

## 재조합 상피세포성장인자를 함유한 경구 점착성 겔제의 위궤양 치유효과

한 건<sup>1</sup> · 이수진 · 김재환\* · 정연복

충북대학교 약학대학, \*대웅제약

(1998년 5월 4일 접수)

### Oral Bioadhesive Gels of Recombinant Human Epidermal Growth Factor(rhEGF) for the Healing of Gastric Ulcers

Kun Han<sup>1</sup>, Su Jin Lee, Jae Hwan Kim\* and Youn Bok Chung

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

\*Dae Woong Pharm. Co., Sungnam, Kyunggi-Do 462-120, Korea

(Received May 4, 1998)

The objective of this study was to develop effective oral formulations of rhEGF for gastric ulcer healing using polycarbophil, hydroxypropylcellulose(HPC) and sucralfate as its bioadhesive bases. Cytoprotective effects of rhEGF, cell proliferation and differentiation, on the ulcers induced by ethanol or acetic acid in rats were studied. rhEGF release from HPC formulation was much faster than that from polycarbophil formulation. HPC formulation combined with small amount of sucralfate showed much slower release of rhEGF than only HPC base only. rhEGF preparations with bioadhesive polymers showed better effects on the healing of gastric ulcers than EGF solution when administered orally. When rhEGF preparations were administered at once and the animals were under starvation, polycarbophil formulation showed better effect on gastric ulcers than HPC formulation. Otherwise, when rhEGF preparations were given more than three times and the rats were fed normally, HPC formulation showed good healing efficacy of ulcers compared to polycarbophil formulation. rhEGF showed dose-dependent effect on the healing of both chronic and acute ulcers.

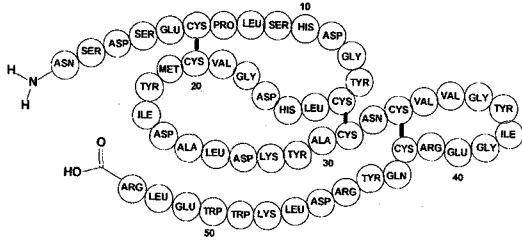
**Keywords**—rhEGF, Ulcer healing, Polycarbophil, HPC, Bioadhesive gels

상피세포성장인자(epidermal growth factor, EGF)는 1962년 Starkey 등<sup>1)</sup>에 의해 mouse의 악하선에서 발견되었으며, 다양한 상피조직세포에 대한 강력한 세포 성장 촉진 효과를 가지고 있는 것으로 밝혀졌다. 1975년 Cohen 등은 사람의 뇨에서도 EGF를 발견하였고, George<sup>2)</sup>는 위산분비 억제작용을 나타내는 urogastron을 발견하였는데 이들은 동일 물질임이 판명되었다. 1983년 이후 human EGF 유전자를 재조합하여 미생물에서 발현시킨 rhEGF가 대량 생산되었고 이것은 천연형 EGF와 물리화학적, 생물학적 동등성을 가지고 있음이 입증되었다.<sup>3)</sup> 그 구조는 53개의 아미노산으로 구성된 분자량 6,045 dalton의 단일 사슬 폴리펩타이드로 생리활성에 중요한 역할을 하는 Cys-Cys

disulfide bond 3개를 가지고 있으며(Scheme I), 등전 점은 4.6으로 비교적 산성에서 안정하다.<sup>4,5)</sup>

사람의 뇨로부터 정제한 천연형 EGF는 1986년 스위스 Inpharzam사에서 안과용 액제(Gentel, 50 µg/ml)로 발매되어 각막손상이나 각막손상을 수반하는 안과수술 등에 사용하였을 때 각막회복의 효능이 있는 것으로 밝혀지고 있다. 그 밖에 창상 및 화상의 치료, 심한 화상 환자의 피부이식 및 외과 수술시 절개부위의 치료 등에 국소 외용제로서 미국 Amgen, Chiron社 등에서 임상시험 중이다. 한편 동물실험에서 EGF를 주사로 투여시 위산분비를 억제하는 것으로 밝혀지고 있으며, 50일 동안 매일 마시는 물로 EGF 6 µg/rat을 경구로 투여시 십이지장궤양 유발 rat의 43% 정도가 치유됨이 보고되었다.<sup>6)</sup> 이때 대조군으로 사용된 cimetidine의 치유율은 40%로 EGF가 더 높은 치

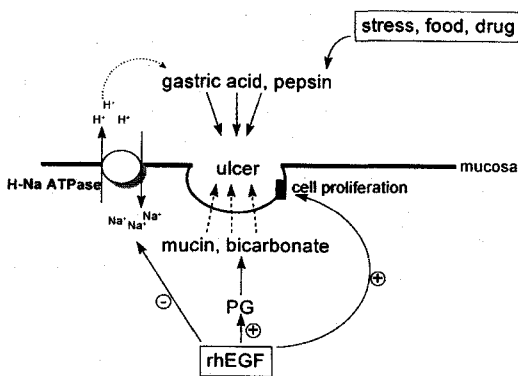
<sup>1</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로



Scheme I—Structure of recombinant human epidermal growth factor.

