

혈청 테스토스테론 농도 측정에 의한 로렐린 데포 주사제의 약효 비교 시험

이혜주^{1,2} · 황성미^{1,2} · 심원식^{1,2} · 정구영³ · 손경철⁴ · 김대덕¹ · 정석재¹ · 심창구^{1,2*}

1서울대학교 약학대학, 2국가지정연구실 및 종합약학연구소, 3동국제약 연구소, 4동국제약 마케팅부
(2008년 12월 17일 접수 · 2009년 1월 5일 수정 · 2009년 1월 19일 승인)

Efficacy Evaluation of a Leuprorelin Formulation (Lorelin Depot Injection[®]) by Determination of Serum Testosterone in Rats

Hye-Ju Lee^{1,2}, Seong-mee Hwang^{1,2}, Won-Sik Shim^{1,2}, Goo-Young Jung³, Kyung-Chul Son⁴,
Dae-Duk Kim¹, Suk-Jae Chung¹ and Chang-Koo Shim^{1,2*}

¹Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

²National Research Laboratory for Transporters Targeted Drug Design & Research Institute of Pharmaceutical Sciences,
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

³Research Dept, Dongkook Pharm. Co., LTD., Jincheon 365-834, Korea

⁴Marketing Dept, Dongkook Pharm. Co., LTD., Seoul 135-502, Korea

(Received December 17, 2008 · Revised January 5, 2009 · Accepted January 19, 2009)

ABSTRACT – The purpose of this study was to compare the efficacy of Lorelin Depot Injection[®] (Dongkook Pharm. Co., LTD) with Lucrin Depot Injection[®] (Abbott) by measuring serum testosterone level in rats. Leuprorelin (leuprolide acetate), which is an active compound for the two formulations, is an LHRH analogue that is used for the treatment of a wide range of sex hormone-related disorders including advanced prostatic cancer, endometriosis and precocious puberty. Lorelin Depot Injection[®] is a micro-encapsulated formulation to suppress testosterone level by releasing leuprorelin continuously for four weeks with a single subcutaneous injection. The comparison study of the efficacy was performed during four weeks, and serum testosterone levels were monitored in the two formulations. The mean serum testosterone levels from the formulations were decreased to that of the castrate range (50 ng/dL or less) after three days after the initial depot injection, and the concentration were remained throughout four weeks' period. There were no significant differences in the AUC_{0-3day} of testosterone and testosterone levels at 3, 7, 14, 21 and 28 days between the two formulations. These results indicate that the two formulations, Lorelin Depot Injection[®] and Lucrin Depot Injection[®], are bioequivalent in terms of the serum testosterone level in rats.

Key words – leuprorelin acetate, Lorelin depot[®], Lucrin Depot[®], testosterone level, prostatic cancer

류프로렐린(Leuprorelin, leuprolide acetate)은 황체형성호르몬유리호르몬(luteinizing hormone releasing hormone, LH-RH)의 합성 유도체로,¹⁾ 뇌하수체에서 LH-RH 효능약(agonist)으로 작용하여 생식샘자극호르몬(gonadotropin releasing hormone, GnRH) 수용체를 자극함으로써 황체형성호르몬/난포자극호르몬(luteinizing hormone/follicle-stimulating hormone, LH/FSH)의 방출을 촉진한다. LH/FSH가 방출되면 테스토스테론, 에스트로겐, 프로게스테론과 같은 성호르몬의 분비가 촉진된다. 그러므로 류프로렐린을 장기간 투여하면 이들 성호르몬의 혈중 농도가 일시적으로 높아지

게 되고, 이는 음성 되먹임(negative feedback) 및 뇌하수체의 GnRH 수용체의 하향 조절(down-regulation)을 유도하여 결과적으로 성호르몬의 혈중 농도가 낮아지게 된다.²⁾ 따라서 류프로렐린은 전립선암,³⁻⁵⁾ 유방암⁶⁻⁷⁾과 같은 성호르몬 의존적인 질환의 치료에 사용되고 있다. 특히 전립선암의 경우 20년 전에 비해 사망자 수가 12.7배나 증가하였고, 유병률 역시 점차 증가하는 추세이므로 (7.9명/십만 명)⁸⁾ 류프로렐린과 같은 치료제의 필요성이 점차 커지고 있다.

