약제학회지(1996), 제26권 제 3호
*J. Kor. Pharm. Sci.*, Vol. 26, No. 3, 175-185(1996)

# 효소 억제제에 의한 토끼의 점막 추출액중 로이신엔케팔린 및 [D-알라$^2$]-로이신엔케팔린아미드의 분해 억제

전인구† · 박인숙 · 현 진
*동덕여자대학교 약학대학*
(1996년 6월 18일 접수)

# Inhibition of Enzymatic Degradation of Leucine Enkephalin and [D-Ala$^2$]-Leucine Enkephalinamide in Various Rabbit Mucosal Extracts by Inhibitors

**In Koo Chun†, In Sook Park and Jeen Hyun**
*College of Phrarmacy, Dongduck Women's University, Seoul 136-714, Korea*
(Received June 18, 1996)

To inhibit the enzymatic degradation of leucine enkephalin (Leu-Enk) and its synthetic analog, [D-ala$^2$]-leucine enkephalinamide (YAGFL), in the nasal, rectal and vaginal mucosal and serosal extracts of rabbits, effects of enzyme inhibitors such as amastatin (AM), puromycin (PM), thiorphan (TP), thimerosal (TM), EDTA, N-carboxymethyl-Phe-Leu (CPL), phenylethyl alcohol (PEA), phenylmercuric acetate (PMA), benzalkonium chloride (BC) and modified cyclodextrins, alone or in combination, were observed by assaying the pentapeptides staying intact during incubation. Mucosa extracts were prepared by exposing freshly-excised mucosal specimens mounted on Valia-Chien cells to isotonic phosphate buffer while stirring. The degradation of Leu-Enk and YAGFL followed the apparent first-order kinetics. The half-lives (mean) in the nasal, rectal and vaginal mucosal extracts were found to be 1.07, 0.33 and 1.14 hr for Leu-Enk, and 16.9, 6.2 and 6.8 hr for YAGFL, respectively. AM or PM, which is an aminopeptidase inhibitor, did not show a sufficient inhibition of Leu-Enk (50 μg/m*l*) degradation in all kinds of extracts. Dimethyl-β-cyclodextrin (DM-β-CyD) decreased the degradation rate constants of Leu-Enk about 2 or 3 times, comparing with no additive. However, the use of mixed inhibitors of AM (50 μM)/TM (0.25 mM)/EDTA (5 mM) resulted in a full stabilization of Leu-Enk by decreasing the degradation rate constants 67.3, 161.3 and 113.8 times for the nasal, rectal and vaginal mucosal extracts, respectively, comparing with no inhibitor. With mixed inhibitors, Leu-Enk remained intact more than 90% after 6 hr-incubation. In the stabilization of YAGFL, AM, TP or CPL alone showed little effect, and some additives demonstrated a considerable inhibition of YAGFL degradation in the rank order of TM > BC > EDTA. However, the addition of mixed inhibitors such as TM (0.5 mM) and EDTA (5 mM) into the extracts protected YAGFL from the degradation by more than 85% even after 24 hr-incubation, suggesting almost complete inhibition of YAGFL degradation in the extract. On the other hand, DM-β-CyD or hydroxypropyl-β-cyclodextrin (10%) were also found to retard enzymatic degradation rates of YAGFL markedly, and resulted in staying intact more than 80% of YAGFL in the nasal and vaginal mucosal extracts, and more than 60% in the rectal mucosal extract after 16 hr-incubation.

**Keywords**—Leucine enkephalin, [D-ala$^2$]-leucine enkephalinamide, Nasal, rectal and vaginal mucosa extracts, Enzymatic degradation, Stabilization, Inhibitors, Modified cyclodextrins

최근 많은 펩타이드와 단백류 약물들이 유용한 약리활성을 나타내고 있지만 주사시에만 효과가 기대되어 사용에 제한이 있다. 또 주사 이외에 위장관, 직장, 비강, 구강 등의 투여경로를 이용할 수 있지만 흡수부위에서의 심한 효소적 분해와 매우 낮은 생체막 투과성으로 인하여 생체이용률이 매우 낮다. 이를 극복하기 위해 분

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

해효소 억제제,[1-4] 투과촉진제[5-7]를 이용해 왔으며, 펩타이드 구조를 변화시켜 효소분해에 대해 안정성을 향상시키거나 막투과의 향상을 도모하여 왔다.[3,8,9]

저자 등은 생리활성 펜타펩타이드인 엔케팔린류와 이의 합성유사체류를 모델 펩타이드로 하여 수용액에서의 물리화학적 안정성을 검토하였고[10-12] 토끼의 비강 직장 및 질 점막 추출액에서의 효소적 분해 정도와 속도를 검토하여 보고하였다.[10,13-15] 투여부위인 점막부위에서 천연 엔케팔린인 메치오닌엔케팔린과 로이신엔케팔린은 주로 아미노펩티다제류에 의해 비강〈질〈직장 점막의 순으로 신속히 분해되었다. 한편 아미노펩티다제류의 활성에 대한 저항성이 크도록 설계되어 합성된 [D-알라$^2$]-메치오닌엔케팔린아미드와 [D-알라$^2$]-로이신엔케팔린아미드는 엔도펩티다제류에 의해 느리게 분해되었다. 또 저자 등[4]은 점막 부위에서 효소적 분해로부터 메치오닌엔케팔린을 보호하기 위해 수종의 효소억제제의 분해억제효과를 검토한 결과 단독 사용한 경우 만족할 만한 억제효과가 얻어지지 않았으나 아미노펩티다제 억제제인 아마스타틴과 이의 강력한 억제제로 밝혀진 치메로살, metalloenzyme의 억제제인 에데트산나트륨 (EDTA) 3종을 혼합사용한 경우 경점막 수송이 가능할 정도로 충분한 안정화가 이루어졌음을 보고하였다. 또 [D-알라$^2$]-메치오닌엔케팔린아미드에 대해서는 치메로살과 EDTA의 2종 혼합 효소억제제만으로도 효소적 분해를 충분히 억제시킬 수 있었다.[13]

본 연구에서는 토끼의 비강, 직장 및 질 점막 추출액 중 로이신엔케팔린 (Leu-Enk)과 [D-알라$^2$]-로이신엔케팔린아미드 (YAGFL)의 효소적 분해를 억제하여 안정화시키고자 여러 효소억제제의 영향을 단독 또는 혼합 사용하여 속도론적으로 검토하였으며 -시클로덱스트린 유도체류의 영향을 검토하였다.

## 실험방법

### 실험 동물

실험동물로는 New Zealand White계 체중 2.5-3.0 kg의 토끼 암컷을 서울대학교 의과대학 동물실로부터 구입하여 사용하였다.

### 재료 및 시약

펩타이드류로는 천연 엔케팔린으로 Leu-Enk (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu, 초산염), 합성 유사체로 YAGFL (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-$NH_2$, 초산염)을 사용하였고, 억제제로는 아마스타틴 (염산염, AM), 치메로살 (TM), 푸로마이신 (PM), 치오르판 (TP), N-carboxymethyl-Phe-Leu (CPL), EDTA, 페닐에칠알코올 (PEA), 초산페닐수은 (PMA), 염화벤잘코늄 (BC) 등을 Sigma Chem. Co.에서 구입하여 썼고 디메칠-β-시클로덱스트린 (DM-β-CyD, Sigma Chem. Co.) 및 2-히드록시프로필-β-시클로덱스트린 (HP-β-CyD, 분자치환도: 0.45, Janssen Chimica)은 안정화제로 사용하였다. 또 내부표준물로 Phe-Leu, 이온회합제로 헵탄설폰산나트륨 (Sigma Chem. Co.)을 사용하였으며 아세토니트릴, 메탄올은 시판 HPLC급을 사용하였고 정제수로는 증류수를 초순수제조기 (Elgastat, UHQ PS)를 통과시킨 것 (18 MΩ)을 썼다. 기타 시약은 시판 특급을 사용하였다.

