

## 재조합 인간 상피세포성장인자(DWP401)의 흰쥐에서의 *in vivo*와 *in vitro* 대사

고여욱<sup>#</sup> · 남권호 · 정주영 · 박승국 · 유영효 · 김재환 · 한 건\* · 박명환 · 심창구\*\*  
(주)대웅제약 중앙연구소, \*충북대학교 약학대학, \*\*서울대학교 약학대학

(Received March 14, 1997)

### *In vivo* and *In vitro* Metabolism of Recombinant Human Epidermal Growth Factor (DWP401) in Rats

Yeo Wook Koh<sup>#</sup>, Kouen Ho Nam, Ju Young Jung, Seung Kook Park,  
Young Hyo Yu, Jae Hwan Kim, Kun Han\*, Myung Hwan Park  
and Chang Koo Shim\*\*

R & D Center, Daewoong Pharmaceutical Co., Sunnam, Kyunggi-Do 462-120, Korea  
\*College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea  
\*\*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

**Abstract**—Metabolism of DWP401, recombinant human epidermal growth factor, was examined *in vivo* and *in vitro* in rats. When <sup>125</sup>I-labeled DWP401 was administered at a dose of 50 µg/kg by *i.v.* injection, <sup>125</sup>I-DWP401 was rapidly degraded within 30 minutes above 93%. Thin layer chromatography analysis of urine collected for 24 hr after *i.v.* administration of <sup>125</sup>I-DWP401 showed only one spot on a X-ray film which was considered as diiodo-tyrosine. This result suggests that <sup>125</sup>I-DWP401 was completely digested into free amino acids without any specific intermediate polypeptides. About 42.1% of the administered iodine was recovered in 24 hr. For *in vitro* degradation study, <sup>125</sup>I-DWP401 was added to plasma and tissue homogenates of rats and incubated at 37°C. Almost 98% of the added radioactivity was recovered from the protein fraction (TCA precipitates) in plasma. However, radioactivity recovered from the protein fraction of the liver, kidney, small intestine, stomach and spleen decreased rapidly. For example, the recovery rates of <sup>125</sup>I-DWP401 were 58.6, 63.2, 39.9, 52.9 and 66.8% after 4hrs of incubation in respective organ homogenates.

**Keywords** □ DWP401, recombinant human epidermal growth factor, metabolism, rat

인간 상피세포성장인자(human epidermal growth factor, hEGF)는 53개의 아미노산으로 구성되어 있고 3개의 이황화결합을 가지는 분자량 약 6000 dalton의 단백질이다<sup>1-3)</sup>. hEGF는 포유류 세포중 특히 각종 상피세포의 성장에 유효한 작용을 나타내어 상처 및 화상 등의 손상된 피부의 재생에 유용한 물질<sup>4-7)</sup>로 알려져 있을 뿐 아니라, 위산생성의 억제 및 궤양조직의 재생효과가 탁월하여 위 십이지장궤양 치료에의 적용을

위해서 많은 연구<sup>8)</sup>가 이루어져 왔다. hEGF의 약물동태에 관해서는, 방사선 동위원소로 표지시킨 <sup>125</sup>I-hEGF를 흰쥐에 투여한 후, 각 장기에서의 흡수 분포를 조사한 결과, 간, 신장, 피부, 위, 소장, 지라 등의 조직에 분포되며 이중 간과 신장이 흡수 및 분포의 주요 장기임을 보고하였으며<sup>9)</sup>, 배설의 경우 흰쥐에 50, 75, 100, 500 µg/kg의 용량으로 *i.v.* 투여시 투여용량에 관계없이 hEGF의 요 배설량이 전체 투여량의 1.5% 이하이었다<sup>10)</sup>. 이는 조직으로 흡수, 분포된 hEGF의 대부분이 체내에서 대사 되어짐을 반영하는 것이다. hEGF는 조직 표면의 막에 있는 특징적인 수용체와 결합한 후,

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 0342-41-7700 (팩스) 0342-731-7554

endocytosis에 의해 세포내로 들어간 후 lysosomal enzyme에 의해 가수 분해되는 것으로 알려져 있으며<sup>11)</sup>, 체내대사에 있어서는,  $^{125}\text{I}$ -EGF를 흰쥐에 *in vivo* 투여 후 일정시간 간격으로 채취된 혈장의 크로마토그래프 분석으로부터, 체내에서의  $^{125}\text{I}$ -EGF의 대사 여부를 확인하는 단편적인 실험이 보고되었을뿐<sup>12)</sup>, hEGF 자체의 각 장기별 대사 및 대사체 분석에 대한 전반적인 연구결과는 보고되어 있지 않다. (주)대웅제약에서는 이미 유전자 재조합 기술을 이용하여 hEGF(대웅제약 약칭 DWP401)를 대량으로 생산하는 기술을 확립하였으며, 이로부터 본 연구에 사용될 시료를 충분한 확보할 수 있었다. 본 연구에서는  $^{125}\text{I}$ -DWP401의 *in vivo* 및 *in vitro* 대사연구를 통해서 각 장기별 대사와 DWP401의 대사체를 분석 규명하고자 하였다.

