

무모(無毛) 마우스의 피부를 통한 항바이러스제의 투과와 Azone의 영향

최승호^{†*} · 김종갑

*유타대학교 약학대학, 중앙대학교 약학대학
(1990년 10월 30일 접수)

Effect of Azone on Penetration of Antiviral Agents through Hairless Mouse Skin

Seung-Ho Choi^{†*} and Johng-Kap Kim

*College of Pharmacy, University, of Utah, Salt Lake City, UT, USA
College of Pharmacy, Chung-Ang University Seoul 156-756, Korea
(Received October 30, 1990)

1-Dodecylazacycloheptan-2-one (Azone) is a new agent that enhances the percutaneous penetration of a number of different chemicals. BVDU and FEAU were evaluated for their potential efficacy in the treatment of cutaneous herpes simplex virus infections by *in vitro* studies through hairless mouse skin. This study demonstrates the value of penetration enhancing agent (Azone) and the need for a predictable evaluations in the development of topical antiviral agents.

Keywords—Percutaneous penetraton, Azone, Hairless mouse skin, Herpes simplex virus (HSV), BVDU, FEAU

피부투과는 단순포진 바이러스(herpes simplex virus(HSV)) 감염의 국소치료요법에 있어 가장 중요한 요인의 하나이다.¹⁾

1-dodecylazacycloheptan-2-one(Azone : Neoson Research and Development, Irvine, CA)는 소수성의 액체로서 여러 가지 화학물질 혹은 약물의 경피흡수에 있어서 흡수촉진제로서의 작용이 크고, 인체피부나 점막에 대한 자극성이 거의 없는 것으로 알려져 있다.¹⁻⁶⁾

이 물질의 구조는 Fig.1과 같으며 LD₅₀의 측정을 통한 통계로는 독성이 매우 낮으며 안전성은 높은 물질로 밝혀졌다.⁶⁾(E)-5-(2-bromovinyl-2-deoxyuridine(BVDU)와 1-(2-deoxy-2-fluoso-β-D-arabinofuranosyl)-5-ethyluracil(FEAU)는 HSV 감염에 대한

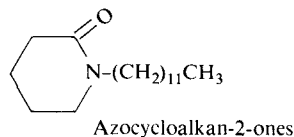


Figure 1—Chemical structure Azone (of 1-dodecylazacycloheptane-2-one).

항의 순서에 따라 준비하였다.

실험 및 분석

Azone 처리한 피부와 처리하지 않은 피부 두 종류를 준비하여 표피쪽이 donor를 향하도록 Franz cell에 덮어 썬었다. donor는 BVDU 및 FEAU를 Carbpopol®-934P(B.F. Goodrich CD., Cleveland, OH)을 이용한 gel로 만들어 사용하였으며 receiver는

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

강력한 바이러스제 증의 하나로 알려져 있다.^{7,8)} Gonsko⁹⁾ 등에 의하면, 어떤 종류의 항바이러스제들은 전신적인 효과보다 국소피부에 대한 효과가 더 높다고 한다. 따라서 HSV 감염에 대한 치료방법으로 경피약물수송체(TDDS)가 권장되고 있으므로 본 연구는, BVDU와 FEAU 두 약물의 피부투과 동태와 이에 대한 Azone의 영향을 밝혀 봄으로써 TDDS에서의 기초적인 자료를 얻고자 하였다.

실험방법

시 약

실험에 사용한 약물은 항바이러스제인 BVDU와 FEAU(Burroughs Wellcome Co., Research Triangle park, NC)이며 경피흡수촉진제로는 Azone(Nelson Research Corp. Irvine, CA)을 사용하였다.

피부막

실험에 사용한 무모 마우스의 피부는 6-8개월 짜리 SKH-HR1종이며 피부에 전혀 상처나 긁힌 흔적이 없는 것으로 선택하였으며 경추탈구 방법에 의하여 고통없이 죽인 다음 전체피부를 벗겨내고 여기에 붙어 있는 지방등은 조심스럽게 제거하여 평균두께 0.22 mm의 것을 사용하였다.