류프로렐린은 9개의 펩티드로 구성되어 있으며 물에 매우 잘 녹는다. 이 약물은 경구 투여 시 위장관에서 거의 흡수되지 않고, 정맥 또는 피하 투여 시 반감기는 16분으로 매우 짧아 체외로 빠르게 배설된다.⁹⁾ 또한 류프로렐린은 간헐적인 투여보다 혈중 농도를 지속적으로 유지하는 것이 더 높

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)880-7873, E-mail : shimck@snu.ac.kr

은 치료효과를 나타낸다는 보고가 있다.¹⁰⁾ 혈중 농도를 유지시켜 주는 서방출성제제는 환자의 복약순응도 또한 증진시킬 수 있기 때문에,¹¹⁻¹³⁾ 생분해성 폴리머를 이용한 서방출 미립구형 데포(sustained release microsphere-type depot) 제제들이 개발되어 실제 임상에서 응용되고 있다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 대표적인 서방출성 제제로는 생분해성 폴리머인 PLGA와 PLA가 사용된 루크린데포 주사(Lucrin Depot Injection[®], 한국 애보트, 서울)가 있으며,¹⁷⁾ 동국제약에서도 이와 유사한 제제인 로렐린데포 주사(Lorelin Depot Injection[®], 동국제약, 서울)를 개발하였다. 그러나 현재까지 이 두 제제의 약효 비교 연구는 수행되지 않았으므로, 본 연구에서는 현재 시판되고 있는 류프로렐린 주사제인 로렐린데포 및 루크린데포를 흰 쥐(rat)에 단 회 투여한 뒤 테스토스테론 성호르몬의 혈중 농도추이를 28일간 관찰함으로써 성호르몬 억제 효과를 비교, 평가하였다.

실험 방법

시약 및 기기

한 바이알 당 3.75 mg의 류프로렐린을 함유하고 있는 로렐린데포 주사(Lorelin Depot Injection[®], 동국제약, 서울)를 시험약으로 하고, 루크린데포 주사(Lucrin Depot Injection[®], 한국 애보트, 서울)를 대조약으로 선정하였다. 유발 시험(challenge test)에 사용한 류프로렐린 표준품은 동국제약에서 제공하였으며, 실험동물로는 200~250 g의 수컷 Sprague-Dawley 랫트(오리엔트 바이오(주), 성남, 경기도)를 사용하였다. 혈청 중 테스토스테론 농도는 테스토스테론 EIA 키트(DSL 10-3731, Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX)를 사용하여 분석하였다. 기기로는 Syringe HT (BIO-TEK, Winooski, VT), SH 30 orbital shaker (FINE PCR, 서울)와 원심분리기 (Centrifuge 5415R, Eppendorf Research[®], Hamburg, Germany)를 사용하였다.

약물 투여 및 혈액 채취

18마리의 SD 쥐를 각 군당 6마리씩 나누고 비투여대조군은 생리식염수(중외제약, 서울)를, 루크린데포(애보트, 투여대조군)군과 로렐린데포(동국제약, 실험군)군은 각각의 시험제제를 100 µg/kg/day의 용량으로 피하 주사하였다. 이 후 정해진 채혈 시간(0, 3, 6 시간, 1, 3, 7, 14, 21, 28일)에 쥐의 꼬리정맥으로부터 약 400 µL씩의 혈액을 취하였다.¹⁸⁾ 또한 약물 투여 후 28일째까지 류프로렐린의 방출이 지속되고 있는지를 확인하기 위하여 28일째 되는 날 채혈 후 류프로렐린 표준품을 생리식염수에 용해하여 100 µg/kg/mL로 투

여하였다(유발 시험). 이후 3, 6, 9시간에 흰 쥐의 꼬리정맥으로부터 약 400 µL의 혈액을 취했다. 채혈된 혈액은 13,000 rpm에서 3분간 원심분리(Centrifuge 5415R, Eppendorf Research[®], Hamburg, Germany) 한 후, 200 µL의 혈청을 취하여 분석 시까지 -20°C의 냉동고에 보관하였다.

