

상피세포성장인자의 수용성 외용제제화

이유철 · 박은석 · 지상철[†]

성균관대학교 약학대학

(1995년 6월 9일 접수)

Formulation of Water-soluble Topical Preparations of Epidermal Growth Factor

Yoo-Cheol Lee, Eun-Seok Park and Sang-Cheol Chi[†]

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon, Kyunggi-Do, 440-746

(Received June 9, 1995)

In order to formulate an aqueous topical preparation of epidermal growth factor(EGF) for the treatment of open wound and burn, the stability of EGF in aqueous vehicles containing various stabilizers was evaluated and the pharmacological activity of gel preparations formulated with poloxamer 407 was determined with wound model. Various additives, which are known as potent stabilizers for proteins and polypeptides so far, were used to increase the stability of EGF in aqueous vehicles. The contents of EGF in the vehicles containing stabilizers were determined with an HPLC method after the storage at 37°C. EGF was more stable in ultrapure water than RO water or saline. All the additives studied resulted in deleterious effects on EGF stability. Therefore, it was speculated that any additives or impurities in the vehicle made EGF unstable. However, nitrogen purge of solution increased the stability of EGF in aqueous vehicles. The aqueous topical preparations of EGF were formulated with poloxamer 407 as a gel base in saline. Gelatin or amastatin was employed as a protease inhibitor. The pharmacological effect of EGF gel was studied with open wound model in mice. EGF preparations, made of oleaginous base or poloxamer gel base, showed significant healing effect compared to the control group($p<0.05$). The addition of protease inhibitor in poloxamer 407 gel resulted in significant healing effect compared to the gel without it($p<0.05$). Body weights of mice treated with EGF preparation were increased at the first day after the formation of open wound, while those of the control group were decreased. The EGF gel made of poloxamer 407 containing a protease inhibitor would be a promising aqueous topical preparation for EGF.

Keywords—Epidermal Growth Factor, Topical preparations, Stability, Wound healing

상피세포 성장인자(Epidermal Growth Factor, 이하 EGF)는 다양한 상피조직 세포의 강력한 세포성장 촉진 인자로서 53개의 아미노산으로 이루어진 단일 사슬 폴리펩타이드로 3개의 이황 결합을 가지고 있으며 분자량은 6045 Da이다.^{1,2)} 사람의 체액 중에 널리 분포하며 특히 뇨, 초유, 모유, 정액 등에 고농도로 존재하며 중요한 생물학적 효과를 나타내는 것으로 알려져 왔는데 대표적인 것은 상피나 각막에서의 세포의 분열과 분화를 촉진시키며 위산의 분비를 억제시키는 작용이다.

일반적으로 창상이 일어나게 되면 곧이어 이에 따른

염증이 일어나게 되며 매크로파지 등 염증 치유에 관계하는 각종 세포가 염증 주위로 이동하게 된다. 이때 매크로파지가 EGF를 분비하게 되며 EGF가 혈관의 신생과 상피의 분열과 분화를 촉진하게 되고 세포의막이 재생되면서 창상의 치유가 완결된다.

본 연구에서는 위와 같이 EGF의 창상 치유 효과를 이용하여 외용 제제를 설계하는데 목적을 두었다. EGF는 유성기제에서는 안정성이 양호하고 약효도 탁월한 것으로 알려져 있다. 그러나, 유성기제는 사용감이 나쁘며 물로 잘 닦여지지 않는 단점이 있다. 특히, 창상에 바를 때 점도가 높아 사용자 통증을 유발할 수

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

가 있다. EGF는 물에 잘 녹기 때문에 단순한 액제로 제제화할 수는 있으나 EGF가 수용액 중에서 매우 불안정하고 또한 EGF의 세포분열 효과는 질환부위가 EGF에 최소한 6시간동안 노출되어야 하기 때문에 단순한 액제로는 제제화가 불가능하고 질환부위에서 이 약물을 장기간에 걸쳐 방출할 수 있는 매트릭스 형태의 액상으로 제제화하여야 한다. 그러므로, 본 연구에서는 이와 같은 조건을 만족하는 수용성 기제로 겔을 제조하면서 효과와 안정성에서는 수용성 기제와 차이가 없으면서 사용감이 좋고 물로 잘 닦이는 제제를 설계하고자 하였다.

