

# 고상법에 의한 Dermorphin 유사체의 합성과 생물학적 활성에 관한 연구

한만소<sup>†</sup>

대진대학교 이공대학 화학과  
(2002년 7월 19일 접수 ; 2002년 9월 4일 채택)

## Synthesis of Dermorphin Analogues by the Solid Phase Method and Biological Activity

Man-So Han<sup>†</sup>

Department of Chemistry, Daejin University, Kyeonggi-Do, Pocheon 487-711, Korea

<sup>†</sup>e-mail : mshan@road.daejin.ac.kr

(Received July 19, 2002 ; Accepted September 4, 2002)

**Abstract** : Dermorphin is a hepta peptide(H-Tyr-DAla-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>) with exceptionally potent and long-lasting peripheral and central activity. Dermorphin analogues, dermorphionyl(DMP)-Lys-NH<sub>2</sub> and DMP-Lys-Lys-NH<sub>2</sub> have been prepared in order to examine the effect of opiod activity. Dermorphin analogues were synthesized by the solid phase method. The crude peptide was purified by gel filter on a Sephadex LH-20, characterized with HPLC and amino acid analyzer. Analgesic potency was estimated by writhing syndrome method and Randall-Selitto method. As a result, dermorphin analogues have lower potency than that of morphine.

**Keywords** : dermorphin, solid phase method, writhing syndrome method,  
Randall-Selitto method.

### 1. 서론

양귀비의 추출물은 의학적 용도로 사용된 물질로서 25종의 알칼로이드가 함유되어 있으며 생물학적으로 많이 알려진 모르핀도 이에 해당된다. 뇌의 신경 전달은 신경 전달 물질에 의하여 이루어지는데, 아편 성질을 갖는 모르핀과 그의 유도체들은 신경 전달 물질의 억제제로 작용한다. 이러한 물질을 endogenous opiate라고 부르며 약리적으로는 통각 결여, 다행증, 탐닉, 위장의 고유 운동성, 내분비의 작용 등에 연관

되어 있는 것으로 알려져 있다[1].

현재까지 분리된 endogenous opiate는 크게  $\beta$ -endorphin과 이에 관련된 화합물인 enkephalin, dynorphin 및  $\alpha$ -neodynorphin으로 구분할 수 있는데, 이들과 결합하는 수용체(receptor)는 입체 특이성을 가지고 있으며 표지된 opiate와의 결합 위치에 따라 opiate 수용체를 발견할 수 있었다. opiate와 수용체의 관계에서  $\beta$ -endorphin은  $\mu$ -와  $\delta$ -수용체에 enkephalin은  $\delta$ -수용체에 dynorphin은  $\kappa$ -수용체에 모르핀은  $\mu$ -수용체에 결합하는 것으로

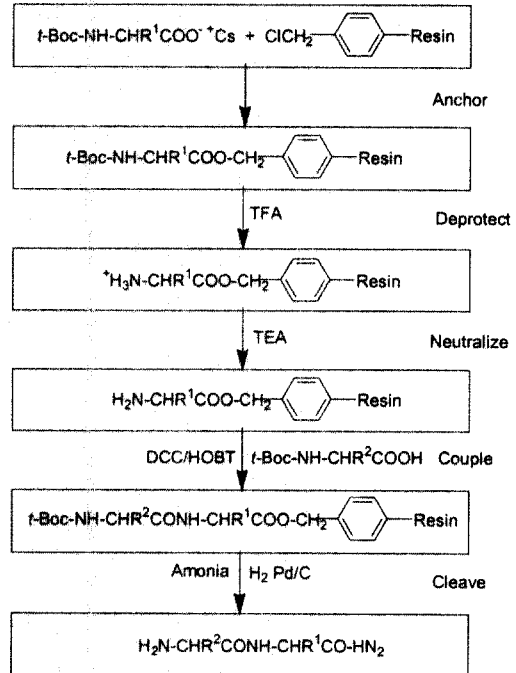
밝혀졌다[2-3]. 또한 Hughes등[4]은 opiate와 유사한 물질이 돼지, 고양이, 송아지의 뇌, 그리고 생쥐 수정관과 기니아 피 회장(guinea pig ileum, GPI)에 존재하며[5-6], 돼지의 뇌에서 추출한 endogenous opiate와 유사한 H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH(Met<sup>5</sup>-enkephalin)과 H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH(Leu<sup>5</sup>-enkephalin)이 분리되었다. 이중 Met<sup>5</sup>-enkephalin은 아미노산 서열에 있어서 뇌하수체 호르몬인 β-lipotropin의 어느 한 부분과 동일하며[7], 대부분의 endogenous opiate 아미노산 서열에 이들이 존재한다는 것을 알았다[8].

