

황체호르몬 유리호르몬의 경점막 수송: 수종의 흡수촉진제를 사용한 [D-Ala⁶] LHRH의 점막투과촉진 및 흰쥐에 있어서의 배란유도효과 향상

한 건* · 정남주 · 박정숙 · 박희범 · 정연복 · 문동철
충북대학교 약학대학

(Received April 25, 1994)

Transmucosal Delivery of Luteinizing Hormone Releasing Hormone(LHRH): Evaluation of Membrane Permeability Enhancement of [D-Ala⁶] LHRH in Rabbit Mucosa and Ovulation Inducing Effect in Vaginal Administration of Rat by the Addition of Several Absorption Enhancers

Kun Han*, Nam Joo Jeong, Jeong Sook Park, Hee Beom Park,
Youn Bok Chung and Dong Cheul Moon

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

Abstract—Due to the limited bioavailability of [D-Ala⁶]LHRH from nonparenteral transmucosal sites of administration, enhancement of mucosal permeability by coadministration of several protease inhibitors and/or penetration enhancers were studied in rabbit mucosa. As a reliable bioassay method for [D-Ala⁶]LHRH, ovulation-inducing effect were measured after vaginal administration in the rat. The permeation of [D-Ala⁶]LHRH through the mucosal membrane of rabbit mounted on George-Grass diffusion cells were examined in the presence of polyoxyethylene 9-lauryl ether (POE), β -cyclodextrin(β -CyD) or ethylene diamine tetra acetate disodium salt(EDTA). The vaginal membrane showed higher permeability of [D-Ala⁶]LHRH than the rectal and nasal membrane. POE and β -CyD showed a small promoting effect on the membrane permeation of [D-Ala⁶]LHRH, but EDTA showed significant enhancement. Ovulation was enhanced by the coadministration of sodium laurate(0.5%), a protease inhibitor but was not enhanced by EDTA, a penetration enhancer. On the other hands, coadministration of sodium tauro 24,25 dihydrofusidate(1%) and EDTA(2%) enhanced the ovulation inducing-effect 2.8 times. These results suggest that the vaginal administration of [D-Ala⁶]LHRH with STDHF or sodium laurate as a protease inhibitor, and EDTA as a penetration enhancer, may become an effective method for transmucosal delivery of [D-Ala⁶] LHRH.

Keywords □ [D-Ala⁶] LHRH, penetration enhancer, permeability, enzyme inhibitor, ovulation inducing effect

황체호르몬 유리호르몬(LHRH)의 고활성 동족체를 과량으로 동물에 연속투여시 혈액중 LH농도 및 testosterone농도가 일시적으로 상승된 후 정상 레벨보다 현저히 저하되고 또한 부성기가 위축된다는 사실이 밝혀졌다. 이러한 성선기능의 억제현상 또는 부

성기의 위축현상이 호르몬의존성 질환 즉, 전립선암, 유방암 등의 내분비의존성 종양, 자궁내막증 및 성조숙증 등^{1,2)}의 치료에 유효하다고 보고되어 현재 LHRH류의 치료약으로서의 개발에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. LHRH 효능제의 작용기구는 다음과 같이 두가지로 구분하여 생각되고 있다. 첫째,

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

강력한 효능제(agonist)의 반복투여에 의해 뇌하수체를 과도하게 자극하여 탈감각을 일으키게 되어 결과적으로 성선자극호르몬의 분비를 저하시킨다는 것이다. 둘째, 과량의 LHRH 효능제의 자극에 의해 다량의 LH가 분비되고 성선(정소)에 있어서 LH 수용체가 감소(down regulation) 된다는 것이다.

한편 Hutchinson 등³⁾은 goserelin 함유 PLGA의 침상 이식체를 환자에 투여시, 혈청중 testosterone 농도가 투여 2~3주후 부터 감소함을 보고하였다. 따라서 위와 같은 효과를 얻기 위하여 LHRH 효능제는 매일 투여가 가능한 것, 또는 1회 투여 후 장기간에 걸쳐서 약물이 지속적으로 방출되는 제제가 요구된다. 이를 위해서는 수용액이나 현탁액 또는 유탁액의 상태로 매일 주사로서 투여하거나 이식체 또는 마이크로캡셀제로 주사해야 하는 단점이 있다. 이에 따라 주사시 동통 및 장기간 투여로 인한 주사부위의 피하지방 위축이나 비대 등 환자의 응낙도가 떨어지므로 이를 개선하기 위하여 위장관에 비해 단백질분해효소가 적고 막투과 특성이 다르며 간장초회통과효과 등을 피할 수 있는 비경구 점막투여경로를 새로운 투여경로로서 확립하기에 관심이 집중되고 있다.

LHRH 및 그 동족체인 [D-Ala⁶] LHRH의 직장, 비강 및 질점막 등 비경구 점막을 통한 약물 송달체계를 개발하기 위해서는 투여부위에서의 protease에 의한 분해 및 막투과성의 개선이 선결되어야 한다. 저자 등은 전보^{4,5)}에서 가토의 직장, 비강 및 질점막 균질액중에서 LHRH 및 [D-Ala⁶] LHRH의 효소분해 억제제로서 중쇄지방산염 중 sodium caprate 및 sodium laurate 등이 유효함을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 가토에 있어서 [D-Ala⁶] LHRH의 각 점막 투과시험시 ethylene diamine tetra acetate disodium salts (EDTA),^{6,7)} β-cyclodextrin(β-CyD)⁸⁾ 및 polyoxyethylene-9-lauryl ether(POE)⁹⁾의 막투과 촉진제로서의 유효성을 검토하였으며, 이들 각각을 [D-Ala⁶]LHRH에 첨가하여 흰쥐에 질점막으로 투여시 배란유도효과를 관찰하였다. 또한 *in vitro* 실험에서 [D-Ala⁶] LHRH의 투과촉진효과가 컸던 EDTA와 효소분해 억제효과가 우수한 것으로 나타났던 sod. laurate 또는 sodium tauro-24,25-dihydrofusidate (STDHF)를 첨가하여 질점막으로 투여시 배란유도 효과에 미치는 영향을 관찰하여 이들의 흡수촉진제로서의 유용성을 검토하였다.

(pyro) Glu¹-His²-Trp³-Ser⁴-Tyr⁵-Ala⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-Gly¹⁰-NH₂

실험방법

시약-[D-Ala⁶] LHRH, EDTA, POE, β-CyD, STDHF, hyaluronidase 및 tryptophan은 Sigma Chemical Co.의 것을 사용하였다. 그외 아세토니트릴, 인산, 메탄올, 에탄올아민 및 기타 시약은 모두 분석용 및 특급품을 사용하였다.

