

## 항류마치스 효과를 갖는 새로운 히스톤 H1 단백질 (p961)의 흰쥐와 토끼에 대한 약물동태

우수경 · 윤민혁 · 이재홍\* · 권광일#  
충남대학교 약학대학, 삼양제넥스 생명공학연구소\*  
(Received May 30, 2001; Revised July 4, 2001)

### Pharmacokinetics of a New Histone H1 Protein (p961), an Arthritis-suppressing Agent, in Rats and Rabbits

Su-Kyung Woo, Min-Hyuk Yun, Jae-Heung Lee\* and Kwang-Il Kwon#  
College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea  
\*Samyang Genex Biotech Research Institute, Taejeon 305-348, Korea

**Abstract** — A purified histone H1 protein, p961, which plays a role in mediating the condensation of DNA into chromatin, was recently proved as an arthritis-suppressing agent in the mouse CIA model. The pharmacokinetics of p961 was carried out in rats and rabbits. The rat's blood, bile and urine samples were serially collected from the femoral vein, common bile duct, and bladder, respectively, after bolus i.v. injection at low (10 mg/kg) and high (30 mg/kg) doses. The rabbit's blood samples were also collected from the marginal ear vein after bolus i.v. injection at a dose 10 mg/kg. p961 and its major metabolite in the physiological samples were analyzed by reverse-phase HPLC using a Vydac C4 protein column and a multistep water-acetonitrile gradient containing 0.24% trifluoroacetic acid. The major pharmacokinetic parameters (AUC,  $C_{max}$ , MRT,  $t_{1/2}$ ,  $V_{ss}$  and Cl) were estimated from the time course of plasma p961 and metabolite concentrations using WinNonlin. A two-compartment model was chosen for p961 as the most appropriate pharmacokinetic model. After i.v. injection of p961 at doses of 10 mg/kg and 30 mg/kg, more than 80% of p961 was removed rapidly from the plasma within 15 min. The plasma half-life of p961 in rats and rabbits was found not to exceed 12 min. p961 (22448.9 mol wt) was rapidly cleaved to 21612 mol wt fragment and the breakdown product appeared rapidly in the circulation with no lag phase. p961 and metabolite were not detected in rat urine and bile.

**Keywords** □ Pharmacokinetics, histone H1 protein, p961, HPLC

Eukaryote chromosome에 있는 DNA 분자는 histone이라는 염기성 단백질과 결합하고 있으며 histone은 H1, H2A, H2B, H3, H4의 5가지 종류로 나뉜다.<sup>1,2)</sup> 서로 다른 organism으로부터 추출한 histone은 H1을 제외하고는 거의 유사하며 H1 protein family가 가장 다양한 subtype(H1.1-H1.5, H1<sup>o</sup> 및 H1t)으로 구성된다.<sup>2)</sup> H2A, H2B, H3, H4는 core histone으로서 histone octamer를 이루며 H1은 linker DNA와

결합하여 linker histone으로 불리며 DNA의 치밀한 구조를 형성하는데 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>3)</sup>

최근 histone의 다양한 기능이 새로이 밝혀지고 있다. H3와 H4는 흰쥐에서 분리한 지방세포에서 인슐린처럼 glucose가 저장형으로 되는 것을 촉진하며, H4 C-terminal은 골아세포의 증식과 alkaline phosphate 활성을 자극하는 OGP(osteogenic growth peptide)로 밝혀졌다. 또한 histone H2A와 H2B는 HTH(homeostatic thymus hormone)의 구성 요소로서 corticosterone 분비를 자극한다. 그 밖에도 histone은 growth hormone, prolactin, thyrotropin 등의 여러

# 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 042-821-5937 (팩스) 042-823-6781

호르몬 분비에 관여하는 것으로 알려져 있다.

p961은 정제된 histone H1 protein으로 mouse CIA(collagen-induced arthritis) model에서 류마치스 억제 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다. p961을 1 mg/kg의 용량으로 2주에 한번씩 복강투여하였을 때 관절 부종으로 나타나는 류마치스의 발달이 완전히 억제되어 CIA model에 있어서 histone H1의 항류마치스 효과는 스테로이드 제제인 dexamethason보다 훨씬 강한 것으로 나타났다. p961은 225개의 아미노산으로 구성되어 있으며 분자량은 22448.9이다. 양전하를 띤 아미노산(Arg+Lys=68)이 많으며 이론에 근거한 등전점 (pI)은 10.91으로 알려져 있다.

동물실험 결과 항류마치스 효과가 있는 것으로 밝혀진 p961의 약물동태를 연구하기 위해 p961을 저용량군과 고용량군으로 나누어 실험동물에 정맥주사한 후 분포 및 배설 형태를 알아보았다. 실험동물로는 흰쥐와 토끼를 사용하였고 약물투여 후 마취된 흰쥐로부터는 혈액과 담즙 및 뇨를 채취하여 혈액 내에서의 소실과 분포 및 담즙과 뇨를 통한 p961의 배설 형태를 알아보았다. 또한 대표적인 대사체를 지표로 하여 p961의 약물동태 양상을 비교하였다. 주요 대사체는 LC-MS를 이용하여 약물투여 후 얻은 검체를 HPLC에서 분리하고 대사체에 해당하는 피크의 spectrum을 분석하여 분자량을 측정하였다. 토끼로부터는 p961을 정맥주사한 후 p961 및 주대사체의 혈중농도 변화를 측정하여 p961의 분포 및 배설 양상을 연구하였다. 두 실험동물로부터 채취된 혈액, 담즙 및 뇨중 p961과 대사체의 농도는 HPLC를 통해 분석하였다.<sup>4)</sup>

## 실험방법

### 기기 및 시약

**혈액, 담즙 및 뇨 채취에 사용된 시약 및 기구** - 실험동물의 마취를 위해서 urethane과  $\alpha$ -chloralose를 Adrich Chem. Co.로부터 구입하여 사용하였다. 헤파린(5000 IU/ml, (주)녹십자), 생리식염 주사액 ((주)중외제약), 1회용주사기(신동방 메디칼) 등이 사용되었다. 담관 및 혈관에 삽입한 PE-10과 PE-50 tube는 Dural 사로부터 구입하여 사용하였다.

