

## 천연형 인성장호르몬 DA-3002의 항원성

강경구\* · 백남기 · 김원배 · 양중익

동아제약(주)연구소

### Antigenicity of DA-3002, a Genuine Recombinant Human Growth Hormone, in Guinea Pigs and Mice

Kyung Koo KANG\*, Nam Gi BAIK, Won Bae KIM and Junnick YANG

47-5, Sanggal-ri, Kiheung-up, Youngin-gun, Kyunggi-do, Korea 449-900

Research Laboratories, Dong-A Pharmaceutical Co. Ltd.

(Received October 11, 1995; accepted November 21, 1995)

**Abstract**—DA-3002 is a genuine human growth hormone produced by Dong-A Pharm. Co. Ltd. research laboratory using recombinant DNA technic. In this study, antigenic potential of DA-3002 was examined by active systemic anaphylaxis(ASA) in guinea pigs, mouse-rat passive cutaneous anaphylaxis(PCA) and passive hemagglutination(PHA) test as a part of safety research. DA-3002 induced anaphylactic shock in ASA test using guinea pigs immunized with DA-3002 alone or DA-3002 incorporated into Freund's complete adjuvant(FCA) when challenged with 10 times higher dose of anticipated clinical dose of DA-3002. In the mouse-rat PCA and PHA test, DA-3002 also showed positive results. DA-3002, therefore, was considered to produce IgE, IgG and/or IgM in mice. The results of this study were similar to those of the other human growth hormones and these positive results were thought to be caused due to the fact that both DA-3002 and the other human growth hormones were heterogenous proteins to guinea pigs and mice. Considering the fact that DA-3002 is a genuine human growth hormone of which structure is identical with indigenous human growth hormone, DA-3002 is thought not to cause immunological problems in clinical use.

**Keywords** □ DA-3002, recombinant human growth hormone, antigenicity

DA-3002는 동아제약(주) 연구소에서 유전자재조합기술을 이용하여 생산한 천연형 인성장호르몬(rhGH)으로서 사람에서의 인성장호르몬과 동일한 아미노산배열로 구성되어 있다. 일반적으로 성장호르몬은 뇌하수체 전엽에서 분비되는 펩타이드호르몬의 일종으로 골, 연골 등의 성장을 촉진시킬 뿐 아니라 근육의 지방분해촉진 및 단백질합성촉진 등의 대사작용을 나타내어 성장호르몬 결핍성 왜소증, Turner 증후군 등에 사용된다(Beck 등, 1957). 인성장호르몬은 Raben(Raben, 1958)이 처음으로 성장호르몬이 결핍된 소아에서 성장촉진효과를 보고한 이래, 사체의 뇌하수체에서 추출한 호르몬을 성장호르몬 결핍성 왜소증의 치료제로 사용하였으나 공급부족, 이물질 혼입과 같은 오염문제 및 장기투약한 일부 환아에서 Creutzfeldt-Jakob 증후군에 의한 사망이 보고되면서 1985년 이후 사용이 중지되었다(Preece, 1986).

그러나, 1970년대 후반부터 유전공학 기법에 의하여 methionyl-hGH (Somatrem)이 합성되고 대량생산이 가능케 되면서(Goeddel 등, 1979) 1981년 이후 임상에 널리 사용되고 있다(Kaplan 등, 1986, Flodh, 1987). 그러나 이와같은 재조합 인성장호르몬은 천연형과의 구조적차이에 기인한 항체발현에 관한 보고가 종종 발표되면서(Tylstrom 등, 1986; Milner 등, 1987) 현재의 천연형 rhGH (Somatropin)의 사용이 점차 증가되고 있는 추세이다. 본 연구에서는 천연형 인성장호르몬인 DA-3002의 안전성연구의 일환으로 guinea pig을 이용한 능동 전신성 아나필락시스 시험과 mouse-rat 수동 피부 아나필락시스 시험 및 간접 적혈구 응집반응시험을 실시하여 DA-3002의 항원성을 평가하였다.

#### 실험방법

#### 시험물질

\*To whom correspondence should be addressed.