실험동물-New Zealand White종 가토(female, 2~3 kg)를 삼육동물센터(경기도, 오산)에서, Sprague-Dawley계, rat(female, 생후 120~150일, 체중 200~240 g)를 제일상사(경기도, 안양)로 부터 구입하여 사용하였다.

[D-Ala⁶] LHRH의 직장, 비강 및 질점막 투과시험-가토의 직장, 비강 및 질점막을 일정한 크기로 채취하여 각각의 점막을 George Grass-Cell 사이에 mucosa측을 donor cell쪽으로 하고 반대측을 receptor cell쪽으로 장착하여 막투과실험을 하였다 (Fig. 1). Donor cell 부분에는 등장 인산염 완충액(직장 및 비강점막의 경우 pH 7.4, 질점막의 경우 pH 6.0으로 조정) 4 ml에 약물의 농도가 84 nmole/ml가 되도록 조제하여 넣고, receptor cell 부분에는 약물을 가하지 않은 등장 인산염 완충액 4 ml를 넣은 후 전 실험기간에 걸쳐 산소를 공급해 주면서 항온조 내에서 막투과 실험을 하였다. 또한 각 점막을 장착한 cell의 donor 및 receptor측에 점막 투과촉진제로서 EDTA,

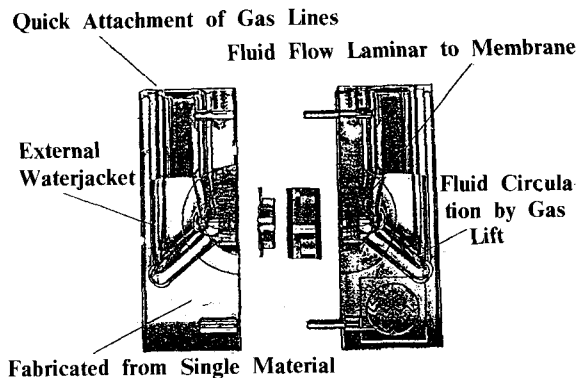


Fig. 1-Diagram of the George-Grass Cell permeation system used for the permeation test of mucosa.

POE 또는 β-CyD를 각각 1% 첨가하여 실험을 하였다. 실험개시 후 일정시간 간격으로 donor 및 receptor 측으로 부터 일정량을 취하여 [D-Ala⁶] LHRH의 투과량 및 잔존량을 측정하였다. 한편 투과계수(apparent permeability coefficient, Papp, cm/sec)는 다음 식에 따라 계산하였다.

$$Papp = \frac{\text{Flux}}{C_o \times A \times 60}$$

여기서 flux(nmole/min)는 시간에 따라 측정된 약물 양을 plot했을 때의 직선방정식의 기울기를 나타내며, C_o는 약물의 초기농도(nmole/ml), A는 투과용액에 노출된 점막의 표면적(cm²), 60은 분을 초로 환산하기 위한 계수를 각각 나타낸다.

실험 중 [D-Ala⁶] LHRH 및 대사물의 정량-Donor 및 receptor cell 중에서의 [D-Ala⁶] LHRH 및 그 대사물(m-i 및 m-ii)의 정량은 전보와 마찬가지로 Lee 등의 HPLC법¹⁰⁾을 개량하여 사용하였다.

흰쥐의 각 성주기의 관찰-Rugh의 방법¹¹⁾에 따라 매일 아침 9시 이전에 면봉으로 흰쥐의 질분비물을 채취하여 slide glass에 묻힌 다음 광학 현미경(Microscope, Philip Harris LTD.)으로 질분비물을 관찰하여 성주기를 판별하였다. 이때 흰쥐는 4일간의 성주기가 규칙적으로 나타나는 것을 2회 이상 확인한 후 실험에 사용하였다. 성주기의 분류는 3가지 주요 cell type 즉 백혈구, 상피세포 및 각화된 상피세포의 모양으로 판별하였으며 각 성주기의 특징은 Table I과 Fig. 2에 나타내었다.

배란유도효과 측정-흰쥐의 성주기를 확인한 후 배란유도효과를 측정하기 위하여 Yamazaki 등의 방법¹²⁾으로 발정정지기(diestrus)에 [D-Ala⁶] LHRH를 피하 또는 질(腔)로 투여(14 : 30 時)한 후 다음날 09 : 00~11 : 00時 사이에 흰쥐를 치사시킨 후 난관을 적출하여 두장의 slide glass 사이에 압착하여 평평

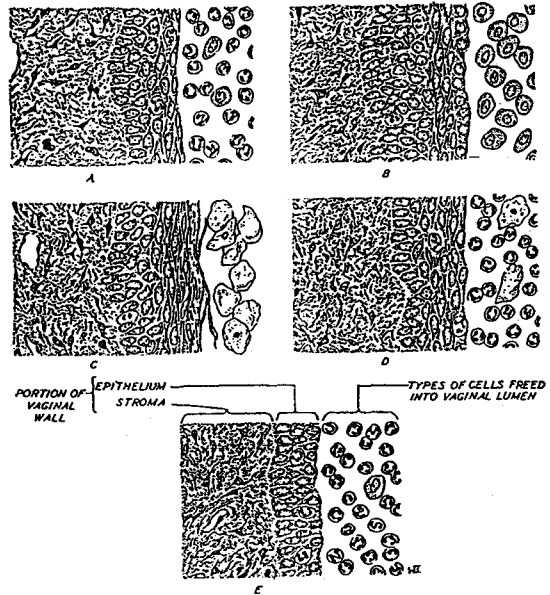


Fig. 2-Epithelial membrane and smears of the rat vaginal during different stages of the estrous cycle. (A) Diestrus, (B) Proestrus, (C) Estrus, (D) Metestrus, (E) Ovariectomized rats for 6 months.

하게 한 후 광학현미경으로 난관내의 난을 검사하였다(Fig. 3). 배란유도의 판정은 난관팽대부위내 과립세포에 둘러싸인 난이 1개 이상 존재하는 경우를 반응양성으로 하였으며 Litchfield & Wilcoxon의 Pharmacological Calculation System을 이용하여 ED₅₀를 계산하였다.