실험방법

시약

다음의 시약들은 구입 후 더 이상 정제하지 않고 그대로 사용하였다: 폴록사머 407(BASF Wyandotte Co., Germany), HPLC용 아세트니트릴(J.T. Baker Inc., U.S.A.), 카보머 940(B.F. Goodrich Co., U.S.A.). EGF는 재조합 hEGF로서 대웅제약(주)에서 제공받았으며 초순수는 실험실에서 역삼투수를 정제하고 여과하여 사용하였다. 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

EGF 시료의 제조

EGF를 초순수 또는 생리식염수에 녹여 600 µg/ml의 EGF 저장용 용액을 제조하였다. 이 용액은 냉동 보관하였으며 사용직전 냉장 상태에서 녹여서 생리식염수로 10배 희석하여 EGF 표준용액으로 사용하였다.

안정성 시험을 위한 EGF 시료는 Table I에 나타낸 바와 같이 역삼투수, 초순수, 생리식염수 등을 용제로 사용하여 제조하였으며 액중의 공기를 제거하기 위하여 질소로 purge를 한 시료도 함께 제조하였다. 겔 기제로는 폴록사머 407과 카보머 940을 사용하였으며 단백질 안정화제로 기존에 그 효과가 보고되어 있는 알부민, 소르비톨, 만니톨, 글리세린, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 에틸렌디아민테트라초산디나트륨, 리신, 아르기닌, 아스코르빈산, linoleic acid, 백당, 유당 등을 각각 첨가하여 EGF 안정화제로의 가능성을 검토하였다. 각 시료중 EGF의 농도는 60 µg/ml로 하였다. 또한 pH의 변화와 사용한 인산염 완충액의 몰농도에 따른 안정성의 변화를 살펴보기 위하여 pH를 5~8로, 몰농도를 pH 7에서 0.01~0.05 M로 변화시켜 EGF 시료를 제조하여 실험을 하였다.

Table I— Various Additives Used for Stabilization of EGF in Water

Group	Ingredient
Vehicle	RO water, Ultrapure water, Saline, Tris buffer
N ₂ Purge	Ultrapure water, Saline
Gel Base	Poloxamer 407(20), Carbomer 940(10)
Protein Stabilizer	Albumin(2), Sorbitol(10), Mannitol(10), Glycerin(10), Sodium CMC(1), EDTA(1), Lysine(1), Arginine(1), Ascorbic acid(5), Linoleic acid(10), Sucrose(20), Lactose(20)

(): W/V%

EGF의 정량

시료중 EGF의 농도는 다음의 HPLC 방법을 이용하여 정량하였다. 즉, 구배펌프(Hitachi, Model L-6200), 수동주입기(Rheodyne, Model 7125), UV 검출기(Hitachi, Model L-4000), 적분계(Hitachi, Model D-2500)로 구성된 HPLC 시스템을 사용하였다. 그 분석 조건으로 칼럼은 Cosmosil C₁₈ AR-300 (4.6×150 mm, 5 µm particle size, Nacalai Tesque)을 사용하였으며 이동상은 아세트니트릴: pH 6.5 0.01 M 인산일수소나트륨(10:90)으로 구성된 용액 A와 아세트니트릴: pH 6.5 0.01 M 인산일수소나트륨(30:70)으로 구성된 용액 B를 다음의 구배조건으로 사용하였다. 즉, 용액 A와 용액 B의 비율을 93:7로 5분간 유지시킨 후 5분에서 30분까지는 용액 B의 함량을 조금씩 증가시켜서 30분에 용액 A와 용액 B의 비율이 58:42가 되게 하였다. 그후, 용액 B의 함량을 조금씩 감소시켜서 35분에 용액 B의 함량이 7%가 되게 하였으며 45분까지 이 조건을 계속 유지시켜서 이동상의 평형상태를 유지하게 하였다. 이동상의 유속은 1.2 ml/min이었다. UV 검출파장은 275 nm, 감도는 0.02 AUFS이었다. 시료는 이동상으로 10배 희석한 후 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과하고 vortex mixer로 진탕 혼합한 후 20 µl를 칼럼에 주입하였다.

이와 같은 분석 방법에 따라 얻어진 대표적인 크로마토그램을 Fig. 1에 표시하였으며 EGF의 retention time은 약 18분이었다.

안정성 시험

EGF의 시험기제중 안정성을 평가하기 위해 시료를 37°C에서 1주 또는 2주간 보관한 후 상기의

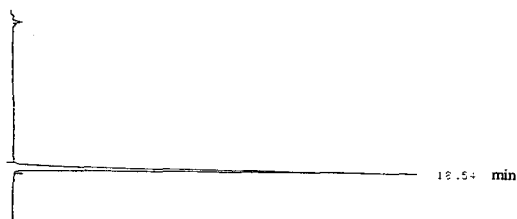


Figure 1—A representative chromatogram of EGF.

