

생체막접착성 하이드로겔을 이용한 황체형성호르몬 유리호르몬의 질점막 수송

한 건¹ · 박희범 · 박정숙 · 정연복

충북대학교 약학대학

(1996년 11월 5일 접수)

Transvaginal Delivery of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Using Bioadhesive Hydrogel

Kun Han¹, Hee Beom Park, Jeong Sook Park and Youn Bok Chung

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

(Received November 5, 1996)

The mucosal route of administration(nasal, buccal, conjunctival and vaginal) has recently been considered as an alternative to parenteral delivery for many peptide drugs because enzymatic degradation of these agents may be partly avoided. The objective of these study was to establish the optimal mucosal administration dosage form of LHRH/(D-Ala⁶)LHRH, based on presystemic metabolism. We reported previously the peptidase inhibition effect of medium chain fatty acid salts(sodium caprylate, soadium caprate and sodium laurate), EDTA and STDHF on the proteolysis of LHRH/(D-Ala⁶)LHRH in rabbit mucosal homogenates. We also reported that EDTA, STDHF and sodium laurate markedly increased the potency of LHRH/(D-Ala⁶)LHRH solution applied vaginally. In the present study, by administration of polycarbophil hydrogel containing LHRH the ovulation inducing activity was 3.3 times greater than solution. These results indicate not only peptidase inhibitor but also polycarbophil hydrogel significantly improved the absorption of this drug. The results of this study would provide the feasibility as a rational dosage form for improving bioavailability and self administration of this hydrogel by the vaginal application.

Keywords—LHRH, (D-Ala⁶)LHRH, Medium chain fatty acid, Peptidase inhibition, Polycarbophil hydrogel, Bioavailability

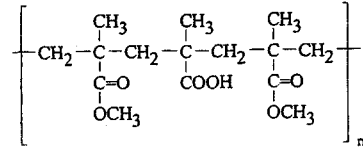
최근 전신작용을 목적으로 경구투여시에 비해 약물의 흡수를 증대시키고 생체이용률을 높이며, 주사제보다 투여가 간편한 방법인 점막투여 즉 직장, 비강, 질, 구강 및 안점막을 통한 펩타이드 및 단백질 투여에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다. 점막흡수에 대한 연구보고로 Okada 등¹⁾은 leuprolide와 같은 친수성 펩타이드를 질점막으로 투여시 성주기에 따라 영향을 받으나 비교적 흡수가 양호하며, 5% citric acid첨가로 절대 생체이용률이 20%까지 증가되었다고 보고하였다.²⁾ LHRH동족체의 일종인 nafarelin acetate의 비점막흡수에 대한 연구결과는 생체이용률이 2~3%로 아주 낮았으며, 흡수촉진제로 sodium

glycocholate를 첨가시 생체이용률이 약 20%정도 증가되었음이 보고되었다.³⁾ 위와같은 결과는 펩타이드 및 단백질의 비교적 높은 분자량 및 단백질분해효소에 대한 감수성에 기인한 것으로 이들 점막송달시스템의 설계 및 평가를 위해서는 이러한 특성이 고려되어야 한다. 즉 펩타이드 및 단백질의 분자량은 600~100,000 정도로 이러한 크기는 그들이 생체막을 통과하는데 방해요인이 될 수 있다. 따라서 이들의 흡수를 촉진하기 위해 담즙산^{4,5)}, 킬레이트화제^{6,7)}, 계면활성제^{8,9)} 등과 같은 투과촉진제가 필요하다. 또한 펩타이드 및 단백질 약물의 투여시 투여부위에서의 단백질분해효소에 대한 감수성이 고려되어야 하며¹⁰⁾, 단백질분해를 회피하기 위해서 이들의 송달 시스템은 유리된 펩타이드 및 단백질의 파괴를 최소화할 수 있

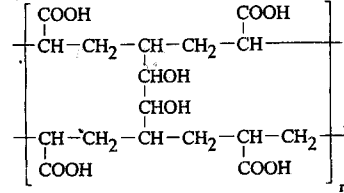
¹ 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

도록 설계되어야 한다. 저자 등은 전보^{11,12)}에서 고용량으로 연속투여시 탈감작에 의해 성선분비호르몬의 분비가 저하되는 점을 이용하여 전립선암이나 유방암 등과 같은 호르몬의존성 질환의 치료에 사용되고 있는 deca-peptide의 일종인 LHRH 및 (D-Ala⁶)LHRH를 토끼의 직장, 비강 및 질점막근질액과 배양하여 이들의 안정성을 평가하였고, 아울러 효소분해 억제제로서 중쇄지방산염, EDTA 및 sodium tauro 24,25 dihydro-fusidate(STDHF) 등이 유효함을 보고한 바 있다. 또한 *in vitro*에서 투과촉진효과가 나타났던 EDTA와 효소분해 억제효과가 우수한 것으로 나타났던 sodium laurate, EDTA 또는 STDHF를 첨가하여 LHRH/(D-Ala⁶)LHRH 용액을 질점막으로 투여시 배란유도효과가 현저히 증가되었음을 보고한 바 있다.¹³⁾