수중 흡수촉진제 첨가에 따른 [D-Ala⁶] LHRH 배란유도효과-[D-Ala⁶] LHRH와 분해억제제로서 sod. laurate(0.5%) 또는 STDHF(1%) 및 투과촉진제로서 POE(1%) 또는 EDTA(2%)를 각각 또는 병용하여 첨가한 용액을 질(腔)로 투여한 후, 전술한 방법에 따라 난의 수를 확인하여 배란유도효과를 측정

Table I-Microscopic characteristics of the vaginal smear as a function of the sexual cycle

Phase	Duration days	Microscopic characteristics of vaginal smears
Diestrus	1~3	Exclusively leukocytes
Proestrus	~1	Leukocytes and nucleated epithelial cells
Early estrus	0.5~1	Epithelial cells, may have some cornified cells
Estrus	0.5~1	Exclusively cornified cells
Metestrus	~1	Leukocytes and cornified cells

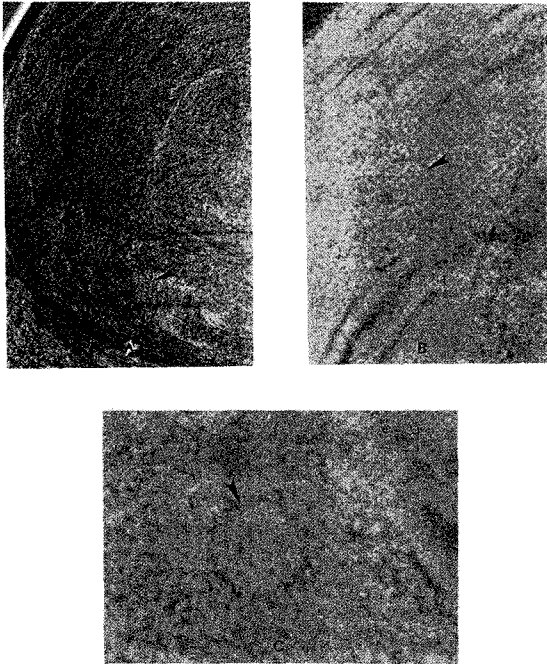


Fig. 3—Light micrographs of the oviduct of rat. They were injected with 16.92 nmole/rat of [D-Ala⁶] LHRH at 2 : 30 p.m. on the day of diestrus. The ampulla is considerably dilated and contains cumulative mass in which several ova(indicated arrow) are present. Twelve ova were found in both oviducts in this animal. A:(×40 magnification) B: (×100 magnification) C: (×200 magnification)

하였다.

결 과

[D-Ala⁶] LHRH의 직장, 비강 및 질점막 투과특성—Fig. 4는 [D-Ala⁶] LHRH의 직장점막 투과실험 결과를 나타낸 것으로 상단에는 donor cell 부분의 시간에 따른 약물의 분해 및 점막투과에 따른 소실 양상을, 하단에는 점막을 투과한 receptor cell 부분의 약물의 양을 정량하여 나타낸 것이다. Donor cell에서의 [D-Ala⁶] LHRH의 분해는 직장점막 균질액⁵⁾에 비해 훨씬 적게 나타났다. 이것은 직장에 존재하는 [D-Ala⁶] LHRH 분해에 관여하는 각종 효소들이 막 표면 보다 세포질에 다량 존재하기 때문인 것으로 추정된다. 분해산물은 m-i([D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁷) 및 m-ii ([D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁹)가 나타났다. Fig. 4의 하단에

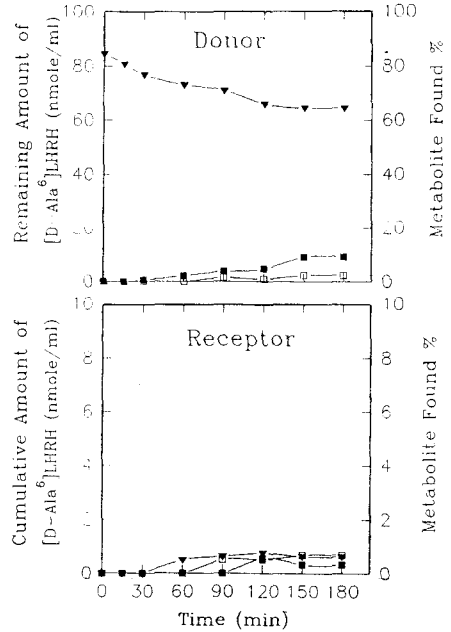


Fig. 4—Degradation and permeation profile of [D-Ala⁶] LHRH and its metabolites in the George-Grass Cell mounted with rectal mucosa.

▼; [D-Ala⁶] LHRH, □; m-i([D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁷) , ■; m-ii([D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁹)

나타낸 바와 같이 receptor측에서도 분해산물이 검출되었다. 이것은 분해산물이 투과되었거나 [D-Ala⁶] LHRH가 투과과정 또는 투과 후 분해된 것으로 생각되며 결과적으로 분해되지 않고 직장점막을 투과한 [D-Ala⁶] LHRH는 1% 이하로써 매우 낮은 투과율을 나타내었다.

Fig. 5는 비강점막의 경우로 donor cell 부분의 약물의 분해정도는 점막 균질액으로 실험한 경우⁵⁾와 달리 직장점막에 비해 훨씬 많이 분해됨을 나타내었다. 따라서 비강점막의 경우 직장점막에 비해 점막 표면에 결합되어 있는 효소들이 많이 존재하는 것으로 생각된다. Receptor cell측으로 투과된 [D-Ala⁶] LHRH는 없었으며 분해산물 m-i([D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁷) 만이 2% 정도 검출되었다.

Fig. 6은 질점막 투과실험을 실시한 결과로 질점막 균질액중에서 실험한 결과⁵⁾와 마찬가지로 donor cell 부분에서 약물의 분해는 직장 및 비강점막에 비해 훨씬 작았다. 투과량은 7% 정도로 직장 및 비강점막에 비해 투과율이 현저히 컸다.

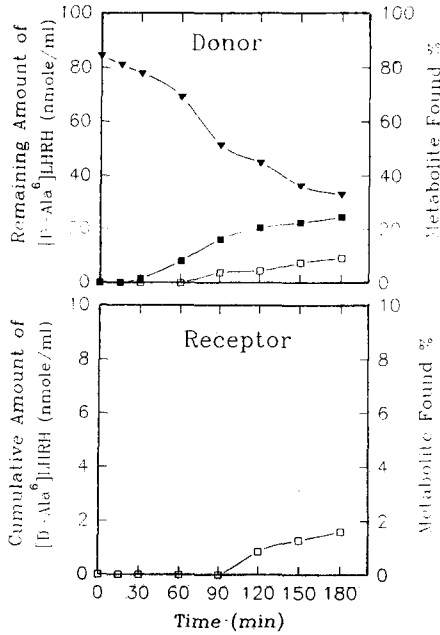


Fig. 5—Degradation and permeation profile of [D-Ala⁶] LHRH and its metabolites in the George-Grass Cell mounted with nasal mucosa. ▼; [D-Ala⁶] LHRH, □; m-i([D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁷), ■; m-ii([D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁹)

이상의 결과로부터 각 점막 중 질점막의 투과율이 가장 크게 나타난 것으로 보아 질점막은 직장 및 비강점막에 비해 보다 느슨한 조직구조를 가지고 있는 것으로 생각된다. 또한 전보⁵⁾의 점막균질액 실험결과 및 본 실험결과에서 직장 및 비강점막에 비해 질점막에서 [D-Ala⁶] LHRH가 가장 안정한 것으로 보아 질점막의 막표면 및 세포질 내에는 직장 및 비강점막에 비해 [D-Ala⁶] LHRH의 분해효소가 적게 존재하는 것으로 생각된다.

