

황체호르몬 유리호르몬(LHRH)의 경점막 수송: 토끼 점막균질액 중에서 [D-Ala⁶] LHRH의 효소적 분해 특성 및 중쇄지방산염의 안정화 효과

박정숙 · 정연복 · 한 건*
충북대학교 약학대학
(Received March 10, 1994)

Transmucosal Delivery of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone(LHRH): Enzymatic Proteolysis of [D-Ala⁶] LHRH and Inhibitory Effect of Medium Chain Fatty Acid Salts in Rabbit Mucosa

Jeong Sook Park, Youn Bok Chung and Kun Han*
College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

Abstract—To investigate the feasibility of mucosal delivery of [D-Ala⁶] LHRH, a potent analogue of LHRH, enzymatic proteolysis of [D-Ala⁶] LHRH and inhibitory effect of medium chain fatty acid salts(MFA) were studied using rabbit mucosal homogenate. [D-Ala⁶] LHRH incubated in homogenates of rectal(RE), nasal(NA) and vaginal(VA) mucosa were assayed by HPLC. The degradation of [D-Ala⁶] LHRH followed the first order kinetics. The degradation products were found as [D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁷(m-i), to a lesser extent, [D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁹(m-ii) and [D-Ala⁶] LHRH¹⁻³(m-iii) by the method of amino acid analysis(PITC method). The formation of [D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁷ was not inhibited by the addition of disodium ethylenediaminetetraacetic acid but inhibited by sodium tauro-24,25-dihydrofusidate, suggesting that endopeptidase 24.11(EP 24.11) cleaves the Leu⁷-Arg⁸ bond of [D-Ala⁶] LHRH and is the primary [D-Ala⁶] LHRH degrading enzyme. The patterns of [D-Ala⁶] LHRH degradation indicated that EP 24.11 exists in each mucosal homogenate with the order of RE>NA>VA. MFA significantly inhibited the proteolysis of [D-Ala⁶] LHRH. The addition of sodium caprate(1.0%) or sodium laurate(0.5%) to the each mucosal homogenate completely protected [D-Ala⁶] LHRH from the degradation.

Keywords □ [D-Ala⁶] LHRH, mucoal homogenate, endopeptidase 24.11, MFA, proteolysis, inhibit

호르몬 의존성 질환의 치료에 사용되고 있는 황체 호르몬-유리호르몬(luteinizing hormone-releasing hormone, LHRH)은 체내에서 쉽게 분해를 받아 그 생리 활성을 소실하므로 보다 강력한 합성 analogue들이 개발되어 왔으며 특히 6위 및 10위의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환할 경우 보다 안정하다고 보고되고 있다. Okada 등²⁾은 6위를 D-leucine으로 치환하고 10위의 glycine을 제거한 뒤 9위를 pro-ethia-

mid으로 합성한 leuprolide를 질(陰)로 투여시 LHRH에 비해 배란유도효과가 50~80배 정도 크다고 보고하였다. Nakamura 등³⁾도 3위~8위를 각각 다른 아미노산으로 치환한 LHRH중 6위를 D-alanine으로 치환한 [D-Ala⁶] LHRH가 가장 높은 활성을 지니고 있음을 밝혔다.

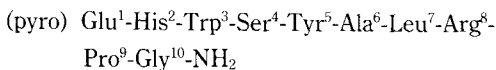
한편 LHRH의 뇌, 폐 및 간장에서의 분해위치 및 분해효소 등에 대해서는 Lasdun 등⁴⁾에 의해 보고된 바 있다. Koch 등⁵⁾은 뇌하수체, 신장 및 간장에서

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

LHRH의 분해는 5~6위 및 9~10위가 첫번째 분해 위치임을 밝혔다. 즉 그들은 6위를 Tryptophan으로 치환한 [D-Trp⁶] LHRH는 5~6위의 분해가 차단되는 반면 Pro⁹-Gly¹⁰NH₂ 위치가 강하게 분해되며, 또 Pro⁶-Gly¹⁰NH₂ 부위도 Pro⁹NET로 치환한 [D-Ala⁶-Pro⁹NET] LHRH는 9~10위의 개별 부분도 차단되어 강력하게 분해에 저항한다고 밝혔다.

저자 등⁶⁾은 protease에 의한 LHRH의 분해 억제제를 개발하기 위하여 가토의 직장, 비강 및 질점막을 취해 그 균질액중에서 LHRH의 분해양상 및 그 분해산물에 대해 밝히고, 효소분해 억제제로서 중쇄지방산염 중 sodium caprylate, sodium caprate 및 sodium laurate 등이 분해에 미치는 영향을 검토하여 보고한 바 있다.

본 연구에서는 LHRH의 6위의 glycine이 D-alanine으로 치환되어 LHRH보다 생리 활성이 강하다고 알려진 [D-Ala⁶] LHRH의 비경구 점막 투여경로를 모색하기 위해 직장, 비강 및 질점막 균질액 중에서 이들의 효소적 분해양상 및 그 분해산물을 밝히고자 하였다. 또한 현재까지 밝혀진 LHRH의 분해에 관련된 효소에 대한 연구보고를 토대로 [D-Ala⁶] LHRH의 분해효소를 규명하고 효소분해억제제⁷⁾로서의 중쇄지방산염의 유효성을 검토하였다.



[D-Ala⁶] LHRH

실험방법

시약-[D-Ala⁶] LHRH, 소혈청 알부민, sodium tauro-24,25-dihydrofusidate(STDHF), disodium ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 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 아세트니트릴, 인산, 메탄올, 에탄올아민 및 기타 시약은 모두 분석용 및 특급품을 사용하였다.