혈청 중 테스토스테론 분석방법

혈청 중의 테스토스테론의 농도는 테스토스테론 EIA 키트(Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX)를 사용하여 효소 면역분석법(enzyme immunoassay, EIA)으로 정량하였다. 테스토스테론 EIA 키트 플레이트의 각 웰(well) 표면은 항체(goat anti-rabbit IgG)로 처리되어 있다. 이 항체에 표지되지 않은 항원(혈청중의 테스토스테론)과 효소가 표지된 항원(테스토스테론 항혈청)이 서로 경쟁적으로 결합하므로 이 분석법에서의 흡광도는 혈청 속의 테스토스테론 농도에 반비례하게 된다.¹⁹⁾

표준품 및 혈청 시료들을 50 µL씩 피펫으로 취해 웰에 넣은 후 이에 효소 결합 용액 100 µL (enzyme conjugate concentrate:conjugate diluents=1:50) 및 테스토스테론 항혈청 100 µL를 넣은 뒤 1시간 동안 실온에서 진탕(orbital microplate shaker) 하였다(500~700 rpm). 이후 세척 용액(wash solution)으로 각 웰을 5번씩 세척한 뒤 흡착지에 플레이트를 뒤집어서 건조시켰다. 각 웰에 TMB chromogen 용액 100 µL를 첨가하여 30분 동안 실온에서 같은 진탕기를 사용하여 500~700 rpm으로 흔들어 주었다. 각 웰에 반응정지 용액(0.2 M sulfuric acid)을 100 µL 씩 넣은 후에 Syringe HT (BIO-TEK, Winooski, VT)를 이용하여 450 nm에서 각 웰의 흡광도를 측정하였다(n=6, 이중 측정). 본 실험 방법의 정량한계는 20 pg/mL이며 정밀도는 10% 이하, 정확도는 90~110%였다.

결과 처리

0일에서 3일까지의 혈중농도곡선하면적(AUC_{0-3days})은 사다리꼴 방법(trapezoidal method)을 사용하여 계산하였으며, 모든 결과는 평균±표준 편차(SD)로 표기하였다. 서로 다른 두 군간의 비교는 student's t-test, 세 군간의 비교는 일원분산분석법(one-way ANOVA)을 사용하였다.

결 과

로렐린데포 주사(동국제약, 실험군)와 루크린데포 주사(애보트, 투여대조군)의 테스토스테론 혈중 농도에 대한 영향을 비교 평가하기 위하여, 생리식염수(비투여 대조군) 및 각각

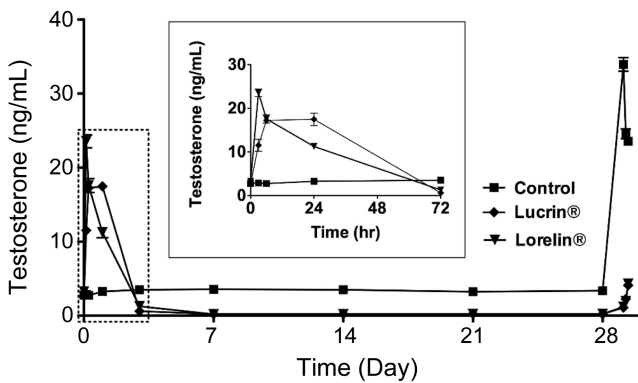


Figure 1—Serum level of testosterone in rats after Lucrin® and Lorelin® depot s.c. injection.(n=6 for each group)

의 시험제제를 흰 쥐에 투여 후 구한 테스토스테론의 농도를 Figure 1에 표시하였다. 시험 제제를 투여하기 전(0시간)의 테스토스테론 농도는 세 군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다($P>0.05$). 이후 정해진 시간에 채혈한 비투여 대조군의 테스토스테론의 평균 농도는 3.25 ± 0.37 ng/mL로 0시간과 유의적인 차이($P>0.05$)를 보이지 않았다. 류프로렐린을 투여한 두 군은 모든 시간에서 비투여 대조군과는 유의적인 테스토스테론 농도 차이가 나타났다($P<0.001$).