### 점막 추출액중 Leu-Enk 및 YAGFL의 효소적 분해 억제 실험

Chun 등[10]의 방법에 따라 신선하게 적출한 토끼의 비강, 직장 및 질점막을 Valia-Chien 투과 장치의 half-cell 사이에 점막 측이 donor 셀을 향하도록 하여 마운팅하고 donor 및 receiver cell측에 각각 등장 인산염완충액 (비강: pH 8.0, 직장: pH 7.2 , 질: pH 6.0, 장막측: pH 7.4)을 각각 3.5 m*l*씩 넣어 채우고 37°C에서 8시간씩 magnetic star-head bar로 교반하여 추출하였다. 매 추출액은 따로따로 냉장고에 보존하였다. 이와 같은 추출 조작을 3회 실시하고 모든 추출액을 합하여 donor cell로부터 취한 추출액을 점막측 추출액, receptor cell로부터 취한 추출액을 장막측 추출액 으로 하였다. 모든 추출액은 최종 추출 완료후 30분 이내에 시험에 사용하였다.

각 점막 추출액 800 μ*l*에 효소억제제 원액 50 μ*l*씩을 넣고 펩타이드 시료 원액 (1,000 μg/m*l*) 50 μ*l*를 넣고 생리식염액을 넣어 1,000 μ*l*로 한 다음 60 rpm으로 흔들면서 37°C에서 Leu-Enk는 6시간에 걸쳐, YAGFL은 12 또는 24시간에 걸쳐 incubation하였다. 효소억제제류의 최종농도는 AM 50 μM, TP 50 μM, TM 0.5 mM, EDTA5 mM 등으로 하였으며 필요시 농도를 적의 변화시켰다. 미리 설정된 시간 간격으로 시료 100 μ*l*씩 취하여 내부표준물질을 함유한 pH 2.2 인산염완충액 400 μ*l*에 넣어 효소반응을 정지시키고 이 액 20 μ*l*를 HPLC에 주입하여 다음의 분석법에 따라 잔존 펩타이드의 양을 정량하였다.

### 점막 추출액중 Leu-Enk 및 YAGFL의 정량

HPLC법에 따라 정량하였다. 칼럼으로는 옥타데실실란 역상 지지체가 충전된 스테인레스 스틸 칼람 (4.6

mm×15 cm, 5 μm, Ultrasphere C8 column)을 쓰고 guard 칼럼 (Ultrasphere C8, 4.6×45 mm)을 부착시켰다. 이동상으로는 펩타이드의 종류에 따라 Leu-Enk과 YAGFL에 대해서 0.05M 인산염완충액 및 아세토니트릴 혼합액 (74: 26 v/v)을 쓰고 fragment가 작은 경우는 같은 성분의 90:10 (v/v) 혼합액을 써서 정량하였다. 이동상은 모두 이온회합제로 0.1% 헵탄설폰산나트륨을 함유시켰다. 검출은 UV 214 nm에서, 유속은 1.0 ml/min으로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 수종의 효소억제제가 Leu-Enk의 효소분해 억제에 미치는 영향

*아미노펩티다제 억제제에 의한 Leu-Enk 분해 억제 효과*—점막 균등질 및 추출액중 Leu-Enk의 분해가 주로 아미노펩티다제류에 의해 이루어진다는 사실이 밝혀졌기 때문에[14,16] 아미노펩티다제의 억제제로 알려진 AM과 PM을 저농도와 고농도로 비강, 직장 및 질 점막의 점막측 추출액과 장막측 추출액에 각각 첨가하고 그 영향을 경시적으로 관찰하였다. 비강 및 직장 점막 추출액에서의 결과를 각각 Fig. 1에 나타내었다. 또 이들 결과를 가지고 1차식에 따라 겉보기 분해속도정수와 반감기를 구하여 Table I에 정리하였다. 비강, 직장 및 질의 점막측 추출액에 AM을 고농도

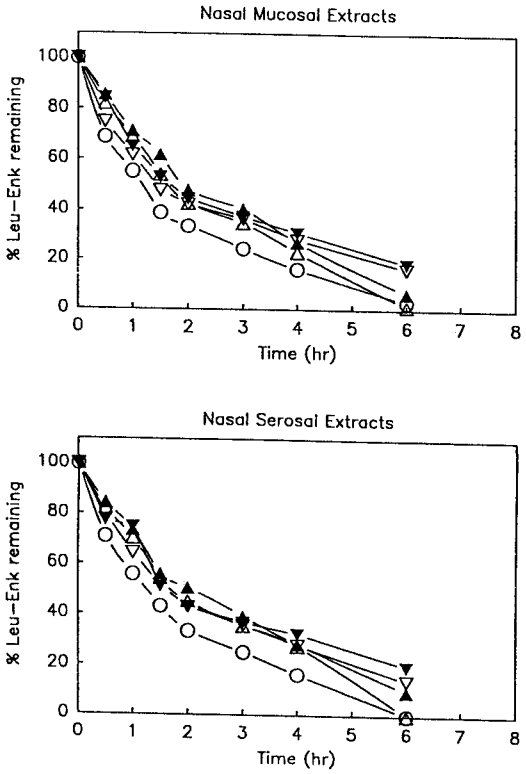


**Figure 1**—Effect of AM amd PM on the degradation of Leu-Enk (50 g/m*l*) in the nasal mucosal and serosal extracts at 37°C. Each point represents the mean of three determinations.
Key: ○: no inhibitor, △: 10 M AM, ▲: 50 M AM, ▽: 100 M PM, ▼: 500 M PM

**Table I**—*Effect of Two Aminopeptidase Inhibitors, AM and PM, on the First-Order Rate Constants (k) and Half-Lives ($t_{1/2}$) for the Degradation of Leu-Enk in Various Absorptive Mucosa Extracts*

| Mucosa | Inhibitor | Mucosal extract | | Serosal extract | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | k (x $10^2$, $hr^{-1}$) | $t_{1/2}$ (hr) | k (x $10^2$, $hr^{-1}$) | $t_{1/2}$ (hr) |
| Nasal | No inhibitor | 80.10(21.20) | 1.07(0.27) | 78.70(37.05) | 1.56(0.50) |
| | AM 10 μm | 64.87(30.00) | 1.94(0.69) | 55.60(26.27) | 2.31(0.82) |
| | AM 50 μm | 61.76(31.50) | 2.21(0.74) | 58.56(28.64) | 2.51(1.06) |
| | PM 100 μm | 57.69(30.56) | 2.48(0.82) | 54.79(23.07) | 2.05(0.59) |
| | PM 500 μm | 52.92(24.96) | 2.42(0.86) | 61.43(34.30) | 2.62(0.93) |
| Rectal | No inhibitor | 206.40(28.41) | 0.33(0.03) | 185.71(42.70) | 0.45(0.11) |
| | AM 10 μm | 87.31(16.86) | 0.92(0.23) | 53.73(16.14) | 1.72(0.51) |
| | AM 50 μm | 71.44(14.46) | 1.15(0.30) | 55.97(16.07) | 1.71(0.58) |
| | PM 100 μm | 6.47(14.89) | 1.28(0.36) | 53.39(13.47) | 1.75(0.62) |
| | PM 500 μm | 66.07(13.87) | 1.27(0.35) | 47.05(16.46) | 2.51(1.09) |
| Vaginal | No inhibitor | 130.90(49.81) | 1.14(0.59) | 127.33(34.51) | 0.80(0.31) |
| | AM 10 μm | 30.36(8.44) | 2.77(0.58) | 38.78(11.11) | 2.20(0.49) |
| | AM 50 μm | 21.24(3.78) | 3.54(0.52) | 30.22(10.35) | 3.05(0.74) |
| | PM 100 μm | 25.61(5.85) | 3.18(0.72) | 45.27(20.80) | 2.58(0.76) |
| | PM 500 μm | 24.54(6.52) | 3.40(0.74) | 32.03(14.87) | 3.78(1.21) |

Data were expressed as the mean ( SEM) of the results obtained from the extracts of three rabbits. The concentration of Leu-Enk in the extract was 50 μg/m*l*.