[D-Ala⁶] LHRH의 질점막 투과실험에 있어서 수종 흡수촉진제의 영향—직장, 비강 및 질점막 중 [D-Ala⁶] LHRH의 투과율이 가장 높게 나타난 질점막을 사용하여 POE, β-CyD 및 EDTA의 막투과 촉진효과를 검토하였다. Donor cell 및 receptor cell에 각각 이들 투과촉진제 1%를 가하여 [D-Ala⁶] LHRH의 질점막 투과실험을 실시한 결과를 Fig. 7에 나타냈다. 투과촉진제를 첨가하지 않은 경우 [D-Ala⁶] LHRH의 lag time은 17분이었으나 POE 첨가시 lag time이 2분으로 단축되었으며 투과율은 유의한 차이를 나타내지 않았다. β-CyD 첨가시 다른 첨가제에

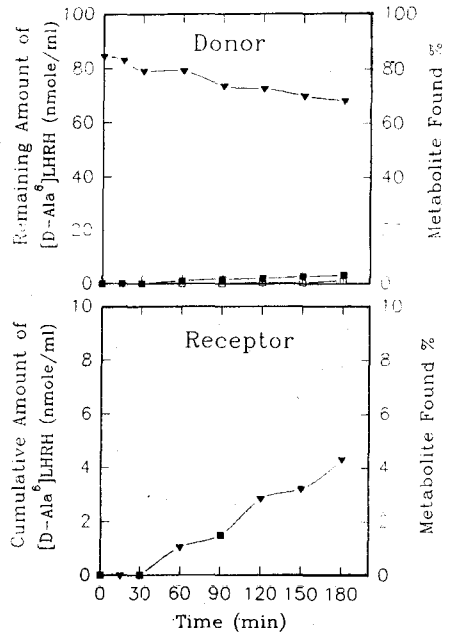


Fig. 6—Degradation and permeation profile of [D-Ala⁶] LHRH and its metabolites in the George-Grass Cell mounted with vaginal mucosa. ▼; [D-Ala⁶] LHRH, □; m-i([D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁷), ■; m-ii([D-Ala⁶] LHRH¹⁻⁹)

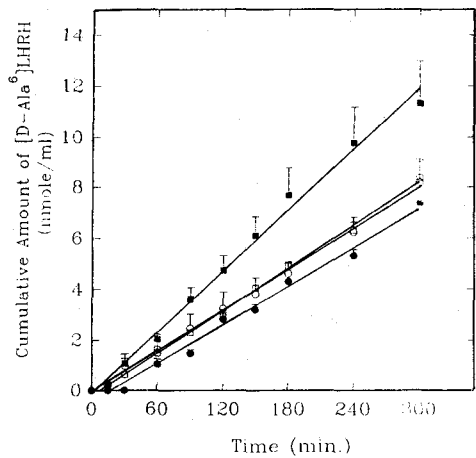


Fig. 7—The effect of several penetration enhancers, polyoxyethylene-9-lauryl ether(POE), ethylene diamine tetra acetate(EDTA) and β-cyclodextrin(β-CyD), on the permeation of [D-Ala⁶] LHRH through the vaginal membrane *in vitro*. Key: ●; control, ○; POE, □; β-CyD, ■; EDTA

비해 lag time은 그다지 감소되지 않았으며(8분),

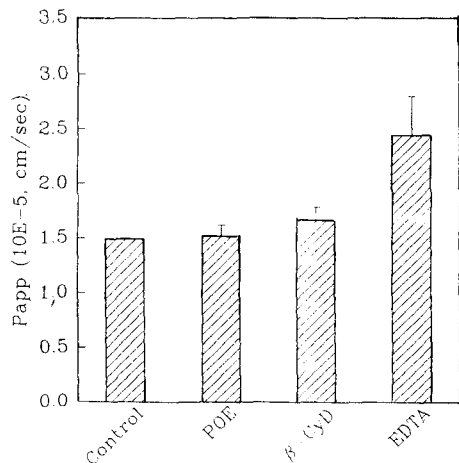


Fig. 8—Influence of penetration enhancers on permeability coefficient of [D-Ala⁶] LHRH across the vaginal membrane. Error bars represent standard errors on the mean for n=3. Asterisk denote significant difference compared with the control.

EDTA의 경우 lag time이 2분으로 감소함과 함께 투과율도 현저하게 증가되었다. Fig. 7의 결과로부터 질점막에서의 [D-Ala⁶] LHRH의 투과계수(Papp)를 산출하여 Fig. 8에 나타내었다. POE 및 β-CyD 첨가의 경우 투과계수는 각각 1.5×10^{-5} cm/sec, 1.7×10^{-5} cm/sec로 비슷한 결과를 나타내었으며, EDTA의 경우 투과계수는 2.4×10^{-5} cm/sec로 투과촉진제를 사용하지 않은 경우에 비해 1.64배 증가된 결과를 나타내었다.

Rat의 각 성주기에 있어서 [D-Ala⁶] LHRH의 배란유도 효과—흰쥐 암컷의 각 단계의 성주기에서 [D-Ala⁶] LHRH(0.84 nmole/rat)를 피하투여(14 : 30

時)후, 배란유도효과를 관찰하여 Table II에 나타내었다. 흰쥐의 난관팽대부위내 과립세포에 둘러싸인 난자를 “Fresh-ova”로 판정했으며, 난관팽대부위보다 아랫부분에서 과립세포가 난분해를 일으켜 과립세포에 둘러싸인 난자를 관찰할 수 없을 때의 난자를 “Shed and Cleft ova”로 판정하였다. 배란이 되는 시기는 발정전기(proestrus)상태 말기에서 시작되어 발정기(estrus) 상태 초기에 완료된다고 알려져 있다. 따라서 순수하게 약물투여에 의한 배란유도효과를 측정하기 위한 [D-Ala⁶] LHRH의 투여시기는 자연 배란일의 이틀전인 발정정지기(diestrus)상태가 적당하며, 발정정지기 상태에서 [D-Ala⁶] LHRH를 투여한 결과 배란이 1일 일찍 유도되었음을 확인할 수 있었다. 발정기와 발정후기(metestrus) 상태에 [D-Ala⁶] LHRH를 투여한 군에서는 난관팽대부위내에 배란직후의 Fresh ova를 확인할 수 없었으며, 난관팽대부아랫부분에서 과립세포가 난분해를 일으킨 Shed and Cleft ova를 확인할 수 있었다. 발정기와 발정후기 상태에서 Shed and Cleft ova의 출현은 [D-Ala⁶] LHRH 투여에 의해서가 아니라 자연배란에 의한 것으로 생각된다. 따라서 흰쥐의 배란유도효과를 이용하여 [D-Ala⁶] LHRH 활성을 측정하는 데는 발정정지기 상태의 흰쥐를 사용하는 것이 타당하다는 것을 알 수 있었다.

