

상피세포 성장인자를 함유한 외용 겔 제제의 특성 및 창상 치유 효과

이정우 · 김희준 · 조성완 · 박준상 · 최영욱*

중앙대학교 약학대학

(Received April 25, 1996)

Topical Gel Formulations of Epidermal Growth Factor and Their Wound Healing Effects

Jung Woo Yi, Hee Jun Kim, Seong Wan Cho, Jun Sang Park and Young Wook Choi*

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract—Epidermal growth factor (EGF), a potential healing agent for wounds and burns, has been formulated to topical gels with the hydrophilic polymer, Carbopol 934P. Physicochemical characteristics of the aqueous gels were evaluated by rheological properties and pH changes on storage. The gels were relatively stable at 4°C and room temperature showing no changes in pH for two weeks, and revealed the rheogram of shear thinning plastic flow with the yield values in the range of 40 to 70 dyne/cm². *In vivo* healing effects of different gel formulations have been compared with water-soluble and oleaginous ointments in full-thickness wound mouse model. The gel systems resulted in better wound healing effects than the other ointments. Furthermore, liposomal Carbopol gel has been developed by the addition of EGF-containing liposomal suspension into the Carbopol gel. The enhanced wound healing effects have been observed in the liposomal gel system, compared to the other gels and conventional ointments.

Keywords □ Epidermal growth factor, Wound healing, Carbopol, Gels, Plastic flow, Ointments, Topical preparation.

강력한 mitogen으로서 상피세포는 물론 다른 세포들의 성장, 발육 및 분화에 중요한 역할을 한다고 알려진 상피세포 성장인자 (epidermal growth factor: EGF로 약함)는 1960년 Stanley Cohen¹⁾에 의해 처음으로 생쥐의 악하선에서 발견되었고 다시 1975년 사람의 뇨에서도 발견, 분리되었으며²⁾ 이로 인해 urogestrone으로 불리기도 한다. 현재는 유전자재조합 공법으로 *E. coli*를 이용하여 대량 생산이 가능하게 되어 피부용으로는 창상, 피부궤양, 화상, 피부이식부위, 수술시 절개부위등의 치료, 안과용으로는 각막손상 및 각막이식등 각막손상을 수반하는 안과 수술부위 치료용

으로 세계적으로 연구, 개발이 진행중에 있다.

EGF는 창상 및 화상등의 손상된 피부에 대하여 상피속의 여러 세포중 EGF receptor가 있는 keratinocyte의 성장을 촉진³⁾시켜 이것이 mitosis 및 migration을 일으켜 상피를 재생하는 것으로 밝혀져 있으며, Rheinwald와 Green⁴⁾이 *in vitro* 실험을 통해 EGF가 대부분의 세포를 휴지기로부터 유사분열기로 들어가게하여 상피세포의 분화를 촉진한다고 하였다. 진피에서는 EGF가 granulation tissue에서 fibroblast들의 분화를 촉진시켜 이로인해 mesenchymal cell들을 축적시키며 교원질(collagen)의 생합성을 증가시켜 치유를 빠르게 한다고 알려져 있으며⁵⁻⁷⁾ 특히, myofibroblast는 창상의 수축에 중요한 역할을 한다^{8,9)}고 이미 잘 알려져 있다.

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 02-820-5609 (팩스) 02-826-3781

현재까지 응용되어온 제형은 주로 silver sulphadiazine을 함유한 Silvadene[®] cream^{3, 10)}이나 lanolin³⁾, Aquaphor^{®11)}등에 EGF를 혼합하여 사용하였고 한편, 물이나 NaCl용액에 단순히 용해시켜 적용했을 때에는 창상치유에 유의성이 거의 없는 것으로 나타났다.¹²⁾ 또, EGF의 제제중에서의 안정성을 고려하여 protease inhibitor를 안정화제로 넣어 사용한 연고제^{13, 14)}를 비롯하여 최근 생체적합성이 우수하며 방출조절이 가능한 고분자를 이용한 제제들의 연구^{15, 16)}가 많이 보고되고 있다. 그러나, EGF는 수용액중에서 매우 불안정하며, 특히 온도의 영향을 많이 받는 것으로 알려져 있어 안정화에 대한 여러 연구^{17, 18)}들이 제제개발에 있어서 중점이 되어 진행되고 있으나, 현재까지는 적당한 안정화제를 찾지 못한 실정이다.