실험동물-Newzealand White종 가토(female, 2~3 kg)를 삼육동물센터(경기도, 오산)에서 공급받아 사

용하였다.

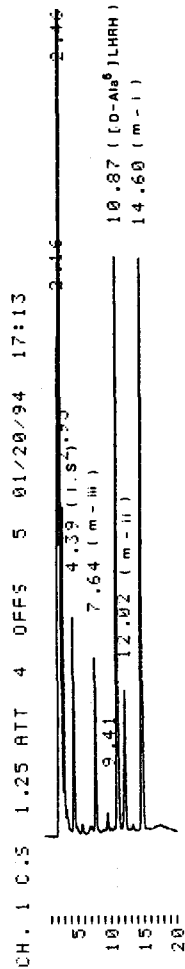
가토의 직장, 비강 및 질점막의 채취 및 각 점막 균질액의 조제-전보(前報)⁶⁾와 마찬가지로 방편으로 각 점막을 채취하여 균질액을 만들고, 색소결합시험법⁸⁾에 의하여 상등액 중의 단백 농도를 5~10 mg/ml로 하여 시험액으로 하였다.

직장, 비강 및 질점막 균질액중에서 [D-Ala⁶] LHRH의 효소적 분해실험-전보의 *in vitro* homogenate법⁹⁾에 준하여, 각 점막 균질액에서의 [D-Ala⁶] LHRH의 안정성을 평가하였다. 각 점막 homogenate 100 μl에 [D-Ala⁶] LHRH 용액(1 mg/ml) 100 μl를 가하여 37°C에서 배양하였다. 경시적으로 배양액을 채취한 후 아세트니트릴 100 μl를 가하여 효소반응을 정지시킨 후 원심분리(10,000 g)하여 응고된 단백질을 제거하고 그 상등액을 취하여 질소기류하에서 아세트니트릴을 증발시킨 다음 15 μl를 HPLC에 주입하여 [D-Ala⁶]LHRH 및 그 대사물을 정량하여 [D-Ala⁶] LHRH의 분해정도를 측정하였다. 중쇄지방산염 및 sodium glycocholate가 [D-Ala⁶] LHRH의 효소분해에 미치는 영향을 검토하기 위하여 배양혼합물에 중쇄지방산염(sodium caprylate, sodium caprate 및 sodium laurate) 및 sodium glycocholate 각각 0.1~1.0%를 첨가하여 실험하였다.

시료 중 [D-Ala⁶] LHRH 및 그 분해산물의 정량-각 점막 균질액중에서의 [D-Ala⁶] LHRH 및 대사물(m-i, m-ii, m-iii 및 m-iv)의 정량은 전보와 마찬가지로 Lee 등의 HPLC법⁹⁾을 개량하여 사용하였다.

[D-Ala⁶] LHRH 분해산물의 확인-[D-Ala⁶] LHRH를 각 점막 균질액과 배양하였을 때 효소분해에 의해 생성되는 [D-Ala⁶] LHRH 분해산물의 아미노산 조성은 전보와 마찬가지로 방법인 PITC법^{10,11)}에 의해 확인하였다.

[D-Ala⁶] LHRH의 분해효소의 규명-단백농도 2 mg/ml의 직장점막 균질액 100 μl에 LHRH 용액(1 mg/ml) 100 μl를 가하고 EDTA(2%) 또는 STDHF(1%)를 첨가하여 이들이 LHRH의 분해에 미치는 영향을 대조군과 비교하여 검토하였다. 또한 LHRH 대신 [D-Ala⁶] LHRH의 경우에도 같은 방법으로 시험 후 시료를 HPLC로 정량하여 각각의 분해산물의 생성여부를 관찰하였다.



Scheme I—Chromatograms of [D-Ala⁶] LHRH and trypthophan as an internal standard.

결과 및 고찰

[D-Ala⁶] LHRH 및 그 분해산물의 정량—전보⁶⁾
 에서 직장, 비강 및 질점막 균질액에서 LHRH는 효소분해에 의해 5~6종의 분해산물이 생성됨을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 LHRH의 analogue인 [D-Ala⁶] LHRH가 직장, 비강 및 질점막 균질액에서 효소분해에 의하여 3~4종의 분해산물이 생성됨을 확인할 수 있었으며 이때 [D-Ala⁶] LHRH의 피이크 출현시간은 10.86±0.05 min 이었다(Scheme I). 분해산물의 명칭은 LHRH 분해산물과 혼동을 피하기 위하여 영문 소문자로 표기하였다.

[D-Ala⁶] LHRH 분해산물의 확인—점막균질액

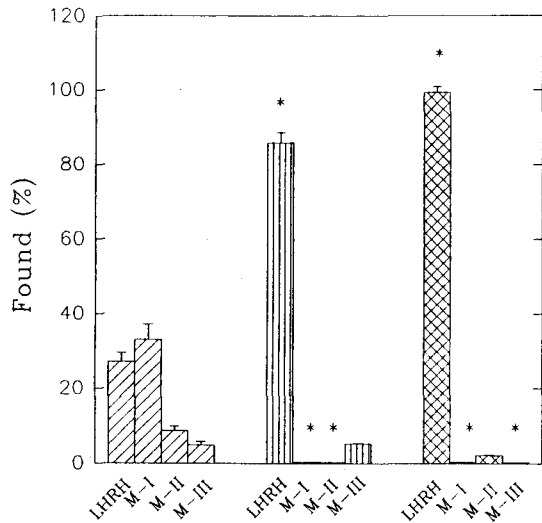


Fig. 1—Inhibitory effect of EDTA(2%) and STDHF(1%) on the LHRH(0.5 mg/ml) proteolysis in rectal mucosal homogenate after 30 min incubation. Error bars represent standard deviations for three times mean. The tissue protein concentration is 1.0 mg/ml.