발정정지기 상태의 흰쥐에 [D-Ala⁶] LHRH를 피하투여한 경우의 배란유도용량반응 (ED₅₀)—발정정지기 상태의 흰쥐에 [D-Ala⁶] LHRH를 피하투여시 용량에 따른 배란유도효과를 Table III에 나타내었다. [D-Ala⁶] LHRH의 투여량 0.21 nmole에서는 난관팽대부위내의 난의 생성을 관찰할 수 없었으며, 1.04 nmole까지 용량을 증가시키에 따라 배란율은 용량에

Table II—Ovulation following subcutaneous administration of [D-Ala⁶] LHRH at various estrous stages of the rat

Stages of estrous cycle at the administration	“Fresh” ova (in the ampulla)		“Shed” and “cleft” ova (in the lower part than ampulla)	
	No. of rats ovulating /No. of rats examined	No. of ova in ovulating rats (Mean ± S.E.)	No. of rats ovulating /No. of rats examined	No. of ova in ovulating rats (Mean ± S.E.)
Proestrus	5/5	10.6 ± 0.65	0/5	—
Estrus	0/5	—	5/5	10.4 ± 1.3
Metestrus	0/5	—	5/5	6.7 ± 1.9
Diestrus	5/5	8.5 ± 2.4	0/5	—

* The subcutaneous does of [D-Ala⁶] LHRH, 0.84 nmole/rat, was given at 14 : 30.

Table III—Dose-response relationship in the induction of ovulation by the subcutaneous administration of [D-Ala⁶] LHRH in the diestrus rat

[D-Ala ⁶] LHRH (nmole/rat)	No. of rats ovulating /No. of rats examined	No. of ova in ovulation rats(Mean± S.E.)
0.21	0/5(0.0%)	0.0± 0.00
0.42	2/5(40.0%)	0.8± 0.58
0.63	3/5(60.0%)	1.2± 0.73
0.84	4/5(80.0%)	5.4± 1.47
1.04	5/5(100.0%)	6.0± 0.89

ED₅₀=0.51(0.34-0.77)nmole/rat

Rat: 200~240 g

*[D-Ala⁶] LHRH was administered at 14 : 30 on the day of diestrus.

Table IV—Dose-response relationship in the induction of ovulation by the vaginal administration of [D-Ala⁶] LHRH in the diestrus rat

[D-Ala ⁶] LHRH (nmole/rat)	No. of rats ovulating /No. of rats examined	No. of ova in ovulation rats(Mean± S.E.)
0.84	0/5(0.0%)	0.0± 0.00
2.51	1/5(20.0%)	0.6± 0.60
4.18	3/5(60.0%)	3.0± 1.84
8.36	4/5(80.0%)	3.4± 1.69
16.72	5/5(100.0%)	7.6± 2.18

ED₅₀=4.23(2.49-7.18)nmole/rat

Rat: 200~240 g

*[D-Ala⁶] LHRH was administered at 14 : 30 on the day of diestrus.

비례하여 증가하는 것으로 나타났다. 용량의 대수와 나타낸 것으로 대조군에 비하여 유의한 차이를 나타낸 배란율 사이에는 직선성을 나타냈으며, 50% 배란유도 효과를 나타내는 [D-Ala⁶] LHRH의 투여량은(ED₅₀)은 0.51(0.34~0.77) nmole/rat 이었다.

[D-Ala⁶] LHRH의 질점막 투여시 수종 흡수촉진제 첨가에 따른 배란유도용량반응(ED₅₀)-[D-Ala⁶] LHRH용액을 질점막으로 투여시 용량에 따른 배란유도효과를 Table IV에 나타내었다. [D-Ala⁶] LHRH의 배란유도용량반응(ED₅₀)은 피하투여시(Table III)와 비교하여 커다란 차이를 나타내어 질점막으로 투여시 ED₅₀(4.23 nmole/rat)는 피하투여시 ED₅₀(0.51 nmole/rat)에 비해 8배 정도의 용량차이를 나타내었다.

Table V는 [D-Ala⁶] LHRH의 *in vitro* 점막투과에

Table V—Dose-response relationship in the induction of ovulation by the vaginal administration of [D-Ala⁶] LHRH, with EDTA(2%) in the diestrus rat

[D-Ala ⁶] LHRH (nmole/rat)	No. of rats ovulating /No. of rats examined	No. of ova in ovulation rats(Mean± S.E.)
0.84	0/5(0.0%)	0.0± 0.00
2.51	2/5(40.0%)	1.4± 0.98
4.18	2/5(40.0%)	1.6± 1.03
5.85	3/5(60.0%)	3.8± 1.96

ED₅₀=4.46(2.03-9.80)nmole/rat Rat: 200~240 g

*[D-Ala⁶] LHRH was administered at 14 : 30 on the day of diestrus.

Table VI—Dose-response relationship in the induction of ovulation by the vaginal administration of [D-Ala⁶] LHRH, with POE(1%) in the diestrus rat

[D-Ala ⁶] LHRH (nmole/rat)	No. of rats ovulating /No. of rats examined	No. of ova in ovulation rats(Mean± S.E.)
0.84	1/5(0.0%)	0.4± 0.00
4.18	2/5(40.0%)	2.2± 1.43
5.85	3/5(60.0%)	3.2± 1.32
8.36	4/5(80.0%)	6.4± 2.06

ED₅₀=3.62(1.41-9.29)nmole/rat Rat: 200~240 g

*[D-Ala⁶] LHRH was administered at 14 : 30 on the day of diestrus.

대해 투과촉진효과가 큰 것으로 나타난 EDTA 2%를 첨가하여 질점막으로 투여한 후의 배란유도효과를 영향을 주지 못함을 알 수 있었다.

내지 않았다. 이것은 *in vitro* 점막균질액 중에서 EDTA가 [D-Ala⁶] LHRH의 주요 분해효소인 EP 24.11을 억제하지 못하여⁵⁾ [D-Ala⁶] LHRH가 흡수되기 전에 상당량 분해되었기 때문인 것으로 생각된다.