유율을 나타내었다. 일본의 Hitachi사가 천연 EGF를 주사용 위궤양 치료제로서 발매하기 위해 허가신청 중인 것으로 알려지고 있으나 rhEGF는 세계적으로 아직 발매제품이 없으며, 세계 10여 개 회사에서 안과용, 피부치료용 및 위궤양 치료제로서 개발하기 위해 임상 혹은 전임상실험중이다. 최근에는 EGF가 위산 분비를 억제한다는 사실의 보고<sup>6)</sup>와 여러 가지 위궤양에 손상을 가할 수 있는 물질 혹은 약물들에 대하여 위궤양을 보호한다는 등의 보고<sup>7)</sup>에 의하여 이 약물이 만성 위궤양이나 십이지장궤양 등의 치료 약물로 관심을 모으기 시작하였다. EGF의 궤양치유기전은 위산의 분비 억제 및 위산 같은 공격인자의 방어인자로서 점액 물질 및 내인성 중화제의 생성을 유도하는 물질인 prostaglandin이나 somatostatin 합성을 촉진하는 간접적인 치료 효과와 함께 점막의 손상부위에 세포들을 분화, 촉진하는 직접적인 효과에 기인하는 것으로 생각된다. 또한 점막의 손상을 예방할 수 있다는 사실 때문에<sup>7)</sup> 기존의 단순한 제산제나 위산 분비 억제 약물들보다 만성 위 · 십이지장 궤양 등에 대해 큰 약리 효과를 기대할 수 있을 것이다(Scheme II).

생리활성 폴리펩타이드의 경구투여 시스템으로서는



Scheme II—Ulcer healing effects of epidermal growth factor.

수용액제, 유제, 리포솜 및 폴리머를 이용한 제어방출 시스템 등이 연구 개발되어 왔으나 EGF는 수용액에서 그다지 안정하지 않고 분자량이 비교적 크므로 전신흡수를 기대하기 어렵다. 따라서 EGF를 위 · 십이지장 궤양 치료 목적으로 효과적으로 사용하려면 궤양 조직세포에의 국소적용이 바람직하다. 이를 위해서는 궤양부위에 점착할 수 있는 폴리머를 이용하여 하이드로겔 형태로 투여시 투여부위에서 오랜시간 방출시킬 수 있는 제형이 바람직한 것으로 생각된다. 생체막점착성 약물 수송체는 투여부위에서의 체류시간이 증가되고 흡수부위와의 접촉시간을 연장시킴으로써 국소치료효과 개선 뿐 아니라 어떤 약물에서는 생체이용률(전신효과)의 상당한 증가를 가져 올 수 있다. 실제 막투과성이 나쁘거나 점막에서 분해를 받기 쉬운 많은 펩타이드 약물들은 오직 주사로만 투여되고 있으나 특정부위에 오랜시간 체류할 수 있는 제형의 이용은 주사요법을 대체할 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 대부분의 생체막점착성 polymer들은 점막투여부위에서 막을 덮고 있는 mucus에 점착성을 나타내며, 점착시간은 polymer가 수용성인가 수불용성인가에 따라 큰 차이가 있다. 수용성 생체막 점착성 polymer는 일반적으로 접촉시간이 수시간에 지나지 않지만 수불용성 polymer는 mucin 혹은 조직세포가 대체되는 기간(보통 4~72시간)동안 점착하여 남아있게 된다. 생체막 점착성 수송체의 연구대상이 된 polymer의 종류는 수용성 polymer중 양이온성의 polylysine, polyvinylmethyl imidazole, polybrene, 음이온성의 alginic acid, carrageenan, sodium carboxy methyl cellulose 및 중성의 polyethylene glycol, polyvinyl pyrrolidone, hydroxypropyl cellulose(HPC) 등이 있고, 수불용성 polymer 중에는 양이온성의 gelatin, 음이온성의 carbopol 934, polycarbophil, cross-linked polymethacrylic acid 및 중성의 hydroxypropylmethyl cellulose(HPMC), polymethyl methacrate, ethyl cellulose 등이 있다. 수용성 polymer는 cross-linked 되지 않는 반면 수불용성 polymer는 cross-linking agent에 의해 팽윤성의 망상구조를 가지고 있다.

저자 등<sup>8)</sup>은 rhEGF의 위 십이지장궤양 치료를 위한 새로운 경구투여 송달시스템 개발을 목적으로 1) rhEGF의 위장관 부위에 따른 효소분해 특성 및 생체에 무해한 분해억제제를 검색하고, 2) 소장 및 결장부위별 막투과 특성을 밝혔으며, 아울러 유효한 흡수촉

진제를 검색하여 보고한 바 있다. 그 결과 rhEGF는 *in vitro* 효소적 분해실험에서 위, 공장, 회장, 결장에 비하여 십이지장에서 가장 빠른 단백질분해(protolysis)를 보였으며 결장점막에서 비교적 안정하였으나 저조한 막 투과성을 보여 실제 rhEGF를 경구투여하여 위장관 흡수로 전신효과를 기대하기는 어려웠다. 이와같은 결과로 미루어 보아 rhEGF의 경구송달시스템은 rhEGF를 직접 레양부위에 장시간 접촉, 방출시켜 국소레양부위의 세포증식이나 상피세포 보호효과를 기대할 수 있는 시스템이 바람직하다. 따라서 효과적인 rhEGF 경구송달 시스템을 개발하기 위하여 본 연구에서는 polycarbophil, HPC 등 수종의 생체막점착성 polymer를 이용한 겔제제를 제조하고, 실험적으로 유도된 초산 및 에탄올궤양 흰쥐에 경구투여 후 레양치유률을 측정함으로써 이들 제제의 경구송달 시스템으로서의 이용가능성을 평가하였다.