Azone의 처리

무모 마우스가 아직 살아있을 때 마우스 왼쪽편에 2.25 cm² 넓이의 부분을 선택한 다음 25 μl의 Azone을 24 시간 동안 접촉시켰다.

그 방법은, 무모 마우스를 가볍게 마취시킨 후 1.5 × 1.5 cm 크기의 꺼즈(Topper® dressing sponge)에 Azone을 떨어뜨린 다음 마우스의 선택한 부위에 올려놓고 수술 테이프(Blenderm®, 3M, Medical products Division, St. paul, MN)로 마우스 몸통 전체를 둘러싸서 떨어지지 않도록 보호한 다음 마우스가 물어 뜯지 못하도록 2회에 걸쳐 보호 테이프로 감싸주고 24 시간 후에 이를 제거하고 피부막 0.1 M-acetate buffer, pH5, 4.5 ml을 사용하였으며 32°C에서 magnetic stirrer를 이용하여 항시 교반하였다.

모든 실험은 3회 이상을 동시에 실시하였으며 일정한 시간에 따라 1 ml 씩의 시료를 취한 다음 다시 신선한 완충액으로 채워서 썩크 조건을 유지할

수 있도록 하였으며 채취한 시료는 HPLC(Beckman Instruments Inc., Berkeley, CA)로 분석하였다.

이동상으로는 메탄올 : 초산염완충액(7 : 93) 용액을 칼럼은 Beckman사의 Utrasil ODS(4.6 mm ID × 25 cm), UV흡수파장은 254 nm, 유속은 1 ml/min을 유지하였으며 여기서 얻어진 시료의 농도를 아래 공식 (1)을 이용하여 투과약물량의 누적치, Q_n을 얻었다.

$$Q_n = V_R \cdot C_n + \sum_{n=1}^n V_R \cdot C_{n-1} \quad (1)$$

C_n은 각 sampling 시간에 있어서의 농도, V_R은 receiver의 용량이며, Q_n의 값을 시간에 대하여 플롯하여 얻어지는 그래프에서 steady-state 부분만을 선택하여 그 기울기(ΔQ/Δt)를 약물 수송속도(flux)로 정하였으며 투과정수는 썩크 조건의 전제아래 아래의 공식(2)를 사용하였다.

$$P = \frac{\Delta Q / \Delta t}{A \cdot Cd} \quad (2)$$

여기에서 Cd는 donor의 약물농도, A는 확산면적(0.636 cm²)을 나타낸다.

결과 및 고찰

Barry 등¹¹⁻¹³⁾의 주장에 따르면 TDDS에 있어서 무모 마우스의 피부를 사용하면 수화(水和)로 인하여 각피층이 투과장벽으로서의 작용을 상실하는 기일이 3-4일 이므로 in vitro 실험은 3-4일만에 완료되어야 한다는 점을 고려할 때, 본 실험계에서도 이 수화의 기일을 확인하기 위하여 별도의 실험을 실시하였으며 Fig. 2에서와 같이 4일 이내에서는 수화의 문제가 없는 것으로 확인되었다.

Fig. 3은 각 시간에 따른 누적투과량의 전형적인 동태이며 다른 몇 가지 항바이러스제와 같이 lag time이 짧다.⁹⁾

Azone자체의 피부투과는 Fig. 4와 같으며(P=1 × 10⁻⁵ ~ 2 × 10⁻⁷ cm/sec) Azone의 P값이 약 2 × 10⁻⁷ cm/sec보다 낮아질 때에는(약 5일째 부터) 흡수촉진제로서의 작용이 없어지는 결과가 된다.(BVDU의 P값은 약 1.36 × 10⁻⁷)

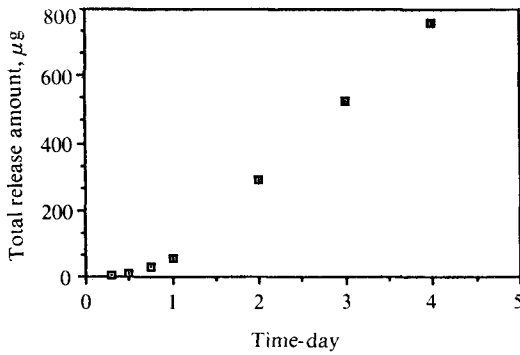


Figure 2—Total release amount of FEAU in pH 5 acetate buffer solution through hairless mouse skin at 32°C.