HPLC 방법으로 정량하였다. EGF는 냉장 상태에서 안정하므로 냉장에서 보관한 시료를 대조군으로 사용하였다.

EGF 외용제제의 제조

EGF 외용기제로 유성기제로 된 제제와 수용성 겔 기제로 된 제제를 제조하여 이들 제제를 가지고 EGF의 창상치유 효과를 평가하였다. 유성 기제의 EGF 제제는 백색바셀린과 정제 라놀린을 80:20의 비율로 혼합한 후 약 50~60°C를 유지시켜 주어 균질한 액상으로 만들었다. 이 액상 혼합물을 냉각시키되 완전히 굳기 전에 EGF 저장용 용액을 가하여 최종농도 60 µg/ml의 EGF 외용제제를 만들었다.

수용성 겔 기제의 EGF 제제는 Table II의 처방에 따라 폴록사머 407을 생리식염수에 첨가한 후 잘 교반하고 냉장 보관하여 투명하고 균질한 용액이 되면 효소 저해제, EGF 저장용 용액의 순으로 가하여 실온에서 보관하여 겔을 형성시켰다. 제조된 EGF 외용제제는 분해를 방지하기 위해서 냉장 보관하였으며 사용 직전에 실온에서 겔을 형성시켜 사용하였다.

창상 치료 실험

무게 30~35 g의 웅성 마우스를 공급받아서 1주일 이상 적응시킨 후 11~14마리씩 5군으로 분류하였다. 실험중 물과 먹이는 무제한으로 공급하였다.

에텔을 사용하여 마우스를 마취시킨 후 등부위의 털을 전기 제모기(Daito Electric Co., Japan)로 제거하였다. 소독용 에탄올로 수술할 부위를 잘 닦아주고 직경 10 mm의 원을 그린 후, 수술용 가위와 겹자를 사용하여 등피를 제거하였다. 이 창상부위에 상기와 같이 제조된 유성 기제와 수용성 겔 기제의 EGF 제제를 매일 12시간 간격으로 2차례씩 약 300 mg씩 처치해 주었다. 처치 전에 상처의 감염을 막기 위해서 소독용 에탄올로 창상 부위를 소독해 주었으며 매일 한번씩 창상의 치유효과를 알아보기 위해서 calipers

Table II—Formulation Variables in the Preparation of EGF Gel

Ingredients	Formulation		
	A	B	C
EGF	0.006*	0.006	0.006
Poloxamer 407	20	20	20
Amastatin		0.01	
Gelatin			0.5
Saline	q. s to 100	q. s to 100	q. s to 100

*W/V%

(Mitutoyo Corporation, Japan)로 창상의 장경(LD)과 단경(SD)을 측정하여 다음과 같은 공식으로 창상의 면적(A)를 계산하였다.

$$A = \frac{\pi \times LD \times SD}{4}$$

실험군에 대하여 각각의 EGF 제제가 50%의 치료율을 나타내는 기간(HT₅₀)을 각 제제에 있어 제제 투여기간 대 창상 치료율의 플롯으로부터 직선회귀법을 이용하여 구하였다.

창상 치료 실험중 체중 변화

체중의 감소와 체액 조성의 불균형은 창상의 형성 후 생기는 쇼크의 대표적인 특징이다. 처치해 주는 기제의 조성에 의해서 그 쇼크가 어떻게 영향받는지 알아보기 위해서 EGF 제제투여 1일째의 체중을 측정 한 후 최초의 체중과 비교하여 퍼센트로 체중의 증감을 비교하였다.

통계처리

Student의 t-test를 이용하여 대조군에 대하여 시험 기제가 창상 치유 능력 및 마우스의 체중 변화 등에서 유의성 있는 차이를 나타내는지 비교하였다.

결과 및 고찰

안정화제와 pH에 의한 EGF의 안정화

일반적으로 단백질은 아미노산의 펩타이드 결합으로 이루어진 2차, 3차, 4차 구조에다 multiple functional 기들을 가지고 있어서 통상의 유기화합물에 비해서 물리화학적 안정성이 매우 나쁘기 때문에 제제중에 안정화제의 사용이 필수적이다. EGF는 methionine oxidation, asparagine deamidation, aspartyl succinimide의 형성으로 분해되며 각 분해 경로의 정도는 수용액의 pH와 보관조건에 좌우된다고 알려져