한편 생체막점착성 약물송달시스템은 제형을 특정부위에 국소화시킴으로써 약물의 생체이용률을 증가시킬 수 있다는 장점이 있다. 즉 투과촉진제 또는 단백분해 효소 저해제를 첨가하여 제조한 제제를 특정부위에 국소화시킴으로써 조직의 투과성을 증가시키거나 펩타이드나 단백질의 분해효소를 억제시킴으로써 생체이용률을 증가시킬 수 있으며 또한 이 제제는 투여부위에 오랫동안 머물게 되므로 1일 1회 투여가 가능하다. 질점막을 통한 생체막 점착성 제형에 대한 연구로 Machida 등¹⁴⁾은 점막 점착성 기제로써 cellulose와 Carbopol을 이용하여 bleomycin의 원반(disk) 모양 제형을 개발하였다. 이 제형으로부터 bleomycin의 방출은 점막점착제의 함량과 관계가 있었다. 또한 막대(stick) 모양 제형을 제조하여 질경관으로 투여시 제형이 일정한 모양을 유지하며 팽윤이 일어나 약물이 방출됨을 보고하였다. Nagai 등¹⁵⁾은 Carbopol 934와 hydroxypropyl cellulose를 여러 비율로 혼합하여 제조한 동결건조 분말을 사용하여 인슐린의 비강투여 제형에 대해 연구하였는데 일단 비강으로 투여된 분말은 점액에 의해 팽윤되고 점막 표면에 부착한다고 하였다. Morimoto 등도 polyacrylic acid gel이 인슐린과 calcitonin 유사체의 직장흡수를 촉진시킴을 보고하였으며^{16,17)} 수용성 polyacrylic acid gel에 의한 polypeptide의 점막 흡수증진 기전으로 킬레이트화능과 수분유입 증가가 관여하는 것으로 밝혔다.¹⁸⁾ 저자 등^{19,20)}은 현재 제어방출 기제로 많이 사용되고 있는 Eudispert hv하이드로겔이 Eudragit L 또는 Eudragit S 하이드로겔에 비해 *in vitro*에서 ketoprofen의



Scheme I—Chemical structure of eudispert hv



Scheme II—Chemical structure of polycarbophil

방출을 지연시키는 것으로 보고한 바 있으며, cephalixin함유 Polycarbophil 또는 Carbomer마이크로캡셀을 제조하여 흰쥐에 경구투여시 생체막점착성이 보다 큰 것으로 나타난 Polycarbophil마이크로캡셀이 증가된 AUC를 나타냄을 보고하였다. Eudispert hv는 methacrylic acid와 methacrylic methyl ester로 구성된 공중합체로 anionic특성을 가지고 있으며, 유리 카르복실기와 에스테르의 비가 2:1 이고 (Scheme I), Polycarbophil은 polyacrylic acid와 divinyl glycol (3,4-dihydroxy-1,5-hexadiene)이 느슨하게 교차결합된 합성 폴리머이다(Scheme II). 이들 폴리머들은 pH의존형으로 분자내 카르복실기를 가지고 있어서 알칼리성에서 그 이온화도가 증가하여 하이드로겔의 팽윤성이 증가된다.¹⁸⁾ 팽윤성은 교차결합밀도 및 이온장력의 영향을 받으며 교차결합밀도가 증가할수록 또 이온장력이 클수록 팽윤성은 감소한다. 또한 폴리머의 함량에 따라 점막점착성이 다른 하이드로겔의 제조가 가능하며 이에 따라 약물방출 조절이 가능하다. 생체막 점착성에 대한 평가시 산성, 중성 및 염기성 폴리머 중 음이온의 폴리머가 가장 큰 생체막점착성을 나타내며, 특히 카르복실산 폴리머가 생체막점착성이 우수한 것으로 보고되고 있다.²⁰⁾

본 연구에서는 상기 결과를 토대로 전보에서 검토한 수종의 흡수촉진제를 첨가하여 LHRH 또는 (D-Ala⁶)LHRH를 함유한 Eudispert hv 및 Polycarbophil 하이드로겔을 제조하고, 이를 흰쥐의 질점막으로 투여했을 때 배란유도효과를 평가하여 이들 폴리머 하이드로겔의 약물송달시스템으로서의 유용성을 검토하였다.