**분석에 사용된 시약 및 기기** - 체액 전처리 과정에 사용한 시약은 trichloroacetic acid(Jensei Chem. Co.) 이었으며 기구로는 microtube(Eppendorff), cen-

trifuge(MicroV, Fisher scientific), ultracentrifuge (Mega 17R, Hanil scientific) 등이었다. 분석기기로는 Shimadzu 10A HPLC System을 이용하였으며 이는 CBM-10A Communication Bus Module, MS-QP8000, SPD-10A UV-VIS detector, CTO-10A column oven, sample cooler, LC-10A pump, SIL-10A auto injector 로 구성되었다. 이동상에 사용된 시약으로는 acetonitrile (Duksan Chem. Co.), trifluoroacetic acid(Across Chem. Co.) 등 이었다.

**투여약물** - 삼양제넥스로부터 제공받은 p961은 사용 전 주사용 생리식염수에 녹여 사용하였다. 흰쥐 고용량군에는 30 mg/kg, 저용량군에서는 10 mg/kg의 용량으로 투여하였다. 토끼에서는 10 mg/kg의 용량으로 투여하였다.

**실험동물** - 본 실험에 사용된 흰쥐와 토끼는 삼육 실험 동물농장에서 구입한 후 일정온도( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) 및 습도(55~60%)가 유지되고 명암주기가 12시간 단위로 조절되는 충남대학교 약학대학 실험 동물실에서 고형 사료와 식수를 무제한 공급하여 사육하였으며 흰쥐는 체중이 200~250 g에 도달할 때 실험에 사용하였다. 토끼는 2~3 kg 정도가 되었을 때 사용하였다.

### 실험방법

**흰쥐에 대한 분포 및 배설실험** - Urethane(800 mg/kg)와  $\alpha$ -chloralose(80 mg/kg)를 복강 내 주사하여 마취시킨 후 대퇴 동맥 및 정맥에 헤파린(25 IU.) 처리된 식염수로 채워진 PE-10 tube을 삽입하였다. 대퇴 정맥을 통하여 p961을 주사한 후 대퇴 동맥으로부터 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 30, 60, 90, 그리고 120분에 1회 0.7 ml씩 채혈하였다. 흰쥐 한마리에서의 채혈시간은 각각 3-4회씩으로 나누어 채혈하였으며 헤파린이 들어 있는 eppendorff tube에 옮겼다. 채혈한 혈액은 원심 분리 후 혈장을 분리하여 분석 시까지  $-20^\circ\text{C}$ 에 냉동 보관 하였다. 채혈된 양과 동량의 생리식염수를 대퇴 동맥을 통해 넣어 주었다.

마취 후 복부 중앙을 절개하여 PE-10 tube를 common bile duct에 깊게 삽입하고 p961을 대퇴 정맥을 통해 10 mg/kg의 용량으로 주사하였다. 투여 후 0-30, 30-60, 60-120분에 각각 모아진 담즙의 부피를 측정하고 분석 시까지 냉동 보관하였다. 손실된 체액을 보충하기 위해 1시간 간격으로 피하에 생리식염수 1 ml씩을 주사하였다.

채뇨는 하복부 증상을 절개하여 방광을 노출시킨 후 방광에 고여 있는 뇨를 주사기를 넣어 빼어낸 후 대퇴 정맥을 통하여 10 mg/kg의 용량으로 투여하였다. 투여 후 2시간에 방광에 고여있는 뇨를 주사기로 뽑아내어 부피를 측정하고 분석 시까지 냉동 보관하였다.

**토끼에 대한 분포실험** - 토끼를 마취 후 귀 가장자리 정맥에 I.V 카테터(Jelco™, 24G)를 삽입 후 해파린이 채워진 주사기를 연결하여 장착하였다. 약물은 10 mg/kg의 용량으로 다른 쪽 귀의 정맥을 통해 주사하였다. 약물투여 후 장착된 카테터를 통해 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30분에 0.7 ml의 혈액을 채취하였다. 즉시 원심분리 후 혈장을 분리하여 분석 시까지 냉동 보관하였다.

**혈액, 담즙 및 뇨중의 p961 농도 분석** - p961 일부를 측정 후 5 mg/ml이 되도록 삼차 증류수에 녹인 후 계열 희석하여 표준용액을 제조하였다. 흰쥐의 혈장 및 뇨 각 270  $\mu$ 에 미리 제조한 표준 용액 30  $\mu$ 를 가하여 0.5, 1, 2, 5, 10  $\mu$ g/ml의 spiked sample로부터 검량선을 작성하였다. 토끼의 혈장도 흰쥐에서와 같은 방법으로 처리하였다.