(50 μM)로 첨가한 경우 Leu-Enk의 분해속도정수를 각각 약 1.30, 2.89 및 6.16배 감소시켰으며 PM을 고농도 (500 μM)로 첨가한 경우도 각각 약 1.51, 3.12 및 5.33배 억제시켰다. 점막 추출액에 있어서 AM이나 PM에 의한 Leu-Enk의 억제효과는 질 〉 직장 〉 비강의 순이었다.

비강 점막 추출액에서는 Leu-Enk의 분해에 대한 AM이나 PM의 효과가 미약하였다. 또한 점막측과 장막측 추출액에 있어서 분해억제효과도 유사하였으며 고농도와 저농도 간에도 현저한 차이는 없었다. 직장이나 질 점막 추출액에서는 AM이나 PM에 의해 분해가 상당히 지연되었으나 경점막 수송을 도모하기에는 이 결과로는 미흡하다. 특히 비강 점막에서 아미노펩티다제 억제제의 효과가 직장이나 질 점막에 비에 현저히 낮은 것은 비강 점막에 엔도펩티다제류, 즉 디펩티딜아미노펩티다제와 디펩티딜카르복시펩티다제의 활성이 상대적으로 높기 때문인 것으로 생각된다.[4,14] 이러한 점 때문에 엔도펩티다제류의 존재로 아미노펩티다제류가 충분히 억제된다 하더라도 Leu-Enk의 분해가 상당히 진행되는 것으로 추정된다.

한편 이들 점막의 점막측 추출액에 DM-β-CyD를 10%의 농도로 첨가하고 Leu-Enk의 분해억제 효과를 검토한 결과 Table II에서와 같이 비강, 직장 및 질 점막 추출액에서 각각 1.72, 2.79 및 2.65배 억제시켰다. 이러한 결과는 분해효소의 열역학적 활동도의 저하와 포접으로 인한 보호효과에 의한 것으로 추정된다. 그러나 전체적으로 보면 아미노펩티다제 하나의 억제제나 하나의 첨가제만으로는 충분한 분해 억제효과를 얻을 수 없음을 알 수 있다.

*수종 효소 억제제류에 의한 Leu-Enk 분해 억제효과*

—아미노펩티다제 억제제로 AM, 엔케팔리나제 억제제인 TP, 킬레이트화제인 EDTA 및 살균제인 TM을 단독 또는 혼합하여 비강, 직장 및 질 점막의 점막측 및 장막측 추출액에 첨가하고 경시적인 잔존률을 측정하였다. 비강 점막의 점막측 및 장막측 추출액 중에서의 분해억제 거동을 Fig. 2에 나타내었다. 직장 및 질 점막 추출액에서도 억제제의 첨가에 의한 분해억제 거동은 비강 점막에서와 유사하였다. 비강, 직장 및 질 점막 추출액 중에서 Leu-Enk의 분해를 억제시키는 데는 모든 점막 추출액에서 AM/TM/EDTA 또는

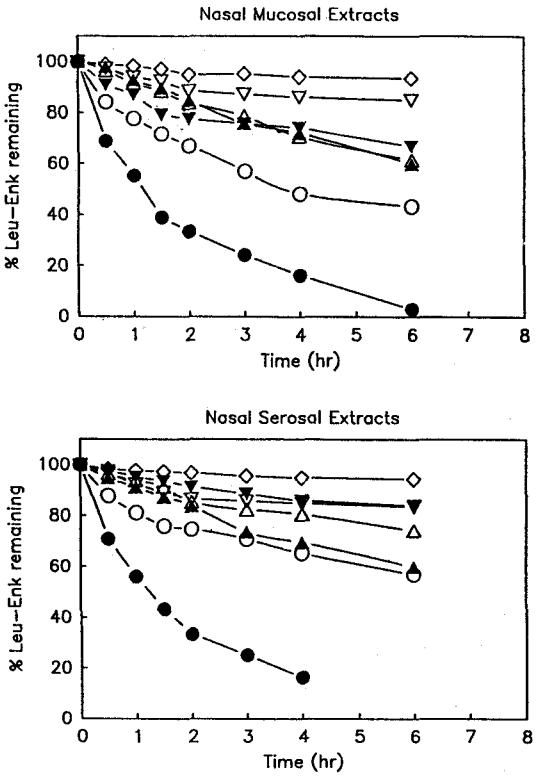


**Figure 2**—Time-course inhibition profiles for the degradation of Leu-Enk (50 μg/m*l*) in the nasal mucosal and serosal extracts in the presence of various enzyme inhibitors at 37°C. Each point represents the mean of three determinations.
Key: ●: no inhibitor, ○: 0.25 mM TM, △: 0.25 mM TM/50 M AM, ▲: 0.25 mM TM/50 M TP, ▽: 0.25 mM TM/5 mM EDTA, ▼: 0.25 mM TM/5 mM EDTA/ 50 μM TP, ◇: 0.25 mM TM/5 mM EDTA/ 50 μM AM

**Table II**—*Effect of DM-β-CyD* on the First-Order Rate Constants (k) and Half-Lives ($t_{1/2}$) for the Degradation of Leu-Enk in Various Absorptive Mucosal Extracts

| Mucosal extract | k ($hr^{-1}$) | | | $t_{1/2}$ (hr) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | None($k_o$) | with DM-β-CyD($k_{DMCD}$) | $k_o/k_{DMCD}$ | None | with DM-β-CyD |
| Nasal | 0.55(0.08) | 0.32(0.02) | 1.72 | 1.43(0.24) | 2.16(0.14) |
| Rectal | 2.40(0.09) | 0.86(0.01) | 2.79 | 0.29(0.01) | 0.81(0.01) |
| Vaginal | 1.83(0.39 | 0.69(0.15) | 2.65 | 0.42(0.09) | 1.11(0.24) |

Data were expressed as the mean (±SEM) of three determinations. The concentrations of Leu-Enk and DM-β-CyD in the extract were 50 g/m*l* and 10.0%, respectively.

**Table III**—*Effect of Various Inhibitors on the First-Order Rate Constants (k) and Half-Lives ($t_{1/2}$) for the Degradation of Leu-Enk in Various Absorptive Mucosa Extracts Containing 0.01% Thimerosal*