실험방법

시약 및 재료

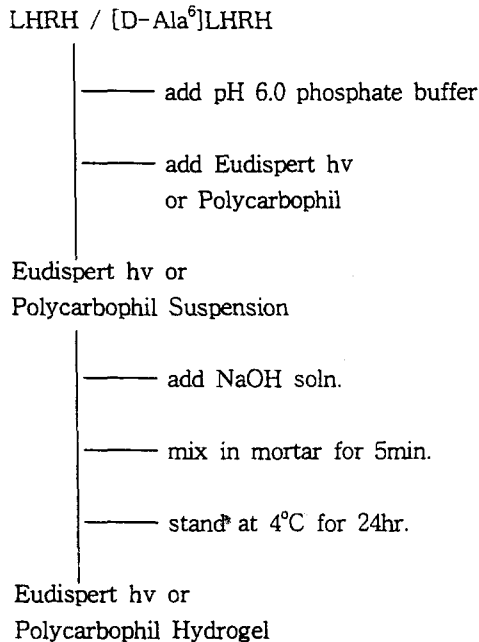
LHRH, [D-Ala⁶]LHRH, STDHF, EDTA는 Sigma Chemical Co.의 것을 사용하였고 sodium laurate는 Tokyo Chemical Industries Co.의 것을 사용하였으며 Eudispert hv 및 Polycarbophil은 각각 Röhm Pharm 및 Goodrich Chemical Co.의 것을 사용하였다.

실험동물

실험동물로는 Sprague-Dawley계 흰쥐(암컷, 생후 120~150일, 체중 200~240 g)를 제일상사(경기도, 안성)로부터 구입하여 사용하였다.

Eudispert hv 및 Polycarbophil 하이드로겔의 제조

Eudispert hv 하이드로겔은 LHRH 또는 [D-Ala⁶]LHRH 용액에 일정량의 Eudispert hv(5%)를 가하고 폴리머 1 g당 2N NaOH 5mEq를 가하여 혼화하여 제조하였으며, 4°C에서 1일 방치하여 겔내에서 약물의 평형이 이루어지도록 하였다. Polycarbophil 하이드로겔은 Eudispert hv 하이드로겔과 마찬가지로 제조되되 Polycarbophil이 2.5%가 되도록 하고 폴리머 1 g 당 2N NaOH 10mEq를 가하여 제조하였다 (Scheme III).



Scheme III—Preparation of Eudispert hv and Polycarbophil hydrogel

Eudispert hv 또는 Polycarbophil 하이드로겔의 질점막 투여시 배란유도효과 시험

매일 아침 9時 이전에 면봉으로 흰쥐의 질분비물을 채취하여 slide glass에 묻힌 다음 광학 현미경 (Microscope, Philip Harris LTD.)으로 질분비물을 관찰하여 성주기를 판별하였다. 이때 흰쥐는 4일 성주기가 규칙적으로 나타나는 것을 2회 이상 확인한 후 실험에 사용하였다. 성주기는 Okada 등²²⁾의 방법에 따라 3가지 주요 cell type 즉 백혈구, 상피세포 및 각화된 상피세포의 모양으로 흰쥐의 성주기를 판별하였다. 배란유도효과 측정은 발정정지기에 LHRH 또는 [D-Ala⁶]LHRH를 질(腔)로 투여(14:30 時)한 후 다음날 09:00-11:00時 사이에 흰쥐를 치사시킨 후 난관을 적출하여 두장의 slide glass사이에 압착하여 평평하게 한 후 광학 현미경으로 난관내의 난을 검사하였다. 배란유도의 판정은 난관 팽대부위내 과립세포에 둘러싸인 난이 1개 이상 존재하는 경우를 반응 양성으로 하였으며 Litchfield & Wilcoxon의 Pharmacological Calculation System을 이용하여 ED₅₀를 계산하였다.¹³⁾

Eudispert hv 또는 Polycarbophil 하이드로겔의 질점막 투여시 수종의 흡수촉진제가 배란유도효과에 미치는 영향

LHRH 또는 [D-Ala⁶]LHRH를 함유한 Polycarbophil 또는 Eudispert hv 하이드로겔을 질점막으로 투여시 배란유도효과는 앞서와 같은 방법으로 측정하였으며, 흡수촉진제로써 EDTA(2%), STDHF(1%) 또는 sodium laurate(0.5%)를 첨가하여 제조한 하이드로겔 제제 투여시의 배란유도 효과도 측정하였다.