채취한 혈액 및 spiked sample 300  $\mu$ 에 2% trichloroacetic acid(TCA)를 동량 섞은 후 4°C에서 14000 rpm으로 15분간 초원심분리하여 상등액을 12시간 이상 동결 건조시켰다. 동결 건조된 분말은 삼차증류수 300  $\mu$ 를 가하고 4°C에서 14000 rpm으로 15분간 초원심분리 후 상등액을 autosampler용 vial에 옮겨 분석하였다.<sup>5,6)</sup> 뇨의 경우는 시간별 취한 뇨 및 spiked sample 300  $\mu$ 에 2% TCA를 동량 가한 후 4000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 컬럼에 주입하여 분석하였다. 담즙은 담즙의 내인성 물질로 인해 HPLC 분석법으로 p961의 확인 및 정량이 어려워 전기영동을 실시하여 p961의 존재여부를 확인하였다.<sup>7)</sup>

HPLC 분석조건은 reverse-phase column(Vydac C4 protein, 250\*4.6 mm ID, 300A)을 사용하여 혈장 및 뇨 샘플을 분석하였으며, 이동상은 solvent A(30% ACN, 0.24%(v/v) TFA)와 solvent B(40% ACN, 0.24%(v/v) TFA)를 이용하여 19분동안 solvent B를 0→100%로 증가시킨 후 6분간 solvent B를 100%로 유지하였다.<sup>8-10)</sup> 분석 시 이동상의 유속은 0.45 ml/min이었으며, 검출기의 파장은 214 nm이었다.<sup>11)</sup> 주입량은

50  $\mu$ 로 하였다.

**LC-MS에 의한 p961 및 대사체의 분자량 측정** - p961을 0.2 mg/ml의 농도로 1% acetic acid-water : methanol(1:1) 혼합액에 녹인 후 infusion mode로 MS profile run을 수행하였다. 이 때 검체는 10 l/ml의 속도로 주입하였다. 대사체의 경우는 p961 100 mg/kg의 용량으로 쥐에게 정맥투여한 후 1 분 및 5 분에 채혈하여 혈중 농도 측정 시와 같은 처리 과정을 하여 검체를 HPLC에서 분리하고 대사체에 해당하는 피크를 scan하여 그 결과로부터 분자량을 산출하였다. Reverse-phase column(Vydac 214TP52, 250\*2.1 mm ID)을 사용하였으며 이동상은 solvent A(20% ACN, 0.02%(v/v) TFA)와 solvent B(50% ACN, 0.02%(v/v) TFA)를 이용하여 1분동안 solvent B를 0→10%로 하여 24분 동안 70%로, 5분 동안 100%로 증가시켰다. 이동상의 유속은 0.2 ml/min로 하였으며 nebulizer gas flow는 4.5 L/min이었다. Scan mass range와 profile mass range는 각각 m/z 550~950, 500~800으로 하였다.

**Pharmacokinetic parameters** - p961의 혈장 농도에 대해서는 non-compartment model과 compartment model 두 가지 모두 이용하여 분석하였고, 대사체에 대해서는 non-compartment model을 이용하였다. Non-compartmental analysis를 위해 흰쥐와 토끼의 시간별 혈중농도를 trapezoidal rule을 이용하여 혈중 농도-시간 곡선하면적(AUC : Area under the plasma concentration versus time curve)과 AUMC(Area under the first moment curve)값을 계산한 후 AUMC를 AUC로 나누어 약물의 평균잔류시간(MRT : Mean residential time)을 구하였다. 각 혈중농도의 소실기로부터 소실속도상수( $k_{el}$ )를 계산하여 이로부터 반감기( $t_{1/2}$ )를 산출하였다. 청소율(CI)은 dose/AUC로부터, steady state의 분포용적( $V_{ss}$ )은 dose  $\times$  AUMC/AUC<sup>2</sup>으로부터 각각 구하였다.

Compartmental analysis를 위해 computer program "WinNonlin"을 이용하여 가장 적절한 모델을 선택하여 fitting하였다. Fitting된 그래프로부터 분포상의 기울기( $\alpha$ )와 y절편(A), 소실상의 기울기( $\beta$ )와 y절편(B) 및 혈중에서 조직으로의 분포속도( $k_{12}$ )와 조직으로부터 혈중으로의 분포속도( $k_{21}$ ) 등을 산출하였다. Central compartment의 분포용적( $V_c$ )은 dose/(A+B)로부터 계산하였다.

실험결과

LC-MS에 의한 p961 및 대사체의 분자량 측정

p961의 profile run을 수행한 결과 multiply-charged 이온이 관찰되었다. m/z 624~775 사이에 있는 8개의 peak로 deconvolution하여 p961의 분자량을 추정한 결과 22,444로 나타났다. p961 100 mg/kg의 용량으로 흰쥐에게 투여한 후 1 분 및 5 분 후에 채혈하여 처리한 검체를 HPLC로 분석하였을 때 chromatogram

상에서 31.7 분에 대사체로 인식되는 피크가 나타났다 (Fig. 1). 이 검체에 대해 LC-MS 분석을 수행하여 31.7분에 유출되는 성분의 spectrum을 얻고 이 spectrum을 분석한 결과 이 물질의 분자량은 21,612 정도인 것으로 나타났으나 낮은 측정농도로 인해 그 정확도가 다소 낮을 것으로 예상된다. 이것은 원래 p961 단백질보다 분자량이 832 감소된 것으로 5-8개의 아미노산이 분해된 것으로 생각된다.

