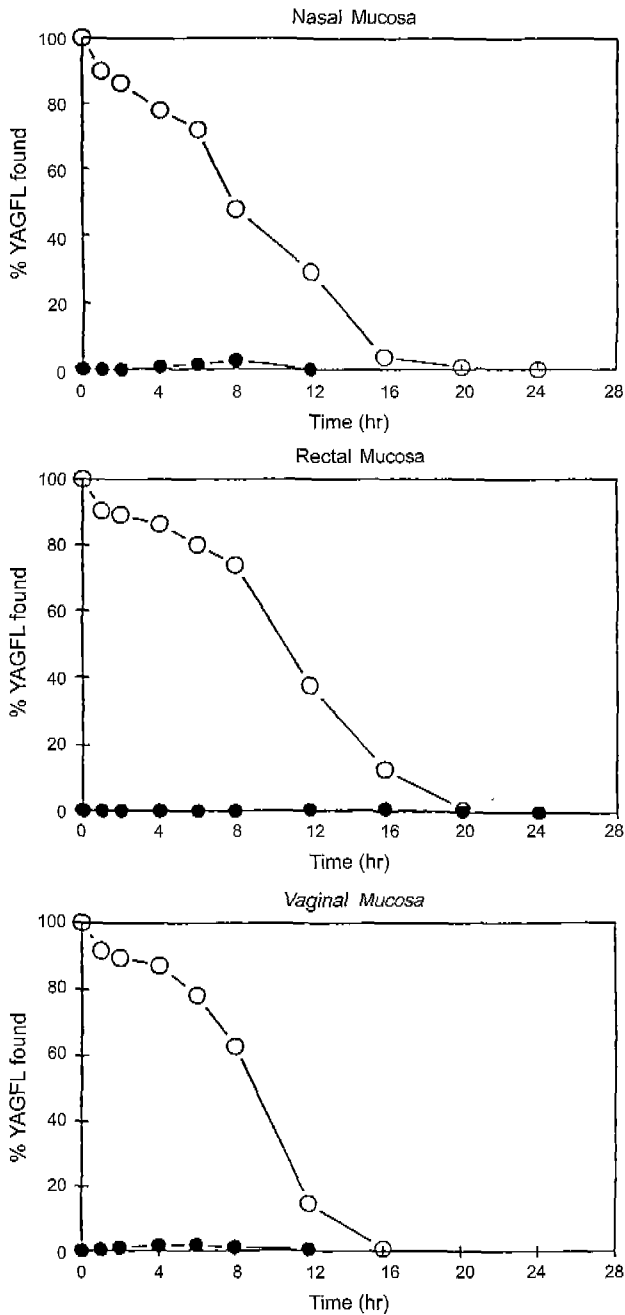


Fig. 4. Disappearance of YAGFL (200 µg/ml) in donor solutions, and its permeation across nasal, rectal and vaginal mucosae in the absence of any inhibitors (n=3). Key: ○, donor; ●, receptor.

의 경우도 donor 액에서 시간이 경과함에 따라 점차 감소되어 16시간 후에는 전혀 검출되지 않았으며, 1시간대부터 receptor 액으로 투과되기 시작하여 6시간에 1.8%를 정점으로 다시 감소하기 시작하여 16시간에는 검출되지 않았다. 이 결과로부터 YAGFL이 점막을 통해 receptor 액으로 투과되었다고 하더라도 receptor 액으로 추출되어 나

은 엔케팔리나제류 등의 분해효소에 의해 분해되기 때문에 정확한 투과량을 알 수가 없다. 따라서 양측 cell에 효소억제제를 첨가하여 YAGFL을 안정화시킨 조건에서 YAGFL의 점막투과시험을 행할 필요가 있다.