| Mucosa | Inhibitor | Mucosal extract | | Serosal extract | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | k (x $10^2$, $hr^{-1}$) | $t_{1/2}$ (hr) | k (x $10^2$, $hr^{-1}$) | $t_{1/2}$ (hr) |
| Nasal | No inhibitor | 80.10(21.20) | 1.07( 0.27) | 78.70(37.05) | 1.56( 0.50) |
| | TM(A) | 17.30( 4.40) | 5.37( 1.83) | 8.51( 0.85) | 8.41( 0.84) |
| | (A)+AM(B) | 8.99( 3.20) | 12.44( 4.88) | 4.91( 0.56) | 14.30( 1.16) |
| | (A)+TP(C) | 8.17( 2.79) | 13.07( 4.92) | 9.48( 3.06) | 9.46( 2.21) |
| | (A)+EDTA(D) | 2.85( 0.67) | 31.18( 9.86) | 2.83( 0.31) | 25.61( 3.24) |
| | (A)+(C)+(D) | 6.83( 1.37) | 12.03( 3.15) | 2.70( 0.23) | 24.24( 3.45) |
| | (A)+(B)+(D) | 1.19( 0.33) | 86.13(34.14) | 0.98( 0.10) | 73.52( 8.19) |
| Rectal | No inhibitor | 206.40(28.46) | 0.33( 0.03) | 185.71(42.70) | 0.45( 0.11) |
| | TM(A) | 36.90( 4.97) | 1.99( 0.29) | 30.76( 1.58) | 2.27( 0.12) |
| | (A)+AM(B) | 17.61( 0.77) | 3.96( 0.17) | 5.24( 1.15) | 15.97( 4.28) |
| | (A)+TP(C) | 30.92( 4.71) | 2.44( 0.45) | 26.35( 2.04) | 2.68( 0.19) |
| | (A)+EDTA(D) | 3.140( 0.23) | 22.40( 1.49) | 2.59( 0.11) | 26.86( 1.11) |
| | (A)+(C)+(D) | 2.51( 0.36) | 29.75( 4.92) | 2.02( 0.37) | 38.78( 8.40) |
| | (A)+(B)+(D) | 1.28( 0.24) | 63.38(15.80) | 1.45( 0.39) | 59.46(15.21) |
| Vaginal | No inhibitor | 130.90(49.81) | 1.14( 0.59) | 127.33( 0.33) | 0.80( 0.31) |
| | TM(A) | 16.19( 3.95) | 5.20( 3.05) | 22.40( 8.65) | 4.47( 1.20) |
| | (A)+AM(B) | 6.80( 3.65) | 21.78( 7.45) | 8.01( 5.18) | 28.97(10.50) |
| | (A)+TP(C) | 9.40( 3.85) | 11.89( 4.02) | 11.30( 5.97) | 12.53( 4.06) |
| | (A)+EDTA(D) | 1.21( 0.20) | 63.15(11.63) | 1.14( 0.06) | 61.54( 3.33) |
| | (A)+(C)+(D) | 1.42( 0.21) | 51.88( 7.04) | 1.52( 0.26) | 48.34( 6.73) |
| | (A)+(B)+(D) | 1.15( 0.23) | 69.68(16.36) | 1.13( 0.10) | 62.41( 5.08) |

Data were expressed as the mean ( SEM) of the results obtained from the extracts of three rabbits. The concentration of Leu-Enk in the extract was 50 g/ml. The concentrations of inhibitors in the extracts were 50 M for AM and TP, and 5 mM for EDTA.

TM/EDTA의 혼합 효소억제제가 가장 효과적이었으며 효소억제제를 사용하지 않은 경우 비강, 직장 및 질 점막의 점막측 추출액에서 1.5시간 후 Leu-Enk의 잔존율이 각각 38.94 (±16.41), 2.42 (±1.97) 및 29.92 (±17.57) % 이었던 것이 TM (0.25 mM)/AM (50 μM)/EDTA (5 mM)의 3종 효소억제제를 사용함으로써 6시간 후에도 모두 90% 이상을 나타내었다. 이러한 결과는 장막측 추출액에서도 유사하게 나타났다. 이러한 결과를 가지고 1차식에 따라 분해속도정수와 분해반감기를 구한 결과 Table III에서와 같이 TM/AM/EDTA의 3종 억제제가 첨가된 경우 비강, 직장 및 질 점막의 점막측 추출액중 Leu-Enk의 분해속도정수를 약 61.3, 161.3 및 113.8배 감소시켰다.

TM 단독으로도 Leu-Enk의 분해억제에 상당한 효과가 있었다. 더욱 TM과 혼합하여 사용하였을 때 개개의 억제제 효과를 보면 그 크기는 EDTA〉AM〉TP의 순으로 나타나 엔케팔리나제 A의 선택적인 억제제로 알려진 TP의 분해억제효과는 그다지 인정되지 않았다. 점막부위에서 Leu-Enk의 경점막 수송을 도모하기에 충분한 안정화는 3종의 혼합 효소억제제를 첨가하였을 때 얻어졌다. 이것은 메치오닌엔케팔린이나 Leu-Enk의 경우 아미노펩티다제류가 분해의 80% 이상을 기여하고 있으나 디펩티딜카르복시펩티다제 (엔케팔리나제 A) 및 디펩티딜아미노펩티다제 (엔케팔리나제 B와 같은 엔도펩티다제류도 분해에 어느 정도 관여하고 있기 때문에 TM/AM/EDTA의 혼합 효소억제제가 이들 3종의 효소활성을 모두 억제하기 때문인 것으로 생각된다. 실제로 메치오닌엔케팔린에 대한 저자 등[4]의 보고에서 TM이 엔케팔리나제 B를 강력히 억제하고 동시에 아미노펩티다제류와 엔케팔리나제 A도 상당히 억제하며, EDTA가 Zn을 cofactor로 필요로 하는 엔케팔리나제 A와 아미노펩티다제를 현저히 억제하는 것을 밝힌 바 있다. 따라서 이러한 복합적인 효소 억제작용에 의해 Tyr-Gly bond, Gly-Gly bond 및 Gly-Phe bond를 절단하는 3종의 효소를 동시에 억제함으로써 점막부위에서 매우 불안정한 Leu-Enk의 안정화가 달성된 것으로 생각된다.

### 수종의 효소억제류가 YAGFL의 분해억제에 미치는 영향

*효소억제제에 따른 YAGFL의 분해억제 효과*—비강, 직장 및 질 점막의 점막측 및 장막측 추출액을 같은 양으로 섞은 액에 TM, BC 및 EDTA의 농도를 순차로 달리 하여 첨가하고 12시간 incubation한 후의 YAGFL 잔존율로부터 억제율 (% inhibition)을 구하여 log C (M)에 대하여 플로트한 결과 Fig. 3에서와 같이 농도 의존적인 분해억제 거동을 나타내었다. 이에서 보면 $1\times10^{-5}$M 농도 이하에서는 그 억제효과의 크기가 TM〉BC〉EDTA의 순으로 나타났으며 이 농도 이상에서는 BC가 TM보다 높은 억제율을 나타내었다. 분해억제의 농도 의존성으로부터 분해정도를 50% 억제하는 데에 요하는 농도 ($IC_{50}$)를 Fig. 3으로부터 구한 결과 비강 점막 추출액에서 TM이 0.85 μM, BC가 9.86 μM, EDTA가 73.7 μM로 나타났고, 직장 점막 추출액에서는 TM이 1.57 μM, BC가 7.03 μM, EDTA가 20.6 μM이었으며, 질점막 추출액에서는 TM이 3.22 μM, BC가 6.92 μM, EDTA가 41.7 μM로 측정되었다. 이와 같이 $IC_{50}$으로부터 볼 때 TM이 양호한 억제제임을 알 수 있다. 그러나 TM을 고농도로 사용하더라도 YAGFL의 분해를 완전히 억제하지는 못하였기 때문에 억제제류의 혼합 사용이 요구되었다.