토기의 경우 p961을 투여 후 얻은 혈장 샘플을 흰

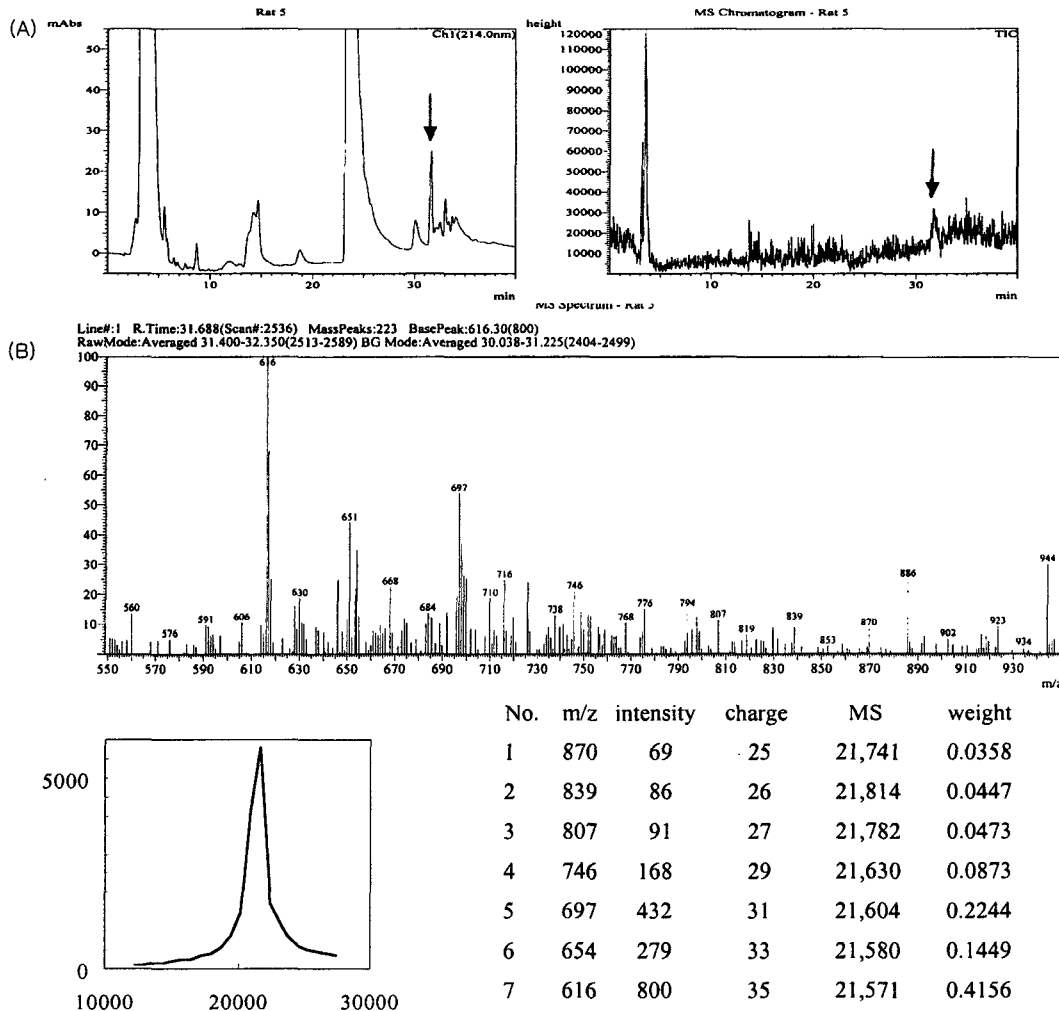


Fig. 1 - HPLC and LC-MS TIC chromatograms of rat blood samples. Rat was injected with p961 100 mg/kg and the pretreated blood sample (5 min after i.v. injection) was analysed by HPLC and LC-MS (A). ESI spectrum of a component eluted at 31.7 min in chromatogram (marked with an arrow in A) of a blood sample of a rat (5 min after injection of p961) and deconvoluted spectrum for determination of molecular weight (B). Method; MS scan, ion source; ESI-positive, probe voltage; 4.5 kV, CDL voltage; -45 V, deflector voltage; 45 V, nebulizer gas flow; 4.5 L/min.