## 실험방법

### 시약 및 기기

rhEGF는 (주)대웅제약으로부터 공급받아 사용하였으며, polycarbophil(Goodrich chemical Co.), hydroxypropylcellulose(Aldrich Chemical Co.), sucralfate(Chungwae Pharm. Co.), cimetidine(Yuhan Pharm Co.), acetonitrile(Fisher Co. Ltd.) 과 기타 phosphoric acid,  $K_2HPO_4$ , ethanol, formalin, ethyl ether anhydrous, acetic acid 등은 분석용을 사용하였다.

실험기기 및 재료로는 HPLC set (Hitachi Co. Ltd.: model L-6000 pump, L-6200 intelligent pump, L-4200 UV/VIS detector, D-2500 chromatointegrator, 50  $\mu$ l loop injector), Side-by-side diffusion cell(Precision Instrument Co. Ltd), Freeze dryer (Edwards High Vacuum Co.), Refrigerated centrifuge (Hitachi Co. Ltd., himac CR 15D), Microscope ( $\times 10$  Olympus Opt. Co.) 등을 사용하였다.

### 실험동물

실험동물은 Sprague-Dawley계 숫 흰쥐(체중 200~250 g)를 삼육동물(경기도 오산)에서 구입하여 사용하였다.

### rhEGF 함유 2% polycarbophil 하이드로겔의 제조

rhEGF 함유 2% polycarbophil 하이드로겔의 제조는 rhEGF가 분해되기 쉽고, 용기에 흡착되기 쉬운 성

질을 가지고 있기 때문에 먼저 하이드로겔을 제조한 후 용시에 rhEGF 용액과 혼합하였다. 즉 먼저 0.4N NaOH 용액 100 ml에 4g의 polycarbophil을 가한 후 교반하여 4% 하이드로겔(pH 7)을 제조하고, 교반시에 포함된 기포를 제거하기 위하여 3,000 rpm으로 약 10분 간 원심분리하였다. 이 하이드로겔을 24시간 후에 pH를 다시 측정하여 NaOH 용액으로 pH를 보정한 후 냉장보관하였다. rhEGF 용액의 제조는 냉동보관된 rhEGF를 증류수에 녹여 농도가 1,600  $\mu$ g/ml가 되도록 조제하여 냉장보관하였다. 실험동물에 약물을 투여하기 전에 rhEGF 용액과 하이드로겔을 각기 plastic syringe에 옮겨 three way lure를 이용하여 1:1로 충분히 혼합하여 rhEGF 함유 polycarbophil 하이드로겔을 제조하였다. 겔제제는 약물의 분해방지를 위하여 냉장보관하였으며 3일 이내에 사용하였다.

### rhEGF 함유 2% HPC 콜로이드 용액의 제조

rhEGF 함유 2% HPC 콜로이드 용액의 제조는 100 ml의 증류수에 4g의 HPC를 넣어 5분 간 stirring하고 polycarbophil 하이드로겔과 마찬가지로 three way lure를 사용하여 rhEGF와 1:1로 혼합하여 제조하였다. 한편 sucralfate를 첨가한 rhEGF 함유 2% HPC 콜로이드 용액은 먼저 rhEGF 800  $\mu$ g을 증류수 1 ml에 녹인 용액에 sucralfate 10 mg을 가하여 녹인 후 약 10시간 동안 동결건조하여 냉장보관하였다. 이어 100 ml의 증류수에 2g의 HPC를 넣어 제조한 2% HPC 용액에 상기의 sucralfate 함유 rhEGF 동결 건조 분말을 넣어 혼합하였다.

### 각 제형으로부터 rhEGF의 방출시험

각 제형으로부터 rhEGF의 방출시험은 side-by-side diffusion cell을 이용하여 실시하였다. Diffusion cell의 양쪽 사이에 cellulose acetate membrane filter(pore size: 0.8  $\mu$ m, diameter: 25 mm)를 장착하고 donor cell에는 앞서 제조한 rhEGF 제제를, receiver cell에는 pH 7.0의 인산염완충액을 각각 1.5 ml씩 넣고 방출실험을 실시하였다. 실험기간 중에 cell 내의 온도는  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지하였으며, 질소가스를 receiver cell에 공급하여 cell 내의 완충액의 순환을 도왔다. Receiver cell로부터 일정시간 간격으로 일정량의 시험액을 취한 후 새로운 완충액을 보충해 주었으며, 채취한 시험액으로부터 rhEGF의 방출량은 HPLC로 정량하였다.

### HPLC에 의한 rhEGF의 정량

각 제제로부터 rhEGF의 방출량은 HPLC를 이용하

여 측정하였다. HPLC 분석조건에서 칼럼은  $\mu$ -bondapak C<sub>18</sub>(10  $\mu$ m, 3.9×300 mm)을 사용하였으며, 이동상은 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH 6.5) : acetonitrile=9:1과 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH 6.5):acetonitrile=3:7 용액을 gradient로 하여 사용하였다. 파장은 214 nm, 유속은 1.2 ml/min이었다.

**궤양의 유발**

**초산 유발 궤양**—초산 유발 궤양은 Okabe 등<sup>9,10</sup>의 방법을 개량하여 사용하였다. 체중 250 g 정도의 숫 흰 쥐를 24시간 절식시킨 후, 에틸로 마취하여 복부를 절개하고 위를 노출시킨 다음 30%의 초산 30  $\mu$ l를 선위부의 점막하조직층에 주입하고 봉합했다. 약물투여는 궤양 유발 다음날 부터 시작하여 1일 2회 씩 10일 간 투여하고, 11일 제에 에틸로 치사시켜 위를 적출한 다음 10% formalin 10 ml를 주입하여 위 점막을 고정시킨 후 궤양지수를 측정하였다.

