

황체호르몬 유리호르몬의 경점막 수송: 가토 점막균질액 중에서 중쇄지방산염의 LHRH에 대한 안정화 효과

한 건# · 박정숙

충북대학교 약학대학

(Received November 19, 1993)

Transmucosal Delivery of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone: Effect of Medium Chain Fatty Acid Salts on Stabilization of LHRH in Mucosal Homogenates *in vitro*.

Kun Han# and Jeong Sook Park

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

Abstract—In order to investigate the feasibility of transmucosal delivery of the model peptide, LHRH, metabolism of LHRH and inhibition effect of medium chain fatty acid salts were studied in rabbit mucosal homogenate. LHRH incubated in homogenates of rectal(RE), nasal(NA) and vaginal(VA) mucosa were assayed by HPLC. Five to six degradation products of LHRH were detected and the degradation of LHRH(500 µg/ml) followed the first order kinetics. The main degradation products were found as LHRH¹⁻⁵(M-I), LHRH¹⁻³(M-II) and LHRH¹⁻⁶(M-III) by the method of amino acid analysis. The half-lives of LHRH in the mucosal homogenates were found to be less than 20 min at protein concentration of 2.5 mg/ml with the order of VA>NA>RE mucosal homogenate. Medium chain fatty acid salts such as sodium caprylate (C₈), sodium caprate (C₁₀) and sodium laurate (C₁₂) at the concentration of 0.5%~1.0% inhibit the proteolysis of LHRH significantly. The addition of sodium laurate(0.5%) into the NA and VA mucosal homogenates protected LHRH completely from the degradation.

Keyword □ LHRH, mucosal homogenate, proteolysis, medium chain fatty acid salts, inhibition.

펩타이드 및 단백질 약물들의 비주사 경점막 수송 경로에 대한 연구는 최근 이 약물들이 신약으로서의 무한한 가능성이 인식되면서 활발히 이루어지고 있다. 1-5) 펩타이드 및 단백질 약물의 비주사 경점막 수송에서 가장 문제가 되는 것은 역시 이들 약물의 분자량이 커서 막투과성이 나빠져 점막 부위의 효소에 의해 흡수되기 전에 분해를 받기 쉽다는 것이다. 6-7) 따라서 막투과성을 개선하거나 점막 흡수부위에서의 분해를 억제하는 물질에 대한 많은 연구가 수행되고 있다. 8-13) 황체호르몬 분비호르몬 (luteinizing hor-

mone releasing hormone: LHRH)은 1971년 Schally 14) 등에 의하여 분리되어 그의 특성이 밝혀지기 시작하였으며 뇌하수체 전엽에 작용하여 luteinizing hormone 과 follicle stimulating hormone을 분비하는 것으로 알려져 있으며, 비교적 고용량으로 투여시 호르몬 의존성 유방암에 효과가 있으며 불임증 치료 및 남녀공용의 피임제로 사용되고 있다. 15)

(pyro) Glu¹-His²-Trp³-Ser⁴-Tyr⁵-Gly⁶-Leu⁷-Arg⁸-
Pro⁹-Gly¹⁰-NH₂

LHRH

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

LHRH 및 그 analogue의 효소분해에 관한 연구로

는 Marks & Stern¹⁶⁾ 등이 효소에 의한 불활화 기전을 규명하기 위하여 뇌 균질액과 배양하여 분해산물을 확인함으로써 그들의 분해위치를 규명한 바 있다. 또한 LHRH의 생체내 효소에 의한 분해저동은 Carone¹⁷⁻¹⁸⁾ 등에 의하여 수년에 걸쳐 상세히 보고되어 왔다. 이들은 LHRH의 분해장기 및 분해효소를 밝히기 위하여 흰쥐의 뇌, 폐 및 간장에 LHRH를 투여후 그 분해양상 및 분해산물에 대해 연구하였고, 뇌, 뇌하수체, 간, 폐, 난소 및 정소의 균질액에서의 LHRH의 분해산물 및 분해효소에 대한 연구보고를 하였다. 최근 그들은 endopeptidase 24.15(EP 24. 15) 및 endopeptidase 24.11 (EP 24. 11)의 효소억제제를 합성하여 뇌하수체 및 시상에서 LHRH의 주 분해효소가 EP 24. 15이며 그외 EP 24. 11 및 angiotensin converting enzyme (ACE)이 LHRH의 생체내 분해에 관여한다는 것을 밝혀내었다.¹⁹⁻²⁰⁾ Oylar²¹⁾ 등도 LHRH의 agonist인 Histrelin의 수용액에 대한 안정성, 그 분해위치 및 분해산물에 대해 보고하였다. Han²²⁾ 등은 펩타이드 약물의 효소분해억제 연구중 가토의 비강점막 균질액에서의 인슐린 가수분해가 중쇄지방산염을 첨가함으로써 효과적으로 억제될 수 있음을 보고하고, 그 기전으로 인슐린 농도 및 중쇄지방산염의 농도에 따라 분해억제 혹은 분해촉진 효과가 있음을 보고하였다. 본 연구에서는 LHRH의 점막투여 부위에서의 분해양상 및 분해억제제로서 중쇄지방산염 첨가가 이들 효소분해에 미치는 영향을 검토하였다.

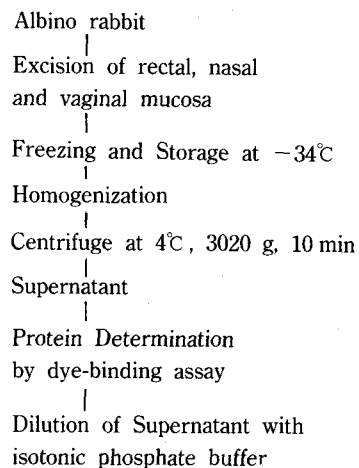
실험방법

시약—LHRH, 소혈청 알부민 및 tryptophan은 Sigma Chemical Co. 의 것을, sodium caprylate, sodium caprate 및 sodium laurate는 Tokyo Chemical Industries Co. 의 것을 사용하였다. 그의 dye-binding assay kit는 Bio-rad Co.,Ltd.의 것을 사용하였고 아세토니트릴, 인산, 메탄올, 에탄올아민, 트리에틸아민, 페닐이소치오시아네이트 및 기타 시약은 모두 분석용 및 특급품을 사용하였다.

실험동물—Newzealand White종 가토(female, 2~3 kg)를 삼육동물센터 (경기, 오산)에서 공급받아 사용하였다.