혼합 효소억제제의 첨가가 YAGFL의 점막투과에 미치는 영향

점막 추출액 중 YAGFL의 분해 억제효과가 큰 것으로

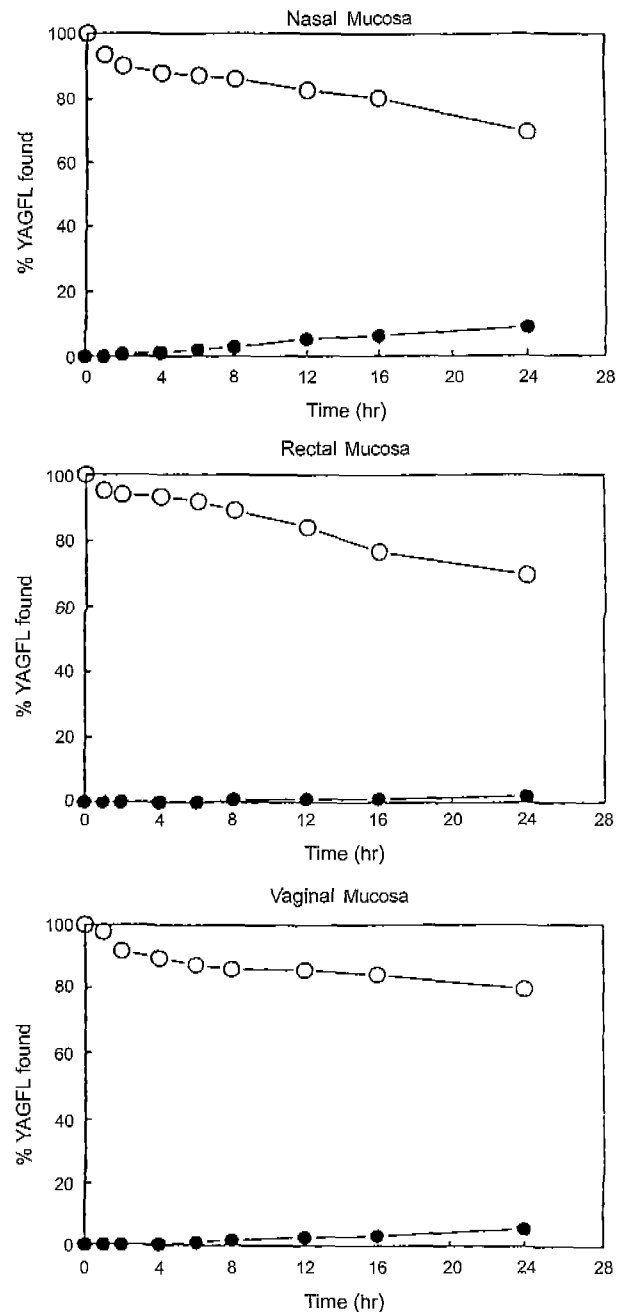


Fig. 5. Disappearance of YAGFL (200 µg/ml) in donor solutions, and its permeation across nasal, rectal and vaginal mucosae in the presence of TM (0.5 mM) and EDTA (10 mM) as mixed inhibitors (n=3). Key: ○, donor; ●, receptor.

보고된 TM 및 EDTA 2종 혼합 효소억제제(Chun *et al.*, 1996)를 선택하여 각각 0.5 mM 및 10 mM 농도로 양측 cell에 첨가하고 YAGFL의 donor 액에서의 잔존량과 receptor 액으로의 투과량을 측정하였다. 비강, 직장 및 질 점막에서의 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 이에서 보는 바와 같이 비강, 직장 및 질 점막의 donor 액에 효소억제제를 첨가하지 않은 경우(Fig. 4)와 비교하여 분해가 서서히 일어나 24시간 후 잔존률은 비강 점막은 69.7%, 직장 점막은 69.8%, 질 점막은 79.8% 이었다. Receptor 액으로의 투과율도 효소억제제를 사용하지 않았을 때에는 펩타이드가 receptor 측으로 투과되어도 그곳에 존재하는 효소 때문에 곧 분해되었으나 양측 cell에 효소억제제를 첨가함으로써 receptor측으로 투과된 YAGFL의 분해가 현저히 억제되어 24시간 후의 투과율이 비강 점막은 10%, 직장 점막은 2.1%, 질 점막은 5.7%로 유의성 있게 증가되었다. 이러한 점막투과 증진효과는 Leu-Enk처럼 YAGFL 분해 효소에 대한 억제효과뿐 아니라 EDTA에 의한 점막조직의 금속 이온들의 구속으로 막의 투과성이 높아졌을 것이