**에탄올 유발 궤양**—에탄올 유발 궤양에 따른 rhEGF의 위궤양의 억제 또는 치유효과를 측정하기 위해 여러 가지 방법이 시도되었다. 먼저 rhEGF 투여에 의한 궤양 억제효과를 측정하기 위하여 Konturek 등<sup>11-13</sup>의 방법을 개량하여 궤양유발 전 1회 투여방법을 시도하였다. 체중 200 g 내외의 숫 흰쥐를 24시간 절식시킨 뒤 rhEGF를 투여하고, 3시간 후에 무수에탄올을 1 ml씩 투여한 다음 1시간 후에 에틸로 치사시켜 위를 적출하였다. 10% formalin 10 ml를 위에 주입하여 위점막을 고정시키고 10배율의 해부 현미경으로 궤양지수를 측정하였다.

한편 궤양의 억제효과가 아닌 치유효과를 측정하기 위하여 궤양유발 후에 약물을 투여하는 방법(method I)을 시도하였다. 체중 200 g 정도의 숫 흰쥐를 24시간 절식시킨 후 무수에탄올 1 ml를 투여하고 1시간 후에 약물을 투여하였다. 궤양유발로부터 24시간 경과 후에 에틸로 치사시켜 위를 적출하고 formalin으로 고정시켰다. 궤양유발 후 3회 투여법(method II)은 Method I에서의 투여회수와 간격을 조정하였다. 즉 체중 200 g 정도의 숫 흰쥐를 24시간 절식시킨 후 무수에탄올 1 ml를 투여하고 각각 4시간, 10시간, 24시간 후에 rhEGF를 투여한 후 궤양유발로부터 30시간 후에 에틸로 치사시킨 후 위를 적출하였다. 10% formalin 10 ml를 위에 주입하여 위점막을 고정시키고 궤양지수를 측정하였다.

**궤양지수, 억제율 및 치유율 계산**

초산 유발 궤양은 궤양면적(mm<sup>2</sup>/stomach)을 측정하고, 에탄올 유발 궤양은 궤양길이의 총합(mm/stomach)

을 측정하여 군내의 평균을 궤양지수(Ulcer Index)로 하였다.

초산 유발 궤양 후의 궤양 치유율(Curative Ratio)은 다음과 같은 식을 이용하여 산출하였다.

$$\text{치유율 (\%)} = \frac{\text{대조군의 궤양지수} - \text{실험군의 궤양지수}}{\text{대조군의 궤양지수}} \times 100$$

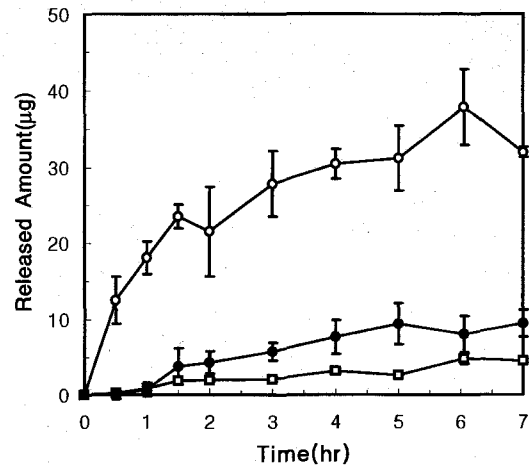
Konturek 등<sup>11-13</sup>의 방법에 의한 에탄올 유발 궤양 후의 억제율도 치유율과 같은 방법으로 산출하였다.

**결 과**

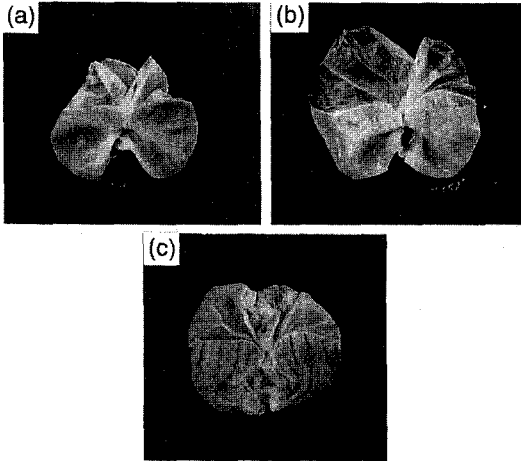
**rhEGF의 겔기제로부터의 방출특성 및 HPLC에 의한 분석**

Polycarboophil(2%), HPC(2%) 및 sucralfate가 첨가된 HPC(2%)로부터의 rhEGF 방출양상을 Figure 1에 나타내었다. 기제로부터 rhEGF(240  $\mu$ g/1.5 ml)의 방출속도는 HPC>sucralfate/HPC>polycarboophil 순이었다. HPC 기제로부터 rhEGF의 방출은 7시간에 걸쳐 약 15% 정도 방출되었고, sucralfate/HPC와 polycarboophil로부터는 약 4% 및 2%로 매우 적은 양이 방출되었다. rhEGF와 내부표준물질로 사용한 이부프로펜라이신염의 유지시간은 각각 20분, 25분으로 gradient system에서 피이크의 분리 및 모양이 양호하게 나타났다.