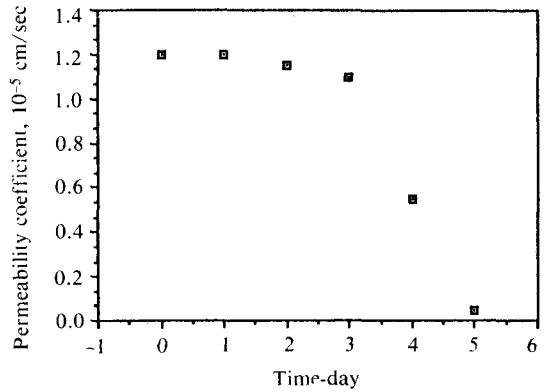


Figure 4—Permeability coefficient of Azone on the hairless mouse skin membrane.

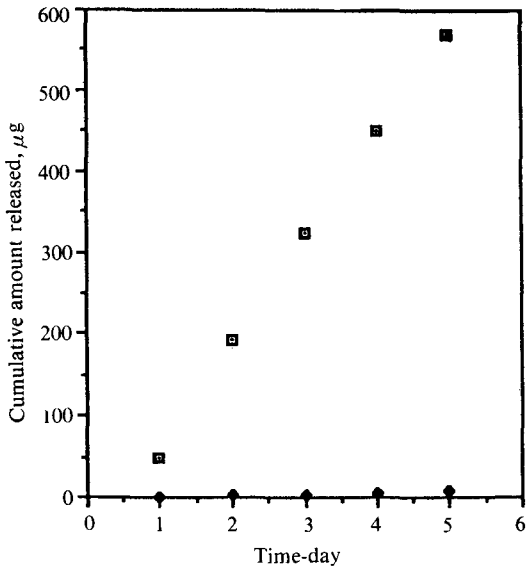


Figure 3—Cumulative amount of total BVDU, 5 mg/ml, with azone (□) and without azone (◆) treated hairless mouse skin at 32°C.

따라서 Azone을 흡수촉진제로 사용할 경우에는 Azone 처리 후 5일 이내의 것이 유의성이 있으며 실험은 3-4일만에 마치는 것이 가장 바람직 하다고

사료된다.

BVDU와 FEAU의 파라미터(Table I)를 고찰해 볼 때 비교적 소수성인 BVDU가 비교적 친수성인 FEAU의 P값 및 약물 수송속도보다 최소 10배 이상의 차이를 나타내는 것은 피부의 지용성을 고려해 볼 때 일반적 이론에 부합된다.

HSV 감염 치료에서 가장 강력한 물질의 하나로 알려진⁷⁾ BVDU를 TDDS로 고려할 경우, 보다 큰 국소효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

경피약물수송체(TDDS)의 *in vitro* 실험에 있어

1) Azone으로 전처리한 무모 마우스의 피부를 사용할 경우 3-5일 정도의 실험기간이 바람직 하다.

2) Azone을 흡수촉진제로 사용할 경우 투과속도는 Azone을 사용하지 않은 경우보다 약 10~55배의 큰 값을 나타낸다.

3) BVDU는 TDDS에 있어서 강력한 국소효과를

Table I—Delivery Properties of FEAU and BVDU through Hairless Mouse Skin Membrane at 32°C

Drug	Solubility in acetate buff. mg/ml	Permeability coefficient × 10 ⁻⁷ cm/sec		Delivery rate	
		non-azone	azone	non-azone	azone
BVDU	5	1.36(0.04)	73.53(0.78)	37.37	2020.25
FEAU	42	0.67(0.02)	7.92(0.01)	154.63	1827.87

mean (+/- S.D.), n = 3

가진 ACV와 비슷한 P값을 지니므로 TDDS으로서의 가능성 및 HSV 감염 치료제로의 활용이 기대된다.