### 실험방법

**실험동물 및 사육조건** - DWP401의 대사연구에 사용한 실험동물로서는 6~8주령의 Sprague-Dawley (SD)계 수흰쥐를 한국 실험동물개발원에서 분양받아 사용하였다. 흰쥐는 실험전 약 1주일간 순화시켰으며 건강한 동물만을 실험에 사용하였다. 시험기간 중 사육 환경은 통상적인 조건 (온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $60 \pm 10\%$ )을 유지하였고, 사료와 물을 자유섭취 시켰다.

**시험물질** - 시험물질인  $^{125}\text{I}$ -DWP401은 (주)대웅제약 중앙연구소에서 순도 99.5% 이상으로 정제된 DWP401시료를 방사성 동위원소인  $^{125}\text{I}$ -Na (Amersham, IMS30)로 표지시켜 제조하였다. 방사선 표지는 Pierce사의 N-chloro-benzensulfonamide sodium salt를 이용한 iodination 방법을 이용하였다 (Pierce, 28665X). DWP401에 결합되지 않은  $^{125}\text{I}$ -Na는 Sephadex G-25 column으로 제거하였고,  $^{125}\text{I}$ -DWP401은 void volume에서 용출되었다. 표지된  $^{125}\text{I}$ -DWP401의 비활성도는  $2 \mu\text{Ci}/\text{nmol}$ 이었으며, 겔 여과 크로마토그래피에 의한 분석 결과 방사선량의 96% 이상이 단백질 분획에서 나타났으며 15% trichloroacetic acid에 의한 침전 결과 95% 이상의 방사선량이 침전되었다.

### DWP401의 *in vivo* 대사

**$^{125}\text{I}$ -DWP401의 투여** - 평균 중량 230 g의 Sprague-Dawley계 수흰쥐를 모든 실험에 사용하였다. 흰

쥐의 마취는 diethylether를 숨에 적신 후 가볍게 마취 시켰다.  $^{125}\text{I}$ -DWP401은  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$  ( $4.55 \mu\text{Ci}$ )의 용량으로 흰쥐의 경정맥에 bolus injection 하였다.

**$^{125}\text{I}$ -DWP401의 *in vivo* 주사후 혈장 및 요의 수집** - 혈장 샘플의 수집은  $^{125}\text{I}$ -DWP401을 *in vivo*로 주사한 후 2.5분, 30분, 60분, 120분 지난 다음 대퇴동맥 cannula에서 각각  $500 \mu\text{l}$ 씩 채취하고 heparinized saline ( $100 \text{ IU}/\text{ml}$ )을 cannula에 소량 주입하였다. 채취된 혈액은 원심분리하여 상정액을 취하고  $-20^\circ\text{C}$ 에 보관하였다. 요의 수집은  $^{125}\text{I}$ -DWP401을 *in vivo* 주사후 metabolic cage를 이용하여 투여 후 0-8 시간, 그리고 8-24 시간동안에 배설된 요를 수집한 후 이를  $-20^\circ\text{C}$ 에 보관하였다.

**$^{125}\text{I}$ -DWP401의 *in vivo* 주입후 간 및 신장 균질액의 조제** - 간 및 신장 균질액은  $^{125}\text{I}$ -DWP401을 *in vivo* 주사 후 2.5분, 60분 경과 후 흰쥐로부터 간과 신장을 각각 분리한 후 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0)으로 세척하고 각 조직에 3배량의 PBS 용액을 가한 다음 homogenizer (Ika-Labortechnik, Ultra-turrax T 25)를 이용하여 완전히 균질화 시켰다. 그후 4500 rpm (Joan cetrifuge)으로 원심분리한 후 상정액을 취하여  $-20^\circ\text{C}$ 에 보관하였다.

**혈장, 요, 간 및 신장 균질액내  $^{125}\text{I}$ -DWP401 대사체의 겔 여과 크로마토그래피 분석** -  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$  용량의  $^{125}\text{I}$ -DWP401을 *in vivo* 투여시킨 흰쥐의 혈장, 요, 간 및 신장균질액을 Sephadex G-25 column ( $1.6 \times 40 \text{ cm}$ )을 이용한 FPLC system (Pharmacia Fine Chemicals., Uppsala Sweden)을 적용하여 분석하였다. 평형화 및 완충용액으로서 1M urea, 0.1% Triton X-100을 포함하는 1M acetic acid 용액을 사용하였다. 시료  $150 \mu\text{l}$  당  $100 \mu\text{l}$ 의 용출용액을 잘 섞어준 후 그중  $200 \mu\text{l}$ 를 컬럼에 주입하였다. 유속은  $0.3 \text{ ml}/\text{min}$ 으로 하였으며, fraction당  $900 \mu\text{l}$ 를 수집한 후 각 분획의 방사선량을  $\gamma$ -counter (Packard, Cobra II)로 측정하였다.