* Significantly different from the control group (p<0.01)
 Key; ▨ control; ▣ +EDTA(2%); ▤ +STDHF(1%)
 M-I(LHRH¹⁻⁵); M-II(LHRH¹⁻³); M-III(LHRH¹⁻⁶)

중에서 [D-Ala⁶] LHRH의 분해산물은 PITC법에 의한 아미노산 분석결과 피이크 출현시간 14.6분은 [D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁷(m-i), 12.0분은 [D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁹(m-ii), 7.6분은 [D-Ala⁶] LHRH¹⁻³(m-iii)임을 확인할 수 있었다. 그외에 6분대에 출현하는 피이크(m-iv)는 일시적으로 소량 생성되어 확인하기가 어려웠다.

[D-Ala⁶] LHRH 분해효소의 규명—직장점막 균질액에 EDTA 및 STDHF를 첨가하여 LHRH와 배양시 이들 첨가제가 LHRH 분해에 미치는 영향을 Fig. 1에 나타내었다. 즉 2% EDTA 첨가시 대조군에 비해 endopeptidase 24.15에 의한 분해산물로 보고된 바 있는 LHRH¹⁻⁵의 출현이 완전히 억제되었으며 LHRH¹⁻³의 생성도 1% 이하로 현저히 감소된 반면, EP 24.11의 분해산물로 보고된 바 있는 LHRH¹⁻⁶의 생성은 억제되지 않았다. 따라서 EDTA는 EP 24.15를 완전히 억제하며 angiotensin converting enzyme(ACE)도

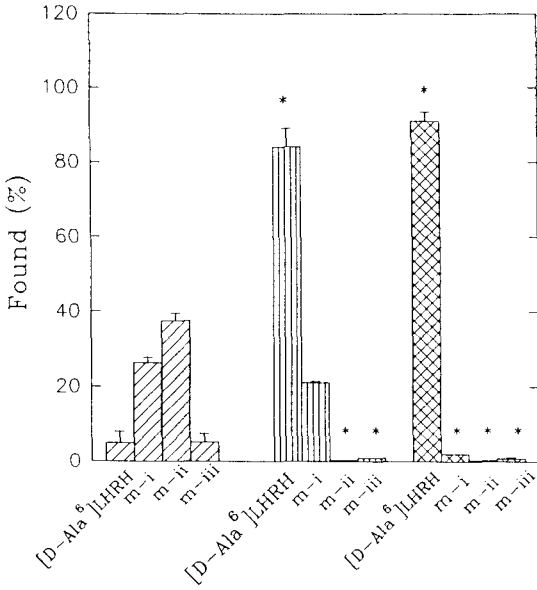


Fig. 2—Inhibitory effect of EDTA(2%) and STDHF(1%) on the [D-Ala⁶] LHRH(0.5 mg/ml) proteolysis in rectal mucosal homogenate after 2 hr incubation. Error bars represent standard deviations for three times mean. The tissue protein concentration is 1.0 mg/ml.

*Significantly different from the control group (p<0.01)

Key; ▨ control; ▩ + EDTA(2%); ▤ + STDHF(1%)

m-i([D-Ala⁶]LHRH¹⁻⁷); m-ii([D-Ala⁶]LHRH¹⁻⁹); m-iii([D-Ala⁶]LHRH¹⁻³)

현저히 억제하는 반면 EP 24.11은 억제하지 못한다고 추정되었다. 또한 1% STDHF를 첨가시 LHRH¹⁻⁵ 및 LHRH¹⁻⁶의 생성이 완전히 억제되었으며, LHRH¹⁻³은 억제하지 못하는 것으로 나타났다(3시간 배양시 19.53 ± 1.4% 생성됨). 따라서 STDHF는 EP 24.15 및 EP 24.11을 완전히 억제하며 ACE는 억제하지 못함을 알 수 있었다. 한편 직장점막 균질액에 EDTA 2%를 첨가하여 [D-Ala⁶] LHRH를 배양시 m-ii의 생성은 완전히 억제되었으며 m-i의 생성은 그다지 억제되지 않았다(Fig. 2). EDTA가 EP 24.11을 억제하지 못한다는 점으로 미루어 m-i은 EP 24.11에 의한 분해산물로 추정되었다. 또한 [D-Ala⁶] LHRH의 경우 STDHF(1%) 첨가시 m-i 및 m-ii의 생성이 거의 완전히 억제되어 m-ii는 EP 24.15에 의한 분해산물로 생각