Erspamer등[9]은 양서류 종의 피부에서 생물학적 활성이 있는 펩티드를 처음 분리하였으며, 포유동물의 중추 말초신경 단위, 위장의 내분비 세포에도 미량 존재하고 있음을 밝혔다. 그 예로는 caerulein, tachylinins, sauvagin과 dermorphin이 있다[10]. 이들 중 dermorphin은 2종의 7개 아미노산으로 이루어진 펩티드(DMP(H-Tyr-DAla-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>), HDMP(H-Tyr-DAla-Phe-Gly-Tyr-Hyp-Ser-NH<sub>2</sub>))가 있는데 생체 내 물질로서는 특이하게 D-아미노산을 가지며[11], 이들의 생물학적 활성은 진통 효과의 강도와 지속성에 있어서 β-endorphin보다 우수하고[12] 뇌하수체 전엽에서 갑상선 호르몬 방출을 증가시키는 것으로 알려져 있다[13].

Weber등[14]은 Met<sup>5</sup>-enkephalin C-말단에 다른 아미노산들을 도입한 화합물에 대한 연구에서 활성 정도에서 Met<sup>5</sup>-enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Arg<sup>7</sup>과 Met<sup>5</sup>-enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Arg<sup>7</sup>-Val<sup>8</sup> 펩티드는 비슷하지만, Met<sup>5</sup>-enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Arg<sup>7</sup>-Val<sup>8</sup>-NH<sub>2</sub>(metorphamide)의 경우에는 큰 활성을 나타냈으며, 친화력에 대한 실험에서 Met<sup>5</sup>-enkephalin-Arg<sup>6</sup>는 κ-수용체에만 조금 나타나며 Met<sup>5</sup>-enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Arg<sup>7</sup> 경우에는 μ-, δ- 및 κ-수용체에 친화력이 크게 나타난다. Met<sup>5</sup>-enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Arg<sup>7</sup>-Val<sup>8</sup> 인 경우에는 μ- 및 κ-수용체에만 친화력이 크게 나타난다. C-말단의 Val<sup>8</sup>를 아미노화시킨 metorphamide는 μ-와 δ-수용체에는 친화력의 변화가 없지만 κ-수용체에는 더욱 크게 나타남을 알았다[15].

이와 같은 결과를 dermorphin(DMP)에 그대로 적용하여 DMP-Arg<sup>6</sup>-Arg<sup>7</sup>-NH<sub>2</sub>과 DMP-Arg<sup>6</sup>-Arg<sup>7</sup>-Val<sup>8</sup>-NH<sub>2</sub>에 대한 연구가 진행되었

다. 그 결과에 모르핀보다는 작지만 상당량의 진통 효과가 나타났다[16]. 이와 같은 연구에서 순도가 높은 폴리 펩티드 합성을 위한 방법으로 고상법[17]이 이용되고 있다. 합성 방법은 N-보호된 아미노산과 chloromethylbenzene이 붙어 있는 수지 지지물에 에스테르 결합으로 수지 지지물에 아미노산을 도입하고 보호기를 제거한 후 다음에 필요한 N-보호된 아미노산을 DCC(1,3-dicyclohexyl carbodiimide)와 HOBT(1-hydroxybenzo triazole hydrate)의 축합시약으로 펩티드를 scheme 1의 방법으로 합성한다. 필요한 펩티드를 합성한 후 수지와 에스테르 결합을 가수소 분해하여 수지 부분을 제거하여 필요한 펩티드를 얻는 방법으로 이는 순수한 폴리 펩티드 합성 방법에서 반응 중간체를 따로 분리할 필요가 없으므로 연속적으로 필요한 아미노산을 도입할 수 있으며 용매에 녹는 부 반응물질 및 미 반응물질을 쉽게 제거할 수 있기 때문에 순도 및 수율을 향상시킬 수 있다. 이 방법으로 인슐린과 같은 긴 사슬의 펩티드를 합성하였다[18].



Scheme 1. A typical scheme for solid phase peptide synthesis.

따라서 본 논문에서는 고상법에 의해 앞의 결과로부터 생물학적 활성을 높이기 위해 dermorphin 유사체의 C-말단에 아민기를 도입하고, 수용체에 대한 친화력을 높이기 위해 dermorphin에 같은 염기성 아미노산이지만 전기적 성질의 세기와 입체적 특성이 다른 Arg를 Lys으로 치환시킨 DMP(H-Tyr-DAla-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser)-Lys<sup>8</sup>-NH<sub>2</sub>과 DMP(H-Tyr-DAla-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser)-Lys<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-NH<sub>2</sub>를 합성하고 동물실험 통하여 DMP-Arg<sup>6</sup>-Arg<sup>7</sup>-NH<sub>2</sub>과 DMP-Arg<sup>6</sup>-Arg<sup>7</sup>-Val<sup>8</sup>-NH<sub>2</sub>의 결과와 비교하여 수용체와의 상관관계를 조사하고 모르핀과 생물학적 활성을 비교하고자 한다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약 및 기기

합성에 사용한 아미노산은 Azinomodo Chemical사, D-alanine은 Sigma Chemical사, 수지 지지물로 사용한 Merrifield's peptide resin 2% cross-linked(chloromethylated styrene/divinylbenzene copolymer), di-*tert*-butyl dicarbonate는 Jassen Chemical사, benzyl bromide, iodoacetic acid, sephadex LH-20, 1-hydroxybenzotriazol(HOBT), palladium charcoal은 Aldrich Chemical사, copper sulfate pentahydrate는 동양화학 제품을 사용하였다.