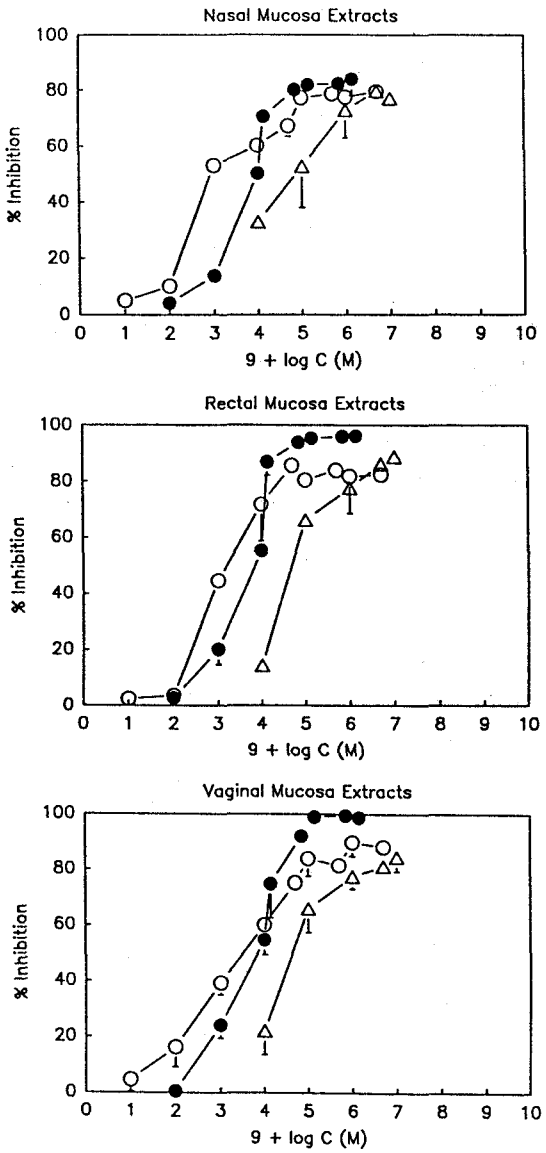


**Figure 3**—Effects of some additives on the degradation of YAGFL (50 μg/m*l*) in various mucosa extracts after 12 hr-incubation at 37°C. Each point represents the mean (± S.D.) of three determinations.
Key: ○: TM, ●: BC, △: EDTA

Fig. 4는 엔케팔리나제의 강력한 억제제로 알려진 N-carboxymethyl-Phe-Leu (CPL)[17]을 3종의 점막 추출액에 농도를 순차로 달리 하여 첨가하고 12 시간 incubation한 후 YAGFL의 잔존률을 CPL의 농도에 대해 플로트한 것으로 $1\times10^{-6}$M 농도에서부터 $1\times10^{-3}$M 농도까지는 오히려 YAGFL의 분해가 촉진되는 것으로 나타났으며 이 농도 이상에서는 약간의 억제 경향이 있었으나 별다른 효과는 없었다. 또한 TM과 구조적으로 유사한 PEA과 PMA를 0.1 mM 농도로 점막 추출액에 첨가하고 12시간 incubation한 후 YAGFL의 분해 억제율을 측정하였다. PEA를 첨가한 경우 비강, 직장 및 질 점막 추출액에서 분해 억제율이 각각 71.87 (±7.18), 26.27 (±5.53) 및 77.74 (±1.80)% 이었으며 PMA를 첨가한 경우는 각각 76.96

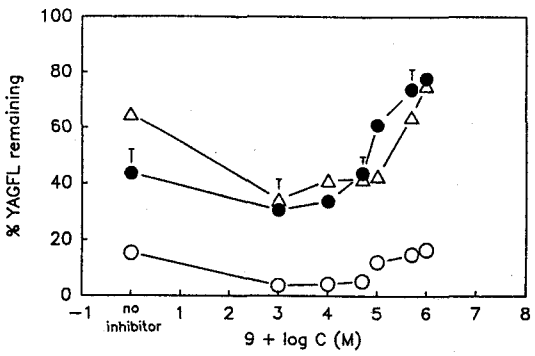


**Figure 4**—Effects of N-carboxymethyl-Phe-Leu concentrations on the degradation of YAGFL (50 μg/m*l*) in various mucosal extracts after 12-hr incubation at 37°C. Each point represents the mean (± S.D.) of three determinations.

(±6.67), 83.92 (±3.41) 및 86.66 (±4.23)%로 나타났다. 이 때 PMA를 첨가한 경우 YAGFL의 잔존율이 비강, 직장 및 질 점막 추출액에서 12시간 후 각각 97.75 (±6.67), 83.92 (±3.41) 및 86.65 (±4.23)로 상당한 안정화 효과가 얻어졌다. 그러나 PMA의 수용액중 용해성이 매우 나쁘고 독성의 문제가 있어 사용에는 제한이 있다.

따라서 억제제 단독으로도 억제효과가 크게 나타난 EDTA와 BC를 각각 5 mM 및 141 μM 농도로 혼합하고 이 혼합계가 YAGFL의 분해억제에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과 Fig. 5에서와 같이 비강, 직장 및 질 점막 추출액에서 12 시간후 억제율이 각각 90.1 (±1.60), 99.04 (±0.77) 및 89.22 (±9.74)%로 매우 높게 나타났다. 이러한 결과는 BC도 EDTA와 혼합하여 사용할 때 유용한 억제제로 활용될 수 있음을 의미한다. 더욱 EDTA (5 mM)와 혼합하는 경우 TM과 BC의 효과를 비교하기 위해 이들을 동일한 저농도 (10 μM)로 첨가하고 분해억제 효과를 비교한 결과 Fig. 6에서와 같이 유의한 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 TM 대신에 BC를 대체하여 사용할 수 있음을 나타낸다.

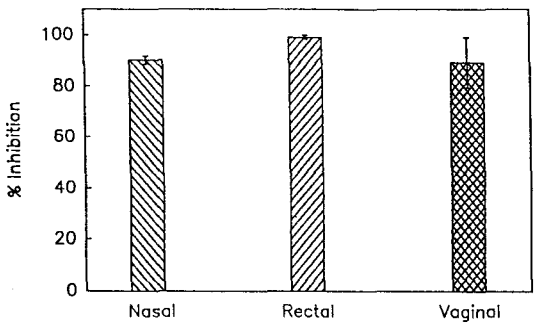


**Figure 5**—Effects of a mixture of BC (141 μM) and EDTA (5 mM) on the inhibition of YAGFL (50 μg/m*l*) degradation in various mucosa extracts after 12 hr-incubation at 37°C. Data were expressed as the mean (± S.D.) of three determinations.

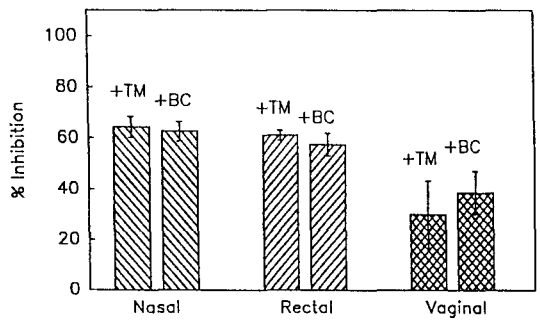


**Figure 6**—Effects of the addition of TM (10 μM) or BC (10 μM) to EDTA (5 mM) on the inhibition of YAGFL (50 μg/m*l*) degradation in various mucosa extracts after 12 hr-incubation at 37°C. Data were expressed as the mean (± S.D.) of three determinations.

*혼합 효소억제제에 의한 YAGFL 분해억제 효과*—아미노펩티다제류에 대한 저항성을 높인 합성유사체라 하더라도 점막추출에서 비교적 빠른 속도로 분해되기 때문에 이의 경점막 수송을 도모하기 위해서는 투여부위인 점막부위에서나 투과 과정 중 효소적 분해로부터 충분히 안정화시킬 필요가 있다. 따라서 AM, TP, EDTA 및 TM을 단독 또는 혼합하여 비강, 직장 및 질 점막의 점막측 및 장막측 추출액에 첨가하고 24시간에