리는 점(Aungst *et al.*, 1991)에 기인한다고 생각된다. 그러나 2종 혼합 효소억제제인 TM과 EDTA의 첨가만으로는 투과량 자체를 크게 향상시키지는 못하기 때문에 효소적으로 안정하게 설계된 합성 유사체라 하더라도 경점막 수송을 증진시키기 위해서는 투과촉진제의 검토가 함께 이루어져야 할 것으로 생각되었다.

**혼합 효소억제제의 존재 시 투과촉진제의 첨가가 YAGFL의 점막투과에 미치는 영향**

혼합 효소억제제로 TM (0.5 mM)과 EDTA (10 mM)의 존재 시 투과촉진제의 첨가가 YAGFL의 비강, 직장 및 질 점막 투과 프로파일에 미치는 영향을 검토하였다. 시간-누적투과량 프로파일의 초기 직선 부분으로부터 투과 flux를 구하여 Table I에 나타내었다. YAGFL의 투과 flux는 STDHF와 BC (0.14 mM)/EDTA (10 mM)를 첨가한 경우 혼합 효소억제제만을 사용한 경우에 비해 비강 점막에서 2.2배, 직장 점막에서 11.0배, 질 점막에서 2.9배 증가되었고, STDHF와 TM/EDTA를 사용한 경우에는 비강 점막에서 2.2배, 직장 점막에서 14.0배, 질 점막에서 2.7배

**Table I.** Effects of various permeation enhancers on the steady-state flux of YAGFL permeation through various rabbit mucosae in the presence of 0.5 mM TM/10 mM EDTA as mixed inhibitors (MI)

| Enhancer                       | Steady-state flux ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ ) |            |           |
|--------------------------------|---|------------|-----------|
|                                | Nasal   | Rectal     | Vaginal   |
| None                           | 4.36±0.72   | 0.54±0.21  | 1.54±0.34 |
| MI                             | 4.78±0.52   | 0.80±0.02  | 2.78±0.71 |
| BC/EDTA+STDHF                  | 10.66±0.73  | 8.77±2.82  | 8.15±1.95 |
| MI+STDHF                       | 10.23±0.06  | 11.29±2.24 | 7.40±2.92 |
| MI+SDC                         | 11.39±0.56  | 9.99±2.19  | 3.30±0.31 |
| MI+SGC                         | 13.94±2.11  | 6.09±0.24  | 5.17±1.64 |
| MI+GAA                         | 8.23±1.09   | 6.95±0.06  | 5.13±1.34 |
| MI+ LPC                        | 21.39±1.91  | 4.53±0.95  | 8.19±4.69 |
| MI+mixed micelle <sup>a)</sup> | 10.14±0.72  | 4.40±0.04  | 7.25±1.06 |

Data were expressed as the mean S.E. (n=3).<sup>a)</sup> A combination of 15 mM STDHF+5 mM linoleic acid.

**Table II.** Protein concentrations ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in donor solution with/without enhancers for various rabbit mucosae after 24 hr permeation of YAGFL

| Enhancer                       | Protein concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |             |             |
|--------------------------------|---|-------------|-------------|
|                                | Nasal   | Rectal      | Vaginal     |
| None                           | 37.9±4.6  | 85.9±11.4   | 96.5±12.3   |
| MI                             | 96.1±6.5  | 147.0±3.6   | 208.5±10.9  |
| BC/EDTA+STDHF                  | 216.3±23.5  | 225.7±58.6  | 298.9±23.0  |
| MI+STDHF                       | 178.2±44.5  | 151.9±14.1  | 203.8±28.3  |
| MI+SDC                         | 1867.2±40.5                                       | 1414.6±60.3 | 2087.0±71.1 |
| MI+SGC                         | 375.0±14.2  | 290.0±11.6  | 343.9±18.8  |
| MI+GAA                         | 281.0±12.5  | 251.2±6.1   | 332.4±16.4  |
| MI+LPC                         | 244.7±6.9   | 260.2±6.1   | 259.5±7.8   |
| MI+mixed micelle <sup>a)</sup> | 196.4±32.1  | 173.5±23.5  | 96.7±10.3   |