**초산 및 에탄올 유발 궤양의 특징**



**Figure 1**—Release profile of rhEGF(240  $\mu$ g) from several formulations. Key:  $\circ$ : HPC(2%),  $\bullet$ : sucralfate/HPC(2%),  $\square$ : polycarboophil(2%).

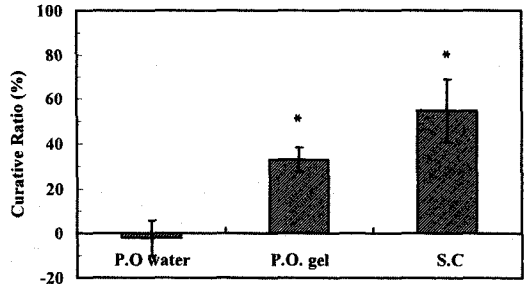


**Figure 2**—Photograph inner surface of stomach injured by acetic acid and ethanol. (a) Normal gastric surface, (b) Gastric surface injured by acetic acid, and (c) Gastric surface injured by ethanol.

초산과 에탄올의 경구투여로 유도된 궤양의 형태를 정상 위장과 비교하여 Figure 2에 나타내었다. 만성궤양 모델로 사용된 초산 유발 궤양의 특징은 둥글고 깊숙히 파여진 궤양의 형태를 나타내었으며, 에탄올 유발 궤양은 급성궤양 모델로 가느다란 줄모양의 궤양이 여러 개 형성되었다.

**투여경로에 따른 rhEGF의 만성위궤양 치유율**

Figure 3은 초산으로 만성궤양이 유발된 흰쥐에 rhEGF의 수용액 또는 겔제제를 경구투여한 경우와 피하주사한 후 위궤양 치료효과를 비교하여 나타낸 것이다. rhEGF 수용액을 피하주사시 10 µg/kg의 낮은 농도에서도 좋은 치료효과를 나타내었으나, 100 µg/kg을 경구투여시 궤양치료효과는 거의 나타나지 않았다. 반면에 polycarboophil 겔제제는 약 33%의 궤



**Figure 3**—Effect of administration routes on the healing of acetic acid-induced chronic ulcers. Key: PO water: EGF 100 µg/kg in water (oral), PO gel: EGF 100 µg/kg in 2% polycarboophil (oral), SC: EGF 10 µg/kg in water (Subcutaneous). \*Significantly different from both PO water and Control (water only) group (P<0.03).

양치유율을 나타내었다(Table I, Figure 3).

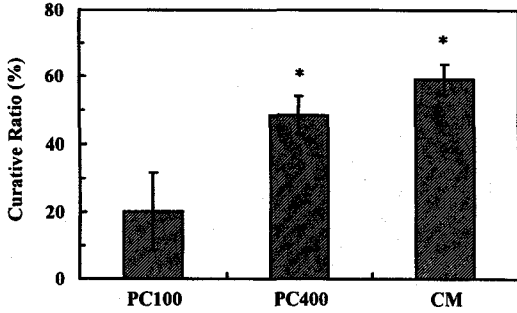
**rhEGF 용량에 따른 만성위궤양 치유율**

초산 유발 만성궤양의 흰쥐에 rhEGF를 함유하지 않은 polycarboophil 하이드로겔만을 투여한 대조군, rhEGF 함유 polycarboophil 하이드로겔(100 µg/kg, 400 µg/kg) 투여군 및 시메티딘 투여군의 궤양 치료지수를 비교하여 Figure 4 및 Table I에 나타내었다. 대조군은 gel 기제가 궤양에 미치는 영향을 배제하기 위한 것이며, 시메티딘은 H<sub>2</sub> 수용체 차단제로 시판 궤양 치료제와 rhEGF의 위궤양 치유효과를 비교하기 위한 것이다. 시메티딘은 히스타민 수용체에 작용하여 위액 분비를 억제함으로써 소화성궤양을 치료하는 약물로서 위궤양의 치료기전에 있어 EGF의 내분비 작용과 유사한 위액분비 억제작용을 갖는다. 본 실험에서는 rhEGF의 궤양 치유율은 시메티딘의 치료율(120 µg/kg, 약 60%)에는 미치지 못하였으나 400 µg/kg 투여시 약 50%의 좋은 치유율을 얻을 수 있었으며,

**Table I**—Ulcer Index of Acetic Acid-Induced Chronic Ulcers after Healing with Various Formulations

Drug	Base	Route	Ulcer index*	Ref.
Control	water	P.O.	13.2(1.77)	Figure 3
PO water	rhEGF 100 µg/kg water	P.O.	13.5(2.10)	
PO gel	rhEGF 100 µg/kg 2% polycarboophil	P.O.	8.9(1.41)	
SC	rhEGF 10 µg/kg water	S.C.	6.0(3.73)	
PC 0	2% polycarboophil	P.O.	11.0(1.41)	Figure 4
PC 100	rhEGF 100 µg/kg 2% polycarboophil	P.O.	8.8(2.43)	
PC 400	rhEGF 400 µg/kg 2% polycarboophil	P.O.	5.7(1.22)	
CM	cimetidine 120 µg/kg water	P.O.	4.5(1.00)	
PC	rhEGF 400 µg/kg 2% polycarboophil	P.O.	8.6(2.61)	Figure 5
HPC	rhEGF 400 µg/kg 2% HPC	P.O.	4.6(1.52)	

\*Mean (±S.E.)