본 연구에서는 창상부위에서의 지속적인 약효발현 및 상처부위에의 적용시 편리성을 고려하여 점막부착성이 뛰어나며 겔 형성능력도 뛰어나 널리 사용되고 있는 카르보폴을 이용하여 안정성을 극대화할 수 있는 조건에서 외용 겔 제제의 처방을 최적화하고자 하였다. 카르보폴은 아크릴산이 polyalkenyl ether와 cross linking된 고분자로서 free acid 형태로 존재하나 적당한 염기로 중화시키면 (-)전하가 사슬을 따라 도입되어 풀어지고 팽창되면서 투명한 겔이 형성된다. pH는 6~11사이가 가장 점성이 있으며 특히 934P는 경구투여도 가능한 안전한 gelling agent로 알려져 있다.^{19, 20)}

한편 상처표면에서 EGF receptor와의 친화력을 높여 효과를 증대시킬 목적으로 생체막 모델로서 이용되고 있는 리포솜을 외용 겔 제제에 도입하였다. 즉 리포솜내에 봉입한 EGF를 카르보폴겔에 혼합하여 별도의 겔제제를 제조하였으며, 이들 각 겔제제들에 대하여 지용성기체인 바셀린을 이용한 연고 및 수용성기체인 폴리에틸렌글리콜을 이용한 연고를 대조용으로 하여 점도 및 창상모델에서의 약효를 비교평가 하였다.

실험방법

시료 및 기기

EGF (DWP401, Lot: 401PU003)는 (주)대웅제약으로부터 제공받았으며 Carbopol 934P는 Goodrich사 제품을, Methylcellulose 4000은 ShinEtsu사 제품 및 Egg Lecithin은 Fluka사 제품을 사용하였다. 기타 시약은 EP급 이상을 사용하였다. 기기로는 Hot plate stirrer (Corning PC-351, U.S.A.), pH meter (Suntex SP-701, Taiwan), Roto viscometer (Haake RV100, Germany), Rotary vacuum evaporator (Eyela, Tokyo Rikakikai Co., Japan), Vortex mixer (Thermolyne Type 37600 Mixer, U.S.A.) 등을 사용하였다.

제제 설계

지용성연고 및 수용성 연고를 대조용으로 하고, 이에 대해 본 연구에서 개발하고자하는 겔제제들을 시험용으로 하기 위해 다음과 같이 제조하였다. 이때, 겔제제는 Carbopol 934P를 이용하여 제조한 카르보폴 겔 (CarboGel로 약함)을 기본으로 하고, 여기에 liposome을 함유시켜 제조한 겔 (LipoGel로 약함)을 가지고 평가하였다.

CarboGel의 제조 - 겔 형성 고분자로 카르보폴을 먼저 상온에서 증류수에 분산시킨 후 1% NaOH용액 또는 triethanolamine으로 중화시켜 pH 6.5로 맞춘다. 중화시키는 1% NaOH 또는 triethanolamine의 양은 별도의 실험을 거쳐 결정하였다. thickening agent로서 methylcellulose 4000을 80°C에서 분산시켜 하룻밤 냉장 방치한 후 각각을 보습제로서 propylene glycol과 함께 공기가 안 들어가도록 섞는다. EGF는 pH 6.5 완충액에 녹인 후 이를 기체와 연화하였다. 각 조성은 Table I과 같다.