가토의 직장, 비강 및 질점막의 채취 및 각점막 균질액의 조제—가토의 귀정맥에 urethane 용액(0.5 g/ml) 3 ml를 주사하여 마취한 후 하복부를 절개하여 질입구로부터 1 cm 정도를 절제하여 질점막을 채취하였다. 이어서 꼬리의 연골을 따라 절제하여 직장을 노출시키고 항문으로부터 2 cm 정도를 절단하여 장막층의 불필요한 조직을 제거하고 등장 인산염완충액 (pH 7.4)으로 직장에 있는 불순물을 씻어내어 직장점막을 분리하였다. 비강점막은 수술용 가위로 비중격 (nasal septum)을 자르고 구강내 천정부위를 정중선을 따라 절개한 후 비강을 완전히 노출시킨 후 비강 연골의 측벽에 부착된 점막을 분리하였다. 얻어진 각 점막조직에 동량의 등장 인산염완충액(직장 및 비강 점막; pH 7.4, 질점막; pH 6.0)을 가하여, ice bath 상에서 균질액 (Ultra-Turax T25, Janke & Kunkel GmbH, Germany)를 사용하여 균질화하였다. 이 균질액을 저온 원심분리기(Himac CR 15D, Hitachi Co., Ltd., Japan)를 사용하여 4°C에서 15분간 원심분리 (3020 g)하여 세포와 핵 파편을 제거한 후 상등액을 취하여 실험에 사용하였다.

상등액중의 단백질 농도는 색소결합시험법²³⁾으로 측정하였다. 즉, 비강, 직장 또는 질점막 균질액 일정 희석액에 색소결합시험키트의 희석액 일정량을 가하고 흡광도(595 nm)를 측정하였으며, 표준품으로서 소혈청알부민을 사용하여 작성한 검량선으로부터 단백질 농도를 산출하였다(Scheme I). 이 검량선으로부터



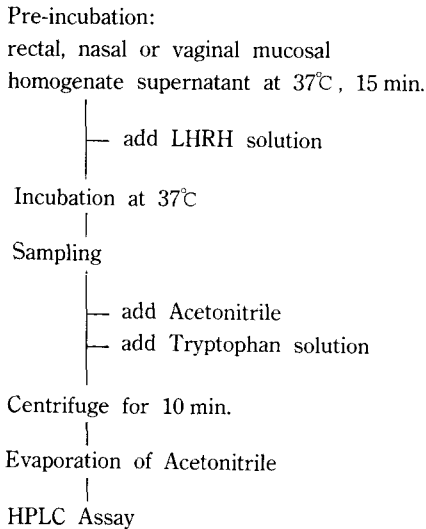
Scheme I—Procedure of preparation of the rectal, nasal and vaginal mucosal homogenates of the albino rabbit.

단백 농도를 구하고, 그 농도가 5~10 mg/ml이 되도록 등장 인산염 완충액으로 균질액을 희석하여 단백질 분해효소를 일정한 농도로 조정한 후 시험액으로 하였다.

직장, 비강 및 질 점막 균질액 중에서 LHRH의 안정성

1) 점막 균질액 중에서 LHRH의 효소적 분해—직장, 비강 및 질점막 균질액 100 μl를 37°C에서 15분간 수욕중에서 진탕하면서 preincubation한 후 100 μl의 LHRH 용액(1 mg/ml)을 가하여 배양하였다. 일정 시간간격으로 배양액으로부터 검액 25 μl를 채취한 후, 아세트니트릴 100 μl를 첨가하여 효소반응을 종결시켰다. HPLC 분석을 위한 내부표준물질로서 tryptophan 용액(16 μg/ml) 25 μl를 가한 후 원심분리(10,000 g) 하여 응고된 단백질을 제거하고 그 상등액을 취하여 질소기류하에서 아세트니트릴을 증발시킨 다음 15 μl를 HPLC에 주입하였다(Scheme II).

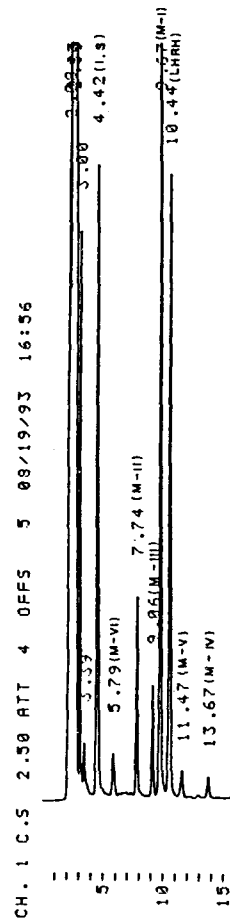
2) LHRH의 분해에 미치는 중쇄 지방산염의 영향—효소 분해 억제제로서 중쇄 지방산염이 LHRH의 분해에 미치는 영향을 검토하기 위하여 배양혼합물 중에 sod. caprylate, sod. caprate 및 sod. laurate를 각각 0.1~1.0%가 되도록 첨가하여 전술한 방법에



Scheme II—Procedure of incubation of LHRH in the rectal, nasal or vaginal mucosal homogenate supernatants and sample preparation for HPLC assay.

따라 실험하였다.

LHRH의 HPLC에 의한 정량—LHRH의 정량은 Lee 등의 HPLC법²⁴⁾을 개량하여 사용하였다. HPLC는 Hitachi Co., Ltd.의 HPLC set(Model L-6000 Pump, L-6200 Intelligent Pump, L-4200 UV/VIS Detector, D-2500 Chromato-Integrator)을 사용하였으며, 컬럼은 Lichrosorb RP-18 (10 μm, 4×250 mm)를 사용하였다. 이동상으로는 탈이온수에 0.6% 에탄올 아민을 첨가하고 인산으로 pH 3.0으로 조정한 용매와 아세트니트릴을 gradient로 하여 사용하였으며, 이동상



Scheme III—Chromatograms of LHRH and tryptophan as internal standard. HPLC assay was performed in; column, Lichrosorb RP-18 (10 μm, 4×250 mm); flow rate, 1.0 ml/min; UV detector, 254 nm; mobile phase, water/acetonitrile 15~35% gradient elution.

용매중의 아세트니트릴 비율을 20분에 걸쳐 15%에서 35%까지 단계적으로 증가시킨 후 초기비율로 돌아오도록 하였다. 파장은 254 nm, 유속은 1.0 ml/min으로 하였다. LHRH의 retention time은 10.4±0.05 min 이었다(Scheme III).