**Figure 4**—Effect of rhEGF doses in polycarbophil gel on the healing of acetic acid-induced chronic ulcers. Key: PC 100: EGF 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in 2% polycarbophil, PC 400: EGF 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in 2% polycarbophil, CM: cimetidine 120  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in water. All drugs were administered by oral route. \*Significantly different from both PC 100 and PC 0 (2% polycarbophil gel only) group ( $P < 0.03$ ).

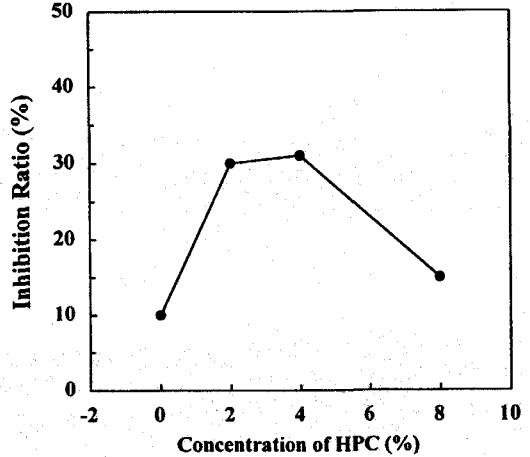
rhEGF의 투여량을 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 에서 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 증가시켰을 때 위궤양 치유율도 20%에서 약 50%로 증가하여 용량의존효과를 나타내었다.

**기제의 종류에 따른 rhEGF의 만성위궤양 치유율**

400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 rhEGF를 함유한 polycarbophil과 HPC의 만성궤양에서의 치유율 차이를 Figure 5 및 Table I에 나타내었다. HPC를 기제로 사용한 경우 약 60%의 높은 치유율을 보여 polycarbophil 하이드로겔 보다 좋은 효과를 보였다.

**HPC의 농도에 따른 rhEGF의 급성위궤양의 치유율**

Figure 6은 Konturek 등<sup>11-13</sup>의 방법을 개량한 방법을 사용하여 무수에탄올로 흰쥐에 급성위궤양을 유발한 다음 흰쥐에 수용액 또는 2%, 4%, 8% HPC 콜로이드

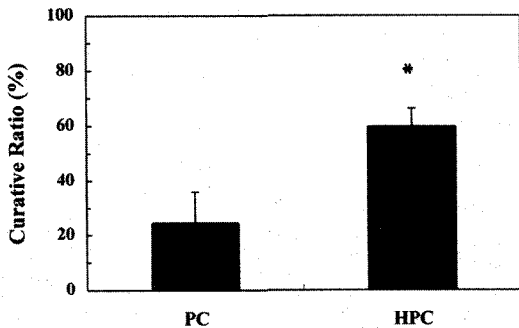


**Figure 6**—Effect of HPC concentration on the ethanol-induced ulcers.

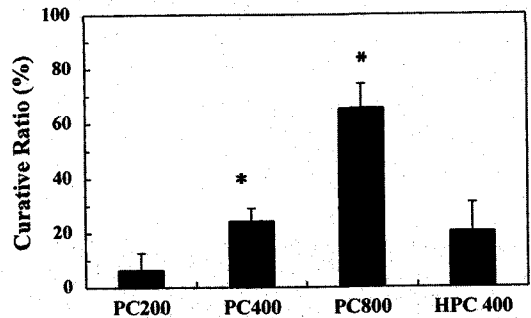
용액으로 rhEGF 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 를 경구투여 했을 때의 궤양치유율을 나타낸 것이다. HPC는 polycarbophil과는 달리 2%에서 겔을 형성하지 않고 콜로이드 용액이었으며, HPC의 농도가 2%, 4%에서 좋은 궤양치유율을 보인 반면 8%에서는 오히려 크게 감소했다.

**rhEGF 함유량과 기제의 종류에 따른 급성위궤양의 치유율**

궤양유발 후 1회 약물투여법(method I)—에탄올 궤양 유발 후 1시간 후에 약물을 투여하고, 24시간 후에 회복하여 궤양지수를 측정하는 방법(method I)에 의한 궤양치유율을 Figure 7 및 Table II에 나타내었다. rhEGF의 투여량이 높아질수록 치유율도 증가하였다. Polycarbophil 하이드로겔로 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의



**Figure 5**—Effect of different bases on the healing of acetic acid-induced chronic ulcers. Key: PC: rhEGF 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in 2% polycarbophil, HPC: rhEGF 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in 2% HPC. All drugs were administered by oral route. \*Significantly different from both PC and Control (water only) group ( $P < 0.03$ ).



**Figure 7**—Effect of rhEGF doses and bases on the healing of ethanol-induced acute ulcers induced by method I. Key: PC 200, PC 400 and PC 800: rhEGF 200, 400, 800  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in 2% polycarbophil gel, respectively, HPC 400: rhEGF 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in 2% HPC. All drugs were administered by oral route. \*Significantly different from both PC 200 and PC 0 (2% polycarbophil gel only) group ( $P < 0.05$ ).