본 연구소 생물공학연구실에서 생산한 DA-3002(lot No. TS-9405)를 사용하였으며, 양성대조물질로는 ovalbumin(OVA, Sigma)를 사용하였다. 면역보조제는 기니픽을 이용한 시험에서는 Freund's complete adjuvant (FCA, Difco)를, 마우스를 이용한 시험에서는 aluminium hydroxide gel(Alum, Serva)을 각각 사용하였다. 그외에 Evan's blue(Sigma), 생리식염수(대한약품공업(주)), 매체대조물질인 glycine phosphate buffer(pH 6.8), 면양적혈구(Korea Media Corp.), glutaraldehyde(Sigma), PBS (Sigma) 등을 사용하였다.

#### 사용동물

C57BL/6계 수컷 마우스(사용시 체중 20~30 g, 5주령), Sprague-Dawley계 랫드(사용시 체중 450~500 g, 12주령) 및 Hartely계 guinea pig(사용시 체중 300~400 g, 5주령)을 일본 Charles River사로부터 구입하여 1주 이상 검역 및 예비사육후에 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 시험기간중 동물은 온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $55 \pm 15\%$ , 환기횟수 15~20회/시간, 조명시간 12시간(08:00~20:00)의 조건으로 설정된 사육실에서 사육하였다. 음수는 자외선멸균 수도수를, 사료는 랫드와 마우스에는 purina 시험동물용 사료(방사선멸균제)를 guinea pig에는 guinea pig용 고형사료(Oriental Yeast Co. Ltd)를 자유섭취시켰다.

#### 능동 전신성 아나필락시스(Active systemic anaphylaxis) 감작

군당 6마리의 guinea pig에 1군에는 매체대조물질, 2군에는 DA-3002 0.17 IU/kg, 3군에는 DA-3002 1.7 IU/kg의 감작항원을 주 2회씩 3주간 개체당 0.5 ml의 액량

으로 5개소에 피하로 분할 투여 하였다. 4군에는 DA-3002와 FCA 동량 혼합액 1.7 IU/kg을, 5군에는 OVA와 FCA 동량 혼합액 1 mg/head를 주 1회씩 3주간 동일한 방법으로 감작하였다(Table I).

#### 유발

최종감작 3주후에 각군의 유발항원을 정맥내로 투여하여 ASA 반응을 관찰하였다. 증상은 유발항원 주사 후 2시간 동안 입모, 재채기, 배뇨, 호흡곤란, 경련, 기침, 폐사 등을 기록하여 아래의 기준에 준하여 판정하였다.

Grade 0(-): 무증상

I(±): Mild: 1~4의 증상

II(+): Moderate: 1~10의 증상

III(++): Severe: 1~19의 증상

IV(+++): Death: 사망

0.무증상, 1.restless, 2.piloerection, 3.tremor, 4.rubbing or licking nose, 5.sneezing, 6.coughing, 7.hyperpnea, 8.urination, 9.evacuation, 10.lacrimation, 11.dyspnea, 12.rhonchus, 13.cyanosis, 14.staggering gait, 15.jumping, 16.gasping and writhing, 17.convulsion, 18.side position, 19.Cheyne-Stokes respiration, 20.death.

#### Mouse-rat PCA(Passive cutaneous anaphylaxis) 감작

군당 6마리의 C57BL/6계 마우스에 1군에는 매체대조물질, 2군에는 DA-3002 0.17 IU/kg, 3군에는 DA-3002 1.7 IU/kg의 감작항원을 주 2회씩 3주간 피하로 투여하였다. 4군에는 DA-3002와 Alum 동량 혼합액 1.7 IU/kg을, 5군에는 OVA와 Alum 동량 혼합액 5 µg/head를 주 1회씩 3주간 복강내로 투여하여 감작하였다(Table II). 투여액

**Table I.** Experimental design for active systemic anaphylaxis test of DA-3002 in guinea pigs.

Group	No. of animals	Sensitizing Ag <sup>a</sup>	Route of sensitization	Challenging Ag
1	2	Vehicle <sup>b</sup>	S.C.	Vehicle
	2			DA-3002, 1.7 IU/kg
	2			OVA, 5 mg/head,
2	6	DA-3002, 0.17 IU/kg	S.C.	DA-3002, 1.7 IU/kg
3	6	DA-3002, 1.7 IU/kg	S.C.	DA-3002, 1.7 IU/kg
4	6	DA-3002+FCA, 1.7 IU/kg	S.C.	DA-3002, 1.7 IU/kg
5	6	OVA+FCA, 1 mg/head	S.C.	OVA, 5 mg/head

<sup>a</sup>Antigen, <sup>b</sup>Glycine phosphate buffer.