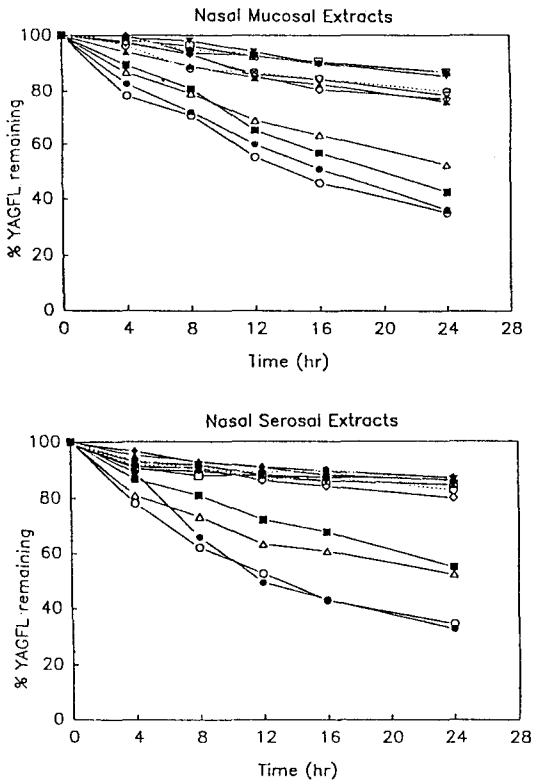


**Figure 7**—Time-course inhibition profiles for the degradation of YAGFL (50 μM) in the nasal mucosal and serosal extracts in the presence of various inhibitors at 37°C. Each point represents the mean of three determinations.
Key: ○: no inhibitor, ●: 50 μM AM, △: 50 μM TP, ▲: 5 mM EDTA, □: 0.5 mM TM, ■: 50 μM AM/50 μM TP, ▽: 50 μM AM/5 mM EDTA, ▼: 50 μM AM/0.5 mM TM, ◇: 50 μM TP/5 mM EDTA, ◆: 0.5 mM TM/5 mM EDTA, ○(dotted line): 50 μM AM/50 μM TP/5 mM EDTA, ●(dotted line): 50 μM AM/0.5 mM TM/5 mM EDTA

걸쳐 YAGFL의 경시적인 잔존률을 측정하였다. 비강 점막 의 점막측 및 장막측 추출액중에서의 잔존율-시간 프로파일을 Fig. 7에 나타내었다. 효소억제제 단독보다는 TM과 다른 억제제를 혼합하여 사용한 경우 현저한 분해억제가 이루어졌으며, 그럼으로 나타내지는 않았지만 직장 및 질 점막 추출액에서도 유사한 결과가 얻어졌다. 비강, 직장 및 질 점막추출액 중에서 YAGFL의 분해를 억제시키는 데는 전체적으로 AM/TM/EDTA 또는 TM/EDTA의 혼합 효소억제제가 가장 효과적이었다.

효소 억제제를 사용하지 않은 경우 비강의 점막측 및 장막측 추출액에서 24시간 후 YAGFL이각각 35.2 및 40.5% 잔존하였으나 TM (0.5 mM)/EDTA (5 mM)의 효소억제제를 사용함으로써 모두 85% 이상을 나타내었다. 직장의 점막측 및 장막측 추출액의 경우에도 효소억제제를 사용하지 않은 경우 24시간 후 YAGFL이 각각 10.8 및 17.8% 만이 남아 있었으나 TM (0.5 mM)/EDTA (5 mM)를 첨가하였을 때 90.5 및 88.3%의 잔존율을 나타내었다. 질의 점막측과 장막측 추출액에서도 24시간에 각각 13.7 및 23.4%의 잔존율을 보여 준 반면 TM (0.5 mM)/EDTA (5 mM)를 첨가하였을 때 92.9 및 88.9%의 잔존율을 나타내었다.

아미노펩티다제류의 억제제인 AM (50 μM)은 YAGFL을 그다지 안정화시키지 못하였다. 이는 YAGFL이 아미노펩티다제류에 대한 저항성을 높이도록 설계된 화합물임을 고려할 때 AM의 안정화 효과가 낮게 나타난 것은 메치오닌엔케팔린이나 Leu-Enk의 경우 아미노펩티다제류가 분해의 80% 이상을 기여하고 있음에 비하여 YAGFL의 분해에서는 Gly-Phe bond를 자르는 엔케팔리나제 A와 같은 엔도펩티다제류가 주로 분해에 관여하고 있음을 나타낸다.[14] 이는 AM이 D-Ala으로 치환된 엔케팔린 유사체인 [D-알라$^2$]-메치오닌엔케팔린아미드의 안정화에 영향을 주지 못하였다는 보고[13]와도 일치된다. 엔케팔리나제 A의 선택적인 억제제인 TP (50 μM)의 효과는 여러 점막 추출액에서 AM (50 μM)보다는 다소 크게 나타났으나 그 효과가 미약하였다. 한편 metalloenzyme의 억제제인 EDTA (5 mM)는 AM (50 μM)이나 TP (50 μM)보다 안정화 효과가 높았다. 이러한 효과는 아미노펩티다제와 엔케팔리나제가 $Zn^{2+}$을 필요로 하는 효소로 EDTA에 의해 이러한 금속이온이 구축되어 엔케팔리나제활성이 나타나지 못한 것에 기인한다고 생각된다.

Chun 등[4]은 점막 추출액 중 메치오닌엔케팔린의 분해억제의 연구에서 TM이 강력한 엔케팔리나제 B의 억제제로 작용하는 동시에 엔케팔리나제 A와 아미노펩티다제에 대해서도 상당한 억제효과가 있음을 보고하였다. YAGFL의 분해억제를 위해 EDTA 및 TM의 효과를 검토한 바 각각 5 mM 및 0.5 mM 농도에서 AM 및 TP보다도 훨씬 우수하였다. 그러나 효소 억제제를 단독으로 쓰는 경우에는 YAGFL 분해효소들 중 어느 한 종류에만 작용하므로 다른 분해효소 활성이 여전히 분해에 관여하여 충분한 안정화를 도모할 수 없다. 그러므로 TM/EDTA 또는 AM/TM/EDTA등의 혼합억제제를 사용하여 좋은 안정화 효과를 얻을 수 있었다.

한편 Friedman 등[18]은 Leu-Enk와 이의 수종 유사체들의 경구흡수를 도모하기 위해 흰쥐의 공장을 사용하여 관류시험을 행한 결과 Leu-Enk는 아미노펩티다제류에 의해 Tyr-Gly bond가 잘라지면서 급속히 분해되었으며 pH를 5.0 이하로 하였을 때 이 효소의 활성이 감소되었다고 하였으며 AM과 엔도펩티다제 억제제인 tripeptide, 즉 Tyr-Gly-Gly를 병용하였을 때 분해억제가 더 효과적이었다고 하였다. 한편 D-Ala가 치환된 [D-Ala$^2$]-Leu-Enk은 엔도펩티다제에 의해 Gly-Phe bond에서 가수분해된다고 하였으며 이의 분해는 AM에 의해 그다지 영향을 받지 않지만 Tyr-Gly-Gly에 의해 억제된다고 하였다. 이러한 결과는 본 연구의 결과와 많은 점에서 일치되는 것이다.

효소억제제 첨가시 YAGFL의 경시적 잔존율을 1차식에 따라 속도정수를 구하여 정리한 결과가 Table IV이다. TM (0.5 mM)/EDTA (5 mM)의 혼합 효소억제제의 존재시 YAGFL의 분해를 효소억제제가 첨가되지 않은 경우와 비교하여 비강의 점막측 및 장막측 추출액에서 각각 8.51 및 6.35배, 직장의 점막측 및 장막측 추출액에서는 각각 16.93 및 15.80배, 질점막의 점막측 및 장막측 추출액의 경우 각각 37.57 및 9.71배 분해속도를 감소시켰으며 24시간 후 모든 추출액에서 85% 이상 YAGFL을 안정화시켰다. YAGFL의 분해는 주로 엔케팔리나제 A에 의해 이루어지며 엔케팔리나제 B와 아미노펩티다제류도 일부 관여하고 있을 것으로 추정되나 그 정도는 엔케팔리나제 A의 활성에 비해 매우 미약한 것으로 생각된다.

