약제학회지(1997), 제27권 제 2 호
J. Kor. Pharm. Sci., Vol. 27, No. 2, 139-143(1997)

수용액 및 연고기제중의 상피세포 성장 인자의 안정화

김종국† · 김경미 · 권수연
서울대학교 약학대학
(1997년 4월 21일 접수)

Stabilization of Epidermal Growth Factor in Aqueous Solution and Ointment Base

Chong Kook Kim†, Kyoung Mi Kim and Soo Yeon Kwon
College of Pharmacy, Seoul National University
San 56-1, Shinlim-Dong, Kwanack-Gu, Seoul, 151-742, Korea
(Received April 21, 1997)

Epidermal growth factor (EGF) is a mitogen which activate the proliferation of basal cells in skin, which implicate the wound healing in severe skin damage such as burn. To carry out the preclinical test for the pharmacological action of EGF, EGF in transdermal delivery system must be stable. Since EGF is a protein susceptible to proteolysis and unstable in aqueous solution, *in vitro* stabilization of EGF is prerequisite for the formulation. In this study, effect of additives on the stability of EGF is investigated *in vitro*. The stability of EGF in aqueous solution was enhanced with the various water-soluble polysaccharides such as HPMC, sorbitol, mannitol and dextrin. EGF was successfully extracted from the ointment with 5% HPMC solution, and EGF in aqueous solution and ointment was also successfully stabilized with 5% HPMC. The ointments prepared with different amount of EGF were applied on the damaged dorsal skin of rats for the determination of optimal concentration of EGF. The ointment with EGF (10 μg/g) showed good wound healing action on the damaged skin of rats.

Keywords—EGF ointment, Stability of EGF, Ointment, Polysaccharide, Wound healing

상피 성장 인자(epidermal growth factor, EGF)는 마우스의 하악선(submaxillary gland)에서 최초로 분리정제된 분자량이 6 kDa인 단백질로, 신생 백서의 눈뜨기와 치아 발육을 촉진시키는 인자로 알려지기 시작했다. 그 후, 초기 배와 태아의 발육촉진, 위산 분비의 저해, 상처 치료 및 간 재생 효과가 있음이 알려졌고 맥관계 형성에도 관여되는 것으로 보고되었다. EGF는 53개의 아미노산으로 구성되어 있으며 3개의 분자내 disulfide 결합이 존재한다.[1,2] 이 단백질은 포유 동물에 널리 존재하며, 사람의 경우에도 대부분의 조직과 체액에서 발견된다.[3] EGF는 사람의 뇨에서 분리된 urogastron과 같은 물질인 것으로 밝혀졌으며, 이 urogastron은 소화관 궤양 치료에 이용되고 있다.[4] EGF는 표적 세포에 존재하는 수용체를 통하여 작용을 나타내는 폴리펩타이드 호르몬의 일종으로, 생체내 또는 시험관내에서 세포의 증식을 촉진시키는 활성을 갖는다.[2-5] 또한, 피부의 상처가 치료되는 과정에서 EGF가 작용하여 피부의 기저 세포 층에서 세포분열을 촉진시킨다는 보고가 있다.[5,6] 따라서 EGF를 화상이나 산후의 상처등 자연 치유되기에는 시간이 오래 걸리는 상처에 사용할 수 있는 제제로 개발하기 위한 기초 연구가 활발히 진행되고 있다.

그러나, EGF와 같은 단백질은 안정성이 좋지 않아 수용액 중에서 쉽게 분해되므로 보관이나 제제화가 어렵고, 생체 내에서도 효소나 산에 의해 쉽게 공격을 받아 불활성화되므로 제품화할 때는 많은 문제점이 따른다. 따라서 기존의 EGF 제제화에 관한 연구는 주로 수용액 중에 노출된 EGF가 쉽게 분해되어 활성이 감소되는 것을 방지하기 위하여 서방성으로 만들고자 하는 것이었다. Cellulose gel, polymer pellet 또는 al-