LHRH 분해산물의 확인—LHRH를 각 점막 균질액과 배양 하였을 때 효소분해에 의해 생성되는 LHRH의 분해산물의 구성 아미노산을 PITC법^{25,26)}에 의해 확인하였다. 즉, 각 점막과 LHRH를 배양 후 일정시간별로 채취한 시료를 HPLC에 주입한 후 각 분해산물의 피크 출현시간(5.7 min, 7.7 min, 9.0 min, 9.6 min, 11.4 min, 13.6 min)에 용리액을 분획 수집하여 시료에 1% 페놀을 함유하는 6N-염산 10 ml를 가하고 110±1°C 에서 24시간 가수분해한 후 실온으로 냉각하고 증류수를 가하여 50 ml가 되도록 하였다. 이중 50 µl를 취하여 반응용바이알에 넣고 Pico-Tag Workstation (Waters Co. Ltd., U.S.A)에 장착한 후 감압하에 시료를 완전히 건조하였다. 건조된 시료에 redrying solvent (ethanol : water : triethylamine=2 : 2 : 1, v/v) 10 µl씩을 가한 후 다시 건조하였다. 이어서 건조된 시료에 phenylisothiocyanate (PITC) 10%액 (ethanol : water : triethylamine : PITC=7 : 1 : 1 : 1, V/V) 20 µl를 가한 후 실온에서 20분 방치한 후 Pico-Tag Workstation에 장착한 후 감압하에 건조하여 미반응 시약을 제거하였다. 이와같이 제조한 검액을 다음과 같은 HPLC(Waters 501 pump, 717 autosampler, 996 photodiode array detector, temperature control module, computer, printer, U.S.A.) 조건하에서 아미노산 표준품과 비교하여 확인하였으며 Scheme IV에 이과정을 간단히 모식적으로 나타내었다.

HPLC Condition

Detector: UV/VIS Spectrophotometer(Wavelength: 254 nm)

Column: Pico-Tag Column(150 mm×3.9 mm)

Column Oven Temperature: 45±1°C

Eluent: A액-0.14 M sodium acetate

0.05% triethylamine

1L Milli-Q quality water

pH 6.3~6.4 with phosphoric acid:

Acetonitrile=94 : 6 (v/v)

B액-60% Acetonitrile

Gradient condition

Time	Flow	%A	%B	Curve
Initial	1.0	100	0	*
10.0	1.0	54	46	5
10.5	1.0	0	100	6
11.0	1.5	0	100	6
14.0	1.5	0	100	6
14.5	1.5	100	0	6
20.5	1.5	100	0	6
21.0	1.0	100	0	6

Peptide/Protein

— hydrolysis (6N HCl+1% phenol,
N₂, 110±1°C, 24 hr)

Free Amino Acids

— residual HCl removal

— redrying

— phenylisothiocyanate derivatization

PTC Amino Acids

— excess reagent removal

— HPLC-analysis

Amino Acids Composition

Scheme IV—Procedure of sample preparation in PTC amino acids analysis.

결과 및 고찰

LHRH 분해산물의 확인—수용액 중에서 LHRH 안정성에 관해서는 Shi²⁷⁾ 등이 보고한 바 있으나 분해산물을 동정하지는 않았고, Moto²⁸⁾ 등은 pH 5 수용액 중 25, 37, 50, 및 80°C 에서 Glu-His 및 Trp-Ser peptide bond가 깨지거나 말단 amide에서 가수분해가 일어나는 것으로 보고하고 있으며, pH 6.5, 25°C 에서 90일 동안 3% 이하의 분해가 일어나는 것으로 보고

하였다. 또한 Lasdun²⁰⁾ 등은 뇌하수체와 시상하부의 균질액에서 LHRH의 분해산물에 대한 연구결과 EP 24, 15에 의해 Tyr-Gly 위치가 개열되어 LHRH¹⁻⁵가 생성되며 이것은 후속하여 ACE에 의하여 pGlu-His-Trp과 Ser-Tyr로 분해된다고 밝혔다. 또한 EC 24.11에 의하여서는 Gly-Leu 부분이 개열되어 LHRH¹⁻⁶이 생성되고, 이것은 다시 pGlu-His-Trp-Ser과 Tyr-Gly로 분해된다고 보고하였다.

PITC법에 의한 점막 균질액 중 LHRH 분해산물은 아미노산 분석 결과 유지시간 9.6분의 분해산물의 구조는 pGlu-His-Trp-Ser-Tyr (M-I), 7.7분은 pGlu-His-Trp (M-II), 9.0분은 pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly (M-III) 임이 확인되었다. 나머지 5.7분 (M-VI), 11.4분 (M-V) 및 13.6분 (M-IV)대의 분해산물은 일시적으로 소량 나타나므로 확인하기가 어려웠다.

Fig. 1에 PITC법에 의한 17종의 아미노산의 분리

양상을 나타내었으며 아미노산 표준품과의 retention time을 비교시 왼쪽부터 aspartic acid, glutamic acid, serine, glycine, histidine, arginine, threonine, alanine, proline, tyrosine, valine, methionine, cystine, isoleucine, leucine, phenylalanine 및 lysine 임을 확인할 수 있었다. 또한 Fig. 2는 LHRH를 가수분해하여 PTC amino acid로 만든 후 HPLC에 주입한 결과로 LHRH의 구성 아미노산중 8종(glutamic acid, serine, glycine, histidine, arginine, proline, tyrosine, leucine)을 확인하였다. 한편 tryptophan은 HCl 가수분해로 파괴되어 나타나지 않으므로 분해산물중의 tryptophan 존재 여부는 균질액 중에서 LHRH를 정량하기 위한 HPLC법과 병용하여 확인하였다.