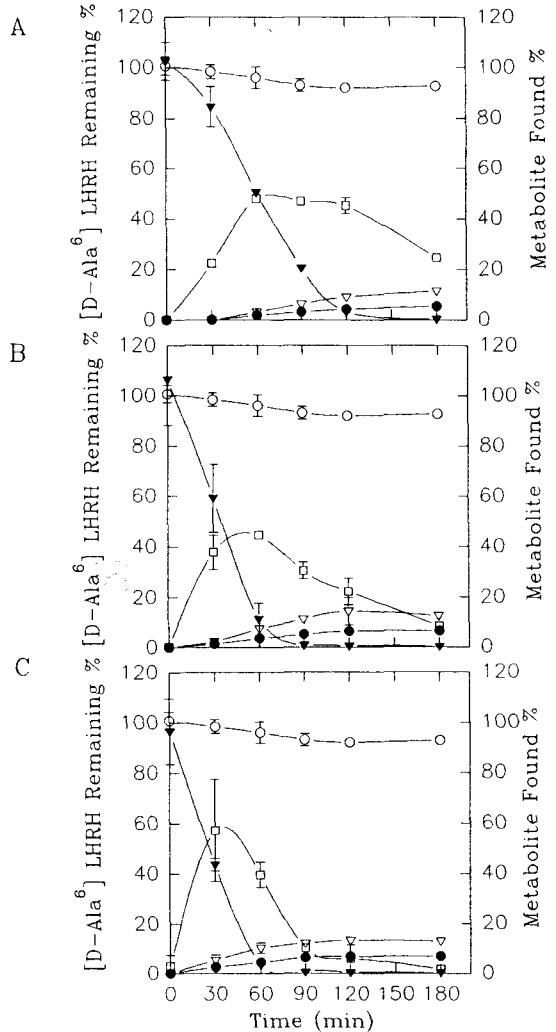


Fig. 3—Proteolysis profile of [D-Ala⁶] LHRH and its metabolites in rectal mucosal homogenate. Error bars represent standard deviations for three times mean. The tissue protein concentrations are (A) 1.25 mg/ml, (B) 2.5 mg/ml and (C) 5.0 mg/ml respectively.

Key: ○; control, ▼; [D-Ala⁶]LHRH, □; m-i, ▽; m-iii, ●; m-iv

되었다. ACE에 의한 분해산물인 m-iii는 EDTA 및 STDHF 첨가시 두경우 모두 2% 이하로 소량 생성되었다. 이것은 ACE의 기질인 Glu-His-Trp-Ser-Tyr의 생성이 부족함에 기인한 것으로 생각된다. 이상의 결과로부터 [D-Ala⁶] LHRH 분해에 관여하는 효소는

EP 24.11, EP 24.15 및 ACE임을 확인할 수 있었다.

각 점막 균질액 중 [D-Ala⁶] LHRH의 효소분해 -전보⁶)에서 직장, 비강 및 질점막 균질액에서 LHRH의 효소분해 특성을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 LHRH의 analogue인 [D-Ala⁶] LHRH의 직장, 비강 및 질점막 균질액에서 효소분해 특성에 대해 검토하였다.

[D-Ala⁶] LHRH의 직장점막 균질액에서의 분해 및 분해산물의 생성 정도를 Fig. 3에 나타내었다. [D-Ala⁶] LHRH는 전보⁶)에서 보고한 LHRH에 비해 분해가 완만히 일어났으며, 분해산물 m-i([D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁷) 이 전 배양시간에 걸쳐 비교적 고농도로 검출되었다. 이것은 [D-Ala⁶] LHRH가 LHRH의 6번째 위치의 glycine 대신 D-alanine으로 치환되어 Tyr⁵-Gly⁶를 잘라 주는 EP 24.15에 의한 분해에 저항하여 EP 24.11에 의한 분해를 받기 때문이라고 생각된다. 또한 LHRH와는 달리 m-iii는 소량 검출되었으며 이것은 EP 24.15에 의한 분해억제로 ACE의 기질인 Glu-His-Trp-Ser-Tyr의 생성량이 부족하기 때문에 결과적으로 Glu-His-Trp이 적게 생성되기 때문이라고 생각된다. 한편 Glu-His-Trp-Ser-Tyr의 생성이 억제됨에도 Glu-His-Trp이 생성되는 것으로 보아 분해받지 않은 [D-Ala⁶] LHRH도 약간의 ACE 기질로 작용하는 것으로 보인다.

이상으로부터 직장점막에서의 [D-Ala⁶] LHRH의 주 분해산물은 EP 24.11에 의한 [D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁷ (m-i)으로 LHRH와 주 분해효소 및 분해위치가 서로 달랐으며, 분해속도도 [D-Ala⁶] LHRH의 경우가 더 늦어서 LHRH 보다 안정함을 나타내었다. 단백질농도에 따른 [D-Ala⁶] LHRH의 분해는 LHRH의 결과⁶)와 마찬가지로 단백질농도가 증가함에 따라 분해가 빨라지는 경향을 보였다.

Fig. 4에 비강점막 균질액에서 [D-Ala⁶] LHRH의 분해양상을 나타내었다. 직장점막에 비해 배양 초기에 [D-Ala⁶] LHRH의 분해 및 m-i의 생성량이 감소하였으며 직장점막에서 검출되지 않았던 m-ii가 검출되었다. 이것은 비강점막이 EP 24.11의 존재 비율이 직장점막에 비해 적어 초기 분해속도가 느려지고 그에 따라 m-i의 전단계 분해산물인 m-ii가 축적되어 검출되는 것으로 생각된다. 즉 단백질농도가 1.25 mg/ml일 때 m-i에 선행하여 m-ii가 출현 후 m-ii의 감소와 함께 m-i이 증가되었으며, 단백질농도가 5 mg/ml인 경우 30