물질 확인을 위해서 IR spectrum은 Perkin-Elmer사 (710B)의 Infrared Spectrophotometer, NMR spectrum은 Bruker사 (model AW-80 ; 80MHz)의 <sup>1</sup>H-NMR Spectrophotometer를, HPLC는 SP 8100 liquid chromatography를, 아미노산 분석은 Hitachi사 (model 835)의 Amino Acid Analyzer를 사용하였다.

### 2.2. 보호된 아미노산의 합성

2.2.1. *tert*-Butyloxycarbonyl (*t*-Boc) 아미노산 유도체들(*t*-Boc-D-Ala, *t*-Boc-L-Phe, *t*-Boc-Gly, *t*-Boc-L-Pro, *t*-Boc-L-Ser)의 합성.

중류수 10mL에 NaOH 4.73g넣은 용액에 각각의 아미노산(D-alanine, L-phenylalanine, glycine, L-proline, L-serine) 0.1mol를 녹이고, *t*-butanol 22mL를 첨가한 후 (Boc)<sub>2</sub>O (di-*tert*-butyl dicarbonate)(30mL, 0.13 mol)를

1시간에 걸쳐 첨가한 후, 다시 *t*-butanol 22mL를 가하여 12시간 교반하였다. 이 용액에 25mL 중류수로 희석시켜 미 반응의 (Boc)<sub>2</sub>O를 펜탄 60mL로 3회 추출하여 제거하고, 0°C에서 수용액 층을 3M HCl 수용액으로 처리한 후 100mL ethyl acetate로 3회 추출하고 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조한 후 용매를 제거한 물질을 석유 에테르로 결정화하여 각각의 생성물을 얻었다.

2.2.2. *tert*-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosine(*t*-Boc-O-Bz-L-Tyr(OBZL))의 합성

2N NaOH 수용액 50mL에 L-tyrosine(9.05g, 0.05mol)를 가하여 녹인 후 중류수 15ml에 CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 7g를 녹인 용액을 가하여 60°C에서 1시간 교반하였다. 반응물을 실온까지 냉각시킨 후 150mL 메탄올을 가하고 2N NaOH수용액 7mL를 첨가한 후 benzyl bromide(8.40g, 0.05mol)를 가하여 15시간 교반하였다. 생성된 구리 착 화합물을 여과하고 중류수와 메탄올로 씻어 준 후 실온에서 건조하였다. 끓는 물 200mL에 EDTA-2Na 20g를 녹인 후 구리 착 화합물 10g를 첨가하여 1시간 교반시킨 후 0°C하에 24시간 방치하여 오일 상의 물질을 얻었으며, 이 물질을 앞에 기술한 *t*-Boc 아미노산 유도체들의 합성법으로 흰색고체 4.87g를 얻었다.

2.2.3. *tert*-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-serine(*t*-Boc-O-Bz-L-Ser(OBZL))의 합성.

DMF 150mL에 *t*-Boc-L-Ser(2.60g, 0.037 mol)를 녹인 후 0°C에서 60% NaH(3.00g, 0.07mol)과 benzyl bromide(6.80g, 0.04mol)를 가하여 실온에서 5시간 교반하였다. 이 혼합물의 용매를 감압 하에서 제거한 후 중류수 50mL를 넣고 에테르 40mL로 2회 세척하여 남아 있는 benzyl bromide를 제거하였다. 수용액 층을 3M HCl 수용액으로 처리한 후 ethyl acetate 100mL로 3회 추출하고 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조시킨 후 용매를 감압 증발시켜 오일 상의 액체 4.87g를 얻었다.

2.2.4. *tert*-Butyloxycarbonyl-N-benzyloxycarbonyl-L-lysine(*t*-Boc-N-Bz-o-L-Lys(CBZ))의 합성.