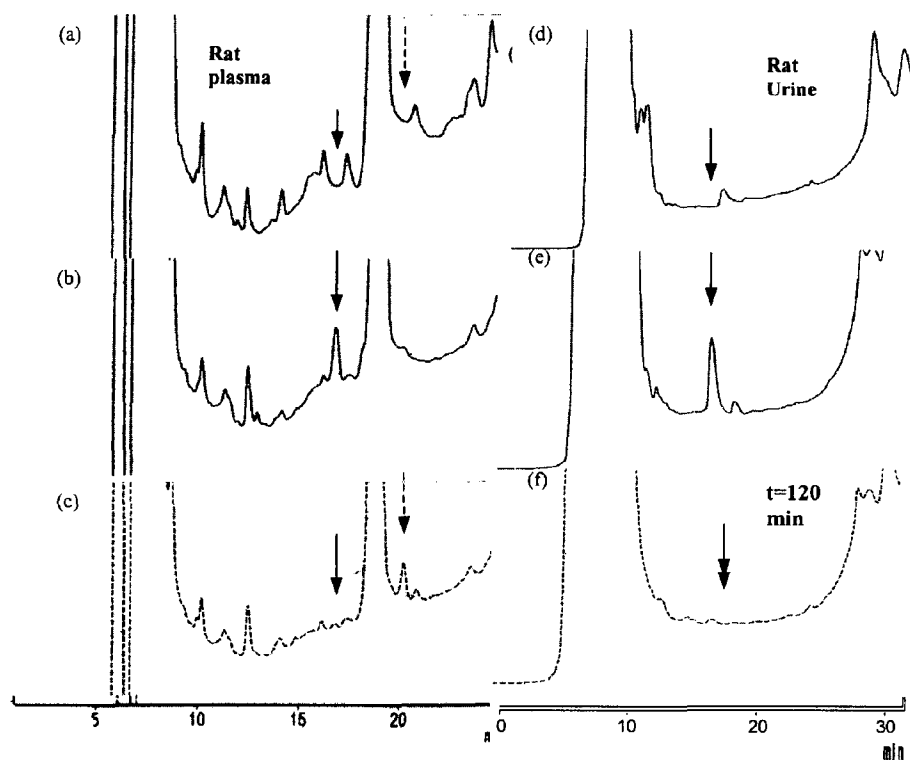


Fig. 2 – Chromatograms of p961 and metabolite in rat plasma and urine. Blank plasma (a) and plasma sample at 1 min (b) and 15 min (c) after IV of p961 30 mg/kg. The arrow and the dashed one indicated p961 and metabolite elution point, respectively. Blank urine (d), spiked urine with 10 µg/ml of p961 (e) and urine sample at 120 min (f) after IV of p961 10 mg/kg.

쥐와 동일한 처리 과정을 통해 분석하였을 때 chromatogram상에서 동일한 retention time을 갖는 물질이 분리되어 토끼에서도 흰쥐에서도 동일한 대사체가 생성되는 것으로 추정하였다.

#### HPLC 분석을 통한 혈장 및 뇨중의 p961 농도

p961 피크의 면적으로부터 구한 흰쥐의 혈장과 뇨에서의 검량선은 각각  $y=27365x - 14671$  ( $r^2=0.9946$ )과  $y=7187.9x + 53917$  ( $r^2=0.9744$ )이었고 토끼의 혈장에 대한 검량선은  $y=13141x - 6784$  ( $r^2=0.9969$ )의 상관관계를 나타내었다. p961의 retention time은 17.35분이었고 측정한계는 0.5 µg/ml이었다. 대사체의 경우 검량선 작성이 불가능하여 chromatogram에 나타난 피크의 면적을 그대로 사용하여 시간에 따른 농도 변화를 상대적으로 비교하였으며, retention time은 20.5분이었다. 흰쥐의 혈장과 뇨 중의 p961과 주요 대사체의 분석 시 chromatogram을 Fig. 2에 나타내었다.

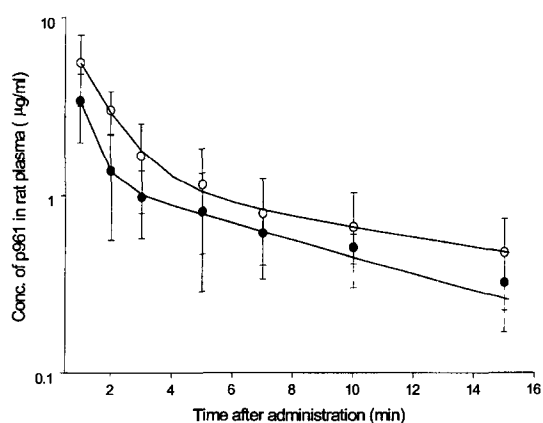


Fig. 3 – Time course of plasma p961 concentrations after intravenous administration of low dose (10 mg/kg, ●) and high dose (30 mg/kg, ○) in rats. The solid line represents the fitted results to two-compartment model with WinNonlin.

#### 흰쥐에 대한 p961의 분포 및 배설

p961의 혈중농도 변화 – 흰쥐에 대해 고용량군(30

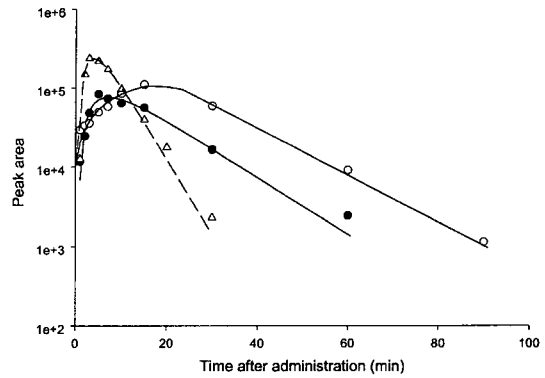
**Table I** – Pharmacokinetic parameters of p961 after intravenous injection of low dose (10 mg/kg) and high dose (30 mg/kg) of p961 in rats (n=6)

Pharmacokinetic parameters	Low dose (10 mg/kg)	High dose (30 mg/kg)
AUC (µg·min/ml)	14.35	33.10
MRT (min)	8.19	10.18
$K_{el}$ (min <sup>-1</sup> )	0.088	0.061
$t_{1/2}$ (min)	7.88	11.29
Cl (L/kg/min)	0.70	0.91
$V_c$ (L/kg)	0.53	1.23
$V_{ss}$ (L/kg)	5.70	9.23
$K_{12}$ (min <sup>-1</sup> )	0.81	0.39
$K_{21}$ (min <sup>-1</sup> )	0.30	0.15
A (µg/ml)	17.62	22.75
B (µg/ml)	1.36	1.57
$\alpha$ (min <sup>-1</sup> )	2.08	1.30
$\beta$ (min <sup>-1</sup> )	0.11	0.08

mg/kg)과 저용량군(10 mg/kg)으로 나누어 p961을 정맥주사한 후 혈중 p961의 시간별 혈중농도 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 이로부터 산출된 약물동태 parameter는 Table I에 정리하였다. 약물을 주사한 후 3분에서 p961의 혈중농도가 1 µg/ml이하로 급격히 감소하고 그 이후부터는 완만한 형태의 소실상을 나타내어 정맥주사에 의한 p961의 분포 및 배설 형태는 two-compartment model에 따르는 것을 알 수 있었다. 약물을 투여하고 15분 이후에서는 0.5 µg/ml의 감도에서 p961이 검출되지 않았다.