### DWP401의 *in vitro* 대사

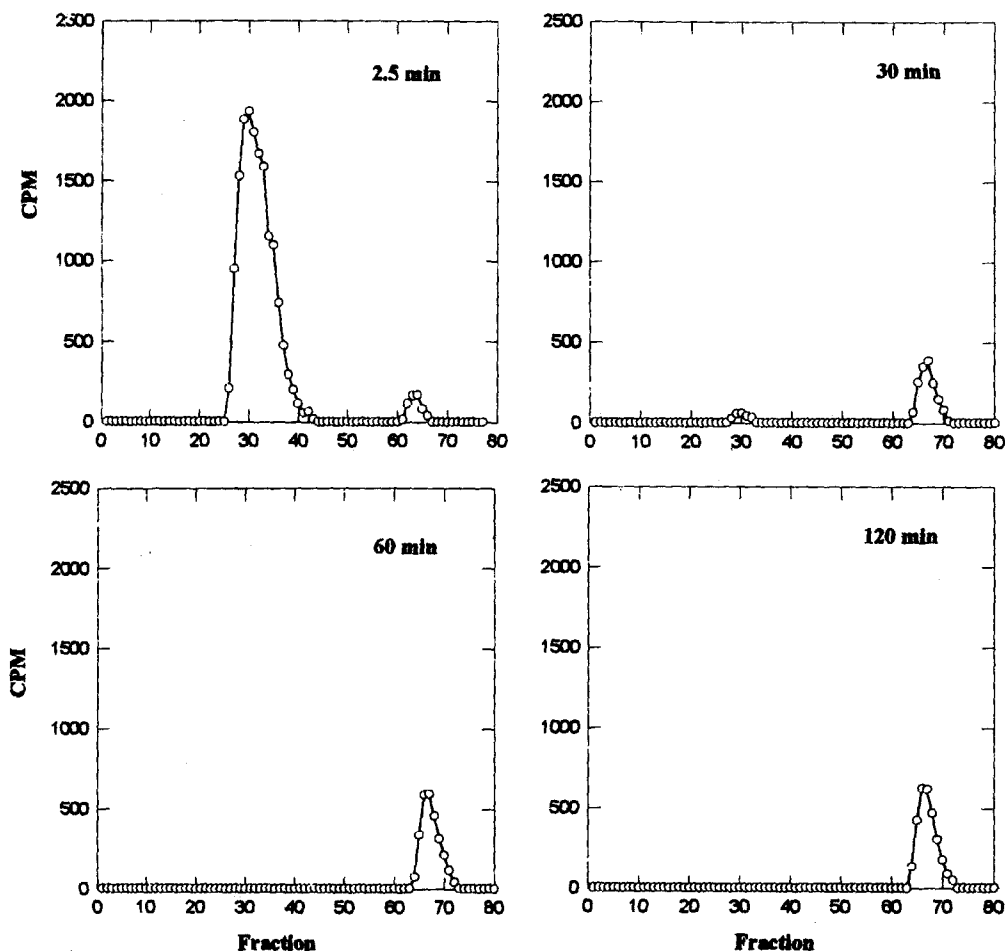
**흰쥐 조직 균질액에 대한 DWP401의 대사** - 3 마리의 SD계 수흰쥐를 16-18시간 동안 굶긴 후 혈액을 채취한 후 해부하여 간, 신장, 위, 소장, 지라의 각 장기를 분리하였다. 흰쥐로부터 적절한 각각의 장기 3개를 혼합한 후 장기 무게 3배 부피의 ice-cold  $0.2 \text{ M KCl}$  용액을 부가한 후 homogenizer로 조직을 완전히 균질화

시켰다. 그 후 4000 rpm에서 20분간 4°C하에서 원심분리한 후 상정액만을 취하여 -20°C에 보관하였다. 대사실험시 상정액을 4°C에서 녹인 후 37°C에서 10분간 방치하고 각 조직균질액 100 µl를 취하여 10 ng의 <sup>125</sup>I-DWP401(0.013 µCi)에 부가하였다. 그 후 37°C에서 0분, 5분, 15분, 30분, 60분, 120분 동안 반응시킨 후 ice bath에서 반응을 중지시키고 TCA 침전법을 수행하였다.