L-Lysine. HCl(22.30g, 0.12mol)과 CuCO<sub>3</sub>·Cu(OH)<sub>2</sub> 17g를 끓는 물 400mL에 첨가하여 2시간

교반 후 여과하여 여과액을 냉각시켜  $\text{NaHCO}_3$  23g를 넣고 아세톤 300mL에 benzyl oxycarbonyl chloride 29g를 녹인 용액을 가하여 15시간 교반하였다. 교반 중 생기는 청색의 침전물을 여과하여 증류수, 아세톤, 에테르의 순서로 씻어 건조하였다. 끓는 물 200mL에 EDTA-2Na 20g과 구리 착 화합물을 넣어 녹이며 1시간 동안 교반하고 12시간 방치한 후 여과하여 흰색 결정을 얻었다. 이 결정을 앞에 기술한 *t*-Boc 아미노산 유도체들의 합성법으로 흰색고체 18.00g를 얻었다.

### 2.3. Dermorphin 유사체의 합성

에탄올 수용액에 *t*-Boc-N-Bzo-L-Lys 를 녹인 후 20%의  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  수용액으로 pH 7.0로 맞추고 10분간 반응시킨 용액을 벤젠을 첨가하여 감압 증류하였다. 이 세습염은 DMF용액에서 Merrifield 수지와 60°C에서 24시간 반응시켰다. 수지에 dermorphin 유사체의 도입은 Table 1의 방법으로 하였고, 축합반응이 끝날 때마다

Ninhydrin test[19]로 반응의 완결 여부를 확인하였다. 수지에 결합된 dermorphin 유사체를 메탄올 용액에 현탁시키고 암모니아 기체로 포화시킨 후 얼음 중탕에서 3일간 반응시켰다. 이 용액을 여과하고 용매를 제거한 후 액체 암모니아에 녹여 소량의 나트륨을 첨가한 후 10분간 교반하였다. 이 용액을 감압 증류하고, 다시 메탄올에 녹이고 Pd/C에서 가수소반응으로 수지를 제거하였다.

Dermorphin 유사체의 정제는 실리카겔 관 크로마토그래피( $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 8 : 2 : 0.5$ )로 1차 정제한 후 sephadex LH-20 ( $\text{MeOH} : \text{CH}_3\text{CN} = 3 : 1$ )으로 2차 정제하였다. 정제된 dermorphin 유사체는 12N HCl/AcOH(2:1)용액 하에서 가수분해시켰다. Spackman방법[20]에 의해 0.2N sodium citrate 완충 용액으로 아미노산 조성을 분석하였고 HPLC분석은  $\mu$ -Bondapak  $\text{C}_{18}$  Column를 사용하고  $\text{MeOH}/0.01\text{M AcONa}(1:1)$ 를 용출액으로 사용하였다.

Table 1. Schedule for DCC/HOBT Coupling in Solid Phase Peptide Synthesis of Dermorphin Analogues

Step	Reagent	Vol(ml)	Time(min)
Swelling	1. MC(wash)	25×1	60
Deprotection	2. MC(wash)	25×4	1.5
	3. 30%TFA/MC (prewash)	25×2	1.5
	4. 30%TFA/MC(deblock)	25×1	30
	5. MC(wash)	25×6	1.5
Washing	6. 30%TEA/MC(prewash)	25×1	1.5
	7. 10%TEA/MC(neutralization)	25×1	10
	8. MC(wash)	25×2	1.5
Coupling	9. 3eqDCC/6eqHOBT	25×1	10
	10. 3eq <i>t</i> -Boc-Amino acid/MC	10×1	120
Washing	11. MC(wash)	25×4	1.5
	12. MeOH	25×3	1.5
	13. MC	25×3	1.5
	14. Test ninhydrin reaction	1	

Double coupling repetition of 5 - 13

MC:Dichloromethane, TFA:Trifluoroacetic acid, TEA: Triethylamine,

DCC:1,3-Dicyclohexylcarbodiimide, HOBT:1-Hydroxybenzotriazole.

**2.4. Writhing Syndrome법에 의한 동물실험 (21-22)**

Koster등[23]이 실험 방법으로 ICR계 수컷 쥐 (18-22g)에 대조 군을 모르핀으로 하여 비교 실험하였다. 0.6% 초산 2mL를 쥐의 복강 내에 투여한 후 5분부터 20분간에 발생하는 Writhing Syndrome를 특정 대조 군에 대한 억제 율로 산출하였다. 합성한 dermorphin 유사체들은 초산의 투여 30분전에 피하 주사하였으며, 용량-반응 곡선으로 ED<sub>50</sub>값을 산출하였다.

**2.5. Randall-Selitto법에 의한 동물실험 (24-25)**

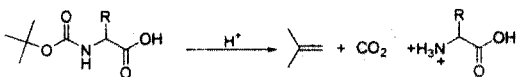
Analgesic meter(Ugo Basile, Cat. 7200)를 이용하여 대조 군을 모르핀으로 하여 진통 효과를 비교 실험하였다. SD계 수컷 쥐(100-120g)에 합성한 dermorphin 유사체들은 복강에 투여한 3시간 후 압 자극에 대한 통증을 나타내는 것을 대조되는 군과 비교하여 상대적 진통지수 (relative pain index)를 식 (1)로 구하였다.

$$\text{Relative Pain Index} = \frac{\text{Threshold of test sample}}{\text{Threshold of control}} \quad \text{-----(1)}$$

**3. 결과 및 고찰**

**3.1. α-아미노기의 보호기 확인**

α-아미노기를 보호하였으며[26], 이 보호기는 TFA와 같은 산성 용액에서 쉽게 제거되므로 고상법으로 복잡한 펩티드를 합성할 수 있는 장점이 있다(Scheme 2).