LipoGel의 제조 - 먼저 EGF를 함유한 liposome을

Table I - CarboGel base formulations

Materials	CarboGel A	CarboGel B	CarboGel C
Carbopol 934P	0.25	0.5	0.5
11% NaOH	7.5	16.5	-
Triethanolamine	-	-	0.52
MC 4000	0.8	-	-
Propylene glycol	16.7	16.7	16.7
Purified water, qs ad	100.0	100.0	100.0

연고자 Bangham²¹⁾의 방법에 따라 다중층의 liposome을 제조하였다. 인지질로서 상전이온도가 4°C인 lecithin (from egg yolk, ~60% phosphatidylcholine) 11.3 mg을 정밀히 달아 클로로포름에 녹이고 이를 회전감압농축기로 감압증류하여 등근 플라스크 기벽에 얇은 인지질 피막을 제조하고, 잔류하는 클로로포름을 질소가스로 완전히 제거한다. 건조된 인지질 피막을 하룻밤 incubation시킨 후, 상온에서 EGF 1 mg을 녹인 pH 6.5 완충액 5 ml를 가하고 5분간 손으로 흔들어 수화시켜 리포솜을 제조하였다. 이를 미리 제조한 CarboGel B와 혼합하여 겔을 조제하였다.

대조용 연고의 제조 - 지용성 연고기제는 바셀린에 라놀린과 파라핀을 각각 70 : 8 : 20의 비율로 섞어 용융법으로 만들었으며, 수용성 연고기제는 PEG 400과 4000을 75 : 25의 비율로 배합시켜 용융법으로 만들었다. EGF는 pH 6.5 완충액에 녹인 후 이를 기제와 혼합하였다.

겔 기제의 물리적 특성

pH - CarboGel에 한하여 상온 및 냉장보관시 기제의 시간에 따른 안정성의 지표로서 pH meter 전극을 직접 접촉시켰으며, 경시적으로 상대적 안정성을 평가하기 위해 겔 제조직후, 9일 후, 13일 후 각각의 pH 변화를 비교하였다.

점도 - Roto viscometer (Haake RV100, Germany)를 사용하였으며, sensor system으로 cup은 MV, rotor는 MV II로 하였고, 측정시간은 왕복 4분 10초동안 측정하였다. CarboGel들과 대조 연고제들간의 유동학적 특성을 비교하였고, 각 겔기제에 있어서 점도별 차이를 비교하였다.

약효평가 실험

실험동물 - 대륙실험동물에서 구입한 4주령의 생쥐를 1주일간 실험실 조건에서 순화시킨 후 사용하였고, 실험하는 동안 물과 사료를 충분히 주었으며 서로 상처를 핥아주는 것을 막기위해 1마리당 1 cage씩 격리 사용하였다.

Full-thickness wound model - Kim¹⁰⁾의 방법에 따라 창상모델을 유발하였다. 먼저 생쥐에 pentobarbital sodium을 복강주사(28 mg/kg)하여 마취한 후 등부위를 제모하고 탈모제를 도포하여 털을 완전히 제거한 후 좌우로 투여군과 대조군 2구획(직경 8 mm)

Table II - pH changes of the CarboGel bases on storage at 4°C and room temp

Time (day)	CarboGel A		CarboGel B		CarboGel C	
	4°C	RT	4°C	RT	4°C	RT
0	6.60	6.60	6.85	6.85	6.85	6.85
9	6.58	6.71	6.85	6.92	6.87	6.93
13	6.58	6.68	6.86	6.91	6.78	6.89

을 punch를 이용하여 상피 및 진피층을 제거, 근피막까지 절손창을 유발하였으며 약물처리부위를 시험동물마다 각각 다르게 좌, 우를 바꾸어 핥지 못하도록 처치하였다. 각 상처부위에 1회 투여용량을 제제 0.1 g의 용량으로 하여 하루에 4회 4시간 간격으로 약물처치를 하여 부위당 EGF 투여량을 24 g/day로 하였다.