점막 균질액중 LHRH의 효소분해—Fig. 3은 직장 점막 균질액 중 서로 다른 단백질농도에서 시간에 따른 LHRH의 분해양상 및 분해산물의 생성 양상을 나타낸

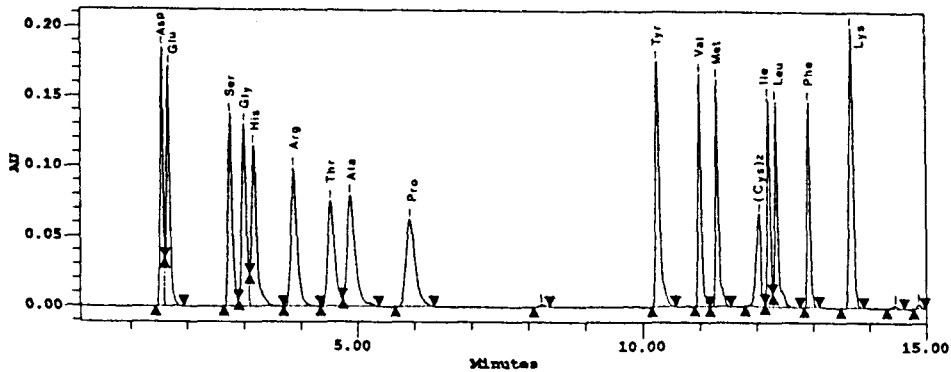


Fig. 1—Chromatograms of 17 PTC amino acids appeared to the order of Asp., Glu., Ser., Gly., His., Arg., Thr., Ala., Pro., Tyr., Val., Met., Cys), Ile., Leu., Phe. and Lys., respectively. The concentration of each amino acid was 1 nmol/ml.

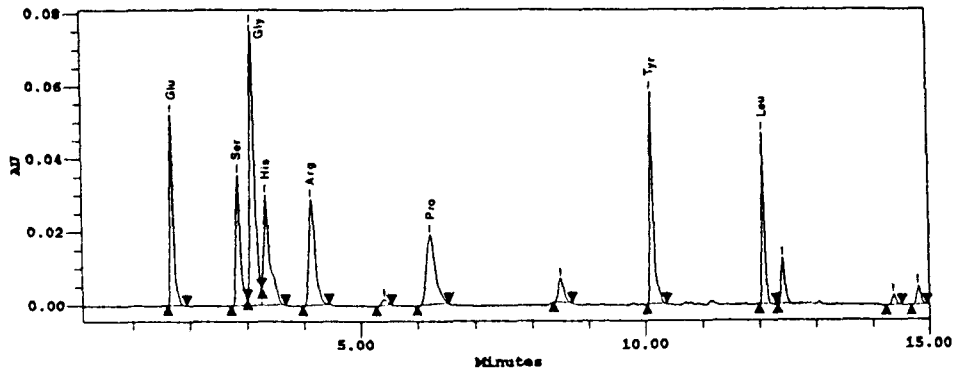


Fig. 2—Chromatograms of component amino acids of LHRH.

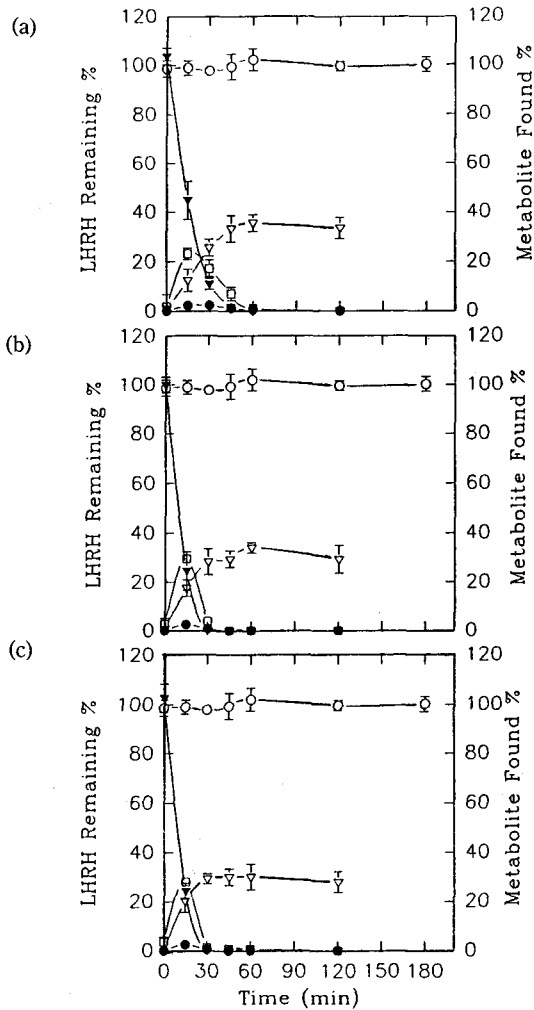


Fig. 3—Proteolysis profile of LHRH and its metabolites in rectal mucosal homogenate. Error bars represent standard deviations for three times mean. The tissue protein concentrations are (A) 1.25 mg/ml, (B) 2.5 mg/ml and (C) 5 mg/ml, respectively.

Key: ○; control, ▼; LHRH, □; M-I(LHRH¹⁻⁵), ▽; M-II(LHRH¹⁻³), ●; M-III(LHRH¹⁻⁶)

것이다. 뇌하수체 및 시상하부의 균질액 중에서 EP 24.15에 의한 분해산물로 보고된 바 있는 M-I(LHRH¹⁻⁵)은 직장점막에서도 배양 초기에 상당량 검출되었으며, 이것은 후속하여 tripeptide인 M-II (LHRH¹⁻³)로 분해를 받아 15분 이후부터는 M-I이 감소하는 동시에 M-II가 증가하였으며, 30분 이후부터는 M-II만 일정량 검출되었다. 또한 단백질농도의 증가에 따라

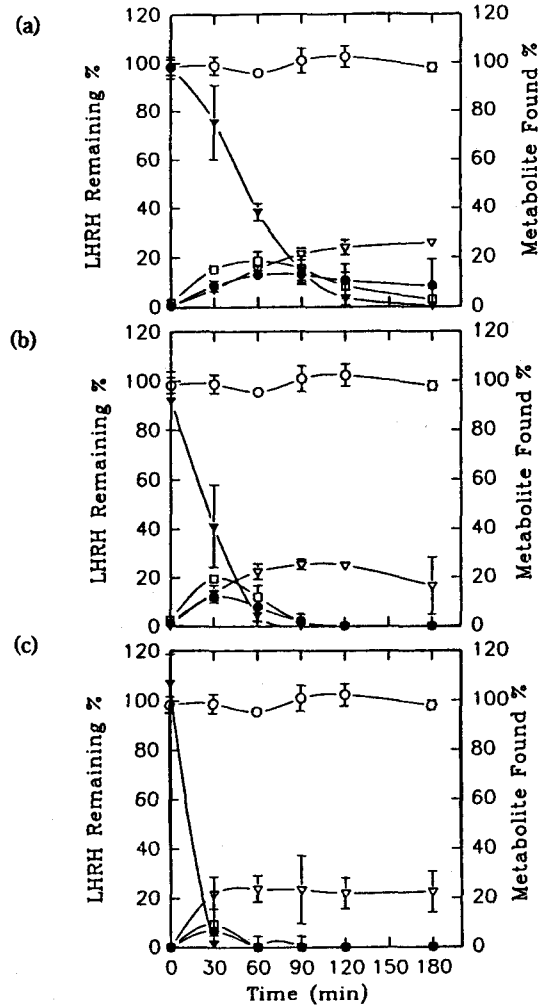


Fig. 4—Proteolysis profile of LHRH and its metabolites in nasal mucosal homogenate. Error bars represent standard deviations for three times mean. The tissue protein concentrations are (A) 1.25 mg/ml, (B) 2.5 mg/ml and (C) 5 mg/ml, respectively.