있다.³⁾ 즉, succinimide는 pH<6에서, deamidation은 pH>6에서 잘 일어나며 산화는 보관 온도에 반비례하여 일어난다고 보고되어 있다. 본 연구에서는 이와 같이 기존에 알려진 EGF의 분해기전과 일반적으로 사용되는 단백질의 안정화제 등을 토대로 안정한 EGF 외용제제를 설계하고자 여러 가지 안정화제를 첨가하여 그 효과를 측정하였다. 용제로는 역삼투수, 초순수, 생리식염수, tris 완충액을 사용하였으며 초순수, 생리식염수에는 질소로 purge한 것과 하지 않은 것으로 구분하였다. 수용성 겔로 제제화하기 위한 겔 기재로서 폴록사머 407과 카보머 940, 단백질과 이미노산으로서 혈장 알부민, 리신, 아르기닌 등을 사용하였다.

당으로는 백당, 유당 등을, 다가알코올로는 소르비톨, 만니톨, 글리세린 등을 사용하였으며 제제내에 들어간 산소의 영향으로 인한 산화를 방지하기 위하여 항산화제인 아스코르빈산을 가하였다. 그 결과는 Fig. 2 및 Fig. 3과 같다.

역삼투수를 용제로 사용하고 안정화제를 첨가하지 않은 시료는 37°C에서 2주간 보관시 EGF가 약 14%만이 분해되지 않고 잔존하여 안정성이 매우 좋지 않았다. 그러나, 초순수를 용제로 사용하고 안정화제를 첨가하지 않은 시료에서는 37°C에서 2주간 보관시 약 51%가 분해되지 않고 잔존해 있었다. 이로부터 용제의 불순물을 제거할수록 수용액중 EGF의 안정성을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 시료내의 공기를 제거하기 위해 질소로 purge하였을 경우에는 안정성이 더욱 향상되어 37°C에서 2주간 보관시 약 64%가 분해되지 않고 잔존해 있었다. 용제로 생리식염수를 사용하였을 경우에도 비슷한 결과가 나타났으며 질소로 purge하여 준 시료가 더욱 높은 안정성을 나타내었다.

pH의 영향에 관한 결과는 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 0.02 M의 농도로 pH 5~8사이에서 1주간 보관시에 약 60~70% 정도 잔존해 있었으며 2주간 보관시에는 약 40~50% 정도 잔존해 있었다. 또한 pH 7에서 완충액의 농도를 0.01 M과 0.02 M의 두가지로 변화시킨 시료를 1주간 보관하여도 두가지 모두 약 70%, 2주간 보관시에는 약 50% 정도 잔존해 있었다. 실험 결과에서 알 수 있듯이 EGF의 안정성은 pH 5~8, 몰농도 0.01~0.05 M의 범위에서는 pH 6에서 안정성이 약간 저하되어 있으나 pH와 몰농도에 의해 거의 영향을 받지 않았다.

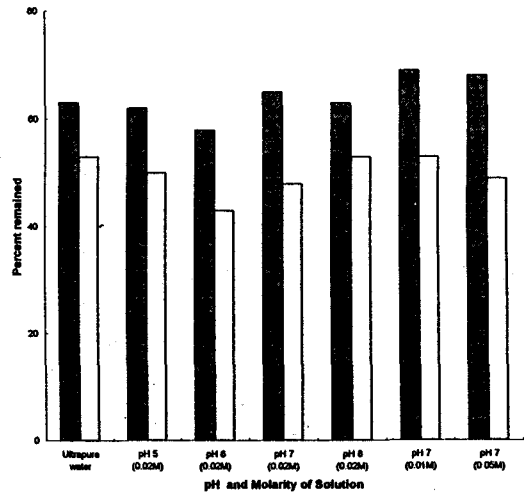


Figure 2—Effect of pH and molarity of solution additives on the stabilization of EGF in water. Key : ■: 1 week, □: 2 week

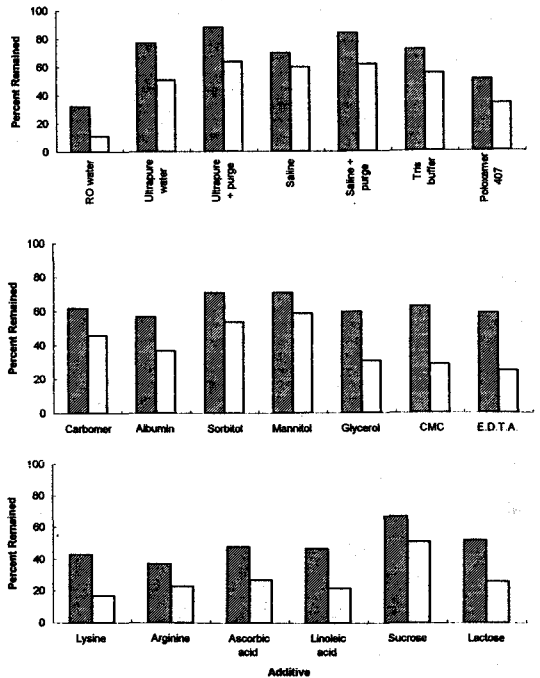


Figure 3—Effect of additives on the stabilization of EGF in aqueous system at 37°C. Key : ■: 1 week, □: 2 week