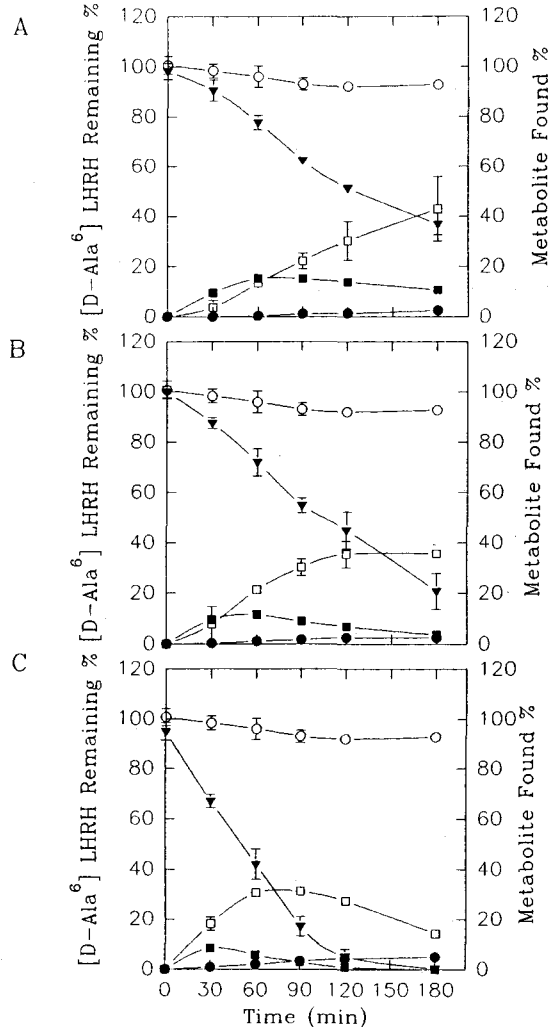


Fig. 4—Proteolysis profile of [D-Ala⁶]LHRH and its metabolites in nasal mucosal homogenate. Error bars represent standard deviations for three times mean. The tissue protein concentrations are (A) 1.25 mg/ml, (B) 2.5 mg/ml and (C) 5.0 mg/ml, respectively.

Key: ○; control, ▼; [D-Ala⁶] LHRH, □; m-i, ■; m-ii, ●; m-iv

분에서 이들이 역전되는 것이 관찰되었다. 이것은 단백질농도 1.25 mg/ml인 경우 90분 이후의 양상과 같음으로 위와 같은 추측이 옳다는 것을 시사해 준다. 반면에 직장점막에서와는 달리 m-iii는 검출되지 않았다. 이것은 ACE의 기질이 부족한 것 뿐만 아니라 직장점막에 비해 비강점막에 ACE의 상대적 존재량이

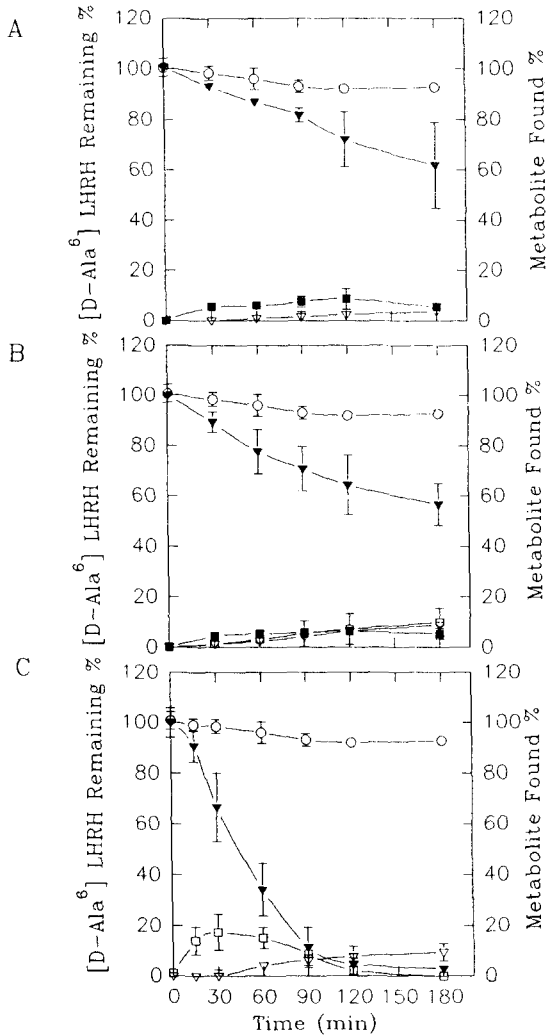


Fig. 5—Proteolysis profile of [D-Ala⁶]LHRH and its metabolites in vaginal mucosal homogenate. Error bars represent standard deviations for three times mean. The tissue protein concentrations are (A) 1.25 mg/ml, (B) 2.5 mg/ml and (C) 5.0 mg/ml, respectively.

Key: ○; control, ▼; [D-Ala⁶] LHRH, □; m-i, ■; m-ii, ▽; m-iii

적기 때문으로 생각된다.

한편 질점막의 경우(Fig. 5) 효소의 활성이 가장 작은 1.25 mg/ml인 경우 m-i는 생성되지 않았다. 이것은 단백질농도가 5 mg/ml인 경우 배양시간 초기 30분 동안 m-ii가 생성된 후 m-i이 후속하여 생성된 것으로 보아 m-ii의 생성이 저조함에 기인한 것으로 생각된다.

또한 전에 보고⁶⁾한 질점막 균질액 중에서 LHRH의 주요 분해산물로 보고된 LHRH¹⁻⁶가 거의 출현하지 않은 것으로 보아 질점막에는 EP 24.11의 양이 절대적으로 적기 때문에 m-i의 생성이 저조하다고 생각된다. 따라서 직장, 비강 및 질점막에는 EP 24.11이 서로 다른 비율로 존재하며 특히 질점막에는 EP 24.15 뿐만 아니라 EP 24.11이 현저히 결여되어 있음을 재차 확인할 수 있었다.