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

ginate bead에 봉입하여 서방성으로 하면 EGF의 안정성이 증가되었다는 보고가 있다.[7-9] 그러나 EGF는 상처치료에 이용하기 위하여서는 상처부위에 국소적용하여 빠른 시일 내에 효과를 얻어야 하므로 보관 중에는 안정하게 EGF를 보호하고 적용 시에는 담체로 부터 상처부위로 신속하게 이행되는 제제가 이상적이다. 또한 난용성 약물과 수용성 약물을 동시에 포함하는 제제의 경우 각 약물의 특성을 고려하여 약효를 극대화시킬 필요가 있다. 한편, EGF를 피부에 국소적용할 때에도 안정화제를 첨가하지 않았을 경우 그 상처 치료 효과가 사라진다는 보고가 있으므로[10,11], 투여 부위에서 EGF를 안정화시키는 것 또한 중요한 과제가 될 수 있다.

본 연구에서는 EGF를 이용한 새로운 상처 치료제 개발을 하기 위한 기초 연구로써, 보관 중에 불활성화를 방지할 수 있는 방법을 탐색하고, EGF를 함유한 연고제를 제조한 후 그 연고기제 중에서 EGF를 안정화시킬 수 있는 방법을 모색하고 장기 보관 중의 안정성을 검토하는 것이 주요 연구과제이며 부수적으로 상처 치료 효과도 동시에 평가하고자 하였다.

실험재료 및 방법

시약

EGF는 Calbiochem사의 제품을 사용하였다. Human albumin, thimerosal, ABTS등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였으며, EGF의 분석시 사용된 1차 및 2차 항체는 각각 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, USA) 또는 Pierce사(Rockford, IL, USA)로 부터 구입하였다. 수용성 다당체들은 Sigma사의 제품을 사용하였으며, 다른 일반적인 시약들은 모두 실험에 적합한 등급을 더이상 정제하지 않고 사용하였다.

실험동물은 Sprague-Dawley계 웅성 백서를 국립보건원에서 구입하여 사용하였다.

수용액 중에서 EGF의 안정성

0.5%의 수용성 다당류 중합체가 포함된 EGF 용액 1 μg/m*l*을 37℃와 45℃에서 보관하면서 시간에 따라 농도를 측정하였다. 수용성 다당류로는 sorbitol, mannitol, hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC) 및 dextran을 사용하였다.

연고제의 제조 및 연고제 중에서의 안정성

250 mg의 HPMC를 10 m*l*의 주사용 증류수에 녹인 후 여기에 다시 EGF를 가하여 천천히 흔들어 주어 맑고 투명한 액을 만든다. 5 g의 백색 바셀린과 15 g의 글리콜스테아레이트를 약 70℃의 고온에서 액화시키고 30 g의 프로필렌 글리콜과 혼합하였다. 혼합된 액을 약 45℃정도까지 냉각한 후 EGF와 HPMC를 함유하는 수용액 및 적량의 주사용 증류수와 혼합한 후 서서히 교반하여 유화시킨다. EGF의 최종 농도가 1~100 μg/g가 되도록 연화시킨 후 상온에서 보관하였다. 일정 시간 간격으로 연고 0.1 g을 취하고 1.0 m*l*의 0.5% 다당류 수용액를 가한 후 액을 균일하게 유화시켰다. 37℃에서 30분간 방치한 후 원심분리하고 그 수층을 여과한 후, 그 여액중의 EGF를 정량하였다.

ELISA법에 의한 EGF의 활성 측정

EGF의 분석은 실제 활성을 나타내는 농도에서의 분석이 가능하도록 ELISA를 시행하였으며, 그 방법은 Abe[12] 또는 Hayash[13] 등의 방법에 기초하여 측정법을 개발하였다. 그 개요는 다음과 같다. 마우스로부터 생성된 단일클론 항체를 코팅시킨 polystyrene well에 검액을 넣고 상온에서 90분간 방치하였다. Well에 결합된 EGF에 토끼에서 생성된 항EGF 항체를 가하고 37℃에서 30분간 반응시켰다. 반응하지 않은 항체를 물로 세척하여 제거한 후, horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체를 가하고 37℃에서 30분 방치하였다. 물로 세척한 후 peroxidase의 기질인 ABTS(2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), diammonium salt)와 hydrogen peroxide를 동량 섞은 용액을 가하고 30분 방치한 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 매 실험마다 기지 농도의 EGF용액을 사용하여 검량선을 작성하고, 이 검량선을 이용하여 미지 시료를 정량하였다. 기준액과 시료 모두 각각 3회씩 반복실험을 실시하였다.