고용량군(30 mg/kg)에서는 trapezoidal rule에 의해 구한 AUC가 33.10 µg·min/ml이었으며 이로부터 산출한 MRT는 10.18 min이었다. 약물의 소실속도 상수( $k_{el}$ )와 반감기( $t_{1/2}$ )는 각각 0.061 min<sup>-1</sup>, 11.29 min으로 계산되었으며, 청소율 (Cl)은 0.91 L/kg/min이었다. 정상상태에서의 분포용적( $V_{ss}$ )은 9.23 L/kg이었다. Compartmental analysis를 통해 산출된 약물동태 parameter를 보면 central compartment의 분포용적( $V_c$ )은 1.23 L/kg였으며  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ 은 각각 0.39 min<sup>-1</sup> 및 0.15 min<sup>-1</sup>이었다. 한편 A, B,  $\alpha$ ,  $\beta$ 값은 각각 22.75 µg/ml, 1.57 µg/ml, 1.30 min<sup>-1</sup>, 그리고 0.08 min<sup>-1</sup>로 계산되었다.

저용량군(10 mg/kg)에서는 AUC가 14.35 µg·min/ml이었으며 이로부터 구한 MRT는 8.19 min였다. 청소율은 0.70 L/kg/min였으며 소실속도 상수와 반감기는 각각 0.088 min<sup>-1</sup>, 7.88 min로 나타났고  $V_{ss}$ 는



**Fig. 4** – Time course of plasma metabolite (peak area) after intravenous administration of low dose (10 mg/kg, ●) and high dose (30 mg/kg, ○) in rats and in rabbits (10 mg/kg, △). The solid and short dash line represent the fitted results to non-compartment model with WinNonlin.

5.70 L/kg이었다. Fitting된 그래프로부터 산출된 2차 약물동태 parameter의 A, B,  $\alpha$ ,  $\beta$ 값은 각각 17.62 µg/ml, 1.36 µg/ml, 2.08 min<sup>-1</sup>, 그리고 0.11 min<sup>-1</sup>으로 계산되었다.  $k_{12}$  및  $k_{21}$ 은 각각 0.81 min<sup>-1</sup>, 0.30 min<sup>-1</sup>이었으며  $V_c$ 는 0.53 L/kg으로 산출되었다.

**주요 대사체의 혈중농도 변화**

대사체의 경우 chromatogram상에 나타난 피크의 면적값을 그대로 사용하여 혈중 대사체의 경시적 변화를 관찰하였으며 흰쥐에게 10 mg/kg 및 30 mg/kg의 용량으로 정맥투여 후 측정된 대사체의 시간별 변화를 Fig. 4에 나타내었다.

Noncompartmental analysis를 통해 산출된 대사체의 약물동태 parameter를 Table II에 정리하였다. 대사체는 두 용량군에서 모두 약물 투여 후 1분부터 관찰되기 시작하였고, 저용량군에서는 5분에서 최고 농도(피크 면적으로서 83738)를, 고용량군에서는 투여 후 15분에서 최고 농도(피크 면적으로서 110072)를 나타내었다. 저용량군에서 trapezoidal rule에 의해 구한 피크면적-시간 곡선하면적은 1721223이었으며 이로부터 산출한 MRT는 17.17 min이었다. 고용량군에서는 피크면적-시간 곡선하면적이 3427404이었고, MRT는 23.69 min으로 나타났다. 소실속도 상수는 저용량군과 고용량군에서 각각 0.065 min<sup>-1</sup>, 0.062 min<sup>-1</sup>으로, 소실 반감기는 10.64 min 및 11.15 min으로 각각 계산되었다.

### 담즙을 통한 p961의 배설

약물을 주사한 후 30, 60, 120분에 각각 모아진 담즙을 부피를 측정된 후 일정량을 취하여 혈장 중 농도 측정 시와 같은 방법으로 분석하였다. 그러나 담즙의 내인성 물질로 인해 p961의 정량이 어려웠으며, 약물 투여 전 취한 담즙과 약물 투여 후 각각의 시간에 채취한 담즙에서의 chromatogram의 피크를 비교하여 보았을 때 큰 차이를 볼 수 없었다. 담즙 속에 p961이 낮은 농도로 존재하여 내인성 물질의 피크에 가려져 확인할 수 없는 경우를 위하여 실시한 전기 영동<sup>12)</sup> 결과에서는 p961 표준품과 같은 위치에 공담즙(blank bile) 및 시간별 취한 담즙에서 어떠한 물질도 위치하지 않았다.

### 노를 통한 p961의 배설

p961을 대퇴 정맥을 통해 주사한 후 120분에 그 시간까지 모아진 뇨를 방광으로부터 직접 주사기로 채취하여 HPLC로 분석한 결과 본 실험방법의 0.5 µg/ml의 감도에서는 p961이 검출되지 않았다.