Data were expressed as the mean S.E. (n=3).<sup>a)</sup> A combination of 15 mM STDHF+5 mM linoleic acid

증가되었다. SDC를 사용한 경우에는 비강 점막에서 2.4 배, 직장 점막에서 12.5배, 질 점막에서 1.2배, 그리고 SGC의 첨가에 의해서는 각각 2.9, 7.6 및 1.9배의 투과 증진효과를 나타내었다. GAA와 LPG에 의한 투과 촉진 효과는 비강, 직장 및 질 점막에 있어 각각 1.7, 8.7, 1.9 배 및 4.5, 5.7, 3.0배로 나타났다. 기타 혼합 미셀을 사

용한 경우 비강 점막에서 2.1배, 직장 점막에서 5.5배 및 질 점막에서 2.6배 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 담즙산염에 의한 투과 촉진효과는 여러 연구 (Morimoto *et al.*, 1985; Gordon *et al.*, 1985; Uchida and maitari, 1991)에서 확인된 바와 같이 각 점막의 porosity 를 증가시켜 약물의 투과를 용이하게 하는 것으로 생각되었다

24시간에 걸친 투과시험 후 donor액 중의 단백질량을 측정 한 결과는 Table II와 같다. 혼합 효소억제제를 사용한 경우 이들을 넣지 않은 컨트롤에 비해 비강, 직장 및 질 점막의 점막측 (장막측)액 중 단백질량이 각각 2.5 (2.05), 1.71 (1.11) 및 2.16 (1.53)배 증가되었다. 또 비강 점막의 donor cell에서 단백 추출에 미치는 투과촉진제류의 효과는 SDC >>SGC>GAA>LPC>MM>STDHF의 순으로 나타났다. 직장 및 질 점막에서도 투과촉진제류의 단백 추출 효과는 비슷하게 나타났다. 혼합 효소억제제만을 사용한 경우에 비해 SDC 또는 SGC를 투과촉진제로 첨가한 경우에 비강, 직장 및 질 점막의 단백 함량이 현저히 증가되었는데, 특히 SDC의 경우 혼합 효소억제제만 사용한 경우와 비교하여 donor cell중 단백 함량이 비강, 직장 및 질 점막측에서 각각 19.4, 9.6 및 10.0배 증가되는 등 단백질의 추출효과가 매우 컸다. 이는 SDC가 점막조직에 대한 장애나 손상을 크게 일으킨다는 다른 연구들 (Hirai *et al.*, 1981; Emnis *et al.*, 1990)의 보고와 일치한다.

이상의 투과 flux와 단백추출효과 등의 결과로부터 투과 flux를 향상시키면서 단백추출효과가 비교적 낮은 LPC가 효과적인 투과촉진제로 생각되어 TM/EDTA 존재 시 LPC의 첨가가 YAGFL의 비강, 직장 및 질 점막 투과에 미치는 영향을 Fig. 6에서와 같이 비교하였다. 투과 flux의 증가는 비강>질>직장 점막 순이었다. 또, TM/EDTA/LPC의 존재하에 YAGFL의 donor dose가 비강 점막 투과 flux에 미치는 영향을 검토한 결과, YAGFL의 초기 농도가 100, 200 및 400 µg/ml로 증가됨에 따라 flux가 각각 8.5, 21.4 및 37.0 µg/cm<sup>2</sup>/hr로 직선적으로 (r=0.991) 증가하였다. 따라서 직장이나 질 점막에 비해 효소분해가 낮으면서 투과율이 높고 뇌로 통하는 수송경로를 가지고 있는 비강 점막이 YAGFL의 경점막 수송에 매우 효과적인 투여경로라고 생각된다.