*수식화된 시클로덱스트린류에 의한 YAGFL 분해억제 효과*—수식화된 β-시클로덱스트린 유도체로 DM-

**Table IV**—*Effect of Various Enzyme Inhibitors on the First-Order Rate Constants for the Degradation of YAGFL in Various Rabbit Mucosa Extracts at 37°C*

| Inhibitor | First-order rate constant [1] (x $10^2$ $hr^{-1}$, ± SEM) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Nasal extract | | Rectal extract | | Vaginal extract | |
| | Mucosal | Serosal | Mucosal | Serosal | Mucosal | Serosal |
| No inhibitor | 4.099(4.354) | 4.180(0.196) | 11.156(5.190) | 7.787(1.144) | 10.220(7.806) | 6.379(2.031) |
| AM(50 μM) (A) | 8.850(6.982) | 5.180(3.132) | 10.180(0.393) | 4.757(0.171) | 12.053(7.726) | 7.466(2.669) |
| TP(50 μM) (B) | 2.215(0.438) | 2.567(0.399) | 14.710(5.286) | 6.104(0.457) | 7.736(4.938) | 5.240(0.236) |
| EDTA(5 mM) (C) | 0.316(0.053) | 1.050(0.745) | 1.325(0.050) | 1.516(0.293) | 0.555(0.257) | 1.375(0.436) |
| TM(0.5 mM) (D) | 0.508(0.138) | 0.628(0.015) | 0.572(0.115) | 0.665(0.041) | 0.573(0.270) | 0.998(0.225) |
| (A)+(B) | 2.309(0.071) | 3.394(1.148) | 7.129(0.438) | 5.180(1.235) | 5.398(4.014) | 7.355(3.418) |
| (A)+(C) | 0.356(0.036) | 1.087(0.470) | 1.148(0.021) | 1.152(0.128) | 0.433(0.095) | 0.949(0.027) |
| (A)+(D) | 0.359(0.013) | 0.795(0.020) | 0.625(0.018) | 1.1 02(0.166) | 0.463(0.055) | 0.682(0.177) |
| (B)+(C) | 0.701(0.246) | 1.250(0.040) | 1.213(0.118) | 1.498(0.390) | 0.643(0.031) | 1.602(0.951) |
| (C)+(D) | 0.482(0.075) | 0.659(0.231) | 0.437(0.115) | 0.493(0.014) | 0.272(0.175) | 0.657(0.006) |
| (A)+(B)+(C) | 0.551(0.152) | 0.852(0.230) | 1.171(0.040) | 1.048(0.093) | 0.526(0.292) | 1.100(0.270) |
| (A)+(C)+(D) | 0.367(0.105) | 0.647(0.076) | 0.688(0.037) | 0.669(0.073) | 0.369(0.105) | 0.522(0.146) |

Data were ecpressed as the means (± SEM) of the data obtained from three rabbits.

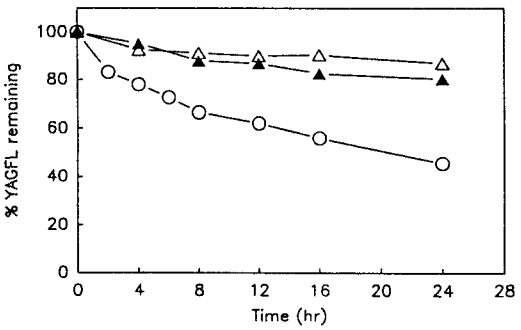


**Figure 8**—Effect of modified cyclodextrins (10%) on the degradation of YAGFL (50 μg/m*l*) in the nasal mucosal extracts.
Key: ○: no additive, △: DM-β-CyD, ▲: HP-β-CyD

β-Cy과 HP-β-CyD를 사용하여 비강, 직장 및 질 점막 추출액에 넣어 10%가 되도록 하고 이들이 YAGFL (50 μg/m*l*)의 분해에 미치는 영향을 경시적으로 검토하였다. 수식화된 CyD의 존재시 비강 점막 추출액 중 YAGFL의 잔존율-시간 프로파일의 예를 Fig. 8에 나타내었다. 이에서 보는 바와 같이 수식화된 CyD류의 첨가시 YAGFL의 분해를 현저히 억제시켰다. 그러나 여러 추출액중 YAGFL의 분해억제에 있어서 DM- 및 HP-β-CyD 간에는 별다른 차이가 없었다. 또 비강점막 추출액을 이용하여 DM- 및 HP-β-CyD의 농도를 각각 5, 10, 20%가 되도록 변화시켜 YAGFL의 분해에 미치는 CyD류의 농도영향을 검토한 결과 농도에 따른 차이는 두드러지지 않았다. 여러 점막 추출액중 YAGFL의 경시적 잔존율로부터 겉보기 1차 분해속도 정수를 구하여 Table V에 나타내었다. 비강, 직장 및 질 점막추출액 중 10% DM-β-CyD의 존재시 24시간 후 YAGFL은 추출액 단독에 비해서 그 분해속도를 각각 8.5, 9.5 및 18.2배 억제시켰다. 2종의 CyD 모두 16시간 incubation후 YAGFL의 잔존율을 직장 및 질 점막 추출액에서는 80% 이상을, 직장 점막추출액에서는 60% 이상을 잔존시켰다. 이와 같이 수용성이 높은 수식화된 β-CyD 유도체들에 의해 YAGFL이 점막 추출액에서 현저히 안정화된 것은 수용액중에서 HP-β-CyD가 YAGFL의 분해억제에 별다른 영향이 없었으나[12] 점막 추출액에서는 CyD류가 YAGFL에 대한 분해효소의 공격을 차단하여 분해효소로부터 보호된 때문인 것으로 추정된다. 그러나 그 주된 기전이 CyD류가 YAGFL를 포접하여 보호된 것인지에 대해서는 더욱 검토되어야 할 것이다. 한편 HP-β-CyD는 ovine 성장호르몬, interleu-

**Table V**—*Effect of Modified Cyclodextrins on the Degradation of YAGFL in Various Rabbit Mucosal Extracts at 37°C*

| | First-order rate constant ($hr^{-1}$, x $10^{-3}$) | | |
|---|---|---|---|
| | Nasal | Rectal | Vaginal |
| None | 24.93(2.16) | 265.71(36.72) | 99.40(10.15) |
| DM-β-CyD | 2.93(0.27) | 27.93(4.42) | 5.47(0.18) |
| HP-β-CyD | 8.14(0.73) | 67.30(9.33) | 6.94(1.74) |

Data were extressed as the means (± SEM) of three determinations. The concentrations of YAGFL and DM-β-CyD in the extract were 50 μg/m*l* and 10.0%, respectively.

kin-2, 종양괴사인자 및 macrophage-colony stimulating factor를 가용화시켰으며 인슐린의 응집과 분해를 억제시켰을 뿐만 아니라[19] 수용액 중 aspartame 분해도 억제되었다.[20] 또한 secretin, LHRH 및 인슐린 등이 CyD류에 의해 생체막 흡수성이 향상되었다는 보고들로부터[21-24] CyD류가 점막 투여부위에서 생리활성 펩타이드류의 분해억제, 가용화 및 흡수촉진 등 유용한 제제첨가제로 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 결 론

생리활성 펜타펩타이드로서 로이신엔케팔린 (Leu-Enk)의 유사체인 [D-알라$^2$]-로이신엔케팔린아미드 (YAGFL)에 대해 토끼의 비강, 직장 및 질 점막 추출액 중에서의 효소적 분해를 억제시키고자 효소억제제류와 수식화된 시클로덱스트린의 효과를 검토하였다. 그 결과 얻은 주된 결론은 다음과 같다.

1. 비강, 직장 및 질의 점막측 추출액에 AM을 고농도 (50 μM)로 첨가한 경우 Leu-Enk의 분해속도정수를 각각 약 1.30, 2.89 및 6.16배 감소시켰으며 PM을 고농도 (500 μM)로 첨가한 경우도 각각 약 1.51, 3.12 및 5.33배 억제시켰으나 AM 단독으로는 충분한 안정화효과가 없었다. 점막 추출액에 있어서 AM이나 PM에 의한 Leu-Enk의 억제효과는 질 〉 직장 〉 비강의 순이었다.