Figure 1의 삽입 그림은 약물 투여 후 72시간 동안의 테스토스테론 농도 변화를 나타낸 것으로, 로렐린데포 주사와 루크린데포 주사의 경우는 약물 투여 후 6시간까지 테스토스테론의 농도가 상승하였다. 류프로렐린을 투여한 두 군은 1일째까지 비투여 대조군에 비해 높은 테스토스테론 농도를 유지하였으나, 사흘 후부터는 비투여 대조군에 비해 테스토스테론 농도가 낮아졌다. 투여 후 3시간 및 1일째에 로렐린데포 주사와 루크린데포 주사를 투여한 두 군간의 테스토스

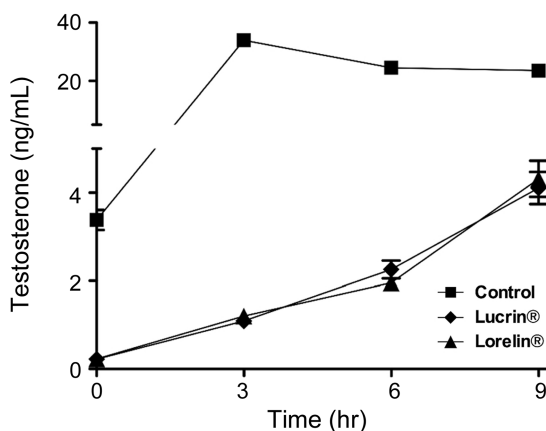


Figure 2—Serum level of testosterone in rats after challenge study. (n=6 for each group)

테론 농도는 유의적인 차이가 있었으나($P<0.001$), 나머지 정해진 채혈 시간에 채혈을 하였을 때는 두 군간의 유의적인 차이는 없었다($P>0.05$).

류프로렐린 표준품을 과량 투여한 유발 시험의 경우, 3, 6, 9 시간 후 비투여 대조군은 투여 전 보다 10배 높은 테스토스테론 농도 상승을, 로렐린데포 주사와 루크린데포 주사는 약 5배 정도의 농도 상승이 나타났다(Figure 2). 유발 시험 후에 로렐린데포 주사와 루크린데포 주사를 각각 비투여 대조군과 비교해 보았을 때 테스토스테론 농도는 유의적인 차이를 보였으며($P<0.001$), 로렐린데포 주사와 루크린데포 주사 군 사이에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($P>0.05$).

고 찰

본 실험에서는 현재 시판되고 있는 류프로렐린 주사제인 로렐린데포 주사(동국제약)와 루크린데포 주사(에보트)를 흰 쥐에 투여하여 테스토스테론의 혈중 농도 추이를 28일간 관찰함으로써 성호르몬 억제 효과를 비교, 평가하였다.

투여 후 3일까지는 루크린데포 주사와 로렐린데포 주사를 투여한 군이 비투여 대조군에 비해 혈중 테스토스테론 농도가 높았는데, 이는 류프로렐린이 LH-RH의 합성 유도체로서 LH-RH에 대한 초효능제(super-agonist)이기 때문이라 여겨진다.²⁰ 그러나 3일 이후의 테스토스테론 농도는 루크린데포 및 로렐린데포 주사군 모두에서 비투여 대조군에 비해 낮았는데, 이는 류프로렐린 약물이 계속 방출되면서 GnRH 수용체가 하향 조절되어 테스토스테론의 음성 되먹임(negative feedback)현상이 나타나게 되고 이로 인해 테스토스테론의 농도가 낮아지는 현상이라 여겨진다. 약물 투여 후 3일간의 테스토스테론 농도 변화를 나타낸 Figure 1을 보면, 로렐린데포 주사와 루크린데포 주사 군은 3시간, 1일째의 농도 차이가 나며 비교적 완만한 농도 변화 양상을 나타내지만, 0~3일 동안의 AUC_{0-3 days}를 비교해 보면 로렐린데포와 루크린데포의 경우 두 군간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다(각각 661.73 ± 57.51 ng·hr/mL 대 784.19 ± 128.37 ng·hr/mL, $P>0.05$). 약물 투여 3일 이후에는 로렐린데포 및 루크린데포 투여군 모두 비투여 대조군에 비해 테스토스테론 농도가 낮았으며, 두 군간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다($P<0.05$).