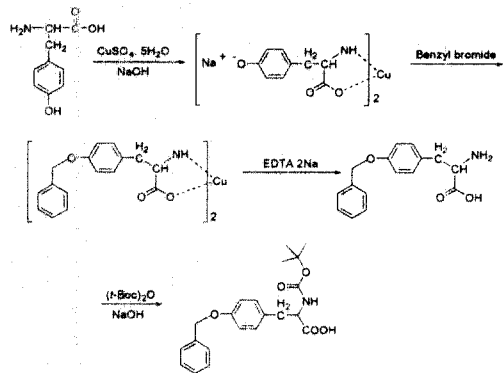


Scheme 2. Deprotection of N-protected amino acid with TFA

t-Boc으로 보호된 아미노산(t-Boc-D-Ala, t-Boc-L-Phe, t-Boc-Gly, t-Boc-L-Pro, t-Boc-L-Ser)의 IR 및 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼분석, 수득률 및 녹는점을 Table 2에 실었다.

**3.2. Tyrosine의 결 사슬 보호기 확인**

Tyrosine의 하이드록시기를 보호하기 위하여 벤질기를 사용하였다. O-benzyl ether의 벤질기는 산에 의해 tyrosine에 벤젠 고리의 3번 위치로 이동하는 Claisen 자리옮김반응의 부산물이 생길 수 있다. α-아미노기는 t-Boc로 보호하였다[27](scheme 3). IR 및 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼분석, 수득률 및 녹는점을 Table 2에 실었으며, IR 및 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼은 Fig. 1 및 Fig. 2에 나타내었다.



Scheme 3. Synthetic route for tert-butylloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosine.

**3.3. Serine의 결 사슬 보호기 확인**

Serine의 하이드록시기는 방향족 고리가 없으므로 NaH하에서 benzyl bromide로 보호한 후 α-아미노기를 t-Boc로 보호하였다[28]. IR 및 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼분석 및 수득률은 Table 2에 나타내었다.

**3.4. Lysine의 결 사슬 보호기 확인**

Lysine를 구리 착 화합물로 만든 후 benzyloxycarbonyl기로 결 사슬의 아미노기를 보호하고 EDTA-2Na로 착 화합물을 분해시킨 후 α-아미노기는 t-Boc으로 보호하였다. IR 및 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼분석, 수득률 및 녹는점을 Table 2에 실었다.

**3.5. Dermorphin유사체의 분석**

Dermorphin-Lys-NH<sub>2</sub>의 HPLC분석 결과 Fig. 3에서 순도가 99%이었으며 아미노산 분석 결과 모든 아미노산의 존재를 확인하였고 (Fig. 5), dermorphin-Lys-Lys-NH<sub>2</sub>의 HPLC

분석 결과 Fig. 4에서 순도는 96.5% 이었으며  
아미노산 분석 결과 모든 아미노산의 존재를 확  
인하였다(Fig. 6).

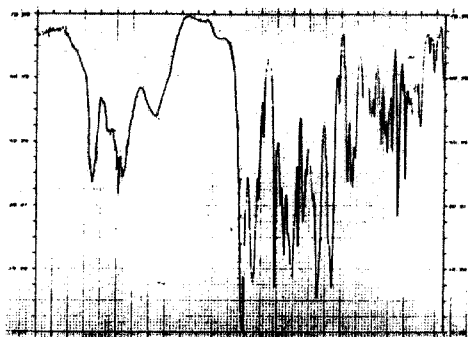


Fig. 1. IR spectrum of *tert*-butylloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosine.

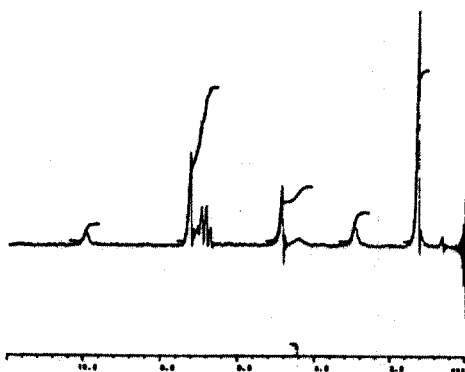
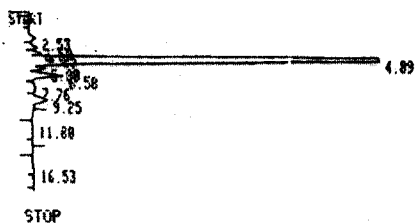
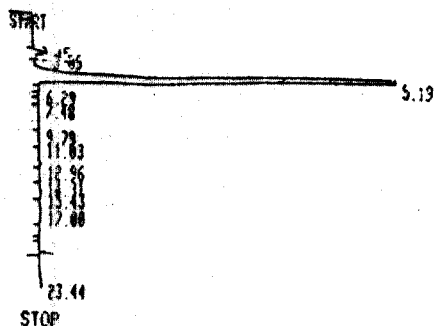


Fig. 2. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of *tert*-butylloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosine.