**TCA 침전 방법** - TCA 침전법은 Kim 등<sup>12)</sup>의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 각 조직 균질액 100 µl에 1 ml의 ice-cold 15% (w/v) trichloroacetic acid (TCA)를 첨가한 후 완전히 섞은 후 0°C에서 30분간 방치하였다. 그 후 4°C하에 12000 rpm에서 5분간 원심분

리하여 상정액을 침전물로부터 완전히 분리시킨 후 상정액과 침전물 분획에 대해 counter로 방사선량을 측정하여 각 침전물에 있는 DWP401의 방사능의 퍼센트를 계산하였다.

**Thin Layer Chromatography (TLC) 에 의한 요중 대사체 분석** - <sup>125</sup>I-DWP401을 50 µg/kg의 용량으로 흰쥐에 i.v.주사 후 8 시간, 24 시간 동안 수집된 뇨중에 존재하는 <sup>125</sup>I-DWP401 대사체를 silica로 coating 된 20×20 cm TLC plate(Merck, ART.5735)로 분석하였다. 각각 샘플 1 µl 및 3 µl씩 점적하였고, control로서는 <sup>125</sup>I-DWP401, <sup>125</sup>I-Na, monoiodo tyrosine, diiodo-tyrosine을 포함한 free 아미노산을 사용하였다. 전개용매 조성으로는 butanol : acetic acid : water의



**Fig. 1**— Elution profiles of <sup>125</sup>I-DWP401 in plasma on a Sephadex G-25 column (1.6×40 cm) at various sampling times after i.v. administration of <sup>125</sup>I-DWP401 in rats. In each case the first peak, near the fraction 30, represents intact <sup>125</sup>I-DWP401 and second peak, near the fraction 68, metabolites of <sup>125</sup>I-DWP401.

비를 50:10:40으로 이루어진 혼합 용액을 사용하였다. 전개 후에 TLC plate를 완전히 말린 후 autoradiography cassette(Fisher Scientific, FRAC 810)를 이용하여 X-ray 필름(Kodak, XAR-5)에 3~4일간 감광시켜 대사체를 확인 하였다. 그후 닌히드린 용액으로 발색시킨 control 아미노산과 X-ray로 film 상에 나타난 대사체 spot을 비교 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**DWP401의 *in vivo* 대사** - 흰쥐 혈장에서의 <sup>125</sup>I-DWP401 대사-<sup>125</sup>I-DWP401을 흰쥐에 *i.v.* 투여후 시간별로 채취된 혈장을 Sephadex G-25 gel filtration 방법으로 분석한 결과를 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 1에서 첫번째 피크에 해당되는 intact <sup>125</sup>I-

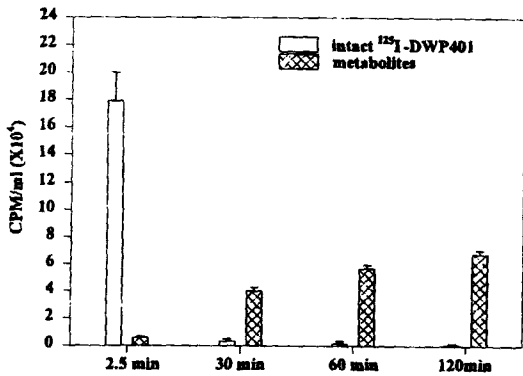


Fig. 2 - Plasma cpm levels after *i.v.* dosing of 50 g/kg <sup>125</sup>I-DWP401 (4.55 Ci) in rats (n=3). Each bar indicates mean ± SE.

DWP401은 void volume에 해당되는 30번 분획근처에서 용출되었고, 두번째 피크인 <sup>125</sup>I-DWP401의 대사체는 68번 분획에서 분리되었다. Fig. 2에서 <sup>125</sup>I-DWP401에 해당되는 cpm 면적비는 두피크의 cpm 면적의 합에 대해 시간이 경과함에 따라 감소되었고, <sup>125</sup>I-DWP401의 대사체의 면적비는 점점 증가함을 나타내었다. 그런데 *in vitro* 상태에서 흰쥐의 혈장에 <sup>125</sup>I-DWP401을 첨가한 후 37°C 에서 반응시킨 경우에는 4시간이 경과하도록 99% 이상의 방사선량이 15% TCA에 의한 침전물에서 나타나는 것으로 보아 (Fig. 6 참조), Fig. 1에서 투여후 60분 만에 혈장에 존재하는 거의 모든 DWP401이 분해된 형태로 나타나는 현상은 혈장중의 단백질분해효소에 의한 DWP401의 분해가 아니라, DWP401이 혈장 이외의 장기에 이행되어 분해된 후 다시 혈장으로 유리되어 나왔다는 것으로 볼 수 있다. 시간별로 수집된 혈장의 난위 부피 당 총 cpm을 측정된 결과, 투여후 30분에 최소 수치를 보였으며 시간이 경과함에 따라 다시 소규모로 증가되는 것이 관찰되었는데 (Fig. 2), 이것은 투여후 30분 이내에 DWP 401이 각 장기에 흡수 분포되며 그 이후에는 분해된 대사체가 각 장기에서 혈장으로 배출되어지는 것으로 해석된다. 또한 30분 경과된 혈장내 intact <sup>125</sup>I-DWP 401은 약 6.9±1.9% 로 존재하였는데 이와같은 결과는 50 µg/kg 용량의 <sup>125</sup>I-DWP401을 *i.v.* 투여시 30분 이내에 신속히 분포되어 93% 이상이 완전히 대사되어짐을 의미한다. 한편 DWP401 대사체 피크는 free <sup>125</sup>I의 용출위치와 같은 위치에서 분리되었으며 (Fig. 1 참조), 시간별 혈장 샘플을 SDS-polyacrylamide gel 전기영