Key: ○; control, ▼; LHRH □; M-I(LHRH¹⁻⁵), ▽; M-II(LHRH¹⁻³), ●; M-III(LHRH¹⁻⁶)

LHRH의 분해속도가 증가하였으며, M-III(LHRH¹⁻⁶)는 어느 경우에도 소량만이 생성되었다.

한편 비강점막 균질액에서는 Fig. 4에서와 같이 LHRH의 분해속도는 직장점막에 비해 늦었으며, 역시 단백질농도 증가에 따라 분해속도가 빨라졌다. 분해산물은 직장점막에서와 마찬가지로 M-I, M-II 및 M-III가 검출되었으며, 직장점막에 비해 Tyr-Gly bond가

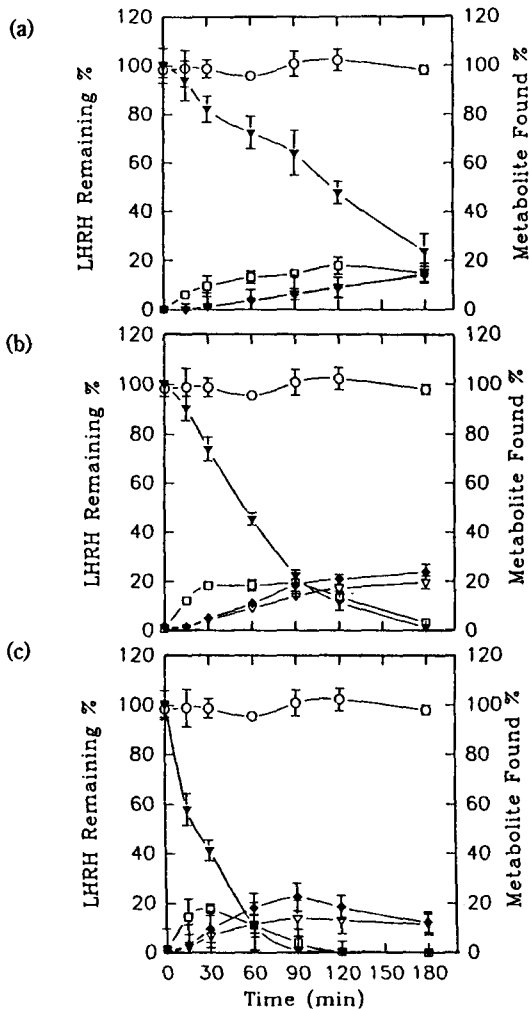


Fig. 5—Proteolysis profile of LHRH and its metabolites in vaginal mucosal homogenate. Error bars represent standard deviations for three times mean. The tissue protein concentrations are (A) 1.25 mg/ml, (B) 2.5 mg/ml and (C) 5 mg/ml, respectively.
Key: ○; control, ▼; LHRH, □; M-I(LHRH¹⁻⁵), ▽; M-II(LHRH¹⁻³), ◆; M-VI(unknown)

개별되어 생성되는 M-I의 생성이 상대적으로 지연되는 것으로 보아 비강점막이 직장점막에 비해 EP 24.15의 활성이 작은 것으로 생각되며, 따라서 배양액중 단위 시간당 LHRH의 양이 직장점막의 경우보다 많아져서 EP 24.11에 의해 Gly-Leu bond가 개별되어 생성되는 M-III가 직장점막에서 보다 많이 검출되는 것으로 생각된다.

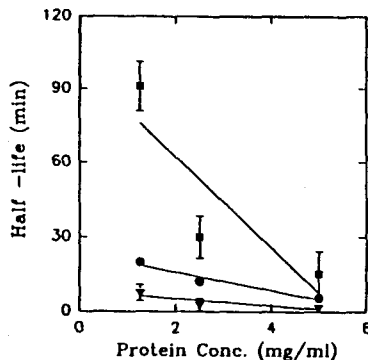


Fig. 6—Influence of protein concentrations on half life of LHRH proteolysis in various mucosal homogenates. The tissue protein concentrations are 1.25 mg, 2.5 mg and 5 mg/ml, respectively.
Key: ▼; Rectal, ●; Nasal, ■; Vaginal

Fig. 5는 질점막 균질액 중에서의 LHRH의 분해양상을 나타낸 것으로 앞서의 직장점막 및 비강점막의 경우에 비하여 분해가 훨씬 완만히 일어났으며, 주 분해산물은 M-I 이었고 단백질농도가 1.25 mg/ml일 경우 ACE에 의한 분해산물로 밝혀진 M-II의 생성속도가 현저히 감소하여 직선적으로 증가함을 나타내었다. EP 24.11에 의한 분해산물로 밝혀진 M-III는 거의 나타나지 않았으며 직장점막 및 비강점막에서 소량 생성되었던 M-VI가 상당량 생성되었다.

Fig. 3~5로부터 각 점막 균질액 중에서 LHRH의 분해는 이들을 log plot 할때 1차속도임을 보였으며 소실속도식으로부터 반감기를 구해 Fig. 6에 나타내었다. Protein 농도가 증가함에 따라 분해속도가 비례하여 증가하는 경향을 나타냈으며 이들 분해속도의 크기는 직장>비강>질점막 순이었다. 이상의 실험결과를 Lasdun²⁰⁾ 등이 뇌하수체 및 시상하부에서 LHRH의 주요분해효소는 EP 24.15이며 이들에 의해 Tyr-Gly가 개별되어 LHRH¹⁻⁵가 생성된다는 보고에서와 마찬가지로 직장, 비강 및 질점막 균질액에서도 EP 24.15에 의한 분해에 따른 M-I의 생성이 우세했으며, M-I의 생성속도 및 양으로 보아 EP 24.15의 상대적 존재 비율은 직장>비강>질 점막 순으로 컸으며, 질점막의 경우 M-III가 생성되지 않는 것으로 보아 EP 24.11이 현저히 결여되어 있는 것으로 생각되어 질점막은 EP 24.15 및 EP 24.11로부터 LHRH의 분해를 피할 수 있는 보다 적합한 경로로 생각된다.