EGF연고의 자상에 대한 효능

상처치료 효능은 백서의 피부절개창에 대한 장력을 측정함으로써 상처의 유착도를 판명하였다. 그 방법은 Schulte and Domenjoz의 방법[14]을 일부 개량하여 실시하였다.

체중 150 g 전후의 Sprague-Dawley계 웅성 백서를 1 군당 8-10 마리씩 사용하였다. 동물은 구입후 23±1℃, 습도 50±5%의 조건에서 일주일 이상 적응시킨 후 일반 상태의 이상이 없는 것들만을 사용하였다. 예비사육 및 시험기간 동안 물과 사료를 자유로이 섭취하도록 하였으며, 시험기간 중에는 모든 동물을 개별 cage에서 사육하였다.

백서 등부위의 털을 animal clipper로 깎아내고, 에테르마취하에 70% 알콜로 피부를 소독한 후, 목선에서 3 cm 떨어진 곳에서부터 정중선을 따라 등부위 피부를 외과용 메스로 2 cm 절개한 후 0.5 cm 간격으로 봉합하였다. 감염방지를 위하여 penicillin을 4일간 1일 1회 근육 주사하였다. 연고를 수술 당일로부터 1일 1회 50 mg/site로 도포하였다. 수술 5일후에 봉합사를 제거하였고, 수술 후 7일째 창상부를 포함하는 피부를 적출하여 RHEOMETER(FUDOH KOGYO NMR-3002D)를 이용하여 창상부의 장력을 측정하였다.

결과 및 고찰

EGF 수용액의 안정성에 미치는 첨가제의 영향

일반적으로 단백질의 안정화제로 사용하는 수용성 다당류 4종을 선택하여 EGF 수용액을 37℃에서 보관하면서 안정화효과를 고찰하였다. 사용한 다당류는 mannitol, sorbitol, HPMC 그리고 dextran이었다. Figure 1에 나타나있듯이, 이들을 완충액에 첨가하였을 때 모두 3주까지 Control에 비하여 EGF의 안정성이 증가됨을 알 수 있다. HPMC와 sorbitol은 4주 이후에도 수용성 EGF의 활성을 80% 이상 유지시키므로 안정화작용이 큼을 알 수 있었다. 그 안정화 작용은 HPMC〉sorbitol〉mannitol〉dextran의 순으로 나타났다.

한편, 45℃에서 안정성을 살펴보았을 때, 약 2시간까지는 전혀 EGF활성의 변화가 없었다. 즉, 연고의 제조조건 중 EGF수용액이 혼합되는 높은 온도에서의 안정성을 살펴본 결과 EGF는 연고를 만드는 과정중에서 지용성성분을 먼저 고온에서 완전히 녹여 혼합한 후, 45℃정도에서 EGF를 포함하는 수용액을 혼합하여 연화시킬 경우 활성에 전혀 영향이 없다고 사료된다.

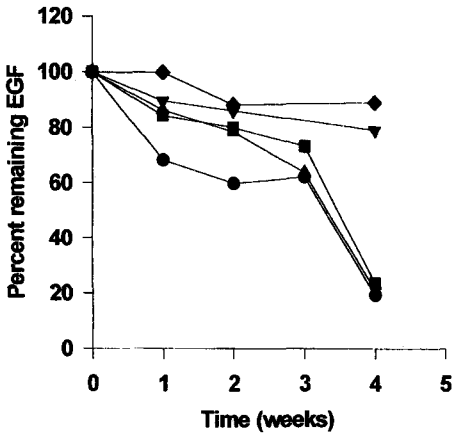

Figure 1 —The stability of EGF in various aqueous solutions.
Key: -◆-; HPMC, -▼-; Sorbitol, -■-; Mannitol, -▲-; Dextran, -●-; Control

Table I—*Recovery of EGF from Ointment with Various Polysaccharide Solution*

polysaccharide[a]	Recovery of EGF[b] (%)
no polysaccaride	50.3
mannitol	38.9
sorbitol	90.5
HPMC	100
dextran	41.3