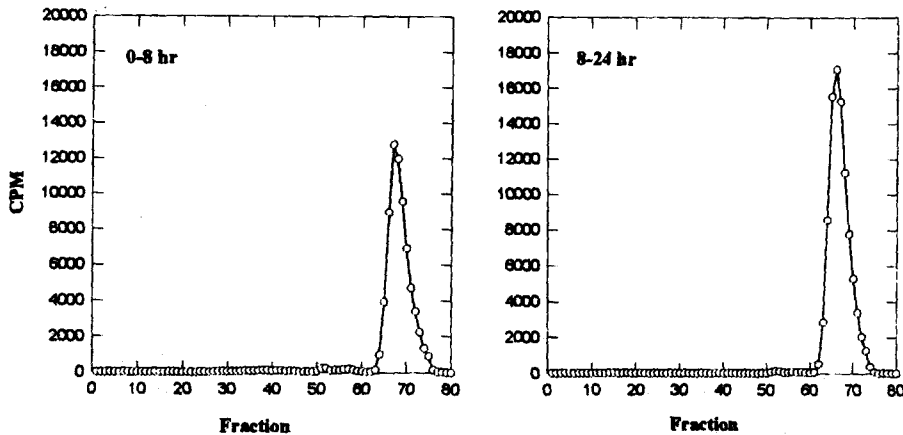


Fig. 3 - Elution profiles of <sup>125</sup>I-DWP401 in urine on a Sephadex G-25 column (1.6×40 cm). Each urine samples were collected during 0-8 hr and 8-24 hr after *i.v.* administration of <sup>125</sup>I-DWP401 in rats.

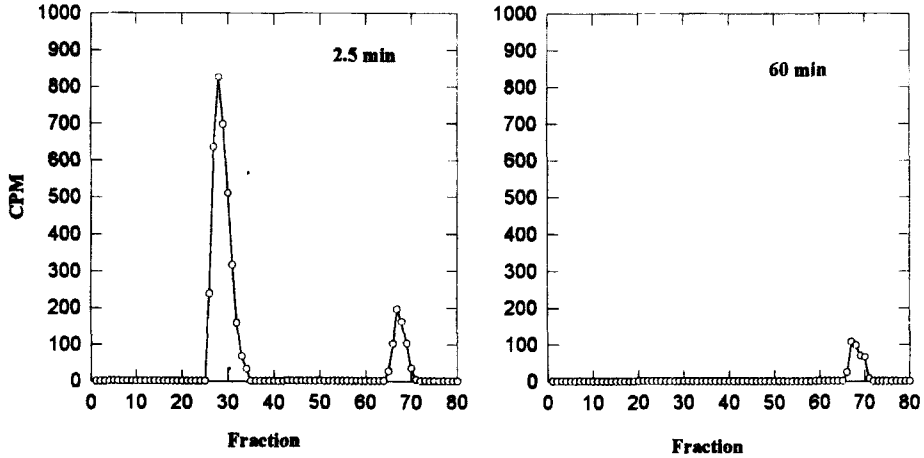


Fig. 4 — Elution profiles of <sup>125</sup>I-DWP401 in liver homogenates on a Sephadex G-25 column (1.6×40 cm) after *i.v.* injection of <sup>125</sup>I-DWP401 in rats. In each case the first peak represents intact <sup>125</sup>I-DWP401 and second peak metabolites of <sup>125</sup>I-DWP401.