결 론

1. Leu-Enk는 비강, 직장 및 질 점막을 통한 투과가 전혀 일어나지 않았으며 donor cell에서 6시간 이내에 모두 효소적으로 분해되었다. 3종 혼합효소억제제로 AM, TM 및 EDTA를 첨가한 경우 비강, 직장 및 질 점막 모두에서 현저한 투과가 일어났으며 STDHF의 첨가로 투과가

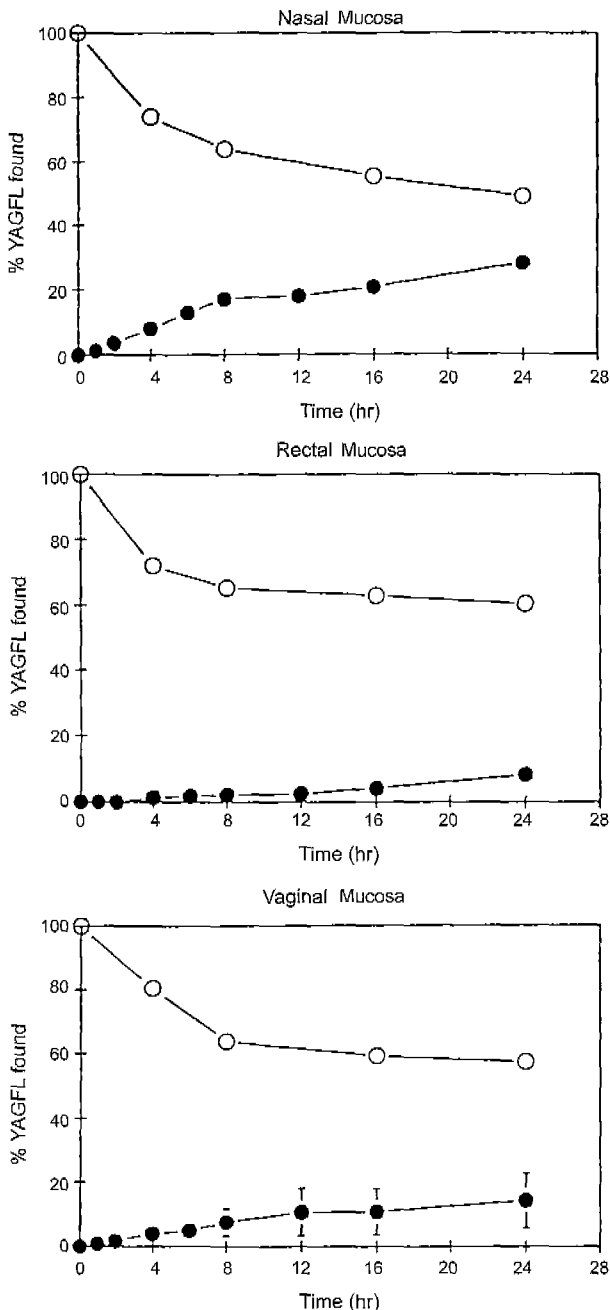


Fig. 6. Effect of LPC (0.5%) on the permeation of YAGFL (200 µg/ml) across nasal, rectal and vaginal mucosae in the presence of TM (0.5 mM) and EDTA (10 mM) (n=3). Key: ○, donor; ●, receptor.



현저히 증진되었다.

2. YAGFL은 비강, 직장 및 질 점막층에서 16-24시간에 모두 소실되었으며 그 투과율은 매우 낮았다.

3. 양측 cell에 2종 혼합 효소억제제로 TM 및 EDTA를 첨가한 조건에서 24 시간 후 donor 액 중 YAGFL의 잔존률은 비강, 직장 및 질 점막에서 각각 69.7, 69.8 및 79.8%이었고, 24시간까지의 투과율은 비강, 직장 및 질 점막에서 각각 10, 2.1 및 5.7%로 다소 증가되었으며 비강 점막을 통한 투과율이 가장 높았다.

4. 양측 cell에 2종 혼합 효소억제제로 TM 또는 BC과 EDTA를 첨가하고 donor cell에 흡수촉진제로서 STDHF, SDC, SGC, GAA, LPC 및 혼합 미셀을 첨가한 결과 YAGFL의 투과율이 현저히 증대되었다.