**Table II.** Experimental design for mouse-rat passive cutaneous anaphylaxis reaction.

Group	No. of animals	Sensitizing Ag <sup>a</sup>	Route of sensitization	Challenging Ag
1	2	Vehicle <sup>b</sup>	S.C.	Vehicle
	2			DA-3002, 1.7 IU/kg
	2			OVA, 5 mg/head
2	6	DA-3002, 0.17 IU/kg	S.C.	DA-3002, 1.7 IU/kg
3	6	DA-3002, 1.7 IU/kg	S.C.	DA-3002, 1.7 IU/kg
4	6	DA-3002+Alum, 1.7 IU/kg	I.P.	DA-3002, 1.7 IU/kg
5	6	OVA+Alum, 5 µg/head	I.P.	OVA, 5 mg/head

<sup>a</sup>Antigen, <sup>b</sup>Glycine phosphate buffer.

량은 모두 10 ml/kg으로 하였다.

**채혈**

최종감작 1주 및 2주후에 각군 동물의 반수에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리, 냉동보관하며 시험에 사용하였다.

**24시간 mouse-rat PCA 반응** 분리한 혈청을 생리식염수로 2배 단계희석하여 4-64로 희석된 마우스 혈청 0.1 ml을 랫드 등부위 피내에 주사하고, 주사 24시간 후에 1% Evan's blue를 함유한 각각의 유발항원 1 ml을 랫드 미정맥내로 투여하였다. 그리고 30분후에 랫드를 방혈 처사시켜 피내에 유출된 Evan's blue spot을 확인하여 반점의 장단경 평균이 5 mm 이상인 경우를 양성으로 판정하였으며, 항체가는 양성을 나타낸 최대희석배수로 나타내었다.

**간접 적혈구 응집반응**

**감작 및 채혈**

Mouse-rat PCA 반응시험에서 얻어진 혈청을 이용하였다.

**감작 적혈구의 제조**

DA-3002로 피복된 감작 면양 적혈구는 Stratis 등(1969)의 방법에 준하여 제조하였다. 면양 적혈구를 PBS(0.15 M, pH 7.2)로 3회 세척한 다음, 적혈구 부유액 0.4 ml에 DA-3002 20 mg(단백질량 기준)을 함유한 PBS 15 ml을 첨가하고 여기에 2.5% glutaraldehyde 1 ml을 가하여 실온에서 1시간 동안 일정하게 stirring 하면서 반응시켰다. 반응 종료후 혼합액을 PBS로 3회 세척하고 1% 정상 마우스 혈청을 함유한 PBS를 이용하여 최종 1% 감작 적혈구 부유액을 제조하였다. OVA로 피복된 감작 면양 적혈구 부유액도 동일한 방법으로 제조하였다.

**Passive Hemagglutination Test**

각 군 6마리의 혈청을 PBS를 이용하여 96 well micro-plate에 50 µl씩 2배 단계희석하고, 각각의 항원으로 피복된 감작 면양 적혈구 부유액을 동량 첨가하였다. 각 well을 잘 혼합한 다음 실온에서 2~3시간 반응시켜 control의 혈구가 완전히 가라앉은 후 각 well의 혈구응집 여부를 판정하였다. 항체가는 응집을 보인 혈청의 최대 희석배수로 하였다.