2. TM/AM/EDTA의 3종 억제제가 첨가된 경우 비강, 직장 및 질 점막의 점막측 추출액중 Leu-Enk의 분해속도정수를 약 61.3, 161.3 및 113.8배 감소시켰으며 6시간 후에도 90% 이상 안정화시켰다.

3. YAGFL의 점막 추출액중 효소분해에 대한 첨가제류의 분해억제효과는 TM 〉 BC 〉 EDTA 순으로 TM이 가장 강력한 억제제로 밝혀졌다. CPL과 PEA은 별다른 억제효과가 없었으며 PMA를 첨가한 경우에는 상당한 안정화효과가 있었으나 PMA 자체의 용해성과 독성에 문제가 있어 사용에는 제한이 있었다.

4. 비강, 직장 및 질 점막 추출액에 AM, TP, TM, BC, EDTA 등의 효소억제제를 단독 또는 혼합하여 첨가하여 YAGFL의 분해억제 정도를 검토한 결과 모든 점막 추출액에서 TM (0.5 mM) 및 EDTA (5 mM)의 2종 혼합효소억제제 또는 AM (50 M), TM (0.5 mM) 및 EDTA (5 mM)의 3종 혼합효소억제제가 YAGFL의 안정화에 가장 효과적이었으며 24시간 후에도 YAGFL이 85%이상 잔존하였다.

5. 비강, 직장 및 질점막 추출액 중 수식화된 -시클로덱스트린류가 YAGFL의 분해에 미치는 영향을 검토한 결과 HP-β-CyD 및 DM-β-CyD 모두 안정화효과가 컸으며 양자 간에 큰 차이는 없었다.

이상의 사실로 보아 혼합 효소억제제와 수식화된 β-시클로덱스트린류가 점막부위에서 효소적으로 불안정한 Leu-Enk와 YAGFL의 안정화에 유용한 첨가제로 생각되며 경점막 투과 연구의 기초가 이루어졌다고 생각된다.

## 감사의 말씀

이 연구는 한국과학재단 특정기초 연구과제 (91-05-00-07)의 연구지원에 의해 이루어졌다. 이에 감사드린다.

## 문 헌

1) B.P. Roques, M.C. Fournie-Zaluski, E. Soroca, J.M. Lecomte, B. Malfroy, C. Llorens and J.C. Schwartz, The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinonoceptive activity in mice. *Nature*, **288**, 286-288 (1980).
2) M. Hachisu, T. Hiranuma, Y. Shibazaki, K. Uotani, S. Murata, T. Aoyagi and H. Umezawa, Composite effects of actinonin when inhibiting enkephalin-degrading enzymes. *Eur. J. Pharmacol.*, **137**, 59-65 (1987).
3) P. Langguth, H.P. Merkle and G.L. Amidon, Oral absorption of peptides: The effect of absorption site and enzyme inhibition on the systemic availability of metkephamid. *Pharm. Res.*, **11**, 528-535 (1994).
4) I.K. Chun and Y.W. Chien, Stabilization of methionine enkephalin in various rabbit mucosal extracts by enzyme inhibitors. *Int. J. Pharm.*, **121**, 217-231 (1995).
5) P.A. Baldwin, C.K. Klingbeil, C.J. Grimm and J.P. Longenecker, The effect of sodium tauro-24,25-dihydrofusidate on the nasal absorption of human growth hormone in three animal models. *Pharm. Res.*, **7**, 547-552 (1990).
6) A.N. Fisher, N.F. Farraj, D.T. O'Hagan, I. Jabbal-Gill, B.R. Johansen, S.S. Davis and L. Illum, Effect of L- -lysophosphatidylcholine on the nasal absorption of human growth hormone in three animal species. *Int. J. Pharm.*, **74**, 147-156 (1991).
7) W.A. Lee, R.D. Ennis, J.P. Longenecker and

P. Bengtsson, The bioavailability of intranasal salmon calcitonin in healthy volunteers with and without a permeation enhancer. *Pharm. Res.*, **11**, 747-750 (1994).

8) P. Langguth, G. Breves, A. Stockli, H.P. Merkle and S. Wolffram, Colonic absorption and bioavailability of the pentapeptide metkephamid in the rat. *Pharm Res.*, **11**, 1640-1645 (1994).

9) M.A. Hussain, R. Seetharam, R.R. Wilk, B. J. Aungst and C.A. Kettner, Nasal mucosal metabolism and absorption of pentapeptide enkephalin analogs having varying N-terminal amino acids. *J. Pharm. Sci.*, **84**, 62-64 (1995).

10) 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.*, **82**, 373-378 (1993).

11) I.K. Chun, Y.J. Yang and C.H. Lee, Stability of [D-ala$^2$]-methionine enkephalinamide in aqueous solution. *J. Appl. Pharmacol.*, **1**, 31-36 (1993).

12) I.S. Park and I.K. Chun, Physicochemical stability of leucine enkephalin and [D-ala$^2$]-leucine enkephalinamide in buffered aqueous solution. *Yakhak Hoeji*, **38**, 488-495 (1994).

13) I.K. Chun and Y.J. Yang, Degradation and stabilization of [D-ala$^2$]-methionine enkephalinamide in various rabbit mucosa extracts. *J. Kor. Pharm. Sci.*, **22**, 173-183 (1992).

14) I.K. Chun and I.S. Park, Enzymatic degradation of leucine enkephalin and [D-ala$^2$]-leucine enkephalinamide in various rabbit mucosa extracts. *Yakhak Hoeji*, **38**, 530-543 (1994).

15) A.P. Sayani, I.K. Chun and Y.W. Chien, Transmucosal delivery of leucine enkephalin: stabilization in rabbit enzyme extracts and enhancement of permeation through mucosae. *J. Pharm. Sci.*, **82**, 1179-1185 (1993).

16) S. Dodda-Kashi and V.H.L. Lee, Enkephalin hudrolysis in homogenates of various absorptive mucosae of the albino rabbit: similarities in rates and involvement of aminopeptidases. *Life Sci.*, **38**, 2019-2028 (1986).

17) M.C. Fournie-Zalusky, E. Soroca-Lucas, G. Waksman, C. Llorens, J.C. Schwartz and B. P. Roques, Differential recognition of enkephalinase and angiotensin-converting enzyme by new carboxyalkyl inhibitors. *Life Sci.*, **31**, 2947-2954 (1982).

18) 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).

19) M.E. Brewster, J.W. Simpkins, M.S. Hora, W.C. Stern and N. Bodor, Use of cyclodextrins in parenteral formulation. *J. Parent. Sci. Technol.*, **43**, 231-240 (1989).

20) M.E. Brewster, T. Loftsson, J. Baldvinsdottir and N. Bodor, Stabilization of aspartame by cyclodextrins. *Int. J. Pharm.*, **75**, R5-R8 (1991).

21) F.W.H.M. Merkus, J. Verhoef, S.G. Romeijn and N.G.M. Schipper, Absorption enhancing effect of cyclodextrins on intranasally administered insulin in rats. *Pharm. Res.*, **8**, 588-592 (1991).

22) T. Irie, K. Wakamatsu, H. Arima, H. Aritomi and K. Uekama, Enhancing effects of cyclodextrins on nasal absorption of insulin in rats. *Int. J. Pharm.*, **84**, 129-139 (1992).

23) Z. Shao, R. Krishnamoorthy and A.K. Mitra, Cyclodextrins as nasal absorption promoters of insulin: mechanistic evaluations, *Pharm. Res.*, **9**, 1157-1163 (1992).

24) I.J. Gill, A.N. Fisher, M. Hinchcliffe, J. Whetstone, N. Farraj, R. De Ponti and L. Illum, Cyclodextrins as protection agents against enhancer damage in nasal delivery systems II. Effect on in vivo absorption of insulin and histopathology of nasal membrane. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **1**, 237-248 (1994).