이상으로부터 前報⁶⁾의 LHRH의 결과와 본 연구의 [D-Ala⁶] LHRH의 각 점막에서의 분해 특성을 고찰하면 다음과 같다. 즉 LHRH의 주 분해산물은 직장, 비강 및 질점막 모두에서 LHRH¹⁻⁵(M-I), LHRH¹⁻³(M-II) 또는 LHRH¹⁻⁶(M-III)로 나타났으며, [D-Ala⁶] LHRH의 주 분해산물은 이와는 달리 직장 및 비강점막의 경우 [D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁷(m-i)이 우세한 분해산물이었고 비강 및 질점막의 경우 m-i의 전단계 분해산물인 [D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁹(m-ii)의 축적이 관찰되었다. 이와 같이 각 점막에서 LHRH 및 [D-Ala⁶] LHRH의 분해산물이 서로 다른 이유는, LHRH의 경우 EP 24.15에 의해 Tyr⁵-Gly⁶ 부위⁴⁾가 공격을 받아 분해산물이 생성되는 반면, [D-Ala⁶] LHRH는 이들 부위가 효소에 의한 분해에 저항을 하여 다른 부위 즉, prolylenendopeptidase에 의해 Pro⁹-Gly¹⁰ 위치⁵⁾가 분해되기 때문이라고 생각된다. 본 연구결과에 있어서도 직장, 비강 및 질점막 균질액 중에서 [D-Ala⁶] LHRH의 분해는 EP 24. 11, EP 24. 15 및 ACE에 의해 Leu⁷-Arg⁸, Pro⁹-Gly¹⁰ 및 Trp³-Ser⁴ 부위가 개열되어 [D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁷, [D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁹ 및 [D-Ala⁶] LHRH¹⁻³가 생성됨을 알 수 있었다. 한편 이들 약물이 각 점막에서 분해속도가 다른 이유로 Lee 등¹²⁾은 peptide 및 protein은 각 점막에 존재하는 endopeptidase에 의해 분해를 받으며 이들 endopeptidase들의 각 점막에서의 단백질분해 활성은 서로 다르다고 하였다. 즉 small peptide의 경우 분해속도는 rectal>buccal>nasal>vaginal 순이며, protein의 경우 nasal>rectal>vaginal>buccal 순이라고 보고하였으며 본 연구의 결과는 이와 일치하는 것으로 나타났다. 또한 각 점막에 존재하는 단백질분해효소들의 상대적 비율 및 subcellular distribution이 다르다는 Lee 등¹²⁾의 주장은 각 점막에서 [D-Ala⁶] LHRH의 분해산물의 상대적 양 및 종류가 다르게 나타난 본 연구결과를 뒷바침 해 주고 있다.

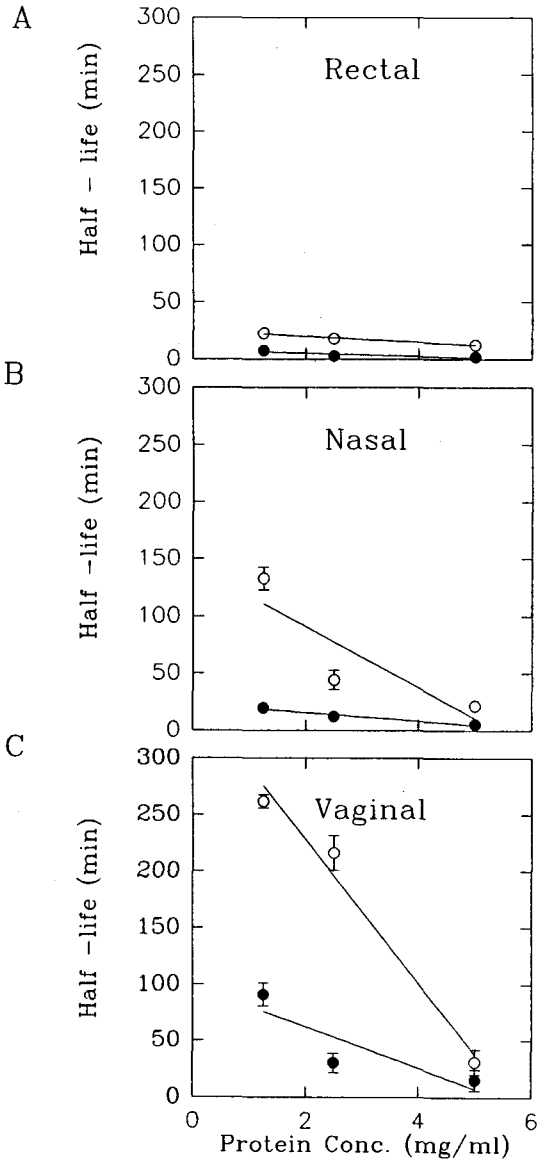


Fig. 6—Influence of protein concentrations on half lives of LHRH and [D-Ala⁶] LHRH proteolysis in various mucosal homogenate. The mucosae are (A) Rectal mucosa (B) Nasal mucosa and (C) Vaginal mucosa, respectively.
Key: ●; LHRH, ○; [D-Ala⁶] LHRH

각 점막균질액에 있어서 [D-Ala⁶] LHRH의 분해 (Fig. 3~5)는 이들을 log plot 할때 1차속도임을 보였으며 소실속도식으로부터 구한 반감기를 LHRH의 결과⁹⁾와 함께 Fig. 6에 나타내었다. LHRH 및 [D-Ala⁶