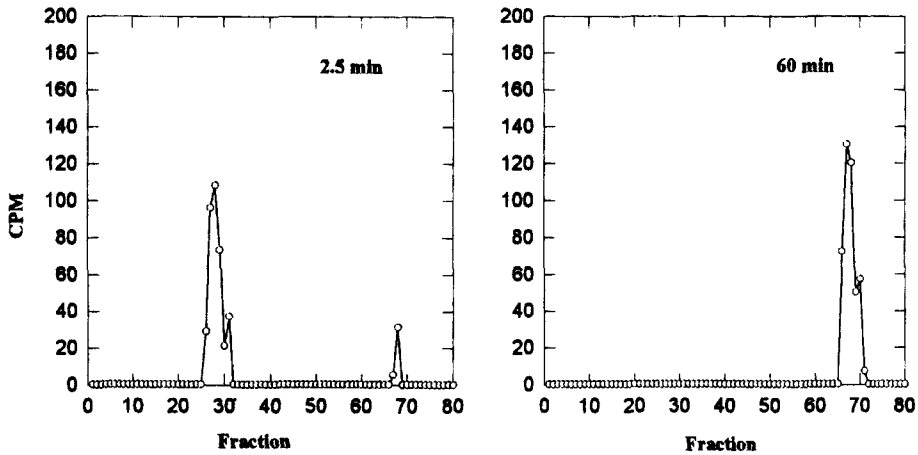


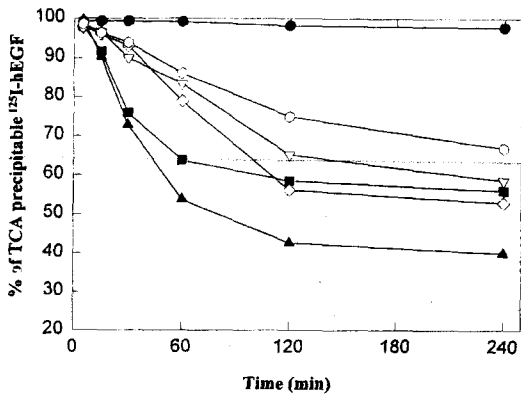
Fig. 5 — Elution profiles of <sup>125</sup>I-DWP401 in kidney homogenates on a Sephadex G-25 column (1.6×40 cm) after intravenous injection of <sup>125</sup>I-DWP401 in rats. The first peak represents intact <sup>125</sup>I-DWP401 and second peak metabolites of <sup>125</sup>I-DWP401.

동한 후 autoradiography한 결과에서도 분자량 700 dalton 이상 크기의 어떤 대사체도 확인되지 않았다(미 발표). 이와같은 결과는 체내에서 DWP401이 분해될 때 일정한 형태의 펩티드 중간체를 거쳐서 분해가 진행되는 것이 아니라, 불특정의 단백질 분해효소에 의한 무작위적인 분해가 이루어지는 것으로 사료된다.

**흰쥐 요에서의 <sup>125</sup>I-DWP401 대사** - <sup>125</sup>I-DWP401을 흰쥐에 *i.v.* 투여후 8시간까지 및 8시간 이후 24시간까지 배설된 요 시료를 Sephadex G-25 겔 여과한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 24시간 경과된 후의 요시료에는 <sup>125</sup>I-DWP401 대사체가 99.3±0.1% 이상 존재하였

고, 시간이 경과됨에 따라 대사체의 배설이 증가됨을 확인할 수 있었다. 또한 투여 24시간 경과후의 흰쥐에 투여된 방사능 총배설율은 42.1±2.4%를 나타내었다.

**흰쥐의 간 및 신장에서의 <sup>125</sup>I-DWP401 대사** - 흰쥐에 <sup>125</sup>I-DWP401을 *i.v.* 투여하고 2.5분, 60분 경과후 간과 신장을 적출하고 homogenation 하여 그 상정액을 겔 여과 크로마토그래피로 분석한 결과를 Fig. 4와 Fig. 5에 나타내었다. 투여 2.5분 후에는 간과 신장에서 약 80% 이상이 intact한 <sup>125</sup>I-DWP401의 형태를 유지한 반면, 60분 경과시 거의 100%의 <sup>125</sup>I-DWP401이 분해되었음을 알 수 있었다. 이는 <sup>125</sup>I-DWP401이 흰쥐의

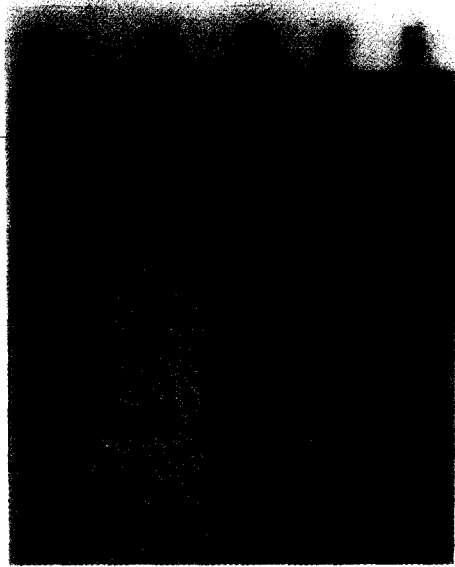


**Fig. 6**—Degradation profile of <sup>125</sup>I-DWP401 on *in vitro* metabolic reactions with tissue homogenates at 37°C. Each point is mean of duplicate reactions.  
 ●: Plasma, ○: Spleen, ■: Kidney, ▽: Liver, ◇: Stomach, ▲: Small intestine