이상으로 보아 혼합 효소억제제와 투과촉진제 (LPC, STDHF 등)를 함께 사용함으로써 비강, 직장 및 질 점막을 통해 Leu-Enk와 YAGFL의 점막 투과성을 현저히 증대시킬 수 있으며 비강 점막이 이들 펜타펩타이드류의 경점막 수송경로로 매우 유망하다고 생각된다.

#### 참고문헌

- Aungst, B. J., Blake, J. A. and Hussain, M. A. (1991). An in vitro evaluation of metabolism and poor membrane permeation impeding intestinal absorption of leucine enkephalin, and methods to increase absorption. *J. Pharm. Exp. Ther.* **259**, 139-145.
- Brownstein, M. J. (1980). Peptidergic pathways in the central nervous system. *Proc. R. Soc. B.* **210**, 133-149.
- Choi, H. K., Flynn, G. L. and Amidon, G. L. (1990). Transdermal delivery of bioactive peptides: the effects of decylmethyl sulfoxide and pH on enkephalin transport. *Pharm. Res.* **7**, 1099-1106.
- Chun, I. K. and Chien, Y. W. (1995). Stabilization of methionine enkephalin in various rabbit mucosal extracts by enzyme inhibitors. *Int. J. Pharm.* **121**, 217-231.
- Chun, I. K. and Yang, Y. J. (1992). Degradation and stabilization of [D-ala<sup>2</sup>]-methionine enkephalinamide in various rabbit mucosa extracts. *J. Kor. Pharm. Sci.* **22**, 173-183.
- Chun, I. K. and Chien, Y. W. (1993). Transmucosal delivery of methionine enkephalin I. kinetics of degradation in buffered solution and metabolism in various mucosal extracts. *J. Pharm. Sci.* **82**, 373-378.
- Chun, I. K. and Park, I. S. (1994). Enzymatic degradation of leucine enkephalin and [D-ala<sup>2</sup>]-leucine enkephalinamide in various rabbit mucosa extracts. *Yakhak Hoeji* **38**, 530-543.
- Chun, I. K., Park, I. S. and Hyun, J. (1996). Inhibition of enzymatic degradation of leucine enkephalin and [D-ala<sup>2</sup>]-leucine enkephalinamide in various rabbit mucosal extracts by inhibitors. *J. Kor. Pharm. Sci.* **26**, 175-185.
- Coy, D. H., Kastin, A. J., Schally, A. V., Morin, O., Caron, N. G., Labrie, F., Walker, J. M., Fertel, R., Bertson, G. G. and Sandman, C. A. (1976). Synthesis and opioid activities of stereoisomers and other D-amino acid analogs of methionine enkephalin. *Life Sci.* **73**, 632-638.
- Dzolic, E. D. and Dzolic, M. R. (1989). Modification of morphine withdrawal in rats by alteration of the endogenous opioid system: effect of actinonin and GEMSA. *Drug Dev. Res.* **18**, 255-261.
- Ennis, R. D., Borden, L. and Lee, W. A. (1990). The effects of permeation enhancers on the surface morphology of the rat nasal mucosa: a scanning electron microscopy study. *Pharm. Res.* **7**, 468-475.
- Faraj, J. A., Hussain, A. A., Aramaki, Y., Iseki, K., Kagoshima, M. and Dittert, L. W. (1990). Mechanism of nasal absorption of drugs. IV: plasma levels of radioactivity following intranasal administration of (3H)leucine enkephalin. *J. Pharm. Sci.* **79**, 768-770.
- Frederickson, J. C. A. and Geary L. E. (1982). Endogenous opioid peptides: review of physiological, pharmacological and clinical aspects. *Prog. Neurobiol.* **19**, 16-69.
- Friedman, D. I. and Amidon, G. L. (1991). Oral absorption of peptides: influence of pH and inhibitors on the intestinal hydrolysis of leu-enkephalin and analogues. *Pharm. Res.* **8**, 93-96.
- Gordon, G. S., Moses, A. C., Silver, R. D., Filler, J. S. and Carey, M. C. (1985). Nasal absorption of insulin: enhancement by hydrophobic bile salts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 7419-7423.
- Hambrook, J. M., Morgan, B. A., Rance, M. J. and Smith, L. F. C. (1976). Mode of deactivation of the enkephalins by rat and human plasma and rat brain homogenates. *Nature*, **262**, 782-783.
- Hersh, L. B. and McKelvy, J. F. (1981). An aminopeptidase from bovine brain which catalyzes the hydrolysis of enkephalin. *J. Neurochem.* **36**, 171-178.
- Hirai, S., Yashiki, T. and Mima, H. (1981). Mechanism for the enhancement of the nasal absorption of insulin by surfactants. *Int. J. Pharm.* **9**, 173-184.
- Hughes, J., Smith, T. W., Kosterlitz, H. W., Fothergill, L. T., Morgan, B. A. and Morris, H. R. (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* **158**, 295-308.
- Kerchner, G. A. and Geary, L. E. (1983). Studies on the transport of enkephalin-like oligopeptides in rat intestinal mucosa. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **226**, 33-38.
- Lee J. and Kellaway I. W. (2000). Combined effect of oleic acid and polyethylene glycol 200 on buccal permeation of [D-ala<sup>2</sup>, D-leu<sup>5</sup>]enkephalin from a cubic phase of glyceryl monooleate. *Int. J. Pharm.* **204**, 137-144.
- Longenecker, J. P., Moses, A. C., Flier, J. S., Silver, R. D., Carey, M. C. and Dubovi, E. J. (1989). Effects of sodium taurodihydrofusidate on nasal absorption of insulin in sheep. *J. Pharm. Sci.* **76**, 351-355.
- Morimoto, K., Akatsuchi, H., Morisaka, K. and Kamada, A. (1985). Effect of non-ionic surfactants in a polyacrylic acid gel base on the rectal absorption of [Asu<sup>1,7</sup>]-eel calcitonin in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **37**, 759-764.