결과 및 고찰

LHRH 함유 하이드로겔의 질점막 투여시 배란유도 용량반응(ED₅₀)

Eudispert hv 하이드로겔로 LHRH를 흰쥐의 질점막으로 투여시 ED₅₀는 46.57 nmole로 배란유도효과는 용액투여시(ED₅₀: 67.10 nmole)²³⁾와 유의한 차이를 나타내지 않았으며 (Table I), Polycarbophil 하이드로겔로 투여시 ED₅₀는 20.67 nmole로 용액투여시에 비해 3.3배 증가된 배란유도효과를 나타내었다 (Table II). 따라서 이러한 하이드로겔은 LHRH를 용액으로 투여하는 것보다 생체이용률을 증가시키는 것으로 추정되었다. Eudispert hv 하이드로겔과 polycarbophil 하이드로겔 제제간의 효능 차이는 이들의

Table I—Dose-response Relationship in the Induction of Ovulation of LHRH by Vaginal Administration of Eudispert hv Hydrogel(5.0%) in the Diestrus Rat

LHRH (nmole/rat)	Stages of estrous cycle	No. of rats ovulating /No. of rats examined	No. of ova in ovulating rats (Mean ± S.E)
30.0	Diestrus	0/4(0.0%)	0.00±0.00
40.0	"	2/4(50.0%)	1.50±0.87
50.0	"	2/4(50.0%)	2.75±1.60
60.0	"	3/4(75.0%)	5.25±1.80
ED ₅₀ =46.57(34.99~61.99)nmole/rat		Rat : 200~240 g	

* LHRH was Administered at 14:30 on the Day of Diestrus.

Table II—Dose-response Relationship in the Induction of Ovulation of LHRH by Vaginal Administration of Polycarbophil Hydrogel(2.5%) in the Diestrus Rat

LHRH (nmole/rat)	Stages of estrous cycle	No. of rats ovulating /No. of rats examined	No. of ova in ovulating rats (Mean ± S.E)
10.0	Diestrus	0/4(0.0%)	0.00±0.00
20.0	"	2/4(50.0%)	1.50±0.96
30.0	"	3/4(75.0%)	2.00±0.71
40.0	"	4/4(100.0%)	4.25±0.48
ED ₅₀ =20.67(13.91~30.71)nmole/rat		Rat : 200~240 g	

* LHRH was Administered at 14:30 on the Day of Diestrus.

Table III—Dose-response Relationship in the Induction of Ovulation of (D-Ala⁶)LHRH by Vaginal Administration of Eudispert hv Hydrogel(5.0%) in the Diestrus Rat

(D-Ala ⁶)LHRH (nmole/rat)	Stages of estrous cycle	No. of rats ovulating /No. of rats examined	No. of ova in ovulating rats (Mean ± S.E)
20.0	Diestrus	1/4(25.0%)	0.75±0.75
30.0	"	1/4(25.0%)	1.25±1.25
40.0	"	3/4(75.0%)	4.00±1.41
50.0	"	4/4(100.0%)	6.50±1.32
ED ₅₀ =3.04(2.05~4.51)nmole/rat		Rat : 200~240 g	

* (D-Ala⁶)LHRH was Administered at 14:30 on the Day of Diestrus.

점막부착성의 차이 또는 킬레이트화에 따른 하이드로젤내로의 수분유입능력의 차이에 기인한 것으로 생각된다. 즉 점막부착성이 더 큰 Polycarbophil 하이드로젤이 투여부위에 LHRH를 보다 효과적으로 국소화시키고, 또한 하이드로젤의 망목상 구조속에 LHRH를 트랩시켜 효소에 의한 공격을 적게 받기 때문으로 생각된다. 또한 고분자 구조내의 카르복실기가 점막의 Ca²⁺와 킬레이트를 형성함에 따라 세포내 수분유입이 증가되고 이에 따라 LHRH의 세포의 경로로의 투과가 용이해지는 것도 흡수촉진 기전의 하나로 작용하는 것으로 생각된다.

[D-Ala⁶]LHRH 함유 하이드로젤의 질점막 투여시 배란유도 용량반응(ED₅₀)

Table III, IV는 Eudispert hv와 Polycarbophil 하이드로젤로 [D-Ala⁶]LHRH를 질점막으로 투여했

을 때의 배란유도효과를 나타낸 것으로 ED₅₀은 각각 3.04 및 1.95 nmole로 용액투여시¹³⁾에 비해 1.4 및 2.2배 증가된 배란유도효과를 나타내었다. 이와같은 결과는 LHRH의 경우와 같은 양상을 나타낸 것으로 Eudispert hv 하이드로젤의 경우 배란유도효과는 용액투여시와 유의한 차이를 나타내지 않았으며, Polycarbophil 하이드로젤로 투여시 증가된 배란유도효과를 나타내었다. 한편 Table I, III와 Table II, IV에 있어서 ED₅₀의 차이, 즉 LHRH에 비해 [D-Ala⁶]LHRH의 효능이 10~15배 큰 것으로 나타난 이유는 LHRH와 [D-Ala⁶]LHRH의 활성 차이에 기인한 것으로 생각된다.