다가알코올이나 당과 같은 폴리올은 효소나 단백질 특히, 동결건조시의 안정화제로 많이 사용되고 있다. 단백질은 당으로 인해 물이 단백질 주위로 둘러싸게 된 결과 단백질내의 소수성 분자가 단백질 안에 묻히

게 되어 단백질의 3차 구조를 안정화시키거나^{4,8)} 수용액상에서 단백질에서의 수소결합의 파괴를 감소시켜서 전이 온도(transition temperature)를 증가시킴으로써 안정성을 향상시킨다고 알려져 있다.⁹⁾ 또한, 수용액중에서 글리세린, 백당 등은 선택적 수화로 인해서 단백질 구조의 안정화제로 사용되어 왔다.^{5,6)} 본 연구에서는 소르비톨, 만니톨, 글리세린, 백당, 유당 등의 폴리올을 단백질의 안정화제로 사용하였는데 37 °C에서 2주간 보관시 50~30% 정도만이 잔존한 것으로 나타난 것으로 보아 EGF의 안정화에 영향을 거의 미치지 못하였다. (Fig. 3)

단백질 약물은 그 약효가 매우 강력하여 희석된 농도로 쓰인다. 이 희석된 용액은 농축된 약물보다 불안정하며 표면 흡착현상을 일으키는 문제가 있다. 그러므로 제제내에 다른 단백질을 넣어주어서 단백질의 농도를 높이는데 이 목적으로 흔히 사용되는 것으로 혈장 알부민이 있다. 알부민은 단백질이 용기에 흡착되어 일어나는 손실을 막아주기도 하나¹⁰⁾ 단백질과 결합할 수도 있으므로 주의해야 한다. 본 연구에서 알부민을 사용하였을 때 37 °C에서 2주간 보관시 약 37%만이 검출되고 나머지는 분해된 것으로 나타난 것으로 보아 안정화에 영향을 거의 미치지 못하였다. (Fig. 3)

기타 여러 가지 다른 기전으로 단백질의 안정성을 증가시켜 준다고 알려져 있는 리신과 아르기닌 같은 아미노산과 linoleic acid, 아스코르빈산 등도 37 °C에서 2주간 보관시 약 20~27%만이 검출되고 나머지는 분해된 것으로 나타나 EGF의 안정화에 큰 영향을 주지 못하였다. 위에 나타난 실험결과를 종합하여 본 결과 첨가하여 준 안정화제가 EGF의 안정성에 큰 영향을 주지 못하였으며 오히려 더 나쁜 안정성을 나타내었다. 그러나, 초순수를 사용했을 때 가장 안정하였으며 질소로 purge하여 주었을 때에는 더욱 안정화 효과가 증가되었다.

위와 같은 결과로 유추해 볼 때 EGF의 안정화제로 사용한 첨가제가 제제의 안정화에 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났으며 따라서 각종 첨가제는 사용하지 않는 것이 좋을 것으로 보이며 용제는 동통을 방지하기 위하여 생리식염수를 사용하며 제제내의 산소를 제거하기 위하여 질소로 purge하는 것이 수용액중 EGF의 안정성을 향상시킬 것이다.

폴록사머 겔의 제조

본 연구에서 설계하려고 하는 EGF제제는 외용제제이고 또 창상치료를 위해서 상처 위에 도포하는 것이

므로 부적절한 삼투압에 의한 동통을 방지하기 위해서 제제의 pH 조절은 중요한 인자이다. 일반적으로 널리 사용하고 있는 겔 형성제인 카보머는 약알칼리성 이상의 pH에서만 겔을 형성한다. 그러나, 카보머의 경우는 피부에 창상이 생겼을 때 적정 pH인 6.8~7.4를 유지할 수가 없어 삼투압 차이로 인한 동통이 생기기 때문에 창상 치유 목적에는 적당하지 않아 본 연구에서는 pH에 관계없이 겔을 형성할 수 있는 폴록사머 407을 겔 형성 기제로 사용하였다. 이 겔은 상처부위에서 비독성 보호작용을 할뿐만 아니라 창상 치료를 증강시키는 효과가 있다고 알려져 있다.¹¹⁾ 또한 폴록사머 407의 reverse thermal gelation의 성질은 단백질의 안정성 확보를 위해서 냉장 보관하면서 사용 직전 냉장고에서 꺼내어 액체 상태로 창상 부위에 부어줄 수 있으므로 창상의 부위를 손쉽게 완전히 도포할 수 있는 장점이 있다.