평가방법 - 창상의 변화는 셀로판 종이를 이용하여 구분구적법에 따라 면적을 측정하고 백분율로 환산하였다. 처음 크기를 S_0 , 시간이 지남에 따라 줄어든 크기를 S_d 로 하여 창상잔존율 (X_d)를 (1)식에 따라 구하였고, 이들의 제제별 차이를 평가하기 위해 상대적 창상잔존율 (RX_d)을 (2)식에 따라 구하였다.

$$X_d(\%) = \frac{S_d}{S_0} \times 100 \quad (1)$$

$$RX_d(\%) = \frac{X_{d, \text{test}}}{X_{d, \text{control}}} \times 100 \quad (2)$$

결과 및 고찰

겔 기제의 pH - 카르보겔 겔에 있어서는 제제의 안정성과 겔형성능면에서 pH 범위가 6.5~7.5에서 가장 적합하다고 알려졌으며¹⁹⁾, EGF원료 정제시의 pH를 고려하여 본 연구에서는 모든 제제의 pH를 6.5로 하였다. 그리고 상온과 냉장보관온도에서 시간에 따른 제제의 pH 변화를 측정하였으며, 그 결과는 Table II와 같다. 저장보관 온도인 4°C에서 pH가 거의 변화되지 않았으므로 EGF의 안정성이 확보되는 저온보관시 겔 제제는 화학적으로 안정할 것으로 평가되었다. 또 장기간 저장시 pH가 좀더 큰 폭으로 변한다 할지라도, 피부적용시 자극이나 표피변형을 주지않는 pH 4~6.5 사이²²⁾에 들어갈 것으로 보여 창상에도 자극이 없을 것으로 예측되었다.

겔 및 연고 기제의 점도 - 사용한 점도계는 Cup and Bob type으로 정지상의 Cup에 Bob이 회전하면

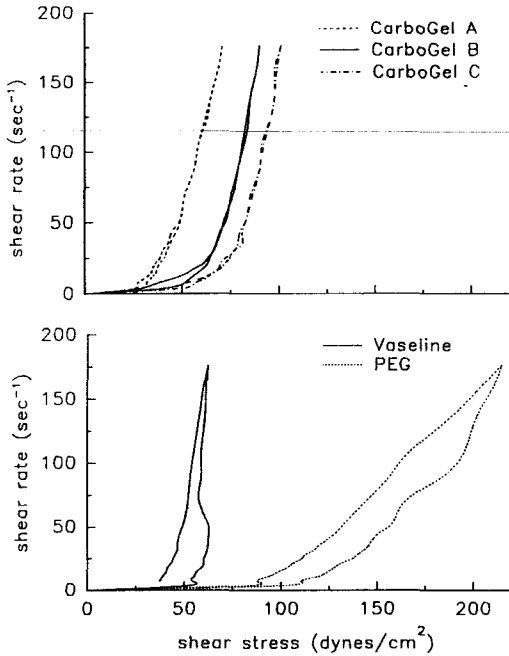


Fig. 1 — Rheogram of different topical formulations.

서 shear rate에 따른 shear stress를 플롯하여 rheogram을 얻었다(Fig. 1). 카르보폴 겔제제들은 모두 non-Newtonian flow로서 일정한 yield value이상의 shear stress에서 shear rate와 비례관계를 나타내는 plastic flow를 보였으며 이때 각 제제들의 yield value는 39.92 (CarboGel A), 62.45 (CarboGel B), 73.14 (CarboGel C) dynes/cm²로 관찰되었다. 그리고, 낮은 shear rate에서는 겔의 유동학적 성질이 일정치 않아 up curve와 down curve가 일치하지 않으면서 negative thixotropy 현상을 보였으나, shear rate가 증가하면서 yield value이상의 shear stress에서는 그 유동학적 성질이 균일한 것을 알 수 있었다. 따라서, 이들 겔제제들은 창상면에 적용시 yield value이상의 힘이 주어졌을 때 균질하게 도포될 수 있을 것으로 해석할 수 있다. 반면 지용성기제와 수용성 기제에서는 thixotropy현상을 보였으며 hysteresis loop을 형성하였다. 이들의 shear rate에 따른 점성변화를 관찰하기 위해 다음 식(3)에 의해 점도를 계산하였으며, 점도곡선은 Fig. 2와 같다.