LHRH 함유 하이드로젤의 질점막 투여시 수중 흡수촉진제 첨가에 따른 배란유도 용량반응(ED₅₀)

Table V는 각종 흡수촉진제를 첨가하여 제조한

Table IV—Dose-response Relationship in the Induction of Ovulation of (D-Ala⁶)LHRH by Vaginal Administration of Polycarbophil Hydrogel(2.5%) in the Diestrus Rat

(D-Ala ⁶)LHRH (nmole/rat)	Stages of estrous cycle	No. of rats ovulating /No. of rats examined	No. of ova in ovulating rats (Mean ± S.E)
10.0	Diestrus	1/4(25.0%)	0.50±0.50
20.0	"	1/4(25.0%)	0.75±0.75
30.0	"	3/4(75.0%)	4.25±1.75
40.0	"	4/4(100.0%)	5.50±1.19
ED ₅₀ =1.95(1.04~3.68)nmole/rat		Rat : 200~240 g	

* (D-Ala⁶)LHRH was Administered at 14:30 on the Day of Diestrus.

Table V—Ovulation Inducing Activity of LHRH after Vaginal Administration of Eudispert hv Hydrogel(5.0%) with Additives to Diestrus Rats

Additives	Dose of LHRH, nmole/rat										ED ₅₀ ^{a)} , nmole/rat	Relative potency
	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0	25.0	30.0	40.0	50.0	60.0		
None	-	-	-	-	-	-	0/4 ^{b)}	2/4	2/4	3/4	46.57(34.99~61.99)	1.0
EDTA (2%)	0/4	-	2/4	-	3/4	4/4	-	-	-	-	15.62(11.90~20.51)	3.0
STDHF(1%)	-	1/4	2/4	3/4	4/4	-	-	-	-	-	14.66(12.53~17.16)	3.2
sod. laurate(0.5%)	1/4	-	2/4	-	3/4	4/4	-	-	-	-	13.95(10.14~19.18)	3.3

^{a)}Fiducial limits (95%)

^{b)}Number of Rats with Induced Ovulation per Number Rats Examined.

*LHRH was Administered at 14:30 on the Day of Diestrus.

Table VI—Ovulation Inducing Activity of LHRH after Vaginal Administration of Polycarbophil Hydrogel(2.5%) with Additives to Diestrus Rats

Additives	Dose of LHRH, nmole/rat								ED ₅₀ ^{a)} , nmole/rat	Relative potency
	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	20.0	30.0	40.0		
None	-	-	-	0/4 ^{b)}	-	2/4	3/4	4/4	20.67(13.91~30.71)	1.0
EDTA (2%)	-	1/4	2/4	2/4	3/4	-	-	-	8.27(4.9~13.97)	2.5
STDHF(1%)	0/4	1/4	2/4	3/4	-	-	-	-	7.29(5.10~10.41)	2.8
sod. laurate(0.5%)	-	1/4	2/4	3/4	-	-	-	-	6.97(5.07~9.59)	3.0

^{a)}Fiducial limits (95%)

^{b)}Number of Rats with Induced Ovulation per Number Rats Examined.

*LHRH was Administered at 14:30 on the Day of Diestrus.

Eudispert hv 하이드로겔로 LHRH를 흰쥐의 질점막으로 투여했을 때의 배란유도효과를 측정 한 결과로 EDTA(2%), STDHF(1%) 또는 Sodium laurate (0.5%) 첨가시 ED₅₀는 15.62, 14.66 및 13.95 nmole로 분해억제제를 가하지 않은 대조군과 비교해 볼 때 3.0~3.3배 증가된 배란유도효과를 나타내었다. 이와같은 결과는 EDTA, STDHF 및 Sodium laurate의 점막균질액 중에서 (D-Ala⁶)LHRH의 분해억제력 크기¹²⁾와 일정한 상관관계를 나타낸 것으로, 분해억제 효과가 가장 컸던 Sodium laurate첨가시 배란유도효과가 가장 컸으며 특히 Sodium laurate(0.5%)의 경우 피하주사에 필적할 만한 효과를 나타내었다.

Table VI은 Polycarbophil 하이드로겔에 수종의 흡

수축진제를 첨가하여 LHRH를 흰쥐의 질점막으로 투여했을 때 배란유도효과를 측정 한 결과로 EDTA(2%)를 첨가시 ED₅₀는 8.27 nmole로 대조군과 비교해 볼 때 2.5배 증가된 배란유도효과를 나타내었으며, STDHF(1%) 또는 Sodium laurate(0.5%) 첨가시 ED₅₀는 7.29 및 6.97 nmole로 대조군에 비해 각각 2.8배 및 3.0배 증가된 배란유도효과를 나타내었다.