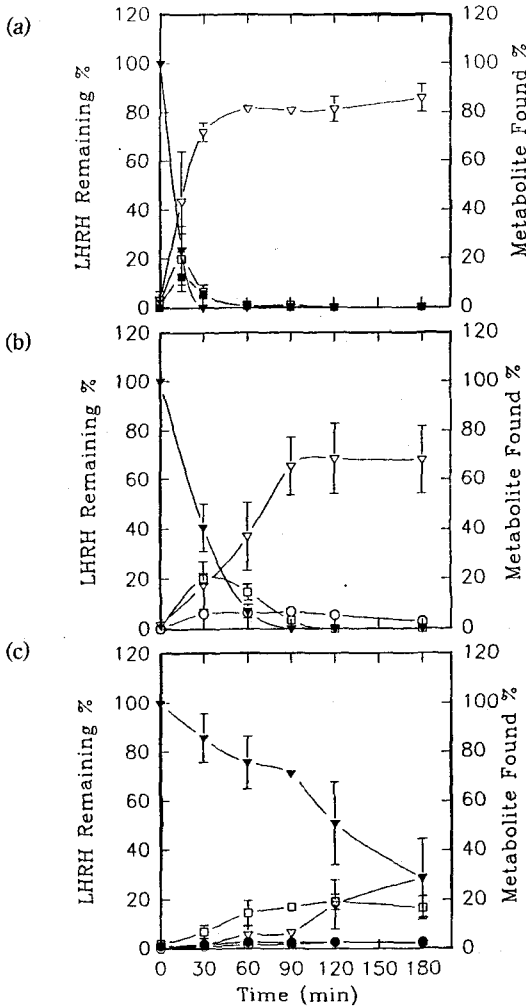


Fig. 7—Effect of sodium caprylate(0.5%) on LHRH proteolysis and its metabolites in various mucosal homogenate (A: rectal, B: nasal, C: vaginal). Error bars represent standard deviations for three times mean. The tissue protein concentration is 2.5 mg/ml.
Key: ▼; LHRH, □; M-I(LHRH¹⁻⁵), ▽; M-II(LHRH¹⁻³), ○; M-III(LHRH¹⁻⁶), ●; M-IV(unknown), ■; M-V(unknown)

LHRH의 분해에 미치는 중쇄 지방산염의 영향
Fig. 7은 LHRH의 분해에 미치는 중쇄지방산염 중 탄소수 8개인 sod. caprylate의 영향을 검토하여 본 것으로 직장 및 비강 점막 균질액에서의 LHRH 분해를 그다지 억제하지는 못했으나 M-II의 생성량이 sod. caprylate를 첨가하지 않았을 때에 비해 현저히

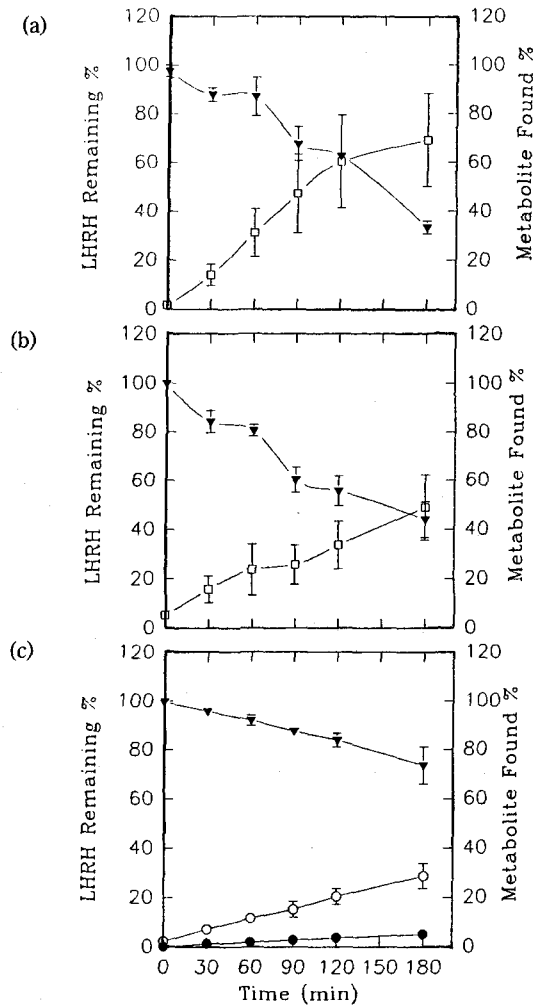


Fig. 8—Effect of sodium caprate(0.5%) on LHRH proteolysis and its metabolites in various mucosal homogenates. (A: rectal, B: nasal, C: vaginal). Error bars represent standard deviations for three times mean. The tissue protein concentration is 2.5 mg/ml.
Key: ▼; LHRH, □; M-I(LHRH¹⁻⁵), ○; M-III(LHRH¹⁻⁶), ●; M-V(unknown)

증가한 것으로 보아 M-II가 재차 분해되는 것을 억제하여 M-II가 축적되었기 때문이라고 생각되며, 질 점막 균질액의 경우 LHRH 분해가 약간 억제됨을 나타내었고 그에 따라 M-I의 생성속도가 늦어졌으며 M-V는 나타나지 않았다. Fig. 8은 중쇄지방산염 중 탄소수 10개인 sod. caprate가 LHRH의 분해에 미치는 영향을 검토하여 나타난 것으로 sod. caprate를 첨

가하지 않았을 때에 비해 LHRH의 분해가 현저히 감소하였으며 직장 및 비점막의 경우 M-II가 생성되지 않은 것으로 보아 ACE가 현저히 억제된 것으로 보이며, 질점막의 경우 M-I이 생성되지 않았으므로 0.5%의 sod. caprate 첨가로 질점막에 존재하는 EP 24.15를 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

Fig. 9는 탄소수가 12개인 sod. laurate를 첨가했을 때 각 점막에서 LHRH의 분해억제 효과를 본 것으로 직장점막의 경우에서 약간의 분해가 일어났으며 비강 및 질점막 균질액 중에서는 분해가 완전히 억제되었다. 이것으로 비강 및 질점막 균질액에서 EP 24.15 및 EP 24.11에 의한 LHRH의 분해억제를 위한 sod. laurate의 첨가 농도는 0.5% 정도면 충분하다는 것을 알 수 있었다.