$$\eta = \frac{\tau}{D} \tag{3}$$

여기서 η 는 viscosity(centipoise), τ 는 shear

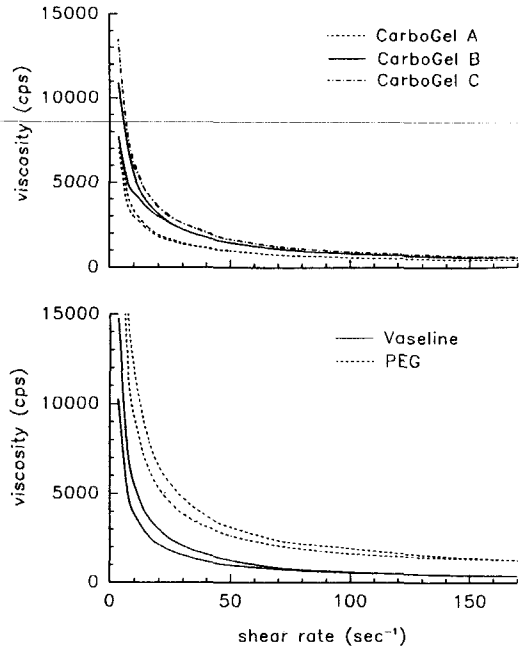


Fig. 2 — Viscosity flow curves of different formulations.

stress(dyne/cm²), D는 shear rate(sec⁻¹)를 나타낸다. 겔제제 및 연고제 모두 shear rate 증가에 따라 점성이 감소하는 전형적인 shear thinning system임을 보였고, 같은 shear rate에서 연고제에 비해 더 적은 점도를 보이는 겔제제가 창상적용시 더 쉽게 도포되리라 예측된다. 겔제제간의 비교시 CP의 양과 비례하여 점도가 커졌으며, thickening agent로서 MC4000의 점도에 대한 영향은 거의 없는 것으로 사료되며 NaOH보다 TEA으로 중화시켰을 때의 겔이 더 점도가 큰 것으로 관측되었다.

창상 치유효과 - 겔제제 및 연고제의 제제별 창상잔존율(X_d)은 Fig. 3과 같고, 제제들 서로간의 차이를 비교하기 위해 상대적 창상잔존율(RX_d)을 Fig. 4에 나타내었다. 7일동안의 상처치유를 보았을 때 창상잔존율은 겔 제제에서 가장 큰 효과를 보였으며, 이를 각 기제간의 차이를 보기위해 상대적 잔존율로 플롯하였을때 겔제제가 뚜렷한 효과를 보임을 알 수 있었으며 오히려 지방성 기제는 자연치유보다 늦은 현상을 보였다. 이는 수용성인 EGF가 겔제제에서 가장 균일하게 혼합되어 있을 뿐만 아니라 지속적인 약물방출과 함께 카르보폴에 의한 창상면과의 접촉이 증대되었기 때문인 것으로 판단된다. 그리고, 치유속도는 창상치유초기(1, 2일간)에