**실험결과**

**능동 전신성 아나필락시스**

기니피크를 이용한 능동 전신성 아나필락시스 시험 결과는 Table III과 같다. DA-3002 0.17 IU/kg으로 감작한 군에서는 6마리 중 4마리가 유발항원 주사후 기침, 재채기, 배뇨, 경련, 호흡곤란 등의 증상을 보이며 5분 이내에 폐사하였으며, 2마리는 동일한 증상을 보였으나 폐사하지는 않아 Grade III로 판정되었다. DA-3002 1.7 IU/kg을 감작한 군에서는 6마리 중 5마리에서 아나필락시스 쇼크 반응을 보이며 폐사하였으며, 1마리는 입모, 코를 핥거나 문지름, 기침, 재채기, 배뇨, 경련, 호흡곤란, 황와 등의 증상을 보여 Grade III로 관찰되었다. 한편, DA-3002와 FCA를 동량 혼합하여 감작한 군은 양성대조군인 OVA 투여군에서와 같이 유발항원 주사후 5분 이내 전형적인 아나필락시스 쇼크 증상을 보이며 모두 폐사하였다.

**Mouse-rat PCA**

마우스-랫드 PCA 시험결과는 Table IV와 같다. DA-3002를 단독으로 감작한 저용량군(0.17 IU/kg)에서는 1주후에 얻은 모든 혈청에서 항체가 4이하로 검출한계 이하를 나타내었으나, 2주째 얻은 혈청은 3마리 중 2마리에서 8의 항체가를 나타내었다. 고용량군(1.7 IU/kg)에서는 1주째 얻은 혈청 3마리 중 1마리에서 4, 2주째 얻은 혈청 3마리 중 2마리에서 8의 항체가를 나타내었다. DA-3002와 Alum을 함께 감작한 군에서는 1주째 혈청 모두 및 2주째 혈청 3마리 중 2마리에서 64이상의 항체가를, 1마리에서는 32의 항체가를 나타내었다. 한편 양성대조군인 OVA 감작군에서는 1주 및 2주째 얻은 혈청 모두에서 64이상의 항체가가 관찰되었다.

**간접 적혈구 응집반응**

Mouse를 감작시켜 얻은 혈청을 이용하여 실시한 간접 적혈구 응집반응의 결과, DA-3002 0.17 IU/kg 감작군에서는 6마리 중 3마리에서 2-4의 항체가(평균 2.7)가 관찰되었으며, DA-3002 1.7 IU/kg 감작군에서는 6마리 모두 2-4(평균 3.3)의 항체가를 나타내었다. 또한 DA-3002를

**Table III.** Results of active systemic anaphylaxis in guinea pig.

Test substance	Dose	Route	Challenging Ag <sup>b</sup>	No. of animals	Severity <sup>c</sup>				
					0	I	II	III	IV
Vehicle <sup>a</sup>	-	S.C.	Vehicle	2	2	0	0	0	0
			DA-3002	2	2	0	0	0	
			OVA	2	2	0	0	0	
DA-3002	0.17 IU/kg	S.C.	DA-3002	6	0	0	0	2	4
	1.7 IU/kg	S.C.	DA-3002	6	0	0	0	1	5
DA-3002+FCA	1.7 IU/kg	S.C.	DA-3002	6	0	0	0	0	6
OVA+FCA	1 mg/head	S.C.	OVA	6	0	0	0	0	6

<sup>a</sup>Glycine phosphate buffer, <sup>b</sup>Antigen, <sup>c</sup>Grade 0: Negative I: Mild II: Moderate III: Severe IV:Death.