감사의 말씀

이 실험을 마치기까지 많은 도움을 주신 Dr. W.I. Higuchi(University of Utah)에게 감사드립니다.

문헌

- 1) S.L. Spruance, M. McKeough, K. Sugibayashi, F. Robertson, P. Gaede and D.S. Clank, Effect of Azone and propylene glycol on penetration of trifluoro thymidine through skin and efficacy of different topical formulations against cutaneous Herpes Simplex Virus infections in guinea pigs, *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **26**, 819 (1984).
- 2) L.E. Schinipper, E.R. Kern, S. Marlowe, K.A. Arndt and J.C. Overall Jr., Early, patient-initiated treatment of herpes labialis with topical 10% acyclovir, *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **25**, 553 (1984).
- 3) S.L. Spruance, M.B. McKeough and J.R. Cardinal, Penetration of guinea pig skin by acyclovir in different vehicles and correlation with the efficacy of topical therapy of experimental cutaneous herpes simplex virus infection, *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **25**, 10 (1984).
- 4) R.B. Stoughton, R.B. and W.O. McClure, Azone: a new, nontoxic enhancer of cutaneous penetration. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, **9**, 725 (1983).
- 5) W.M. Shannon, L. Westbrook, W.I. Higuchi, K. Sugibayashi, D.C. Baker, S.D. Kurnai, J.L. Fox, G.L. Flynn, N.F.H. Ho and R. Vaidyanathan, Influence of 1-dodecylazacycloheptan-2-one(Azone) on the topical therapy of cutaneous Herpes Simplex Virus type-1 infection in hairless mice with 2',3'-i-O-acetyl-9-β-D-arabinofuranosyladenine and 5'-O-valeryl-9-β-D-arabinofuranosyladenine. *J. Pharm. Sci.*, **74**, 1157 (1985).
- 6) R.B. Stoughton, Enhanced percutaneous penetration with 1-dodecylazacycloheptan-2-one., *Arch. Dermatol.*, **118**, (1982).
- 7) E. De Clercq, J. Descamps, P. De Somer, P.J. Barr, A.S. Jones and R.T. Walker, (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine: a potent and selective antiherpes agent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2947 (1979).
- 8) M.M. Mansuri, I. Ghazzouli, M.S. Chen, H.G. Howellk, P.R. Brodfuehrer, D.A. Benigi and J.C. Martin, 1-(2-Deoxy-2-fluoro-β-D-arabinofuranosyl)-5-ethyluracil, a highly selective antiherpes simplex agent, *J. Med. Chem.*, **30**, 867 (1987).
- 9) A. Gonso, G. Imanidis, P. Vogt, E.R. Kern, H. Tsuge, M.H. Su, S.H. Choi and W.I. Higuchi, Controlled (trans) dermal delivery of an antiviral agent (Acyclovir) I: an *in vitro* animal model for efficacy evaluation of cutaneous HSV-1 infections. *Int. J. Pharm.* in press.
- 10) T. Okano, M. Miyajima, F. Komada, G. Imanidis, S. Nishiyama, S.W. Kim and W.I. Higuchi, Control of drug concentration-time profiles *in vivo* by zero-order transdermal delivery system, *J. Control. Rel.*, **6**, 99 (1987).
- 11) J.R. Bond and B.W. Barry, Limitations of hairless mouse skin as a model for *in vitro* permeation studies through human skin.: hydration damage, *J. Invest. Dermatol.*, **90**, 486 (1988).
- 12) R.S. Hinz, C.D. Hodson, C.R. Lorence and R.H. Guy, *In vitro* percutaneous penetration: evaluation of the utility of hairless mouse skin, *J. Invest. Dermatol.*, **93**, 87 (1989).
- 13) W.J. Lambert, W.I. Higuchi, K. Knutson and S.L. Krill, Effect of long-term hydration leading to the development of polar channels in hairless mouse stratum corneum, *J. Pharm. Sci.*, **78**, 925 (1989).