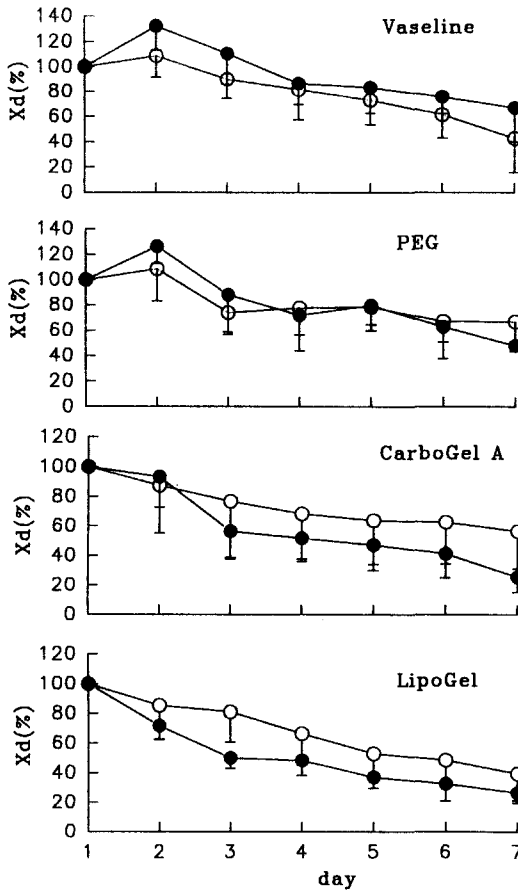


Fig. 3—Wound healing effect of different topical formulations. ○, Control; ●, Test.

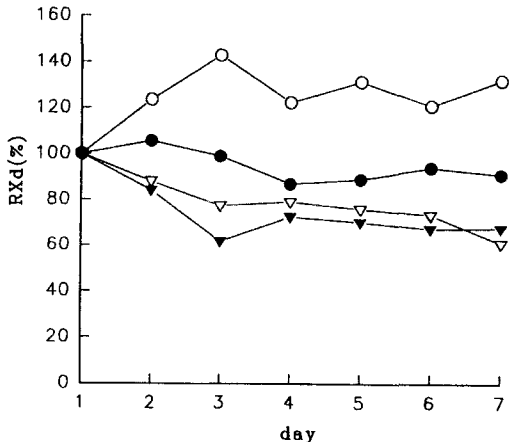


Fig. 4—Relative residual percent of wounds following topical applications of different formulations. ○, Vaseline; ●, PEG; ▽, CarboGel A; ▼, LipoGel.

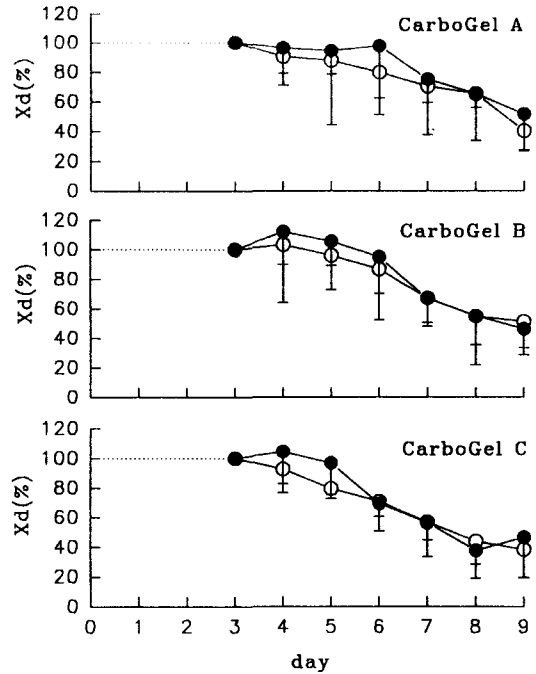


Fig. 5—Wound healing effect of different gels following topical applications on untreated wounds for three days. Dotted line represents untreated period after wound surgery. ○, Control; ●, Test.

결정되는 것으로 보이며 이는 초기의 EGF에 의한 창상의 수축에 의한 것으로 사료된다.