이상의 결과로부터 배란유도효과는 Sodium laurate(0.5%)를 첨가했을 때 가장 큰 것으로 나타났으며, Eudispert hv 하이드로겔에 비해 Polycarbophil 하이드로겔로 투여했을 때 배란유도효과가 1.9~2.0배 높은 것으로 나타났다. 따라서 이러한 사실은 Sodium laurate (0.5%) 함유 polycarbophil 하이드로겔

Table VII—Ovulation Inducing Activity of (D-Ala⁶)LHRH after Vaginal Administration of Eudispert hv Hydrogel(5.0%) with Additives to Diestrus Rats

Additives	Dose of (D-Ala ⁶)LHRH, nmole/rat								ED ₅₀ ^{a)} , nmole/rat	Relative potency
	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	5.0		
None	-	-	1/4 ^{b)}	-	1/4	-	3/4	4/4	3.04(2.05~4.51)	1.0
EDTA (2%)	-	-	-	1/4	3/4	3/4	4/4	-	2.81(2.32~3.40)	1.1
STDHF(1%)	1/4	2/4	3/4	4/4	-	-	-	-	1.39(1.01~1.92)	2.2
sod. laurate(0.5%)	2/4	2/4	3/4	4/4	-	-	-	-	1.18(0.71~1.94)	2.6

^{a)}Fiducial limits (95%)

^{b)}Number of Rats with Induced Ovulation per Number Rats Examined.

*LHRH was Administered at 14:30 on the Day of Diestrus.

Table VIII—Ovulation Inducing Activity of (D-Ala⁶)LHRH after Vaginal Administration of Polycarbophil hv Hydrogel(2.5%) with Additives to Diestrus Rats

Additives	Dose of (D-Ala ⁶)LHRH, nmole/rat								ED ₅₀ ^{a)} , nmole/rat	Relative potency
	0.25	0.50	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0		
None	-	-	1/4 ^{b)}	-	1/4	-	3/4	4/4	1.95(1.04~3.68)	1.0
EDTA (2%)	-	-	1/4	1/4	3/4	4/4	-	-	1.52(1.02~2.26)	1.3
STDHF(1%)	-	1/4	2/4	3/4	4/4	-	-	-	0.85(0.51~1.42)	2.3
sod. laurate(0.5%)	1/4	2/4	2/4	3/4	-	-	-	-	0.66(0.25~0.88)	3.0

^{a)}Fiducial limits (95%)

^{b)}Number of Rats with Induced Ovulation per Number Rats Examined.

*LHRH was Administered at 14:30 on the Day of Diestrus.

이 질점막 투여제로써 보다 효과적임을 입증하는 결과라고 할 수 있다.

[D-Ala⁶]LHRH 함유 하이드로겔의 질점막 투여시 수중 흡수촉진제 첨가에 따른 배란유도 용량반응 (ED₅₀)

(D-Ala⁶)LHRH 함유 Eudispert hv 하이드로겔에 각종 흡수촉진제를 첨가하여 질점막으로 투여했을 때 이들의 배란유도효과에 미치는 영향은 Table VII에 나타내었다. EDTA(2%)를 첨가한 경우 ED₅₀는 2.81 nmole로 그 효능은 대조군의 1.1배로 나타나 배란유도 효과는 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이와 같은 결과는 용액투여시와 마찬가지로 EDTA가 [D-Ala⁶]LHRH의 주 분해효소인 endopeptidase 24.11(EP 24.11) 23)을 억제하지 못하기 때문으로 생각된다. 또한 STDHF(1%) 또는 Sodium laurate(0.5%) 첨가시의 ED₅₀는 각각 1.39 및 1.18 nmole로 배란유도효과는 대조군에 비해 각각 2.2 및 2.6배 향상된 결과를 나타내었다. 따라서 이와같은 배란유도 증진효과는 STDHF 및 sodium laurate가 endopeptidase 24.15 (EP 24.15)²²⁾ 및 EP 24.11을 억제하여 잔존하는 [D-Ala⁶]LHRH량의 증가에 따라 흡수가 증가되었기 때문인 것으로 생각된다.

[D-Ala⁶]LHRH 함유 Polycarbophil 하이드로겔에 각종 흡수촉진제의 첨가에 따른 배란유도효과는

Table VIII에 나타내었다. EDTA(2%)를 첨가했을 때 ED₅₀는 1.52 nmole로 대조군과 비교시 그 효능은 1.3배로 나타나 유의한 차이를 나타내지 않았다. STDHF (1%) 또는 Sodium laurate(0.5%) 첨가시의 ED₅₀는 0.85 및 0.66 nmole로 배란유도효과는 대조군에 비해 각각 2.3 및 3.0배 향상된 결과를 나타내었다.

Figure 1은 EDTA(2%), STDHF(1%) 또는 sodium laurate(0.5%)를 첨가하여 용액, Eudispert hv 하이드로겔 또는 Polycarbophil 하이드로겔로 LHRH/[D-Ala⁶]LHRH를 흰쥐의 질점막으로 투여했을 때의 배란유도효능을 피히주사시의 결과와 비교하여 상대적으로 나타낸 것이다. 점막균질액에서 효소적 분해에 더 민감한 LHRH가 [D-Ala⁶]LHRH에 비해 분해억제제 첨가로 상대적 효능이 증가되었다(절대적 효능은 [D-Ala⁶]LHRH가 큼). 또한 LHRH의 주분해효소인 EP 24.15억제력의 차이에 비례하여, 즉 EDTA < STDHF < sodium laurate 순으로 배란유도효능이 증가되었으며, 점막부착력의 차이, 즉 용액 < Eudispert hv 하이드로겔 < Polycarbophil 하이드로겔 순으로 배란유도효능이 증가되었다.