Table I은 균질액 중 단백질 농도에 따른 각 점막에서의 LHRH의 반감기를 계산한 것으로 단백질 농도가 2.5 mg/ml일 때 직장점막의 경우 2.7분, 비강점막의 경우 12분, 질점막의 경우 29.9분을 나타내었으며, Table II는 각종 첨가제의 농도에 따른 LHRH 분해 반감기를 산출하여 나타낸 것으로 첨가제 농도 및 첨가제의 탄소사슬의 길이가 증가함에 따라 효소 분해 억제효과가 큰 것으로 나타났다. 직장점막의 경우 sod. laurate 1% 첨가로, 비강 및 질점막의 경우 sod. laurate 0.5% 첨가로 각 점막에 존재하는 효소로부터 LHRH 분해를 효과적으로 억제할 수 있었다.

결론

펩타이드 약물의 일종인 LHRH의 주사투여의 대체 경로인 경점막 투여를 모색하기 위한 기초실험으로 가토의 직장, 비강 및 질점막 균질액과 LHRH를 배양하였을 때 그들의 분해양상, 분해산물 및 중쇄지방산염이 이들 분해억제에 미치는 영향을 검토하여 다음과 같은 결론을 내릴 수 있었다.

1. LHRH의 주 분해산물은 LHRH¹⁻⁵, LHRH¹⁻⁶ 및 LHRH¹⁻³ 이었으며, 생성되는 분해산물로 보아 직장, 비강 및 질점막에 존재하는 LHRH의 주 분해효소는 EP 24.15 이었으며, 그 활성의 크기는 직장>비강>질점막순이었다.

2. 중쇄지방산염의 첨가로 각 점막에 존재하는 LHRH 분해효소를 억제할 수 있었으며 그 억제 정도는 탄소 사슬이 길어짐에 따라 증가하여 sod. lau-

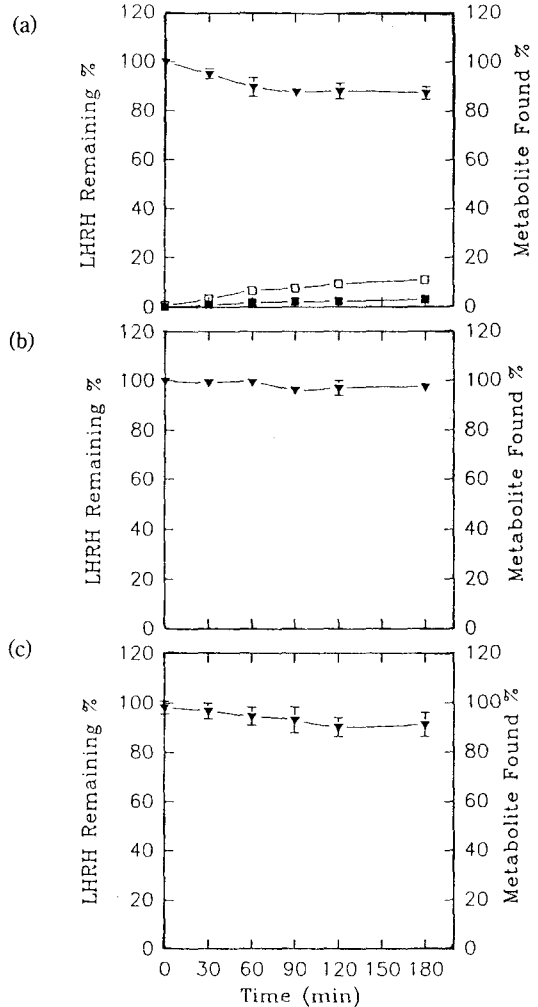


Fig. 9—Effect of sodium laurate(0.5%) on LHRH proteolysis and its metabolites in various mucosal homogenates (A: rectal, B: nasal, C: vaginal). Error bars represent standard deviations for three times mean. The tissue protein concentration is 2.5 mg/ml. Key: ▼; LHRH, □; M-I(LHRH¹⁻⁵), ■; M-IV (unknown)

Table I—Half life(min) of LHRH in various mucosal homogenate supernatant

Protein conc. (mg/ml)	Rectal	Nasal	Vaginal
1.25	7.5± 0.8	19.7± 0.6	90.9± 10.2
2.5	2.7± 0.8	12.0± 1.1	29.9± 8.5
5.0	1.7± 0.5	5.5± 1.8	15.0± 9.2

Table II—Effect of medium chain fatty acid salts on the half life(min) of LHRH. The tissue protein concentration is 2.5 mg/ml

Inhibitor	Conc. of inhibitor (%)						
	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.5
		Rectal			Nasal		Vaginal
Sodium caprylate	1.7 (± 0.7)	2.7 (± 0.5)	34.8 (± 6.8)	6.0 (± 2.7)	13.2 (± 4.6)	286.4 (± 191.2)	16.5 (± 4.0)
Sodium caprate	19.1 (± 6.2)	126.3 (± 9.2)	4666.1 (± 828.1)	20.5 (± 3.8)	156.7 (± 40.0)	7311.0 (± 1701.0)	486.7 (± 50.6)
Sodium laurate	30.8 (± 8.5)	1157.4 (± 50.6)	N.D.	102.0 (± 10.9)	N.D.	N.D.	N.D.

Each value is the mean ± S.D. for 3 experiments.

N.D.: No degradation.

rate(C_{12}) > sod. caprate (C_{10}) > sod. caprylate (C_8) 순이었다.

3. 각 점막에서의 분해양상 및 중쇄지방산염 첨가에 따른 분해억제 효과를 고려해 볼 때 질 점막이 LHRH의 경점막 투여의 가장 적합한 경로로 생각된다.

감사의 글

이 연구는 과학재단 특정기초 연구과제 (#91-05-00-07) 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사 드린다. 그리고 아미노산 분석에 도움을 준 동국대학교 약의 이미정 약사에게 감사 드린다.