한편 겔 제제간의 약효를 비교해 보면, CarboGel 조성별 세가지 제제는 TEA로 중화시킨 Gel C가 효과가 없는 것으로 나타났으며 Gel A > Gel B > Gel C 순으로 효과가 좋은 결과를 나타내었다. LipoGel은 CarboGel A와 유사한 치유양상을 보였다. 이를 종합해보면 CarboGel A 및 LipoGel이 치유효과가 우수한 것으로 나타났으며, 특히 LipoGel의 효과가 뛰어난 것으로 보아 liposome이 EGF가 세포에 직접 작용하도록 하여 receptor와의 결합을 촉진하는 것으로 해석된다.

창상 상태에 따른 겔 제제의 효과 비교 - 육아조직형성으로 인한 EGF 제제의 효과에 대한 영향을 보기 위해 대조군, 실험군 모두 창상 유발후 일정시간 지나 육아조직이 형성되었을 때부터 상처에 적용하여 효과를 비교하였다. 이에 대한 창상잔존율은 Fig. 5와 같다. 육아조직에 대한 겔 기체의 투과성은 대조군과의 효과와 비교해 보았을 때 모두 대조군과 유의성 있는 차이를 안 보여 육아조직밀의 창상조직의 수용체에 EGF가 제대로 작용하지 못하는 것으로 추측된다. 따라서, EGF제

제 적용시는 창상면에 육아조직이 형성되기 전에 적용해야 하는 것으로 사료된다.

결 론

1. 보관온도에 따른 경시적 pH값은 4°C 냉장보관시 거의 변화가 없었으므로, EGF의 안정성이 확보되는 저온보관시 겔 제제는 화학적으로 안정할 것으로 평가되었다.

2. 유동학적 특성을 관찰하였을 때, 겔제제는 plastic flow를 보여 일정 yield value 이상에서는 그 유동학적 성질이 균일한 것을 알 수 있었으나, 연고제는 hysteresis loop를 보이면서 thixotropic flow를 나타내었다. 겔제제의 점성변화는 다른 기제보다 더 예민하여 shear rate 50 sec⁻¹ 이상에서는 2000 cps 이하로서 shear-thinning 현상을 보였다.

3. 각 제제별 치유효과를 창상잔존율로 비교하였을 때 LipoGel > CarboGel > 수용성기제 > 지용성기제 순으로 창상치유 효과를 나타내었다.

4. CarboGel간의 효과를 비교하였을 때 CarboGel A와 LipoGel이 우수한 효과를 보였으며, 특히 LipoGel이 가장 좋은 효과를 보였는데 이는 liposome이 창상면에서 EGF receptor와의 친화력을 도모해 주었기 때문인 것으로 해석된다.

5. 창상상태에 따른 겔 제제의 효과를 비교하기 위해 창상유발 3일 경과후 실험군, 대조군 모두 육아조직이 형성되었을 때부터 각 겔 제제를 적용한 결과, 모두 대조군과 거의 차이를 보이지 않고 치유되는 것으로 보아 육아조직으로 인해 EGF가 창상의 세포에 직접 작용하지 못하는 것으로 추측되며, 따라서 본 제제는 육아조직이 형성되기 전 창상초기부터 적용하는 것이 최적의 사용방법이라고 판단된다.

감사의 말씀

본 연구는 1994년도 신약개발 연구지원으로 수행되었으며, 원료를 제공해 주신 (주)대웅제약 중앙연구소에 감사드린다.