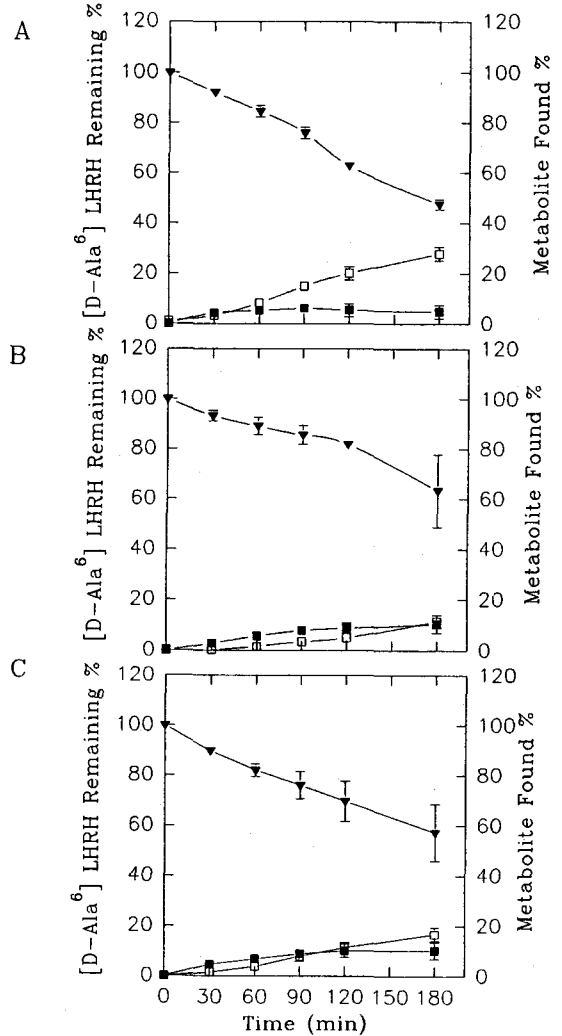


Fig. 7—Effect of sodium glycocholate(0.5%) on [D-Ala⁶] LHRH proteolysis and its metabolites in various mucosal homogenates. (A: rectal, B: nasal, C: vaginal). Error bars represent standard deviations for three times mean. The tissue protein concentration is 2.5 mg/ml.
Key: ▼; [D-Ala⁶]LHRH, □; m-i, ■; m-ii

LHRH 어느 경우에도 단백질도가 증가함에 따라 소실속도가 비례하여 증가하는 경향을 나타내었으며 각 점막에서 반감기의 크기는 질>비강>직장점막 순이었다. [D-Ala⁶] LHRH의 반감기는 LHRH에 비해 3~7배 정도 크게 나타났으며, 따라서 [D-Ala⁶] LHRH가 효소분해에 대해 LHRH 보다 안정함을 알 수 있었다. 직장, 비강 및 질점막 균질액중에서 [D-Ala⁶

Table I—Effect of medium chain fatty acid salts and sod.glycocholate on the half life (min) of [D-Ala⁶] LHRH¹⁾

Inhibitor	Conc.of inhibitor (%)									
	0.0	0.1	0.5	1.0	0.0	0.1	0.5	1.0	0.0	0.5
	Rectal				Nasal				Vaginal	
Na caprylate	17.9 (± 0.3)	19.0 (± 4.7)	28.9 (± 3.1)	313.9* (± 54.9)	44.4 (± 8.6)	43.0 (± 9.8)	88.8 (± 38.2)	627.9* (± 85.4)	216.5 (± 15.3)	771.6* (± 6.4)
Na caprate	17.9 (± 0.3)	68.9* (± 40.9)	550.3** (± 250.3)	N.D.**	44.4 (± 8.6)	149.8* (± 3.0)	N.D.**	N.D.**	216.5 (± 15.3)	N.D.**
Na laurate	17.9 (± 0.3)	80.9* (± 3.6)	N.D.**	N.D.**	44.4 (± 8.6)	N.D.**	N.D.**	N.D.**	216.5 (± 15.3)	N.D.**
Na glycocho- late	17.9 (± 0.3)	33.2 (± 4.2)	167.4* (± 38.3)	241.7* (± 25.4)	44.4 (± 8.6)	102.5* (± 9.9)	340.8* (± 26.1)	491.7* (± 22.9)	216.5 (± 15.3)	257.9 (± 44.0)

1) The tissue protein concentration is 2.5 mg/ml.

Each value is the mean±S.D. of three different experiments(*p<0.05, **p<0.01). N.D.: No degradation.

LHRH의 분해에 미치는 중쇄지방산염 및 sodium glycocholate의 영향—각 점막 균질액에 분해억제제로서 sodium caprylate, sodium caprate 및 sodium laurate를 첨가시 [D-Ala⁶] LHRH의 분해반감기를 산출하여 Table I에 나타내었다(분해양상 생략). 각각의 점막 균질액에 이들 중쇄지방산염을 첨가한 경우, [D-Ala⁶] LHRH의 분해반감기는 중쇄지방산염을 첨가하지 않은 경우에 비하여 현저하게 증가되는 경향을 나타내었다. 0.5% sodium caprylate 첨가시 [D-Ala⁶] LHRH는 직장 및 비강점막 균질액에서는 분해억제 효과가 적었으나 질점막의 경우 상당히 분해가 억제되어 분해 반감기가 216.5분에서 771.6 분으로 3배 이상 증가하였다. 또한 중쇄지방산염 중 sodium caprate 0.5%(직장점막의 경우 1%) 및 sodium laurate 0.5% 첨가로 [D-Ala⁶] LHRH의 직장, 비강 및 질점막에서 효소분해가 효과적으로 억제되는 것을 알 수 있었다.