AREA%	RT	AREA TYPE	AK/HT	AREA%
100	4.89	1.6214E+07 DSHB	0.347	100.000

Fig. 3. High performance liquid chromatographic analysis of dermorphin-Lys-NH<sub>2</sub>.



AREA%	RT	AREA TYPE	AK/HT	AREA%
0.804	2.45	483948 BV	1.729	0.804
1.619	3.09	974678 D VH	0.407	1.619
96.502	5.19	5.8096E+07 SHB	0.422	96.502
0.529	12.96	318638 TVV	1.688	0.529
0.545	17.00	328350 TVV	1.492	0.545

Fig. 4. High performance liquid chromatographic analysis of dermorphin-Lys-Lys-NH<sub>2</sub>.

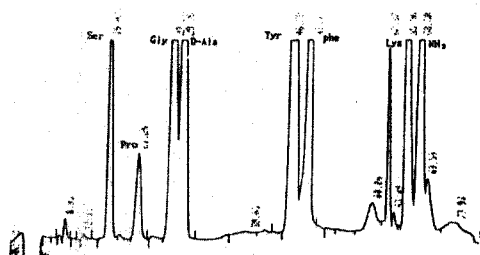


Fig. 5. Amino acid analysis of dermorphin-Lys-NH<sub>2</sub>.

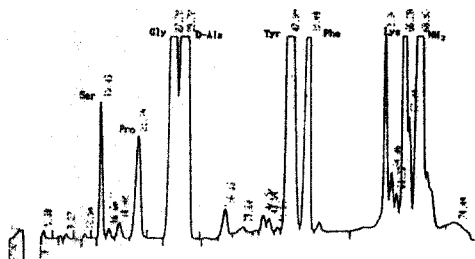


Fig. 6. Amino acid analysis of dermorphin-Lys-Lys-NH<sub>2</sub>.

Table 2. Physical, Spectral Data of Protected Amino Acids

Protected amino acid	mp(°C)	IR (cm <sup>-1</sup> )	<sup>1</sup> H-NMR (δ)	Yield(%)
<i>t</i> -Boc-D-Ala	84	3400 (-NH-) 1750 (acid C=O) 1700 (amide C=O)	1.5 (s, 9H, -C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ) 1.6 (s, 3H, -CH <sub>3</sub> ) 3.8 (m, 1H, CH*) 4.3 (br, 1H, -NH-) 8.5 (br, 1H, -COOH)	74.1
<i>t</i> -Boc-L-Phe	86-87	3350 (-NH-) 1720 (acid C=O) 1650 (amide C=O)	1.5 (s, 9H, -C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ) 3.4 (d, 2H, -CH <sub>2</sub> -) 3.8 (m, 1H, CH*) 4.5 (br, 1H, -NH-) 7.2 (s, 1H, -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) 12 (s, 1H, -COOH)	80.9
<i>t</i> -Boc-Gly	90	3100 (-NH-) 1750 (acid C=O) 1680 (amide C=O)	1.4 (s, 9H, -C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ) 3.9 (d, 2H, -CH <sub>2</sub> -) 5.3 (br, 1H, -NH-) 10.4 (s, 1H, -COOH)	62.3
<i>t</i> -Boc-L-Pro	136	1750 (acid C=O) 1650 (amide C=O)	1.6 (s, 9H, -C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ) 2.1-2.4 (br, 4H, -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -) 3.7 (br, 2H, -N-CH <sub>2</sub> -) 4.4 (m, 1H, CH*) 9.5 (s, 1H, -COOH)	46.0
<i>t</i> -Boc-L-Ser	oil	3480 (-OH) 3400 (-NH-) 1770 (acid C=O) 1680 (amide C=O)	1.0 (s, 9H, -C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ) 3.6 (d, 2H, -CH <sub>2</sub> -) 3.9(m, 1H, CH*)	79.6
<i>t</i> -Boc-O-Bz-L-Tyr(OBZL)	270	3300 (-NH-) 1680 (acid C=O) 1530 (amide C=O)	1.4 (s, 9H, -C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ) 3.0 (br, 2H, -CH <sub>2</sub> -) 4.2 (m, 1H, CH*) 4.8 (s, 2H, O-CH <sub>2</sub> -Ph) 6.5-7.7(m, 9H, -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -, -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) 9.9 (s, 1H, -COOH)	39.6
<i>t</i> -Boc-O-Bz-L-Ser (OBZL)	oil	3400 (-NH-) 1750 (acid C=O) 1640 (amide C=O)	1.4 (s, 9H, -C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ) 2.9 (m, 2H, O-CH <sub>2</sub> -) 3.8 (m, 1H, CH*) 4.5 (s, 2H, -CH <sub>2</sub> -Ph) 7.3 (s, 5H, -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )	44.9
<i>t</i> -Boc-N-Bzo-L-Lys (CBZ)	42	3000 (-NH-) 1700 (acid C=O) 1530 (amide C=O)	1.1 (s, 8H, -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -) 1.4 (s, 9H, -C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ) 3.0 (br, 1H, -NH-) 4.0 (m, 1H, CH*) 5.0 (s, 2H, -CH <sub>2</sub> -Ph) 5.5 (br, 1H, -COOH) 7.2 (d, 5H, -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )	39.5