약물 투여 후 28일이 지난 후에 28일 동안 류프로렐린의 방출이 지속되고 있는지 확인하기 위해 류프로렐린을 과량 투여하는 유발 시험을 수행하였다. 만약 28일 이전에 류프로렐린이 소진된다면, GnRH 수용체의 하향 조절 상태가 방

해 받게 되므로 테스토스테론 농도가 높아질 것이다.²²⁾ 유발 실험 결과 테스토스테론의 혈중 농도는 투여 전에 비해 비 투여 대조군에서는 10배, 로렐린데포와 루크린데포 주사는 약 5배 증가하였다. 이를 통하여 로렐린데포 주사와 루크린 데포 주사에서는 28일 동안 류프로렐린 방출이 지속되고 있었음을 확인할 수 있었다.

루크린데포 주사(Lucrin Depot Injection[®], 한국 에보트, 서울)와 로렐린데포 주사(Lorelin Depot Injection[®], 동국제약, 서울)는 모두 PLGA와 PLA를 사용한 류프로렐린 서방출형 제제이다. 그러나 루크린데포 주사는 용출 속도가 모두 동일한 단일 미립구로 구성되어 있으나 로렐린데포 주사는 용출 속도가 서로 다른 다공성/비다공성 미립구 형태의 제제임에도 불구하고,^{17,23)} 로렐린데포 주사의 약물 투여 후 혈중 테스토스테론 농도는 루크린데포 주사와 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 결론적으로 로렐린데포 주사는 방출 특성 차이에 관계없이 루크린데포 주사와 생물학적으로 동등한 약효(테스토스테론 성호르몬 억제 효과)를 나타내는 것으로 판단되었다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단의 국가지정연구실사업 (No. ROA-2006-000-10290-0) 및 BK21사업(서울대학교 응용생명약학사업단) 및 서울대학교 종합약학연구소의 학술연구비 사업의 지원을 받았으며, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