Table II에 의해 제조된 겔은 외관상 젤라틴이 함유된 것을 제외하고는 모두 투명하며 유연하였고 젤라틴이 함유된 겔은 외관이 약간 혼탁함을 보여주었으며 모든 겔은 피부에 바르면 얇고 매끄러운 막이 형성되며 쉽게 수세되었다. 냉장에서 보관한 결과 폴록사머 407을 20% 사용한 기제는 졸 상태로 바뀌었다가 다시 실온으로 보관 시에 겔이 형성되었다.

EGF 제제의 창상치료 효과

Okumura 등¹²⁾은 여러 가지 효소 저해제를 함유하는 EGF연고의 창상 치료의 효과 평가 결과 nafamostat를 사용한 EGF 제제가 gabexate나 젤라틴을 사용한 EGF 제제보다 창상 치유에 뛰어난 효과를 나타냄을 보고하였다. Kiyohara 등¹³⁾도 랫트에 화상을 일으킨 후 nafamostat를 함유하는 EGF 연고를 투여한 결과 혈장 에피네프린, 코티솔과 GOT의 증가를 억제하여 nafamostat를 첨가한 EGF 연고가 화상으로 인한 혈액의 조직순환을 개선시킨다는 것을 보고하였다. 그들은 또한 EGF에 nafamostat를 함유한 연고를 화상에 사용하였을 때 mRNA와 superoxide dismutase의 함량은 증가시킨 반면 heat shock protein 70의 함량은 감소시켜 이 제제가 창상으로 인한 쇼크의 감소, 염증의 억제, 창상의 치료 등에 영향을 미침을 보고하였으며¹⁴⁾ 창상에 nafamostat를 함유한 EGF 연고를 도포하였을 때 히드록시프로린의 함량과 파립조직의 건조무게가 증가하여 nafamostat를 첨가한 EGF 제제가 창상 초기 단계에서 창상의 치유 효과가 있다는 것을 보고하였다.¹⁵⁾

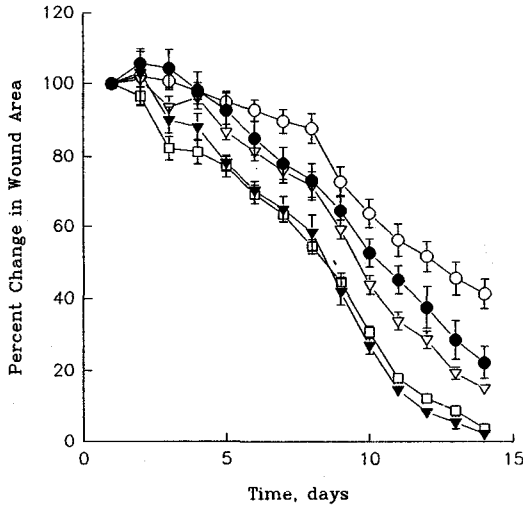


Figure 4—Healing effect of EGF preparations on open wound induced on rat dorsal skin.
Key : ○; Control, ●; Oleaginous base, ▽; Poloxamer gel alone, ▼; Poloxamer gel containing amastatin, □; Poloxamer gel containing gelatin. Results are expressed as the mean values±S.E. (n=11-14).