## 3.6. 동물실험

Writhing Syndrome법에서는 사용 약물의 각 농도 당 5마리를 사용하였고 실험은 2회 반복한 결과를 모르핀과 비교하여 Table 3에 나타내었다. Randall-Sellito법에서는 사용 약물의 각 농도 당 6마리를 사용하였고 상대적 진통지수 (relative pain index)를 1로 기준 하여 dermorphin 유사체를 모르핀과 비교 실험한 결과를 Table 4에 나타내었다. 이 실험으로부터 같은 염기성 아미노산인 Arg를 Lys으로 치환한 동물실험의 결과에서 상대적 진통지수가 감소하는 이유는 보다 많은 비 공유 전자쌍을 가지는 아르기닌의  $\epsilon$ -guanidine기가  $\epsilon$ -amine기보다 수용체와 잘 결합한다고 여겨진다. 또한 dermorphin에 한 개의 염기성 아미노산과 두 개의 같은 염기성 아미노산이 결합한 경우 및 중성 아미노산인 Val를 도입한 경우 비슷한 결과가 나타나는 이유는 수용체와 관계에서 영향을 미치지 못하는 것으로 여겨진다.

## 4. 결론

Dermorphin에 Lys-NH<sub>2</sub> 및 Lys-Lys-NH<sub>2</sub>를 도입한 2종의 dermorphin 유사체인 DMP-Lys-NH<sub>2</sub> 과 DMP-Lys-Lys-NH<sub>2</sub>를 보호된 아미노산을 사용하여 scheme 1의 방법인 고상법에 의해 합성하였다.

동물실험에 의한 생물학적 활성에 대한 조사에서 합성한 dermorphine 유사체인 Arg[16]을 Lys으로 치환되어진 두 종류 유사체는 같은 수용체와 상관관계로 인하여 생물학적 활성을 결정된다고 간주할 수 있다. 이 경우를 비교하면 같은 염기성 아미노산이면서 전기적 세기 및 입체적 특이성 차이에 의하여 수용체와의 상관관계에 있어서 친화력이 적어지게 되어 활성이 감소된다. 또한 반복된 똑같은 아미노산의 도입이나, 중성 아미노산의 도입에 의해 유사체는 수용체와의 상관관계에 영향을 미치지 않기 때문

Table 3. Inhibitory Effects of Dermorphin Analogues on Acetic Acid Induced Writhing Syndrome in Mice

Compounds	Dose (mg/Kg, s.c.)	No. of writhing (Mean $\pm$ s.e.)	Inhibition(%)	ED50 (mg/Kg, s.c.)
Control		30.7 $\pm$ 3.29	0	
Morphine HCl	0.8	5.2 $\pm$ 3.69	83.06	0.37
	0.4	10.8 $\pm$ 2.71	64.82	
	0.2	19.4 $\pm$ 3.25	36.81	
	0.1	25.6 $\pm$ 4.68	16.61	
DL <sup>a</sup>	48.0	8.4 $\pm$ 2.54	72.64	28.08
	24.0	12.3 $\pm$ 4.21	59.93	
	12.0	22.1 $\pm$ 4.54	28.01	
	6.0	28.9 $\pm$ 3.78	5.86	
DLL <sup>b</sup>	56.0	8.1 $\pm$ 3.95	73.61	34.74
	28.0	12.4 $\pm$ 4.03	59.61	
	14.0	25.7 $\pm$ 3.17	16.29	
	7.0	31.5 $\pm$ 4.64	0	

<sup>a</sup>Dermorphin-Lys-NH<sub>2</sub>, <sup>b</sup>Dermorphin-Lys-Lys-NH<sub>2</sub>