### 토끼에 대한 p961의 분포

토끼는 10 mg/kg의 용량으로 p961을 정맥 주사한 후 p961 및 주요 대사체의 시간별 혈중농도변화를 측정하였다(Fig. 4). 토끼의 경우 흰쥐와는 달리 p961의 매우 빠른 소실로 인해 약물 투여 후 2분 후에는 1 µg/ml 이하의 농도를 나타내었고, 시간에 따른 p961의 경시적 변화를 측정하기 어려웠다. 따라서 약물동태 parameter는 p961보다는 대사체의 시간별 변화로부터 산출하였으며 Table II에 정리하였다. 대사체의 경우 Fig. 4에 나타난 바와 같이 약물 투여 후 3분에서 최고농도(피크 면적으로서 236560)에 도달한 후 30분까지 빠른 소실을 보였다. Trapezoidal rule에 의해 구한 피크면적 시간 곡선하면적은 2615381이었으며, 약

물의 평균 잔류 시간인 MRT는 12.36 min이었다. 대사체의 걸보기 소실속도 상수는 0.079 min<sup>-1</sup>으로, 반감기는 8.72 min으로 계산되었다.

## 고 찰

### 흰쥐에 대한 분포 및 배설

정맥 주사에 의한 흰쥐에서의 p961 혈중농도는 two-compartment model에 따른 분포 및 배설 형태를 따르고 있다. 10 mg/kg 용량의 p961을 정맥주사하였을 때 3분 이내에 혈중농도가 1 µg/ml 이하로 급격히 감소되었고, 투여 15분 후에는 검출되지 않았기 때문에 15분까지의 측정된 data로부터 약물동태 parameter를 산출하였다. Daskalov 등의 연구에 의하면 모든 내인성 histone(H1, H2b+H2a, H3, H4)을 50 mg/kg의 용량으로 흰쥐에게 정맥투여 하였을 때 60~70%가 30분 이내에 소실되는 것으로 나타났다.<sup>13)</sup> 이러한 결과로 볼 때 histone은 체내에 정맥투여 하였을 때 투여됨과 동시에 혈액내에서 매우 빠른 속도로 소실되는 것으로 생각된다. 주대사체의 소실상의 반감기는 흰쥐의 경우 저용량군과 고용량군에서 각각 10.64 min과 11.15 min으로 p961과 비슷한 값을 나타내고 있으며, 저용량군에서는 정맥주사 후 5분에 최고농도에 도달한 후 60분까지 직선적으로 감소하였고, 고용량군에서는 15분에 최고 피크를 나타내었고 90분까지 검출되었다. 저용량군과 고용량군에서 p961의 AUC는 각각 14.35 µg·min/ml과 33.10 µg·min/ml로 계산되어 고용량군이 약 2.3배로서 실제 투여된 약물의 양(3배)에 비해서 낮게 나타났다.

분자량 500이하의 물질은 주로 뇨를 통해 배설되고, 그 이상의 분자량을 갖는 물질의 배설 경로는 주로 담즙을 통해 이루어진다.<sup>14)</sup> p961의 경우 매우 큰 분자량을 갖고 있어 뇨를 통해 배설되지 않을 것이라는 예상대로 약물 투여 후 2시간까지 모아진 뇨샘플에서 전혀 검출되지 않았다. 약 21612의 분자량을 갖는 대사체 또한 뇨에서 검출되지 않았다. 담즙의 경우는 담즙 내의 자체 물질의 방해로 인해 물질의 확인 및 정량이 어려웠으나 약물 투여 전에 취한 담즙과 투여 후에 취한 담즙 샘플에서 chromatogram 상에서 별다른 차이를 볼 수 없었다. 또한 p961 표준품을 이용해 담즙 샘플내 p961의 존재 여부를 확인하기 위해 실시한 전기 영동 결과에서도 p961 표준품과 같은 위치에는 공

**Table II** - Pharmacokinetic parameters of metabolite after intravenous injection of p961 in rats and rabbits (n=6)

Pharmacokinetic parameters	Rat		Rabbit
	10 mg/kg	30 mg/kg	10 mg/kg
T <sub>max</sub> (min)	5	15	3
MRT (min)	17.17	23.69	12.36
T <sub>1/2</sub> (min)	10.64	11.15	8.72
K <sub>el</sub> (min <sup>-1</sup> )	0.065	0.062	0.079

담즙 및 시간별 취한 담즙 샘플에서 어떤 물질도 나타나지 않아 p961 자체는 담즙을 통해 배설되더라도 극히 미량이거나 혈액내에서 빠른 속도로 여러 대사체 형태로 분해되어 배설될 것으로 생각된다.

#### 토끼에 대한 p961의 분포

토끼의 경우 대사체의 걸보기 소실속도 상수가  $0.079 \text{ min}^{-1}$ 으로 흰쥐보다 크게 나타났으며 흰쥐에서 대사체가 60분 혹은 90분까지 지속된 것에 비해 토끼는 30분까지 급속한 감소를 나타내었다. 또한 10 mg/kg의 용량에서 비교할 때 대사체의 최대 피크가 흰쥐의 약 3배 정도 높게 나타났고 도달 시간도 약물 투여 후 3분으로 흰쥐에서보다 p961이 더 빠른 속도로 대사 되어 토끼에서는 약물 투여 후 p961의 경시적 변화를 관찰하기 어려웠던 것으로 생각된다. 10 mg/kg의 용량으로 정맥투여 하였을 때 대사체의 평균 체류 시간 (MRT)은 흰쥐에서 17.17 min이었고 토끼는 12.36 min으로 나타나 토끼가 흰쥐의 경우보다 p961을 빠른 속도로 대사 시키고 생성된 대사체 또한 빨리 소실 시키는 것으로 사료된다.