[a] 0.5% polysaccharide solution in PBS buffer containing 1% human serum albumin
[b] percentage of extrated EGF per added EGF

연고제중에서의 EGF의 추출

수용액중의 안정성 결과를 토대로 연고를 제조하였고 연고 중에 존재하는 EGF를 0.5% 다당류 수용액으로 추출을 시도하였다. 추출된 EGF를 정량한 결과, 그 회수되는 정도가 다당류 존재시 증가되었다. 그 회수량이 증가된 순서는 안정화 작용을 나타낸 순서와 일치하였다(Table I). 따라서, EGF는 연고에서 추출하는 과정에서 쉽게 활성을 잃을 수 있으며, 추출액에 다당류가 존재할 때 그 다당류에 의하여 안정화된다고 사료된다. 특히 HPMC를 사용하여 연고중의 EGF를 추출하였을 때에는 추출된 EGF의 활성저하가 전혀 없었으므로 연고중의 안정성 시험시에 HPMC를 사용하여 추출을 시행하는 것이 바람직하다.

연고제중에서의 EGF의 활성 변화

실험 방법에서 기술하였듯이 HPMC와 몇가지 농도의 EGF가 함유된 연고를 제조하여 상온에서 보관하였다. Figure 2는 1 μg/g의 EGF를 함유하는 연고에서 경시적으로 추출한 EGF의 활성을 표시한 것이다. 연고 제조 후 약 3개월 후 까지 연고의 일부를 취하여 EGF를 추출하여 활성을 측정한 결과, EGF의 활성은 시험기간 동안 거의 변화가 없었다. 따라서 EGF 연고를 효능 실험하는 과정에서 HPMC를 첨가함으로써 EGF의 안정성을 확보할 수 있다는 결론을 얻었다.

EGF를 함유한 연고제의 효능

백서 등부위에 인위적으로 유발한 창상에 대한 EGF 연고의 효능을 창상피부의 장력측정법으로 측정하였다. 각군에 사용한 백서는 8-9 마리였으며 3회 실험한 결과를 무처치군과 비교하였다. 0, 10, 25, 50 그리고 75 μg/g의 연고를 사용하여 실험한 결과를 Fig-

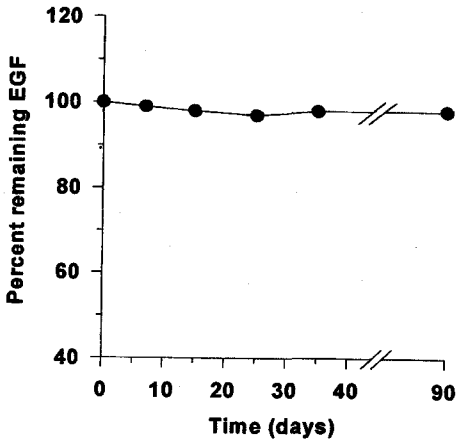

Figure 2 —The stability of EGF in ointment base. The ointment with EGF (10 μg/g) was prepared with ointment base containing 5% HPMC.

ure 3에 나타내었다. 모든 연고에서 EGF는 사용시까지 안정하여 제조직후와 같은 농도의 EGF가 추출됨을 확인하였다. Figure 3에서 보듯이 EGF를 포함하지 않은 연고기제만으로도 창상에 대한 상처치료 효과가 있었다(무처치군에 비하여 148%). EGF를 포함하는 연고를 처치한 창상부위는 대조군에 비하여서는 평균 150-170%, 기제에 비하여는 평균 100-140%의 장력을 나타내었다. 그러나 평균값의 차이가 있음에도 불구하고 개체차이 때문에 통계적으로 유의성있게 큰 차이가 난다고 판정하기는 어렵다. 그러함에도 Figure 3에서 보듯이 장력의 증가 효과는 EGF의 함유량에 따라 차이가 있음을 알 수 있다. EGF를 10 μg/g 함유하는 연고가 평균적으로 가장 효과가 좋았고, 용량이 증가할수록 효과가 감소하는 경향이 있으며 75 μg/g의 EGF를 함유하는 연고의 경우에는 기제와 거의 동등한 정도의 상처치료 효과를 나타낸다. 본 실험결과에 의하면, 고용량의 EGF에 의하여서는 오히려 상처 치료 효과가 감소되는 경향이 있으므로, 상처 치료용 연고에는 10 μg/g의 EGF를 포함시키는 것이 적합하다고 사료된다.