문 헌

- 1) Cohen, S. : Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J. Biol. Chem.* **237**, 1555 (1962).
- 2) Cohen, S. and Carpenter, G. : Human epidermal growth factor(EGF) : isolation and chemical and biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 1317 (1975).
- 3) Brown, G. L., Curtsinger, L., Brightwell, J. R., Ackerman, D. M., Tobin, G. R., Polk, H. C., George-Nascimento, C., Valenzuela, P. and Schultz, G. S. : Enhancement of epidermal regeneration by biosynthetic epidermal growth factor. *J. Exp. Med.* **163**, 1319 (1986).
- 4) Rheinwald, J. G. and Green, H. : Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature* **265**, 421 (1977).
- 5) Buckley, A., Davison, J. M., Kamerath, C. D., Wolt, T. B. and Woodward S. C. : Sustained release of epidermal growth factor accelerates wound repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7340 (1985).
- 6) Latta, M., Niinikoski, J., Lebel, L. and Gerdin, B. : Stimulation of wound healing by epidermal growth factor: a dose dependent effect. *Ann. Surg.* **203**, 379 (1986).
- 7) Franklin, T. J., Gregory, H. and Morris, W. P. : Acceleration of wound healing by recombinant human urogastrone (epidermal growth factor). *J. Lab. Clin. Med.* **108**, 103 (1986).
- 8) Guber, S. and Rudolph, R. : The myofibroblast. *Surg. Gynecol. Obstet.* **146**, 641 (1978).
- 9) Montandon, D., Gabbiani, G., Ryan, G. B. and Majno, G. : The contractile fibroblast: its relevance in plastic surgery. *Plast. Reconstr. Surg.* **52**, 286 (1973).
- 10) Kim, S. W., Hong, S. P. and Lee, D. H. : The effect of epidermal growth factor in wound healing of skin defect. *대한성형외과학회지* **18**, 5 (1991).
- 11) Franklin, J. D. and Lynch, J. B. : Effects of topical applications of epidermal growth factor on wound healing. *Plast. Reconstr. Surg.* **64**, 766 (1979).
- 12) Greaves, M. W. : Lack of effect of topically ap-

- plied epidermal growth factor on epidermal growth in man *in vivo*. *Clinical and Experimental Dermatology* **5**, 101 (1980).
- 13) Okumura, K., Kiyohara, Y., Komada, F., Iwakawa, S., Hirai, M. and Fuwa, T. : Improvement in wound healing by epidermal growth factor(EGF) ointment. I. Effect of nafamostat, gabexate, or gelatin on stabilization and efficacy of EGF. *Pharm. Res.* **7**, 1289 (1990).
 - 14) Kiyohara, Y., Komada, F., Iwakawa, S., Hirai, M. and Fuwa, T. and Okumura, K. : Improvement in wound healing by epidermal growth factor(EGF) ointment. II. Effect of protease inhibitor, nafamostat on stabilization and efficacy of EGF in burn. *J. Pharmacobio-Dyn.* **14**, 47 (1991).
 - 15) DiBiase, M. D. and Rhodes, C. T. : Investigation of Epidermal Growth Factor in Semisolid Formulations. *Pharm. Acta Helv.* **66**, 165 (1991).
 - 16) Tan, E. L., Shah, H. S., Leister, K. J., Kozick, L. M., Pasciak, P., Vanderlaan, R. K., Yu, C. and Patel B. : Transforming growth factor- α in a semisolid dosage form: Preservative and vehicle selection. *Pharm. Res.* **10**, 1238 (1993).
 - 17) Njieha, F. K. and Shalaby, S. W. : Stabilization of epidermal growth factor. *J. Bioactive and Compatible Polymers* **7**, 288 (1992).
 - 18) Langer, R. and Moses, M. : Biocompatible controlled release polymers for delivery of polypeptides and growth factors. *J. Cellular Biochemistry* **45**, 340 (1991).
 - 19) Committee : *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, The American Pharmaceutical Association, Washington D.C., p.41 (1986).
 - 20) Lieberman, H. A., Rieger, M. M. and Banker, G. S. : *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems* Vol. 2, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, p. 502 (1989).
 - 21) Bangham, A. D., Standish, M. M. and Watkin, J. C. : Diffusion of univalent ion across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, 238 (1965).
 - 22) Clearly, G. W. : *Medical Applications of Controlled Release*, Vol.1, CRC Press, Florida, p. 204 (1984).