본 실험에서는 EGF의 창상 치유 효과를 알아보기 위해 유성 기제, 폴록사머 기제, amastatin을 첨가한 폴록사머 기제, 젤라틴을 첨가한 폴록사머 기제를 사용하여 창상 치유 효과를 대조군과 비교 측정하였으며 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4에서 알 수 있듯이 대조군에 비해 EGF 제제는 모두 창상 치유 효과를 나타내었으며 창상 치유 효과의 정도로는 amastatin을 첨가한 폴록사머 겔 제제와 젤라틴을 첨가한 폴록사머 겔 제제가 가장 좋은 효과를 나타내었으며 이 두 제제 사이에는 유의성 있는 차이가 없었다($p < 0.05$). 단백질 저해제를 첨가하지 않은 폴록사머 겔제제도 그 다음으로 창상 치유 효과가 있었으며 유성 기제가 EGF를 사용한 제제중 가장 효과가 낮았다. 특히 폴록사머 겔 제제에 EGF를 단독으로 사용한 결과보다는 EGF와 효소 저해제를 병용하여 사용한 제제가 더 좋은 창상 치유 효과를 나타내었는데 효소 저해제만을 단독으로 사용할 경우 창상 치유에 큰 효과가 없다는 결과¹³⁾로부터 EGF와 효소 저해제가 단독으로 사용할 때보다는 두 물질을 병용 투여하는 것이 상승 작용이 있음을 나타내었다. 마우스의 각 제제에 대한 HT₅₀을 계산한 결과 대조군이 13.0일인 반면 유성 기제 제제는 10.5일, 폴록사머 407 제제는 9.5일, amastatin을 첨가한 폴록사머 407 제제에서는 7.9일, 젤라틴을 첨가한 폴록사머 407 제제에서는 8.0 일로 나타나 효소 저해제를 첨가한 폴

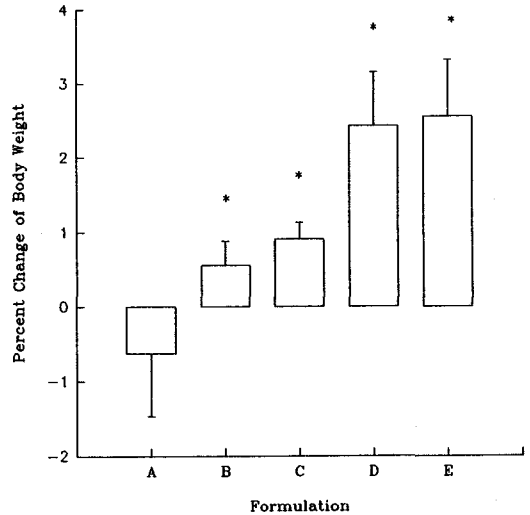


Figure 5—Effect of EGF topical preparations on percentage on body weight of mouse one day after their application on open wound.
Key : A; Control, B; Oleaginous base, C; Poloxamer gel containing amastatin, E; Poloxamer gel containing gelatin.
*Significantly different from the control group($p < 0.05$) (n=11-14).

록사머 407 제제의 HT₅₀은 대조군에 비해서 5일 이상 빠른 것으로 나타났다.

EGF 제제의 체중 변화에 대한 영향

Kiyohara 등¹³⁾은 랫트에 있어서의 창상 후 체중의 증감과 혈장 에피네프린과의 관계에 대해서 연구를 하였는데 nafamostat를 첨가한 EGF제제는 체중의 증가와 창상으로 인한 혈장 에피네프린의 증가를 억제하는 효과를 나타내었다. 이는 창상으로 인한 호르몬의 불균형을 nafamostat를 첨가한 EGF 제제가 완화시켜 체중의 증가를 나타낸 것으로 보인다. 이들은 또 랫트의 허혈성 궤양에서의 nafamostat를 첨가한 EGF 연고의 체중 증감 현상을 연구한 결과에서도 nafamostat를 첨가한 EGF 제제가 허혈성 궤양으로 인한 쇼크를 감소시켜서 대조군에 비해 유의성 있는 체중의 증가를 나타내었다고 보고하였다.¹⁵⁾

본 실험에서는 창상 1일 후 마우스의 체중과 제제를 투여한 마우스의 체중을 측정하여 처음의 체중에 대한 퍼센트로 체중의 증감을 비교하였으며 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 대조군에서는 체중감소가 일어난 반면 EGF 제제를 투여한 군에서는 체중증가가 일어났으며 amastatin이나 젤라틴과 같은 효소 억제제를 첨가한 폴록사머 제제에서는 특히 체중이 많이 증가하였

다. 이 결과는 창상 치유 실험에서의 창상 치유 효과와도 긴밀히 연결하여 볼 수 있다. 즉, 초기 체중의 변화가 창상 치유에도 큰 영향을 미쳤다는 것을 알 수 있는데 효소 억제제를 첨가한 폴록사머 제제에서는 체중이 다른 제제나 대조군에 비해 많이 증가하였는데 이 제제가 창상 치유 효과가 가장 큰 것으로 보아서 이 두 제제가 창상으로 인하여 일어나는 체중의 감소를 줄여 주는 보호작용이 있는 것으로 추측된다.