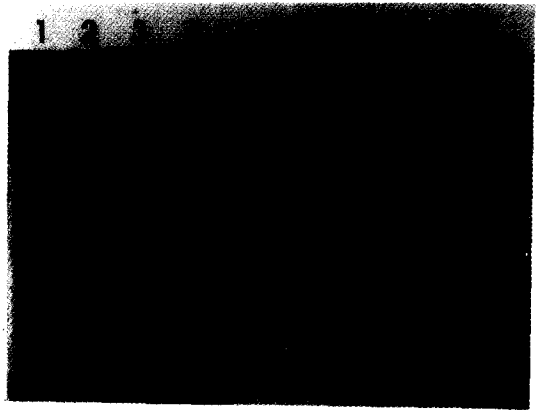
주요 분포 장기인 간과 신장에서 직접적으로 대사가 되어짐을 반영한 결과이다.

**DWP401의 *in vitro* 대사** - 흰쥐의 각 장기를 적출하고 균질화한 후 그 상등액에 <sup>125</sup>I-DWP401을 처리하여 분해되는 정도를 시간별로 관찰하였다. 각 장기 균질액에 <sup>125</sup>I-DWP401을 섞어준 후 즉시 15% TCA로 침전시켰을 때, 약 95% 내외의 침전율을 나타내었기 때문에 이 수치를 intact <sup>125</sup>I-DWP401의 총량으로 놓고 각 균질액 <sup>125</sup>I-DWP401의 TCA 침전 방사선량의 퍼센트를 경과시간에 대하여 분석한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 혈장에서의 분해는 거의 이루어지지 않았으며, 4시간 경과후에도 넣어준 방사선량의 약 99.2%가 15% TCA 조건에서 침전되었다. 그렇지만 간, 신장, 비장, 위, 소장조직에서는 모두 시간이 경과함에 따라 대사가 진행되어 15% TCA에 의하여 침전되는 <sup>125</sup>I-DWP401의 방사능은 감소하였으며, 4시간 반응후 침전되는 방사능량은 각각 58.6, 63.2, 66.8, 52.9, 39.9%를 나타내었다. 특히 간과 신장이 흡수분포에 있어서 주요 장기로 알려져 있지만 대사에 있어서는 오히려 소장에서 더욱 활발한 대사가 이루어졌다. 이러한 결과는 <sup>125</sup>I-DWP401의 대사는 조직 특이적으로 이루어지지 않으며 대사의 주요 장기로서 간과 신장뿐 아니라 소장을 포함한 대부분의 장기조직에서 활발히 대사가 이루어짐을 반영하는 것이다.

**요중 DWP401 대사체 확인 및 분석** - TLC에 의한 요중 대사체를 분석한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. DWP401 투여후 8시간까지 및 8시간에서 24시간 사이



**Fig. 7**—Thin layer chromatography of <sup>125</sup>I-DWP401 metabolites in urine after *i.v.* administration at 50 µg/kg dose in rats. The TLC plate was autoradiographed for 4 days. Lane 1, <sup>125</sup>I-DWP401; lane 2 and 4, Urine collected for 8hr after *i.v.* administration in rat, 1 µl and 3 µl; lane 35, Urine collected for 8hr-24hr after *i.v.* administration in rat, 1 µl and 3 µl



**Fig. 8**—Thin layer chromatography of <sup>125</sup>I-DWP401 metabolites in urine after *i.v.* administration in rats. The TLC plate, lane 5 to 8, was autoradiographed on a X-ray film and lane 1 to 4 was stained with ninhydrin solution. Lane 1: leucine; lane 2: tyrosine; lane 3: moniodo-tyrosine; lane 4: diiodo-tyrosine; lane 5: <sup>125</sup>I-DWP401; lane 6: urine collected during 8hr after *i.v.* injection; lane 7: urine collected during 8-24hr after *i.v.* injection; lane 8: <sup>125</sup>I-Na.

에 배설된 요 1  $\mu$ l, 3  $\mu$ l를 TLC 분석한 결과 DWP401 대사체는 단일한 형태의 한가지의 spot만이 검출되었다. 이는 DWP401이 특이한 중간 단계의 펩티드 없이 완전히 대사되어 요로 배설되어지는 것으로 사료된다. 또한 요중의 DWP401 대사체를 표준물질로서 tyrosine, monoiodo-tyrosine, diiodo-tyrosine과 함께 TLC로 분리한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 요중의 DWP401 대사체를 autoradiography로 분석한 결과와 표준물질과의 발색 spot의 위치를 비교한 결과, 요중의 DWP401 대사체의 Rf값은 약 0.67로서 diiodo-tyrosine과 동일한 위치에서 나타났다. 따라서 TLC에 의해 확인된 대사체는 두개의  $^{125}$ I가 방사선 표지된 tyrosine으로 추정되었다. 아미노산 53개로 구성된 DWP401은 tyrosine이 5개 존재하며 이들이 아미노산 서열의 전 범위에 걸쳐 존재하므로 (아미노산 서열 13, 22, 29, 37, 44번), 분해물이 유리아미노산 형태인  $^{125}$ I-diiodo-tyrosine으로 존재한다는 것은 DWP401이 체내에서 완전히 분해되어 유리아미노산의 형태로 요로 배설되어짐을 제시하는 것이었다.