한편 담즙산염의 일종인 sodium glycocholate는 인슐린 등 많은 펩타이드 및 단백질 약물의 흡수 촉진제로서 연구되어 왔다. Hirai 등¹³⁾은 rat의 비강 점막 균질액에서 sodium glycocholate가 leucine aminopeptidase의 활성을 방해하여 인슐린의 proteolysis를 방지하는 것으로 보고하였다. 따라서 본 연구에서도 [D-Ala⁶] LHRH의 분해에 미치는 sodium glycocholate의 영향을 검토하였다. Fig. 7은 sodium glycocholate 0.5%를 첨가했을 때의 각 점막에서의 [D-Ala⁶] LHRH의 분해양상을 나타낸 것이다. 점막

특이성은 거의 나타나지 않아서 직장, 비강 및 질 점막균질액에 있어 [D-Ala⁶] LHRH의 분해 반감기는 큰 차이가 없었다. 이것은 직장>비강>질점막 순, 즉 EP 24.11의 존재 비율 순으로 분해가 억제됨을 나타내며 결과적으로 sodium glycocholate는 EP 24.11를 선택적으로 억제하는 것으로 생각된다. 위와 같은 결과는 sodium glycocholate가 leucine aminopeptidase(EP 24.11)을 억제한다는 Hirai 등¹³⁾의 결과와 일치하는 것으로 나타났다. 또한 sodium glycocholate 첨가량의 변화(0.1%~1.0%)에 따라 분해억제 효과는 첨가량에 비례하여 증가하는 경향을 나타내었다(Table I). 이상으로 부터 중쇄지방산염 및 sodium glycocholate의 첨가에 의한 [D-Ala⁶] LHRH의 분해억제는 sodium laurate(C₁₂)>sodium caprate(C₁₀)>sodium glycocholate>sodium caprylate(C₈) 순이었다.

결 론

1. [D-Ala⁶] LHRH는 LHRH에 비해 훨씬 효소분해에 저항하는 것으로 나타났다. 이것은 LHRH의 6번째 위치의 Glycine이 D-Alanine으로 치환되어 LHRH의 주된 분해효소인 EP 24.15에 의한 분해가 억제 되었기 때문이라고 생각된다. 또한 각 점막에 있어서 [D-Ala⁶] LHRH 분해에 주로 관여하는 효소는 EP 24.11로 이의 존재비율에 따라 [D-Ala⁶] LHRH의 분해는 직장 및 비강점막에 비해 질점막에서 분해가 가장 완만하게 일어났다.

2. [D-Ala⁶] LHRH의 주 분해산물은 LHRH와는 달리 직장 및 비강점막의 경우 [D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁷(m-i)이었으며, 질점막의 경우 [D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁹(m-ii)이었고 소량의 [D-Ala⁶] LHRH¹⁻³(m-iii)도 생성되었다. 이것은 LHRH의 Gly⁶-Leu⁷부분을 분해하던 EP 24.11이 Leu⁷-Arg⁸부분을 분해하여 m-i이 생성되고, LHRH의 Tyr⁵-Gly⁶부분을 분해하던 EP 24.15가 Pro⁹-Gly¹⁰부분을 분해하여 m-ii가 생성 되는 것으로 추정되었다.

3. 중쇄지방산염 중 sodium caprate 1.0% 또는 sodium laurate 0.5% 첨가로 각 점막에서 [D-Ala⁶] LHRH의 분해가 거의 완전히 억제되었다. 이들 중쇄지방산염들은 특정효소를 선택적으로 억제한다기보다 각 점막에 존재하는 효소를 전반적으로 억제하였으며 첨가량 및 탄소사슬의 길이가 증가함에 따라 효소억제 정도가 증가함을 나타내었다.

이상의 결론으로 부터 [D-Ala⁶] LHRH는 LHRH와는 달리 EP 24.15의 분해에는 저항하는 반면 직장 및 비강점막의 경우 EP 24.11에 의해 상당히 분해되는 것으로 나타났으며 이들 분해는 소량의 중쇄지방산염 첨가로 효과적으로 억제할 수 있었다.

감사의 글

이 연구는 과학재단 특정기초 연구과제(#91-05-00-07) 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사 드린다. 또한 아미노산 분석에 도움을 준 충북대학교 약학대학 문동철 교수님과 이미정께 감사 드린다.

문헌

- 1) Koch, Y & Baram, T.: Resistance to enzymic degradation of LH-RH analogues possessing increased biological activity: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **74**(2), 488-491 (1977).
- 2) Okada, H., Yamazaki, I., Ogawa, Y., Hirai, S., Yashiki, T. & Mima, H.: Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone releasing hormone analog (leuprolide) in rat I: Absorption by various routes and absorption enhancement. *J. Pharm. Sci.*, **71**, 1367-1371 (1982).
- 3) Nakamura T., Nagata T., Tanabe Y., Yanaihara N. & Hasegawa Y.: Comparison of *in vivo* biological

- activities of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) analogues in 60-day-old cockerels. *General & Comparative Endocrinol.*, **83**(2), 290-296 (1991).
- 4) Lasdun, A. M.: The role of Endopeptidase 24.15 in the metabolism of LHRH. (1990).
- 5) Zohar Y., Goren A., Fridkin M., Elhanati E. & Koch Y.: Degradation of gonadotropin-releasing hormone in the gilthead seabream, *Sparus aurata* II. Cleavage of native salmon GnRH, mammalian LHRH, and their analogs in the pituitary, kidney, and river. *General & Comparative Endocrinol.*, **79**(2), 306-319 (1990).
- 6) Han, K., Park, J. S.: Transmucosal delivery of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone(I): Effect of medium chain fatty acid salts on stabilization of LHRH in mucosal homogenates *in vitro*: *Yakhhak Hoeji.*, **38**(1), 67-77 (1994).
- 7) Mishima M., Wakita Y., & Nakano M.: Studies on the promoting effects of medium chain fatty acid salts on the nasal absorption of insulin in rats. *Pharmacobio-Dyn.*, **10**, 624-631 (1987).
- 8) 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).
- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) Heinrichson, 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).
- 12) Lee V. H. L.: Peptide and protein drug delivery, Marcel Dekker, University of California School of Pharmacy, Los Angeles, California
- 13) 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).