참고문헌

- 1) M. Fujino, T. Fukuda, S. Shinagawa, S. Kobayashi, I. Yamazaki, R. Nakayama, J.H. Seely, W.F. White and R.H. Rippel, Synthetic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) substituted in position 6 and 10, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 406-413 (1974).
- 2) H. Toguchi, Y. Ogawa, H. Okada and M. Yamamoto, Once-a-month injectable microcapsules of leuprorelin acetate (Japanese), *Yakugaku Zasshi*, **111**, 397-409 (1991).
- 3) T.W. Redding and A.V. Schally, Inhibition of prostate tumor 6 growth in two rat models by chronic administration of D-Trp analogue of luteinizing hormone-releasing hormone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6509-6512 (1981).
- 4) N. Faure, F. Labrie, A. Lemay, A. Belanger, Y. Gourdeau, B. Laroche and G. Robert, Inhibition of serum androgen levels by chronic intranasal and subcutaneous administration of a potent luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) agonist in adult men, *Fertil. Steril.*, **37**, 416-424 (1982).
- 5) The Leuprolide Study Group, Leuprolide versus diethylstilbestrol for metastatic prostate cancer, *N. Engl. J. Med.*, **311**, 1281-1286 (1984).
- 6) E.S. Johnson, J.H. Seely, W.F. White and E.R. DeSombre, Endocrine-dependent rat mammary tumor regression: use of a gonadotropin releasing hormone analog, *Science*, **194**, 329-330 (1976).
- 7) E.R. DeSombre, E.S. Johnson and W.F. White, Regression of rat mammary tumors effected by a gonadoliberein analog, *Cancer Res.*, **36**, 3830-3833 (1976).
- 8) S.K. Park, L.C. Sakoda, D. Kang, A.P. Chokkalingam, E. Lee, H.R. Shin, Y.O. Ahn, M.H. Shin, C.W. Lee, D.H. Lee, A. Blair, S.S. Devesa and A.W. Hsing, Rising prostate cancer rates in South Korea, *The Prostate*, **66**, 1285-1291 (2006).
- 9) Y.W. Chien, Systemic delivery of peptide-based pharmaceuticals, in: J. Swarbrick (Ed.), *Drugs and the Pharmaceutical Sciences 50, Novel Drug Delivery Systems*, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, pp. 631-745 (1992).
- 10) H. Okada, I. Yamazaki, Y. Sakura, T. Yashiki, T. Shimamoto and H. Mima, Desensitization of gonadotropin-releasing response following vaginal consecutive administration of leuprolide in rats, *J. Pharm. Dyn.*, **6**, 512-522 (1983).
- 11) H. Okada, Y. Doken, Y. Ogawa and H. Toguchi, Preparation of three month depot injectable microspheres of leuprorelin acetate using biodegradable polymers, *Pharm. Res.*, **11**, 1143-1147 (1994).
- 12) R.H. Asch, F.J. Rojas, A. Bartke, A.V. Schally, T.R. Tice, H.G.Klemcke, T.M. Silerkhodr, R.E. Bray and M.P. Hogan, Prolonged suppression of plasma LH levels in male rats after a single injection of an LHRH agonist in poly (dl-lactide-co-glycolide) microcapsules, *J. Androl.*, **6**, 83-88 (1985).
- 13) K.J. Walker, A.O. Turkes, A. Turkes, R. Zwink, C. Beacock, A. Buck, W.B. Peeling and K. Griffiths, Treatment of patients with advanced cancer of prostate using a slow-release (depot) formulation of the LHRH agonist ICI 118630 (Zoladex[®]), *J. Endocrinol.*, **103**, R1-R4 (1984).
- 14) H. Okada, Y. Ogawa and T. Yashiki, Prolonged release microcapsule and its production. US Patent, 4,652,441, 1987 (Jpn. Patent Appl. 207760/1983, November 4, 1983).
- 15) M. Yamamoto, S. Takada and Y. Ogawa, Method for producing microcapsule, *Jpn. Patent Appl.* 22978, February 7 (1985).
- 16) Y. Ogawa, M. Yamamoto, H. Okada, Y. Yashiki and T. Shimamoto, A new technique to efficiently entrap leuprolide acetate into microcapsules of polylactic acid or copoly(lactic/glycolic) acid, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1095-1103 (1988).
- 17) H. Okada, T. Heya, Y. Ogawa, H. Toguchi and T. Shimamoto, Sustained pharmacological activities in rats following single and repeated administration of once-a-month injectable microspheres of leuprolide acetate, *Pharm. Res.*, **8**, 584-587 (1991).
- 18) H. Okada, Y. Inoue, T. Heya, H. Ueno, Y. Ogawa and H. Toguchi, Pharmacokinetics of once-a-month injectable microspheres of leuprolide acetate, *Pharm. Res.*, **8**, 787-791

- (1991).
- 19) T.G. Shrivastav, A. Basu and K.P. Kariya, One step enzyme linked immunosorbent assay for direct estimation of serum testosterone, *J. Immunoassay Immunochem.*, **24**, 205-217 (2003).
- 20) A.S. Pathak, J.S. Pacificar, C.E. Shapiro and S.G. Williams, Determining dosing intervals for luteinizing hormone releasing hormone agonists based on serum testosterone levels: a prospective study, *J. Urol.*, **177**, 2132-2135 (2007).
- 21) P. Periti, T. Mazzei and E. Mini, Clinical pharmacokinetics of depot leuprorelin, *Clin. Pharmacokin.*, **41**, 485-504 (2002).
- 22) H.B. Ravivarapua, K. Burtonb and P.P. DeLuca, Polymer and microsphere blending to alter the release of a peptide from PLGA microspheres, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **50**, 263-270 (2000).