결 론

흰쥐를 이용한 DWP401의 *in vivo* 및 *in vitro* 대사 연구에서 다음과 같은 연구 결과를 얻었다.

1. *in vivo* 대사 연구에서,  $^{125}$ I-DWP401을 50  $\mu$ g/kg의 용량으로 *i.v.* 투여하여 2.5분, 30분, 60분, 120분 경과 후 혈장을 분석한 결과, 투여후 30분 이내에 93% 이상이 분해되었으며, 60분 이후에는 intact한  $^{125}$ I-DWP401을 거의 검출할 수 없었는데, 이는 투여된  $^{125}$ I-DWP401이 흡수, 분포의 주요 장기인 간 및 신장 등 체내조직에 의하여 직접적으로 대사되어진 결과이다.
2.  $^{125}$ I-DWP401 투여후 24시간까지 배설된 요를 종합하여 분석한 결과, 이 기간중 투여된 방사능량중 42.1%가 요중으로 배설되었으며, 그중에서 intact한 형태로 배설되는 DWP401은 0.7% 내외로 매우 낮은 수치를 확인하였다. 또한 DWP401 대사체는 특정한 폴리펩티드 절편과 같은 중간체 없이 체내에서 완전히 분해되어 유리아미노산의 형태로 배설되어짐을 확인하였다.
3.  $^{125}$ I-DWP401의 *in vitro* 대사 실험결과 흡수, 분포의 주요 장기인 간과 신장 뿐 아니라 비장, 위, 소장 등의 대부분의 조직에서 대사가 활발히 이루어짐을 확인하였고, 특히 소장에서 더욱 대사가 잘 이루어짐을 알

수 있었다.

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**, 1555-1562 (1962).
- 2) Savage, C. R., Hash, J. H., and Cohen, S. : Epidermal growth factor location of disulfide bond, *J. Biol. Chem.* **248**, 7669-7672 (1973).
- 3) Savage, C. R., Inagami, T., and Cohen, S. : The primary structure of epidermal growth factor, *J. Biol. Chem.* **247**, 7612-7621 (1972).
- 4) Cohen, S., and Elliot, G. A. : The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse, *J. Invest. Dermatol.* **40**, 1-5 (1963).
- 5) Nill, M., Ryan, G. B., and O'Brien, B. M. : The effect of epidermal growth factor on wound healing in mice, *J. Sug. Res.* **33**, 164-168 (1982).
- 6) Rown, G. L., Nanney, L. B., and Griffen, J. : Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor, *N. Engl. J. Med.* **321**, 76-79 (1989).
- 7) Brown, G. L., Curtsinger, L., and Brightwell, J. R. : Enhancement of epidermal regeneration by biosynthetic epidermal growth factor, *J. Exp. Med.* **163**, 1319-1324 (1986).
- 8) Itoh, M., Joh, T., Imai, S., Miyamoto, T., Matsusako, K., Iwai, A., Katsumi, K., Endo, K., and Takeuchi, T. : Experimental and clinical studies on epidermal growth factor for gastric mucosal protection and healing of gastric ulcers, *J. Clin. Gastroenterol.* **10** (suppl.1), S7-S12 (1988).
- 9) Jorgensen, P. E., Poulsen, S. S., and Nexø, E. : Distribution of *i.v.* administered epidermal growth factor in the rat, *Regulatory Peptide* **23**, 161-169 (1988).
- 10) Murakami, T., Kishimoto, T., Higashi, Y., Amagase, H., Hayashi, T., Fuwa, T., and Yata, K. : Biliary and urinary excretions of immunoreactive human epidermal growth factor after intravenous administration in rats, *Int. J. Pharm.* **49**, 173-178 (1989).

- 11) Dunn, W. A., and Hubbard, A. L. : Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by hepatocytes in the perfused rat liver: Ligand and receptor dynamics, *J. Cell. Biol.* **98**, 2148-2159 (1984).
- 12) Kim, D. C., Sugiyama, Y., Fuwa, T., Sakamoto, S., Iga, T., and Hanano, M. : Kinetic analysis of the elimination process of human epidermal growth factor(hEGF) in rats, *Biochem. Pharm.* **38**(12), 241-249 (1989).