Table VI는 [D-Ala⁶] LHRH에 첨가제로서 POE 1%를 첨가하여 질점막으로 투여한 결과로서 대조군에 비하여 약 1.2배의 배란유도효과를 나타내었으나 EDTA 첨가시와 마찬가지로 흡수촉진효과는 대조군에 비해 유의한 차이를 나타내지 않았다. POE는 비이온성 계면활성제의 일종으로 직접 점막을 자극하여 막을 perturbation시킴으로 약물의 흡수를 촉진시키는 것으로 알려져 있다.⁹⁾ 본 연구의 점막투과실험 결과 lag time을 현저히 감소시켰으나 투과율은 유의한 차이를 나타내지 않았으며(Fig. 7) 점막균질액 중에서

Table VII—Dose-response relationship in the induction of ovulation by the vaginal administration of [D-Ala⁶] LHRH, with STDHF(1%) in the diestrus rat

[D-Ala ⁶] LHRH (nmole/rat)	No. of rats ovulating /No. of rats examined	No. of ova in ovulation rats(Mean± S.E.)
0.42	0/5(0.0%)	0.0± 0.00
0.84	1/5(20.0%)	0.4± 0.40
2.51	2/5(40.0%)	1.2± 0.80
4.18	3/5(60.0%)	2.6± 1.33

ED₅₀ = 3.05(1.12 - 8.35)nmole/rat Rat: 200~240 g

*[D-Ala⁶] LHRH was administered at 14 : 30 on the day of diestrus.

Table VIII—Dose-response relationship in the induction of ovulation by the vaginal administration of [D-Ala⁶] LHRH, with sodium laurate(0.5%) in the diestrus rat

[D-Ala ⁶] LHRH (nmole/rat)	No. of rats ovulating /No. of rats examined	No. of ova in ovulation rats(Mean± S.E.)
0.84	1/5(20.0%)	1.0± 0.00
1.67	2/5(40.0%)	1.0± 0.63
2.51	4/5(80.0%)	2.4± 0.75
4.18	4/5(80.0%)	4.4± 1.29

ED₅₀ = 1.72(0.93 - 3.19)nmole/rat Rat: 200~240 g

*[D-Ala⁶] LHRH was administered at 14 : 30 on the day of diestrus.

단백분해 효소 억제작용은 나타나지 않은 점으로 미루어 보아 POE는 [D-Ala⁶] LHRH의 흡수에 그다지 Table VII은 [D-Ala⁶] LHRH에 첨가제로서 STDHF 1%를 첨가한 경우의 배란 유도효과를 나타낸 것이다. STDHF는 [D-Ala⁶] LHRH의 주요분해 효소인 EP 24.11을 억제하였으며,⁵⁾ 배란유도효과는 대조군에 비하여 1.4배 정도 유의성 있게 증가된 결과를 나타내었다. 따라서 STDHF 첨가에 의한 배란유도 증진효과는 Longenecker 등¹³⁾이 인슐린에 대해 보고한 혼합 미셀 생성에 따른 흡수촉진기전 이외에도 [D-Ala⁶] LHRH의 주요분해 효소인 EP 24.11을 억제하여 [D-Ala⁶] LHRH가 흡수되는 동안 분해를 받지 않고 안정한 상태로 남아 있기 때문인 것으로 생각된다.

Table VIII은 중쇄지방산염의 일종인 sodium laurate 0.5%를 첨가하여 [D-Ala⁶] LHRH를 질점막으로 투여할 후의 용량에 따른 배란유도효과를 나타낸 것

Table IX—Dose-response relationship in the induction of ovulation by the vaginal administration of [D-Ala⁶] LHRH, with STDHF(1%)+ EDTA(2%) in the diestrus rat

[D-Ala ⁶] LHRH (nmole/rat)	No. of rats ovulating /No. of rats examined	No. of ova in ovulation rats(Mean± S.E.)
0.84	1/5(20.0%)	0.6± 0.60
1.67	3/5(60.0%)	2.4± 1.50
2.51	4/5(80.0%)	3.8± 1.28
3.34	4/5(80.0%)	5.4± 2.34

ED₅₀ = 1.50(0.86 - 2.60)nmole/rat Rat: 200~240 g

*[D-Ala⁶] LHRH was administered at 14 : 30 on the day of diestrus.

으로 대조군에 비해 2.5배 정도 향상된 배란유도효과를 나타내었다. sodium laurate가 점막균질액에서 [D-Ala⁶] LHRH의 분해억제효과를 나타낸 전보⁵⁾의 결과로부터 흡수촉진효과는 주로 [D-Ala⁶] LHRH의 안정화 때문인 것으로 생각된다.

한편 점막투과시험시 투과증진효과를 나타냈던 EDTA와 점막균질액 중에서 [D-Ala⁶] LHRH의 분해를 억제하는 것으로 나타난 STDHF를 병용하여 투여시 배란 유도효과는 EDTA 단독 및 STDHF 단독 첨가시에 비해 훨씬 증가된 2.8배를 나타내었다(Table IX). 이들의 병용첨가시 증가된 배란유도효과는 STDHF의 [D-Ala⁶] LHRH의 점막에서의 안정화 작용과 EDTA의 막투과 증진 효과가 상가되어 나타난 결과로 생각된다. 즉 EDTA 단독 첨가시 배란유도증진효과가 없었으나 STDHF와 함께 병용투여시 배란 유도효과가 향상된 것은 STDHF에 의해 [D-Ala⁶] LHRH의 점막에서의 효소분해가 억제되고, EDTA에 의해 [D-Ala⁶] LHRH의 점막투과가 촉진되었기 때문으로 생각된다. 따라서 단백질분해효소 저해가 [D-Ala⁶] LHRH의 점막흡수를 증진시키기 위한 필수 조건임을 알 수 있었다.

고 찰

질점막으로의 약물투여는 케이스트 및 젤리 등의 피임약을 질내에 삽입시켜 사용하여 왔으며 또한 질(膣)에서는 흡수가 일어나지 않는다는 가정하에 트리코모나스증을 치료하기 위해 비소화합물 및 수은 화합물 등의 독성물질도 사용된 바 있다. 그후 많은 연구가 진행됨에 따라 질에서도 약물이 흡수된다는