- Olsen, G. A., Olsen R. D., Kastin, A. L. and Coy, D. H. (1981). Endogenous opiates. *Peptides* **2**, 349-369.
- Pert, C. B., Pert, A., Chang, J. K. and Fong, B. T. W. (1976). [D-Ala<sup>2</sup>]-met-enkephalinamide: a potent, long-lasting synthetic pentapeptide analgesic. *Science* **194**, 330-332.
- Sayani, A. P., Chun, I. K. and Chien, Y. W. (1993). Transmucosal delivery of leucine enkephalin: stabilization in rabbit enzyme extracts and enhancement of permeation through mucosae. *J. Pharm. Sci.* **82**, 1179-1185.
- Schosinsky, K. H., Vargas, M., Esquivel, A. L. and Chavarria, M. A. (1987). Simple spectrophotometric determination of urinary albumin by dye-binding with use of bromophenol blue. *Clin. Chem.* **33**, 223-226.
- Schwartz, J. C., Malfroy, B. and De La Baume, S. (1981). Biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalin dipeptidyl-carboxypeptidase ("enkephalinase") as neuropeptidase. *Life Sci.* **9**, 1715-1740.
- Stratford, R. E., Carson, L. W., Dodda-Kashi, S. and Lee, V. H. L. (1988). Systemic absorption of ocularly administered enkephalinamide and insulin in the albino rabbit: extent, pathways and vehicle effects. *J. Pharm. Sci.* **77**, 838-842.
- Uchida, N. and Maitari, Y. (1991). Influence of bile salts on the permeability of insulin through the nasal mucosa of rabbits in comparison with dextran derivatives. *Int. J. Pharm.* **74**, 95-103.
- Van Hoogdalem, E. J., Heijlingers-Feijen, C. D., Verloef, J. C., de Boer, A. G. and Breimer, D. D. (1990). Absorption enhancement of rectally infused insulin by sodium tauro-24, 25-dihydrofusidate (STDHF) in rats. *Pharm. Res.* **7**, 180-183.