Table 4. Analgesic Effects of Dermorphin Analogues on Paw by Randall and Selitto Method in Rats

Compounds	Dose(mg/Kg s.c.)	Threshold(gr) × 20	Relative pain index
Control		8.12 ± 1.32	1
Morphine	8.0	19.38 ± 2.43	2.43
	4.0	11.23 ± 1.04	1.38
DL <sup>a</sup>	23.57	7.92 ± 2.96	0.98
	11.79	7.49 ± 3.71	0.92
DLL <sup>b</sup>	26.76	8.27 ± 2.30	1.01
	13.38	8.03 ± 3.11	0.99
DA <sup>c</sup>	27.7	14.78 ± 1.59	1.85
	13.9	8.89 ± 1.09	1.11
DAAV <sup>d</sup>	30.2	13.65 ± 2.49	1.71
	15.1	8.87 ± 0.94	1.10

<sup>a</sup>Dermorphin-Lys-NH<sub>2</sub>, <sup>b</sup>Dermorphin-Lys-Lys-NH<sub>2</sub>,

<sup>c</sup>Dermorphin-Arg-NH<sub>2</sub>(ref.16), <sup>d</sup>Dermorphin-Arg-Arg-Val-NH<sub>2</sub>(ref.16).

에 비슷한 활성도를 나타내는 것으로 예상되어진다. 비교 약물로 사용한 모르핀에서 활성이 감소되는 것은 dermorphine 유사체가  $\mu$ -수용체와 결합하는 양이 상대적으로 감소하게 되어 활성이 감소되는 것으로 여겨진다.

### 감사의 글

본 연구는 2001년도 대전대학교 교내 연구비에 의하여 수행되었음.

### 참고문헌

1. J. Davis, "Endorphin ; New Wave in Brain Chemistry", p. 1, The Dial Press, Doubleday & Company Inc., New York (1984).
2. C. B. Pert and S. H. Snyder, *Science*, **179**, 1011 (1973).
3. E. J. Simon, J. M. Hiller, and I. Edelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 1947 (1973).
4. J. Hughes, T. W. Smith, H. W. Kosterlitz, L. H. Fothergill, B. A. Morgan, and H. Morris, *Nature*, **255**, 557 (1975).
5. G. W. Pasternak, R. Goodman, and S. H. Snyder, *Life Sci.*, **16**, 1765 (1975).
6. R. Simantov and S. H. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2115 (1976).
7. C. H. Li, *Nature*, **201**, 924 (1964).
8. R. J. Miller and P. Cuatrecasas, *Vitamins and Hormones*, **36**, 297 (1976).
9. V. Erspamer and P. Melchiorri, *Neuroendocrine Perspectives*, **2**, 37 (1983).
10. V. Erspamer, *Prog. Anesthesiol (Pharmacol. Basis Anesthesiol)*, **2**, 37 (1983).
11. V. Erspamer, P. Melchiorri, G. Falconieri Erspamer, P. C. Montecucchi, and R. de Castiglione, *Peptides, 6 Suppl.*, **3**, 7 (1985).
12. T. Glaser, K. Hubner, R. de Castiglione, and B. Hamprecht, *J. Neurochem.*, **37**, 1613 (1981).
13. H. G. Gullner and G. D. Kelly, *Arch. Int. Pharmacody.*, **250**, 4 (1983).
14. E. Weber, F. S. Esch, P. Bohlen, S.

- Paterson, A. D. Corbett, A. T. Mcknight, H. W. Kosterlitz, J. D. Barchas, and C. J. Evans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 7362 (1983).
15. H. Matsuo, A. Miyata, and K. Mizuno, *Nature*, **305**, 721 (1983).
16. N. J. Hong, Y. T. Park, J. W. Lim, C. W. Lee, and S. U. Kooek, *Korean J. Med. Chem.*, **1**(1), 44 (1991).
17. R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149 (1963).
18. A. Marglin and R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 5051 (1966).
19. E. Kaiser, *Anal. Biochem.*, **25**, 6335 (1986).
20. D. M. Spackman, W. H. Stein, and S. More, *Anal. Chem.*, **30**, 1190 (1958).
21. J. F. Emele and J. Shanman, *Fed. Proc.*, **22**, 248 (1963).
22. C. V. Wende and S. Margolin, *Fed. Proc.*, **41**, 75 (1956).
23. R. Koster, M. Anderson, and E. I. Debeer, *Fed. Proc.*, **18**, 412 (1959).
24. L. O. Randall and J. J. Selitto, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **111**, 409 (1957).
25. C. A. Winter and I. Flataker, *J. Pharm. Exp. Ther.*, **150**, 165 (1965).
26. L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 2725 (1960).
27. C. A. Witer and I. Flataker, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, **150**, 165 (1975).
28. H. Sugano and M. Miyoshi, *J. Org. Chem.*, **41**, 2352 (1976).