이상의 연구결과를 종합하면 EDTA(2%), STDHF (1%) 또는 sodium laurate(0.5%)를 첨가한 용액상태 또는 Eudispert hv 하이드로겔로 흰쥐의 질점막으로

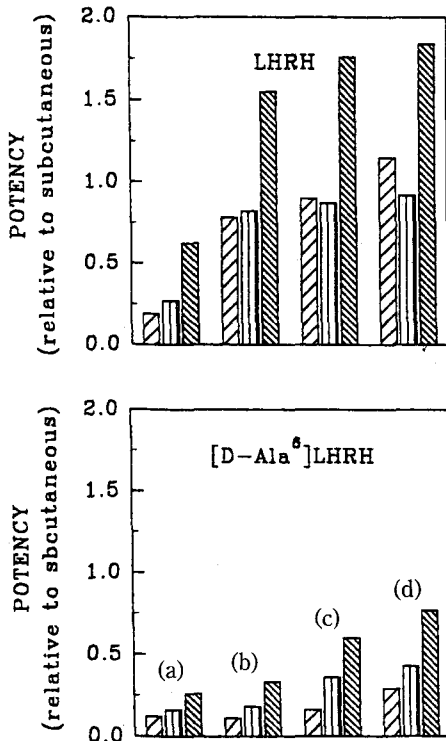


Figure 1—The Potency(Relative to Subcutaneous) after Vaginal Administration of solution, Eudispert hv, Polycarbophil Hydrogel Containing LHRH/[D-Ala⁶]LHRH with Absorption Enhancers. Key : (a): control, (b): EDTA, (c): STDHF, (d): sod. laurate solution, ■: Eudispert hv, ▨: Polycarbophil

투여했을 때 이들 양자간에 LHRH의 배란유도효과는 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 Eudispert hv 하이드로겔이 LHRH의 흡수에 지장을 주지 않는 안전한 송달시스템으로서의 가능성을 제시해주는 결과이다. 한편 polycarbophil 하이드로겔로 투여했을 때는 용액으로 투여했을 때에 비해 오히려 1.6~2.0배 증가된 배란유도효과를 나타내어 Eudispert hv 하이드로겔보다 Polycarbophil 하이드로겔이 효과적인 것으로 나타났다.

결 론

1. Eudispert hv 하이드로겔로 LHRH 또는 [D-Ala⁶]LHRH를 흰쥐의 질점막으로 투여했을 때 배란유도효과는 용액투여시와 유의한 차이를 나타내지 않았으며, polycarbophil 하이드로겔로 투여시 용액 투여시에 비해 각각 3.2 및 2.2배 증가된 배란유도효과를

나타내었다.

2. Eudispert hv 및 polycarbophil 하이드로겔에 효소분해 억제제로서 EDTA(2%), STDHF(1%) 또는 sodium laurate(0.5%)를 첨가하여 LHRH를 흰쥐의 질점막으로 투여했을 때 대조군(효소분해억제제를 가지 않은 Eudispert hv 또는 Polycarbophil 하이드로겔)에 비해 2.5~3.0배 증가된 배란유도효과를 나타냈다.

3. Eudispert hv 및 polycarbophil 하이드로겔에 효소분해 억제제로서 EDTA(2%)를 첨가했을 때 [D-Ala⁶]LHRH의 배란유도효과는 대조군에 비해 큰 차이를 보이지 않았으나, STDHF(1%) 또는 Sodium laurate(0.5%) 첨가했을 때 2.2~3.0배 증가된 배란유도효과를 나타내었다.

4. LHRH 및 [D-Ala⁶]LHRH의 흡수증진 기전으로는 EDTA, STDHF 또는 Sodium laurate의 LHRH 분해효소에 대한 억제효과 및 polycarbophil에 대해 보고되고 있는 Ca²⁺에 대한 킬레이트화에 따른 용매건인 효과 등이 상승적으로 작용하여 흡수를 촉진했기 때문으로 생각된다.

5. 1~3의 결과로부터 Sodium laurate(0.5%)를 첨가한 polycarbophil 하이드로겔은 LHRH 및 [D-Ala⁶]LHRH의 질점막 송달시스템으로써 유용할 것으로 생각된다.