결 론

상피와 각막의 성장을 촉진시키는 효능을 가진 EGF를 이용하여 창상 치유의 목적으로 폴록사머 407을 겔기제로 사용하여 EGF의 외용제제를 제조하였으며 안정성 가속시험과 창상 치유 시험, 실험 동물의 체중증가 비교시험 등을 검토하여 다음의 결론을 얻었다.

1. EGF는 기존에 알려져 있는 여러 가지 단백질 안정화제에서 불안정함을 나타내었으며 오히려 순수한 초순수만을 용제로 사용하는 것이 더욱 안정성이 있었다.
2. EGF를 외용제제화하여 창상에 도포하였을 때 유성기제로 된 제제와 폴록사머 겔기제로 된 제제 모두 그 효과가 우수하였으나 폴록사머 겔제제가 유성기제의 제제보다 창상 치유 효과가 더 높게 나타났다. 또한 효소 저해제를 병용하였을 경우 창상 치유 효과가 더욱 우수하였다.

감사의 말씀

본 연구는 1994년도 보사부 신약개발 연구지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다. 원료를 제공해주신 (주)대웅제약 중앙연구소에도 감사드립니다.

문 헌

- 1) C.R. Jr. Savage, T. Inagami and S. Cohen, The primary structure of epidermal growth factor, *J. Biol. Chem.*, **247**, 7612-7672 (1972).
- 2) J.M. Taylor, W.M. Mitchell and S. Cohen, Epidermal growth factor. Physical and chemical properties, *J. Biol. Chem.*, **247**, 5928-5934 (1972).
- 3) R.I. Senderoff, S.C. Wootton, A.M. Boctor, T. M. Chen, A.B. Giordani, T.N. Julian and G.W. Radebaugh, Aqueous stability of human epidermal growth factor 1-48, *Pharm. Res.*, **11**, 1712-1720 (1994).
- 4) J.C. Lee and S.N. Timasheff, The stabilization of protein by sucrose, *J. Biol. Chem.*, **256**, 7193-7201 (1981).
- 5) K. Gekko and S.N. Timasheff, Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol, *Biochemistry*, **20**, 4677-4686 (1981).
- 6) T. Arakawa and S.N. Timasheff, Preferential interaction of proteins with salts in concentrated solutions, *Biochemistry*, **21**, 6545-6552 (1982).
- 7) P.L. Privalov and S.J. Gill, Stability of protein structure and hydrophobic interaction, *Advances in Protein Chemistry*, Academic Press, New York, p.191 (1988).
- 8) T.F. Busby and K.C. Ingham, Thermal stabilization of antithrombin III by sugars and sugar derivatives and the effects of nonenzymatic glycosylation, *Biochem. Biophys. Acta*, **799**, 80-86 (1984).
- 9) S.Y. Gerlisma, Reversible denaturation of ribonuclease in aqueous solutions as influenced by polyhydric alcohols and some other additives, *J. Biol. Chem.*, **243**, 957-965 (1968).
- 10) Y.J. Wang and Y. Chien, *Sterile Pharmaceutical Packaging: Compatibility and Stability*, Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia. (1984).
- 11) R.M. Nalbandian, R.L. Henry, K.W. Balko, D. V. Asams and N.R. Neuman, Pluronic F-127 gel preparation as an artificial skin in the treatment of third-degree burns in pigs, *J. Biomed. Mater. Res.*, **21**, 1135-1148 (1987).
- 12) K. Okumura, Y. Kiyohara, F. Komada, S. Iwakawa, M. Hirai and T. Fuwa, Improvement in wound healing by epidermal growth factor(EGF) ointment. I. Effect on nafamostat, gabexate or gelatin on stabilization and efficacy of EGF, *Pharm. Res.*, **7**, 1289-1293 (1990).
- 13) Y. Kiyohara, F. Komada, S. Iwakawa, T. Fuwa and K. Okumura, Systemic effects of epidermal growth factor(EGF) ointment containing protease inhibitor or gelatin in rats with burns or open wounds, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 73-76 (1993a).
- 14) Y. Kiyohara, K. Nichiguchi, F. Komada, S. Iwakawa, M. Hirai and K. Okumura, Cytoprotective effects of epidermal growth factor (EGF) ointment containing nafamostat, a

- protease inhibitor, on tissue damage at burn sites in rats, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 1146-1149(1993b).
- 15) Y. Kiyohara, F. Komada, S. Iwakawa and K. Okumura, Improvement in wound healing by epidermal growth factor(EGF) ointment: Efficacy of EGF ointment containing protease inhibitor, nafamostat, for ischemic ulcer(Decubitus) in rats, *Yakuzaigaku*, **54**, 117-121 (1994).