문헌

- 1) Su, K. S. E., Campanale, K. M., Mendelsohn, L. G., Kerchner, G. A. & Gries, C. L.: Nasal delivery of polypeptides I: Nasal absorption of enkephalins in rats. *J. Pharm. Sci.*, **74**, 394-398 (1985).
- 2) Hussain, A. A., Kimura, R. & Huang, C. H.: Nasal absorption of testosterone in rats. *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1300-1301 (1984).
- 3) Shichiri, M., Yamasaki, Y., Kawamori, R., Kikuchi, M., Hakui, N. & Abe, H.: Increased intestinal absorption of insulin: an insulin suppository. *J. Pharm. Pharmacol.*, **30**, 806-808 (1978).
- 4) Okada, H., Yamazaki, I., Ogawa, Y., Hirai, S., Yahiki, T. & Mima, H.: Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone releasing hormone analog(leuprolide) in rats I: Absorption by various routes and absorption enhancement. *J. Pharm. Sci.*, **71**, 1367-1371 (1982).
- 5) Stratford, R. E., Carson, L. W., Dodda-kashi, S. & Lee, V. H. L.: Systemic absorption of ocularly administered enkephalinamide and inulin in the albino rabbit: Extent, pathways and vehicle effects. *J. Pharm. Sci.*, **77**, 838-842 (1988).
- 6) Dodda, K. S. & Lee, V. H. L.: Enkephalin hydrolysis in homogenates of various mucosae of the albino rabbit: Similarities in rates and involvement of aminopeptidases. *Life Sci.*, **38**, 2019-2028 (1986).
- 7) Hayakawa, E., Yamamoto, A., Shoji, Y. & Lee, V. H. L.: Effect of sodium glycocholate and polyoxyethylene-9-lauryl ether on the hydrolysis of varying concentrations of insulin in the nasal homogenates of the albino rabbit. *Life Sci.*, **45**, 167-174 (1989).
- 8) Hirai, S., Yashiki, T. & Mima, H.: Mechanisms for the enhancement of the nasal absorption of insulin by surfactants. *Int. J. Pharm.*, **9**, 173-184 (1981).
- 9) Longenecker, J. P., Moses, A. C., Flier, J. S., Silver, R. D., Carey, M. C. & Dubovi, E. J.: Effects of sodium taurodihydrofusidate on nasal absorption of insulin in sheep. *J. Pharm. Sci.*, **76**, 351-355 (1987).
- 10) Nishihata, T., Okamura, Y., Kamida, A., Higuchi, T., Yagi, T., Kawamori, R. & Shichiri, M.: Enhanced bioavailability of insulin after rectal administration with enamine as adjuvant in depancreatized dogs. *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 22-26 (1985).
- 11) Yoshioka, S., Caldwell, L. & Higuchi, T.: Enhanced

- rectal bioavailability of polypeptides using sodium 5-methoxysalicylate as an absorption promoter. *J. Pharm. Sci.*, **71**, 593-594 (1982).
- 12) Miyake, M., Nishihata, T., Wada, N., Takeshima, E. & Kamada, A.: Rectal absorption of lysozyme and heparin in rabbits in the presence of non-surfactant adjuvants. *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 2020-2025 (1984).
 - 13) Okada, H., Yamazaki, I., Ogawa, Y., Hirai, S., Yashiki, T. & Mima, H.: Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone releasing hormone analog (leuprolide) in rats I: Absorption by various routes and absorption enhancement. *J. Pharm. Sci.*, **71**, 1367-1371 (1982).
 - 14) Shally, A. V., Arimura, A., Baba, Y., Nair, R. M. G., Matsuo, H., Redding, T. W., & Debeljuk, L.: Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **43**(2), 393-399 (1971).
 - 15) Okada, H., Sakura, Y., Kawaji, H., Yashiki, T. & Mima, H.: Regression of rat mammary tumors by a potent luteinizing hormone-releasing hormone analogue (Leuprolide) administered vaginally. *Cancer Research*, **43**, 1869-1874 (1983).
 - 16) Marks, N. & Stern, F.: Enzymatic mechanisms for the inactivation of luteinizing hormone releasing hormone(LH-RH). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **61**(4), 1458-1463 (1974).
 - 17) Carone, F. A., Stetler-Stevenson, M. A., May, V., LaBarbera, A. & Flouret, G.: Differences between *in vitro* and *in vivo* degradation of LHRH by rat brain and other organs. *Am. Physiol.* E317-E321 (1987).
 - 18) Lasdun, A., Reznik, S., Molineaux, C. J. & Orłowski, M.: Inhibition of endopeptidase 24.15 slows the *in vivo* degradation of luteinizing hormone releasing hormone. *Am. Pharmacol. Exp. Ther.* **251**(2), 439-447 (1989).
 - 19) Orłowski, M., Michaud, C. & Molineaux, C. J.: Substrate-Related potent inhibitors of brain metalloendopeptidase. *Biochem.*, **27**, 597-602 (1988).
 - 20) Lasdun, A. M.: The role of endopeptidase 24.15 in the metabolism of LHRH. (1990).
 - 21) Oyler, A. R., Naldi, R. E., Lloyd, J. R., Garden, D. A., Shaw, C. J. & Cotter, M. L.: Characterization of the solution degradation products of Histrelin, a Gonadotropin Releasing Hormone (LH/RH) agonist. *J. Pharm. Sci.* **80**(3), 271-275 (1991).
 - 22) Han, K., Cha, C. H., Chung Y. B. & Park, J. S.: Effect of fatty acid salts on proteolysis of insulin in the nasal tissue homogenates of rabbit. *J. Kor. Pharm. Sci.*, **22**(2), 97-104 (1992).
 - 23) Braford, M. M.: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
 - 24) Hawajawa, E., Yamamoto, A., Shoji, Y. & Lee, V. H. L.: Effect of sodium glycocholate and polyoxyethylene-9-lauryl ether on the hydrolysis of varying concentrations of insulin in the nasal homogenates of the albino rabbit. *Life Sciences*, **4**, 167-174 (1989).
 - 25) Koop, D. R., Morgan, E. T., Tarr, G. E. & Coon, M. J.: Purification and Characterization of a unique isozyme of Cytochrome P-450 from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. *J. Biol. Chem.* **257**, 8472-8480 (1982).
 - 26) Heinrikson, R. L. & Meredith, S. C.: Amino acid analysis by reverse-phase high performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with penylisothiocyanate. *Anal. Biochem.* **136**, 65-74 (1984).
 - 27) Shi, Y-F., Sherin, P. J., Brightwell, D., Gallelli, J. F. & Chatterji, D. C.: Long-term stability of aqueous solutions of luteinizing hormone-releasing hormone assessed by an *in vitro* bioassay and liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.* **73**(6), 819-821 (1984).
 - 28) Motto, M. G., Hamburg, P. F., Graden, D. A., Shaw, C. J. and Cotter, M. L.: Characterization of the degradation products of luteinizing hormone releasing hormone. *J. Pharm. Sci.* **80**(5), 419-423 (1991).