문 헌

- 1) H. Okada, I. Yamazaki, Y. Ogawa, S. Hirai, T. Yashiki and H. Mima, 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).
- 2) H. Okada, I. Yamazaki, T. Yashiki and H. Mima, Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone releasing hormone analog (leuprolide) in rats II: Mechanism of absorption enhancement with organic acids, *J. Pharm. Sci.*, **72**(1), 75-78 (1983).
- 3) ST. Anik, G. McRae, C. Nerenberg, A. Worden, J. Foreman, JY. Hwang, S. Kushinsky, RE. Jones, B. Vickery, Nasal absorption of nafarelin acetate, the decapeptide [D-Na(2)6] LHRH, in rhesus monkeys. *I*, *J. Pharm. Sci.*, **73**(5), 684-685 (1984).
- 4) G.S. Gordon, A.C. Moses, R.D. Silver, J.S. Flier and M.C. Carey, Nasal absorption of insulin: enhancement by hydrophobic bile sal-

- ts, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**(21), 7419-7423 (1985).
- 5) T. Murakami, Y. Sasaki, R. Yamajo and N. Yata, Effect of bile salts on the rectal absorption of sodium ampicillin in rats, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**(5), 1948-1955 (1984).
 - 6) T. Nishihata, H. Tomida., G. Frederick, J.H. Rytting and T. Higuchi, Comparison of the effects of sodium salicylate, disodium ethylenediaminetetraacetic acid and polyoxyethylene-23-lauryl ether as adjuvants for the rectal absorption of sodium cefoxitin, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**(3), 159-163 (1985).
 - 7) S. Yamashita, S. Saitoh, H. Nakanishi, M. Masada, T. Nadai and T. Kimura, 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).
 - 8) K. Sakai, T.M. Kutsuna, T. Nishino, Y. Fujihara and N. Yata, 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).
 - 9) S. Hirai, T. Yashiki and H. Mima, Mechanisms for the enhancement of the nasal absorption of insulin by surfactants, *Int. J. Pharm.*, **9**, 173-184 (1981).
 - 10) R.E. Stratford and V.H.L. Lee, Aminopeptidase activity in homogenates of various absorptive mucosae in the albino rabbit: implications in peptide delivery, *Int. J. Pharm.*, **30**, 73-82 (1986).
 - 11) J.S. Park and K. Han, 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).
 - 12) J.S. Park, Y.B. Chung and K. Han, 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, *Yakhak Hoeji*, **38**(2), 202-210 (1994).
 - 13) K. Han, N.J. Jeong, J.S. Park, H.B. Park, Y. B. Chung and D.C. Moon, 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, *Yakhak Hoeji*, **38**(4), 440-450 (1994).
 - 14) Y. Machida, H. Masuda, N. Fujiyama, S. Ito, M. Iwata and T. Nagai, Preparation and phase II clinical examination of topical dosage form for treatment of Carcinoma Coli containing bleomycin with hydroxypropyl cellulose, *Chem Pharm Bull.*, **27**, 93-100 (1979).
 - 15) K. Morimoto, H. Akatsuchi, R. Aikawa, M. Morishita and K. Morisaka, Enhanced rectal absorption of [Asu¹]-eel calcitonin in rats using polyacrylic acid aqueous gel base, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1366-1368 (1984).
 - 16) K. Morimoto, I Hama, Y. Nakamoto, T. Takeeda, E. Hirano and K. Morisaka, Pharmaceutical studies of polyacrylic acid aqueous gel base, Absorption of insulin from polyacrylic acid aqueous gel bases following rectal administration in alloxan diabetic rats and rabbits, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **3**, 24-32 (1980).
 - 17) K. Morimoto, T. Iwamoto and K. Morisaka, Possible mechanisms for the enhancement of rectal absorption of hydrophilic drugs and polypeptides by aqueous polyacrylic acid gel, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **10**, 85-91 (1987).
 - 18) J.H. Kou, G.L. Amidon and P. Lee, pH-dependent swelling and solute diffusion characteristics of poly (hydroxyethylmethacrylate-co-methacrylic acid) hydrogels, *Pharm. Res.*, **5**, 592-597 (1988).
 - 19) K. Han, J.S. Park, N.S. Kim, Y.B. Chung and C.H. Cha, Controlled release properties of ketoprofen from methacrylate polymer gels, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **21**(1), 1-10 (1991).
 - 20) K. Han, J.H. Kim, Y.B. Chung and U.K. Jee, Evaluation of bioavailability of bioadhesive microcapsules containing cephalixin, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **24**(3), 177-186 (1994).
 - 21) H. Park, H.S. Chung and J.R. Robinson, Recent advances in drug delivery system, 163-183 (1984).
 - 22) V.H.L. Lee, Peptide and Protein Drug Delivery, Marcel Dekker, New York, pp633-661 (1991).
 - 23) K. Han, J.S. Park, Y.B. Chung, M.J. Lee, D. C. Moon and J.R. Robinson, Identification of enzymatic degradation products of luteinizing hormone-releasing hormone(LHRH)/[D-Ala⁶]LHRH in rabbit mucosal homogenates, *Pharm. Res.*, **12**(10), 1539-1544(1995).