사실이 밝혀졌으며 최근에는 국소작용 뿐만 아니라 전신작용 목적의 투여부위로서 연구가 활발히 진행되고 있다. 질점막에서 흡수된 약물은 직접 전신순환으로 이행되어 간장에 의한 초회통과효과를 회피할 수 있다. 질점막흡수에 관한 연구보고로 Okada 등¹⁴⁾은 leuprolide와 같이 친수성 펩타이드를 환취의 질점막에 투여한 결과 약물의 흡수가 비교적 잘되며, 발정후기 및 발정정지기에 투여시 발정전기 및 발정기에 비해 약 13배 정도 흡수가 큰 것으로 보고하였다. 이와 같은 결과는 발정후기 및 발정정지기 동안 질점막 상피는 가능하고 극히 다공성이어서 약물의 투과가 보다 용이하기 때문이라고 설명하였다. 또한 Leuprolide 질점막 투여시 5% citric acid 첨가로 절대 생체이용률이 20%로 증가되었으며, 이러한 흡수촉진기전은 유기산의 킬레이트화능과 관련이 있다고 밝혔다. 다른 친수성 약물로 insulin 및 phenolsulfonphthalein, salicylic acid를 각 성주기에 투여시 이들 화합물의 흡수가 성주기에 현저한 영향을 받으며 이것은 세공양 경로를 통한 흡수율의 변화에 기인하는 것으로 보고하였다.¹⁵⁾ 점막층을 통한 약물의 흡수는 세포의 소포내로 uptake되어 간질강(interstitial space)내로 배출되는 transcytosis, 세포내 경로(transcellular route) 및 세포-세포 접합부위 또는 세포간 공간을 통하여 수송되는 세포간극 경로(paracellular route)의 세가지 경로를 통하여 투과된다.¹⁶⁾ 이러한 점막투과 과정에는 지질 및 단백질로 구성된 세포실질막, 또는 세포를 접합시키고 있는 밀착대(tight junction)가 약물의 흡수를 결정하는 율속부위로 작용한다.¹⁷⁾ EDTA와 같은 킬레이트제는 tight junction 부위의 Ca^{2+} 을 고갈시켜 세포간극의 투과성을 증가시킨다고 보고되고 있다.¹⁸⁾ 또한 EDTA, sodium caprate 및 담즙산염 등은 랫트의 직장에서 ampicillin의 흡수를 촉진시킴과 동시에 수분의 유입(influx)을 증가시킨다^{19,20)}는 보고도 있다.

본 연구에서는 킬레이트화제인 EDTA, 중쇄지방산염의 일종인 sodium laurate, 비이온성 계면활성제인 POE 및 fusidic acid의 sodium salt와 taurin의 포함체인 STDHF의 배란유도효과에 미치는 영향 및 이들의 흡수촉진 기전에 대해 검토하였다. EDTA는 [D-Ala⁶] LHRH의 *in vitro* 점막투과를 촉진시켰으나(Fig. 7) 흡수과정 중 분해효소를 억제하지 못한 결과⁵⁾ EDTA(2%) 첨가에 의해 *in vivo*에 있어서

[D-Ala⁶] LHRH의 흡수는 증가되지 않았다(Table V). 또한 직접 점막을 자극하여 약물의 흡수를 촉진시킨다⁹⁾고 알려진 POE는 본 실험에 있어서 [D-Ala⁶] LHRH의 *in vitro* 점막투과율을 유의성 있게 증가시키지 못한 결과를 나타내었다(Fig. 7). 따라서 배란유도효과도 대조군에 비하여 유의한 차이를 나타내지 않았다. 한편 STDHF는 항생제의 일종인 fusidic acid의 sodium salt와 taurine의 포함체로 물리화학적 성질은 유리 및 포함담즙산염의 성질과 유사하다. 이들은 항생효과가 없으며 물에 매우 잘 용해되고 수용액중에서 안정하다. Longenecker 등¹³⁾의 보고에 따르면 인슐린의 양(洋)의 비점막 흡수가 STDHF 첨가에 의하여 현저히 증가하였으며 이들의 흡수촉진기전이 STDHF-인슐린의 혼합미셀의 생성에 의한 것으로 제시하였으며, 막용해작용이 POE에 비해 100배 정도 적어서 국소독성이 적다고 보고하였다. 또한 Hoogdaem 등²¹⁾은 직장점막에서 흡수가 어려운 cefoxitin 및 펩타이드 약물의 일종인 desglycineamide arginine vasopressin(DGAVP)이 STDHF에 첨가에 의하여 흡수가 현저히 증진됨을 보고 하였다. 본 실험에 있어서 [D-Ala⁶]LHRH의 배란유도효과는 STDHF에 의해 1.4배 유의성 있게 증가되었다(Table VII). 이것은 주로 흡수과정 중 분해효소인 EP 24.11을 억제하기 때문인 것으로 생각되며 혼합미셀 형성에 의한 흡수촉진 또는 단백질분해효소로부터 보호작용도 배제할 수 없다고 추정된다.

Mishima 등²²⁾은 비점막에서 인슐린 흡수가 중쇄지방산염의 일종인 sod. caprate 첨가에 의해 상당히 촉진되어 피하주사(비점막 투여 용량의 1/2)의 98% 이었다고 보고하였으며, 그 흡수촉진효과가 막에 대한 용혈효과나 삼투압에 의한 것이라기 보다 Ca^{2+} 과의 킬레이트화능과 leucine aminopeptidase 활성 저해효과에 기인한다고 하였다. 본 실험에 있어서 [D-Ala⁶] LHRH의 배란유도효과는 sodium laurate 0.5% 첨가에 의해 2.5배 증가되었다(Table VIII). 이러한 sodium laurate의 흡수촉진기전은 세포간극경로로의 약물투과증진 또는 proteolysis 억제 등 단일기전에 의하지 않고 이들 두가지 기전이 복합적으로 작용하는 것으로 생각되며 세포내경로로의 흡수도 배제할 수 없어서 이 경우 여러 작용기전이 복합적으로 관여하는 것으로 생각된다.

본 연구의 결과를 종합하여 Table X에 나타내었

Table X—Ovulating-inducing activity of [D-Ala⁶] LHRH after vaginal administration with additives to diestrous rats^a

Additives	Dose of [D-Ala ⁶]LHRH, nmole/rat										ED ₅₀ , nmole/rat	Relative potency
	0.42	0.84	1.25	1.67	2.51	3.34	4.18	5.85	8.36	16.72		
None	—	0/5	—	—	1/5	—	3/5	—	4/5	5/5	4.23(2.50–7.18) ^b	1.0
EDTA(2%)	—	0/5	—	—	2/5	—	2/5	3/5	—	—	4.46(2.03–9.80)	0.9
POE(1%)	—	1/5	—	—	—	—	2/5	3/5	4/5	—	3.62(1.41–9.30)	1.2
STDHF(1%)	0/5	1/5	—	—	2/5	—	3/5	—	—	—	3.05(1.12–8.35)	1.4
sod. laurate(0.5%)	—	1/5	—	2/5	4/5	—	4/5	—	—	—	1.72(0.93–3.19)	2.5
EDTA(2%)+ STDHF(1%)	—	1/5	—	3/5	4/5	4/5	—	—	—	—	1.50(0.86–2.60)	2.8

^a Number of rats with induced ovulation per number of rats examined.

^b Fiducial limits(95%)

* [D-Ala⁶] LHRH was administered at 14 : 30 on the day of diestrus.

으며 첨가제의 종류에 따라 [D-Ala⁶] LHRH의 배란 유도효과는 큰 차이를 나타내었다. 즉 EDTA(2%) 또는 POE(1%) 단독사용시 배란유도효과는 그다지 증진되지 않았으며, 분해억제효과가 컸던 STDHF 또는 sodium laurate 사용시 유의성 있는 차이로 배란유도효과가 향상된 것으로 나타났다. 한편 분해억제효과가 있었던 STDHF(1%)와 투과촉진효과가 있었던 EDTA(2%)를 병용사용시 증가된 배란유도효과를 나타낸 것으로 보아 펩타이드 약물의 점막투과시 선결되어야 할 문제점으로는 투여부위에서의 약물의 안정화이며 이어 투과촉진제의 투과촉진작용임을 알 수 있었다.