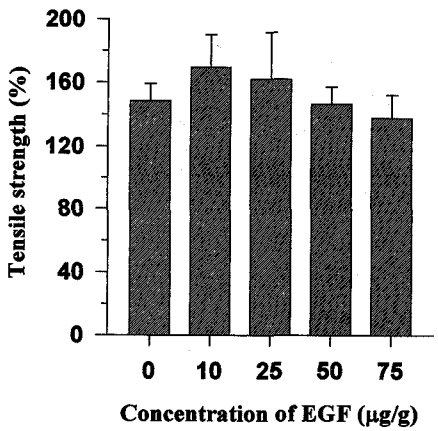

Figure 3—Effect of EGF on the tensile strength at the wounded sites of dorsal skins in rats.

결 론

EGF를 상처 치료용 외용제로 제제화 할 경우 5% HPMC를 첨가하여 EGF를 안정화 시킬 수 있다는 결론을 얻었으며 상처치료 효과는 EGF가 10 μg/g 내외가 함유되도록 만드는 것이 바람직하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 서울대학교 약학대학 약학연구재단의 연구지원으로 수행되었으며 저자는 이에 감사드린다.

문 헌

1) C. R. Savage and S. Cohen, Epidermal growth factor and a new devirative, *J. Biol. Chem.*, **247**, 7609-7611 (1972).
2) C. R. Savage, Jr., T. Inagami and S. Cohen, The primary structure of epidermal growth factor, *J. Biol. Chem.*, **247**, 7612-7621 (1972).
3) G. Carpenter, Epidermal growth factor, *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 193-216 (1979).
4) S. Cohen and G. Carpenter, Human epidermal growth factor and chemical and biological properties, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, **72**, 1317-1321 (1975).
5) G. Carpenter, EGF: new tricks for an old growth factor, *Curr. Opi. Cell Biol.*, **5**, 261-264 (1993).
6) S. E., Lynch, R. B. Colvin and H. N. Antoiades, Growth factors in wound healing, *J. Clin. Invest.*, **84**, 640-646 (1989).
7) G. L. Brown, L. Curtsinger, M. J. Jurkiewicz, F. Nahai and G. Schultz, Stimulation of healing of chronic wounds by epidermal growth factor, *Plastic Reconst. Surg.*, **88**, 189-194 (1988).
8) A. Buckley, J. M. Davidson, C. D. Kamerath, T. B. Wolt and S. C. Woodwatd, Sustrained release of epidermal growth factor accelerates wound repair, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, **82**, 7340-7344 (1985).

9) E. C. Down, N. E. Rovertson, T. L. Riss and M. L. Plunkett, Calcium alginate beads as a slow-release system for delivering antiogenic molecules ***in vivo*** and ***in vitro, J. Cell. Physiol.***, **152**, 422-429 (1992).
10) K. Okumura, Y. Kiyohara, F. Komada, S. Iwakawa, M. Hirai and T. Fuwa, Improvement of wound healing by epidermal growth factor (EGF) ointment. I. Effect of nafamostat, gabexate, or gelatin on stabilization and efficacy of EGF, *Pharm. Res.*, **7**, 1289-1293 (1990).
11) Y. Kiyohara, F. Komada, S. Iwakawa, M. Hirai, T. Fuwa and K. Okumura, Improvement in wound healing by epidermal growth factor (EGF) ointment. II. Effect of proteaase inhibitor, nafamostat, on stabilization and efficady of EGF in burn, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **14**, 47-52 (1991).
12) Y. Abem T. Sagawa, K. Sakai and S. Kimura, Enzyme-linkged immunosorbent asssay (ELISA) for human epidermal growth factor (hEGF), *Clinica Chimica Acta*, **168**, 87-95 (1987).
13) A sensitive enzyme immunoassay for human epidermal growth factor. Determination of hEGF in human serum and urine and pharmacokinetics in mouse, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **12**, 410-415 (1989).
14) R. Schulte and R. Domenjoz, *Med. Pharmacol. Exp.*, **16**, 453-458 (1967).