**Table II**—Ulcer Index of Ethanol-Induced Acute Ulcers after Oral Administration of Various Formulations

Drug	Base	Ulcer index*	Ref.
PC 0	—	2% polycarbophil	78.0(11.0)
PC 200	rhEGF 200 µg/kg	2% polycarbophil	73.0(9.75)
PC 400	rhEGF 400 µg/kg	2% polycarbophil	59.0(7.42)
PC 800	rhEGF 800 µg/kg	2% polycarbophil	27.0(13.4)
HPC 400	rhEGF 400 µg/kg	2% HPC	62.0(6.4)
Control	—	water	110(52.0)
S 400	rhEGF 400 µg/kg	2% PC+sucralfate(10 mg/kg)	91.7(39.2)
S 800	rhEGF 800 µg/kg	2% PC+sucralfate(10 mg/kg)	66.3(18.9)
HPC 400	rhEGF 400 µg/kg	2% HPC	82.5(39.0)
PC 400	rhEGF 400 µg/kg	2% polycarbophil(PC)	96.0(53.7)
CM	Cimetidine 150 µg/kg	water	68.8(19.3)

\*Mean (±S.E.)

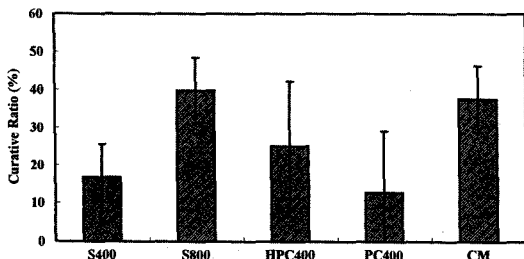
rhEGF를 투여한 경우 위궤양치유율은 대조군과 비교하여 큰 차이를 발견할 수 없었으나, 800 µg/kg의 rhEGF를 투여한 경우 약 65%에 이르는 높은 치유율을 보였다. rhEGF 400 µg/kg를 투여한 경우 위궤양치유율은 polycarbophil이 24%의 위궤양치유율을 나타낸 반면 HPC의 경우 20%의 치유율을 나타내었다. 이와같은 결과는 초산으로 유발된 만성궤양시에 HPC를 기재로하여 400 µg/kg의 rhEGF를 투여한 경우 위궤양치유율이 약 60%의 치유효과를 보였던 것과 비교할 때 매우 다른 양상이었다.

궤양유발 후 3회 약물투여법(method II)—에탄올은 경구투여 후 1시간내에 적절한 궤양모델을 유도할 수 있으나 rhEGF가 단백질이므로 안정성에 미칠지 모르는 영향을 고려하여 에탄올로 궤양을 유발한 후 4시간이 지나서 첫 번째 투여를 시작했으며, rhEGF의 명확한 궤양치유효과를 관찰하기 위해 30시간 동안 3회

에 걸쳐 rhEGF를 투여하였다. 이때 sucralfate를 첨가한 이유는 sucralfate가 궤양의 기저부위에 부착하여 공격인자로부터 방어하여 rhEGF의 궤양치유에 대한 상승작용을 기대하기 위하여 사용하였다. rhEGF 수용액에 10 mg/kg의 sucralfate를 녹인 후 동결건조한 것을 투여한 경우 및 HPC(2%) 또는 polycarbophil만을 기재로 하여 투여한 경우에 있어 rhEGF의 궤양치유율을 비교하여 Figure 8 및 Table II에 나타내었다. 동일한 rhEGF 함유량(400 µg/kg)을 가진 기재에서 보여지는 궤양치유율을 비교하면 HPC > sucralfate/HPC > polycarbophil 순이었다.

## 고찰

Itoh 등<sup>14)</sup>에 의하면 EGF는 장에서 배설속도가 빠르기 때문에 많은 양을 투여하여도 효과를 기대하기 어려우나, HPC와 병행투여시 단독으로 투여했을 경우보다 30~60배의 EGF가 장내에 남아있다고 하였다. 따라서 본 연구에서는 Konturek 등<sup>11-13)</sup>의 방법을 개량한 방법을 사용하여 무수에탄올로 흰쥐에 급성위궤양을 유발한 다음 흰쥐에 수용액 또는 2%, 4%, 8% HPC 콜로이드 용액으로 rhEGF 100 µg/kg를 경구투여했을 때의 궤양치유율을 관찰하였다. 그 결과 HPC의 농도가 2%, 4%에서 좋은 궤양억제율을 보인 반면 8%에서는 오히려 크게 감소했다(Figure 6). 이와 같은 결과가 나타난 이유는 본 시험법이 약물투여 4시간 후에 궤양지수를 측정하는 것으로 HPC의 농도가 증가할수록 점착성이 커져 약물 방출속도가 늦어지므로 효과를 크게 볼 수 없었던 것으로 생각된다. 또한 HPC(2%)는 초산유발 궤양과 에탄올유발 궤양 후



**Figure 8**—Effect of rhEGF doses and bases on the healing of ethanol-induced acute ulcers induced by method II. Key: S 400 and S 800: 2% HPC containing rhEGF 400 µg/kg, 800 µg/kg, respectively, in combination with 10 mg/kg sucralfate, HPC 400: rhEGF 400 µg/kg in 2% HPC, PC 400: rhEGF 400 µg/kg in 2% polycarbophil, CM: cimetidine 150 mg/kg in water. All drugs were administered by oral route.