결 론

1. [D-Ala⁶] LHRH의 직장, 비강 및 질점막 투과율은 질점막 투과율이 7%로서 가장 높았으며 단백분해효소에 의한 분해에 대해서도 직장 및 비강점막에 비해 안정한 것을 알 수 있었다. 또한 [D-Ala⁶] LHRH의 질점막투과는 EDTA의 첨가에 의해 현저히 증가되었다.
2. 발정정지기 상태의 흰쥐에 [D-Ala⁶] LHRH를 피하주사 또는 경점막투여시 자연배란보다 1일 일찍 배란이 유도되어 자연배란의 영향을 받지 않았다.
3. [D-Ala⁶] LHRH의 *in vitro* 점막투과를 촉진시킨 EDTA를 첨가하여 질점막으로 투여시 배란유도효과는 대조군에 비해 유의한 차이를 나타내지 않았다. 한편 질점막균질액에서 [D-Ala⁶] LHRH의 분해억제효과가 큰 STDHF 또는 sodium laurate의 첨가에

의해 배란유도효과는 현저히 증가되었다. 또한 STDHF(1%)와 EDTA(2%)를 병용하여 질점막으로 투여시 STDHF 또는 sodium laurate 단독 투여, 또는 EDTA 단독 투여시에 비하여 배란유도효과가 증가되었다.

위와 같은 결론으로부터 [D-Ala⁶] LHRH의 경점막 투여경로로는 질점막 투여가 바람직하며 질점막 투여시 흡수를 촉진시키기 위해서는 투여부위에서의 효소에 의한 약물의 분해억제가 선결문제이며 뒤이어 막투과촉진효과가 필요하다는 것을 알 수 있었다.

감사의 글

이 연구는 과학재단 특정기초 연구과제(#91-05-00-07) 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Sandow, J., Stoeckemann, K. & Jerabek Sandow, G.: Pharmacokinetics and endocrine effects of slow release formulations of LHRH analogues, *J. of Steroid Biochem. & Molecular Biol.*, **37**(6), 925-931 (1990).
- 2) Brogden, R. N., Buckley, M. M. & Ward, A.: Buserelin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical profile, *Drugs*, **39**(3), 399-437 (1990).
- 3) Walker, K. J. et al. *J. Endocrinol.* **103**, R1-R4 (1984).

- 4) Kun, H. & Jeong Sook, P.: Transmucosal Delivery of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone: Effect of medium chain fatty acid salts on stabilization of LHRH in mucosal homogenates *in vitro*. *Yakhak Hoeji*, **38**(1), 67-77 (1994).
- 5) Jeong Sook, P., Youn Bok, C. & Kun, H.: Trasmucosal 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, *Yakhak Hoeji*, **38**(2), 202-210 (1994).
- 6) Yamashita, S., Saitoh, S., Nakanishi, H., Masada, M., Nadai, T. & Kimura, T.: Effects of diclofenac sodium and disodium ethylenediamine tetra-acetate on electric parameters of the mucosal membrane and their relation to the permeability enhancing effects in the rat jejunum, *J. Pharm. Pharmacol.*, **39**, 621-626 (1987).
- 7) Nishihata, T., Tomida, T., Frederick, G., Rytting, J. H. & Higuchi, T.: Comparison of the effects of sodium salicylate, disodium ethylenediamine tetra-acetic acid and polyoxyethylene-23-lauryl ether as adjuvants for the rectal absorption of sodium cefoxitin, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 159-163 (1985).
- 8) Shao, Z., Krishnamoorthy, R. & Mitra, AK.: Cyclodextrins as nasal absorption promoters of insulin, *Pharm. Research.*, **9**(9), 1157-1163 (1992).
- 9) Sakai, K., Kutsuna, T. M., Nishino, T., Fujihara, Y. & Yata, N.: Contribution of calcium ion sequestration by polyoxyethylated nonionic surfactants to the enhanced colonic absorption of *p*-aminobenzoic acid, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 387-389 (1986).
- 10) 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).
- 11) Rugh, R.: In the Mouse, Its Reproduction and Development, Burgess Minneapolis, Minn., (1968).
- 12) Yamazaki, I., Nakagawa, H., Yoshida, K., and Nakayama, R.: LHRH bioassay with a parameter of ovulation-induction in the diestrous rat, *J. Fertil. Steril.*, **22**, 136 (1977).
- 13) Longenecker, J. P., Moses, A. C., Filter, J. S., Silver, R. D., Carey, M. C. & Duvovi, E. J.: Effect of sodium taurodihydrofusidate on nasal absorption of insulin in sheep, *J. Pharm. Sci.*, **76**, 351-355 (1987).
- 14) 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).
- 15) Okada, H., Yashiki, T. & Mima, H.: Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone releasing hormone analogue(leuprolide) in rats III: Effect of estrous cycle on vaginal absorption of hydrophilic model compounds, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 173-176 (1983).
- 16) McMartin, C., Hutchinson, L.E.F., Hyde, R. & Peters, E.: Analysis of structural requirements for the absorption of drugs and macromolecules from the nasal cavity, *J. Pharm. Sci.*, **76**, 535-540 (1987).
- 17) Powell, D. W.: Barrier function of epithelia, *Am. J. Physiol.*, **241**, G 275-G 288 (1981).
- 18) Yamashita, S., Saitoh, S., Nakanishi, H., Masada, Nadai, T., & Kimura, T.: Effects of diclofenac sodium and disodium ethylenediamine tetra-acetate on electrical parameters of the mucosal membrane and their relation to the permeability enhancing effects in the rat jejunum, *J. Pharm. Pharmacol.*, **39**, 621-626 (1987).
- 20) Shiga, M., Hayashi, M., Horie, T. & Awazu, S.: Differences in the promotion mechanism of the colonic absorption of antipyrine, phenol red and cefmetazole, *J. Pharm. Pharmacol.*, **39**, 118-123 (1987).
- 21) Van Hoogdalem, E. J., Heijligers-Feijen, C. D., Mathot, R.A.A., Wackwitz, A.T.E, van Bree, J.B.M.M., Verhoef, J. C., de Boer, A. G. & Breimer, D. D.: Rectal absorption enhancement of cefoxitin and desglycineamide arginine vasopressin by sodium tauro-24,25-dihydro fusidate in conscious rats, *J. Pharmacol. & Exp. Thera.*, **251**(2), 741-743 (1989).
- 22) 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, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **10**, 624-631 (1987).