## 결 론

p961을 흰쥐와 토끼에 정맥 주사한 후 p961의 약물 동태를 연구하였다. 흰쥐에서는 고용량군으로서 30 mg/kg을 저용량군으로는 10 mg/kg의 용량으로 정맥투여한 후 혈중농도와 담즙 및 뇨 배설 농도를 측정하였다. 토끼의 경우 10 mg/kg을 정맥투여 후 혈중농도 변화를 측정하였다. 각 시간별로 채취된 혈액, 담즙 및 뇨중 p961농도와 그 대사체의 농도는 HPLC를 통해 분석되었다. 대사체의 경우 검체를 HPLC에서 분리하고 대사체에 해당되는 피크를 LC-MS로 분석하여 분자량을 산출하였다.

1. 흰쥐의 경우 10 mg/kg과 30 mg/kg을 정맥투여 시 p961의 혈중농도는 two-compartment model에 따른 분포 및 배설형태를 따르고 있으며 최고 혈중농도는 투여 1분 후 각각  $3.42 \pm 1.44 \mu\text{g/ml}$ 과  $5.61 \pm 2.41 \mu\text{g/ml}$ 으로 나타났으며, 투여 후 15분 안에 측정값도 이하로 소실되었다.

2. 두 용량군의 주요 약물동태 parameter를 보면 central compartment의 분포용적( $V_c$ )은 각각 0.53 L/kg과 1.23 L/kg이었고 p961의 반감기( $t_{1/2}$ )는 각각

7.88 min과 11.29 min이었으며 청소율은 각각 0.70 L/kg/min 및 0.91 L/kg/min으로 산출되었다.

3. 흰쥐의 고용량군과 저용량군에서 p961은 담즙 및 뇨에서 검출되지 않았다.

4. 흰쥐에서 p961의 주요 대사체는 LC-MS를 통해 분석한 결과 분자량이 약 21612였고 p961을 정맥투여 후 1분부터 관찰되었으며, 토끼에서도 같은 대사체가 검출되었다.

5. 토끼의 경우 p961은 정맥 투여(10 mg/kg) 1분 후에  $1 \mu\text{g/ml}$  정도로 매우 낮게 검출되었다.

6. 토끼에서 대사체의 최대 피크의 크기는 동량투여 (10 mg/kg)한 흰쥐에 비해 2.8배 높았고  $T_{max}$  또한 3분으로 흰쥐의 5분에 비해 빠르게 나타났다. 토끼에서 대사체의 반감기는 8.72분으로 산출되었다.

## 감사의 말씀

본 연구는 삼양제넥스(주)의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Drew R. H : Reconstitution of Short-spaced Chromatin from the Histone Octamer and either HMG-14,17 or Histone H1. *Journal of Molecular Biology*, 230, 3, 824 (1993).
- 2) Doenecke, D., Albig, W., Bode, C., Drabent, B., Franke, K., Gavenis, K., and Witt, O. : Histone: genetic diversity and tissue-specific gene expression. *Histochem. Cell Biol.* 107, 1 (1997).
- 3) Wang, Z-F, Sirotkin, I. A., Buchold, M. G., Skoultschi, I. A., Marzluff, W. F. W. : The mouse histone H1 genes : Gene organization and differential regulation. *Journal of Molecular Biology*, 271, 1, 124 (1997).
- 4) 강원구, 권광일 : SB-31의 Glycyrrhizin을 지표로 한 rat와 Rabbit에서의 약물동태 연구. 최종보고서, 한보제약(주), 1998.
- 5) Lindner H., Sarg B., Hoertnagl B., Helliger W. : The microheterogeneity of the mammalian H1(0) histone. Evidence for an age-dependent deamidation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(21), 13324 (1998 May 22).
- 6) Talasz T, Sapojnikova N, Helliger W, Lindner H, and Puschendorf B : In vitro binding of H1 histone subtypes to nucleosomal organized mouse mammary



- tumor virus long terminal repeat promotor. *Journal of Biological Chemistry*, **273**(21), 32236 (1998).
- 7) Gauthier V. J., Tyler L. N., Mannik M. : Blood clearance kinetics and liver uptake of mononucleosomes in mice. *J Immunol*, **156**(3), 1151 (1996 Feb 1).
  - 8) Juan A. and Moore C. S. : Reconstitution of chromatin complexes from high-performance liquid chromatography-purified histones., *Method : A comparison to methods in Enzymology* **15**, 333 (1998).
  - 9) Gurley L. R., Spall W. D., Valdez J. G., London J. E., Dethloff L. A., Lehnert B. E. : An HPLC procedure for the analysis of proteins in lung lavage fluid. *Anal Biochem.* **172**(2), 465 (1988).
  - 10) Gurley L. R., D'Anna J. A., Blumenfeld M., Valdez J. G., Sebring R. J., Donahue P. R., Prentice D. A., Spall W. D. : Preparation of histone variants and high-mobility group proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **297**, 147 (1984).
  - 11) Gurley L. R., Prentice D. A., Valdez J. G., Spall W. D. : High-performance liquid chromatography of chromatin histones. *J Chromatogr.* **266**, 609 (1983).
  - 12) Espinoza, I., Toro, G. C., Hellman, U. and Galanti, N. : Histone H1 and core histones in Leishmania and Crithidia. *Comparison with Trypanosoma. Experimental Cell Research* **224**, 1 (1996).
  - 13) Daskalov, D. and Gavazova, I. : Isolation and electrophoretic identification of exogenous histone from rat blood plasma. *Experientia* **35** (1979).
  - 14) Shargel, L., Yu, B. C. A. : *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*, 4th ed., Appleton and Lange, Stamford, CT (1999).