3회 투여법(method II)에서 좋은 효과를 보이는 반면 (Figure 5, Figure 8), polycarbophil은 에탄올유발 궤양 후 1회 투여법(method I)에서 비교적 높은 치유율을 보였다(Figure 7). HPC가 초산유발 궤양에 더 나은 치유율을 보인 이유는 초산유발 궤양의 경우 궤양면이 비교적 넓어 단위 시간당 더 많은 rhEGF가 필요하며 즉, 기제로부터 더 빠른 rhEGF의 방출이 요구되며, Figure 1의 결과로부터 HPC가 이 요구에 부응한 것에 기인한 것으로 생각된다. 또한 에탄올유발 궤양 후 3회 투여법(method II)에서 좋은 효과를 보인 이유는 에탄올유발 궤양 후 1회 투여법에 비해 궤양면에 자주 약물을 투여하여 지속적인 약물 공급이 이루어졌기 때문으로 생각된다. 한편 에탄올유발 궤양 후 1회 투여법(method I)에서 polycarbophil이 HPC에 비해 비교적 높은 치유율을 보인 이유는 앞서 밝혔듯이 polycarbophil로부터 rhEGF의 방출은 HPC에 비해 서서히 일어나므로 단지 1회 약물을 투여한 경우 HPC에 비해 polycarbophil로부터 지속적인 rhEGF의 공급이 이루어지기 때문으로 생각된다. 따라서 효과적으로 rhEGF를 궤양면에 송달하기 위해서는 polycarbophil보다는 방출이 빠르며 HPC에 비해 지속적으로 약물을 방출할 수 있는 기제가 요구된다.

## 결 론

1. rhEGF의 방출은 기제에 따라 2% HPC/sucralfate 첨가 2% HPC/2% polycarbophil순으로 용이했다.
2. 초산으로 유발된 만성궤양모델에서 rhEGF(100 µg/kg)를 수용액으로 투여시 위궤양 치유 효과를 거의 관찰할 수 없었으나, 생체막점착성 폴리머인 polycarbophil 하이드로겔 (2%)로 투여시 33%의 위궤양 치유효과를 나타내었다.
3. 2% HPC를 기제로하여 rhEGF를 투여시 정상식이 하에 초산유발 궤양 후 다회(多回)의 약물을 투여한 경우와 에탄올궤양 유발 후 3회 투여한 경우에 좋은 궤양 치유효과를 보였으며, 2% polycarbophil의 경우 절식하에 에탄올 궤양 유발 후 1회 투여한 방법에서 좋은 궤양 치유효과를 나타내었다.

## 감사의 말씀

본 연구는 과학재단 핵심전문 연구비(# 961-0717-103-2) 및 대웅제약의 연구비 지원에 의해 수행되었으

며 이에 감사드린다.

## 문 헌

- 1) R.H. Starkey, S. Cohen, and D.N. Orth, Epidermal growth factor: Identification of a new hormone in human urine, *Science*, **189**, 800-802 (1975).
- 2) N. George, A.G. Carlos, S.H. Mitchell, M. James, V. Pablo, S.S. Kathelyn, R.M. Frank and R. Anne, Characterization of recombinant human epidermal growth factor produced in yeast, *Biochemistry*, **27**, 797-802 (1988).
- 3) C.R. Savage, J.H.Jr. Hash and S Cohen, Epidermal growth factor location of disulfide bond, *J. Biol. Chem.*, **248**, 7669-7672 (1973)
- 4) C.R. Savage, T. Inagami, and S. Cohen, The primary structure of epidermal growth factor, *J. Cell Biol. Chem.*, **247**, 7612-7621 (1972).
- 5) M. Niall, G.B. Ryan and B.M. O'Brien, The effect of epidermal growth factor on wound healing in mice, *J. Sug. Res.*, **33**, 164 (1982).
- 6) A. Dembinski, D. Drozdowicz, H. Gregory, S. J. Konturek and Z. Warecha, Inhibition of acid formation by epidermal growth factor in the isolated rabbit gastric glands, *J. Physiol.*, **378**, 347-357 (1986).
- 7) S.J. Konturek, T. Radecki, T. Brzozowski, I. Piastucki, A. Dembinski, A. Zmuda, R. Grulewski and H. Gregory, Gastric cytoprotection by epidermal growth factor: Role of endogenous prostaglandin and DNA synthesis, *Gastroenterology*, **81**, 438-443 (1981).
- 8) K. Han, M.S. Choi and Y.B. Chung, Site-specific degradation and transport of recombinant human epidermal growth factor (rhEGF) in the rat gastrointestinal mucosa, *Int. J. Pharm.*, In Press (1998).
- 9) S. Okabe and C.J. Pfeiffer, Chronicity of acetic acid ulcer in the rat stomach, *Digestive disease*, **17**(7), 619-629 (1972).
- 10) K. Takagi, S. Okabe and R. Saziki, A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing, *Jap. J. Pharmac.*, **19**, 418-426 (1969).
- 11) S.J. Konturek, M.T. Radecki, I. Piastucki and A. Dembinski, Cytoprotection effects of gastrointestinal hormones. Gut. Peptides and Ulcer, Biomedical Research Foundation, Tokyo, pp. 411-417 (1983).
- 12) S.J. Konturek, T. Radecki, T. Brozozowski, I. Piastucki, A. Dembinski, I. Piastucki, Gastric cytoprotection by epidermal growth fac-



- tor, *Gastroenterol.*, **81**, 438-443 (1984).
- 13) S.J. Konturek, M. Cieszkowski, J. Jaworele, T. Brozowski and H. Gregory, Effect of epidermal growth factor on gastrointestinal secretions, *Am. J. Physiol.*, **246**, G580-586 (1984).
- 14) M. Itoh, J. Takashi, I. Shinpei, M. Tadahisa, M. Kei and I. Akira, Experimental and clinical studies on epidermal growth factor for gastric mucosal production and healing of gastric ulcers. *J. Clin. Gastroenterol.*, **10**, S7-S12 (1988).