**Table IV.** Results of mouse-rat passive cutaneous anaphylaxis of DA-3002.

Test substance	Dose	Route	Sampling time (Wks) <sup>b</sup>	No. of serum	Challenging Ag <sup>c</sup>		
					Vehicle	DA-3002	OVA
Vehicle <sup>a</sup>	-	S.C.	1	1	<4 <sup>d</sup>	<4	<4
				2	<4	<4	<4
				3	<4	<4	<4
			2	4	<4	<4	<4
				5	<4	<4	<4
				6	<4	<4	<4
DA-3002	0.17 IU/kg	S.C.	1	1	- <sup>e</sup>	<4	-
				2	-	<4	-
				3	<4	-	-
			2	4	-	8	-
				5	-	8	-
				6	-	<4	-
	1.7 IU/kg	S.C.	1	1	-	4	-
				3	-	<4	-
				5	-	<4	-
			2	4	-	8	-
				5	-	8	-
				6	-	8	-
DA-3002+ Alum	1.7 IU/kg	I.P.	1	1	-	>64	-
				2	-	>64	-
				3	-	>64	-
			2	4	-	>64	-
				5	-	32	-
				6	-	>64	-
OVA+ Alum	5 µg/head	I.P.	1	1	-	-	>64
				2	-	-	>64
				3	-	-	>64
			2	4	-	-	>64
				5	-	-	>64
				6	-	-	>64

<sup>a</sup>Glycine phosphate buffer, <sup>b</sup>Weeks after the last immunization, <sup>c</sup>Antigen, <sup>d</sup>PCA titer, <sup>e</sup>Not tested.

**Table V.** Passive hemagglutination assay in the mice immunized with DA-3002.

Test substance	Dose	Coated Ag <sup>b</sup>	No. of serum	Response						Mean
				1	2	3	4	5	6	
Vehicle <sup>a</sup>	-	DA-3002	6	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
DA-3002	0.17 IU/kg	DA-3002	6	2	<2	<2	<2	4	4	2.7
	1.7 IU/kg	DA-3002	6	4	4	4	2	4	2	3.3
DA-3002+ Alum	1.7 IU/kg	DA-3002	6	4	8	8	8	8	16	8.6
OVA+ Alum	5 µg/head	OVA	6	32	16	16	8	8	16	16.0

<sup>a</sup>Glycine phosphate buffer, <sup>b</sup>Antigen.

Alum과 함께 투여한 군에서는 항체가가 4-16(평균 8.6)으로 관찰되었다. 한편, 양성대조군인 OVA 감작군에서는 8-32(평균 16.0)의 항체를 나타내었다(Table V).

## 고 찰

유전자 재조합기술을 이용하여 생산한 천연형 인성장호르몬인 DA-3002의 항원성을 조사하기 위하여 DA-3002의 추정임상사용량, 추정임상사용량의 10배량 및 추정임상사용량의 10배량과 면역보조제와의 혼합물을 기니

픽과 마우스에 감작한 후, 기니픽에서 능동 전신성 아나필락시스 반응, 랫드에서 PCA 반응 및 간접 적혈구 응집반응을 실시하였다. 기니픽에서의 능동 전신성 아나필락시스 시험 결과 DA-3002 저용량군(0.17 IU/kg) 및 고용량군(1.7 IU/kg)에서 면역보조제의 사용여부에 관계없이 아나필락시스쇼크 반응이 관찰되었다. 또, IgE형의 항체 생성유무를 확인하는 시험계로 널리 이용되고 있는 mouse-rat 이중 PCA 반응에서도 DA-3002는 단독 감작시 저용량군 및 고용량군에서 4-8의 항체를, IgE형의 항체 형성을 촉진하는 Alum을 면역보조제로 사용하여

감작시 64이상의 항체가 나타내, DA-3002는 IgE형의 항체 생성능도 가지는 것으로 관찰되었다. 이상과 같은 기니픽 능동 전신성 아나필락시스와 mouse-rat PCA에서 나타난 양성의 결과는 DA-3002가 기니픽과 마우스에는 이종단백질이므로 정상적인 생체반응으로 항체가 생성되어 나타난 것으로 판단되며, 이와같은 DA-3002의 항원성 양성의 결과는 동일 계열의 다른 약물인 somatropin이 동물실험에서 양성을 보인 것과 일치하는 것이었다 (Tylstrom 등, 1986; 약사일보사, 1989).

한편, 간접 적혈구 응집반응에서는 DA-3002 저용량 감작군에서는 2-4(평균 2.7), DA-3002 고용량 감작군에서는 2-4(평균 3.3)의 항체를, Alum을 면역보조제로 사용한 군에서는 4-16(평균 8.6)의 항체를 나타내었다. 일반적으로 PHA는 IgG와 IgM이 관여하는 것으로 알려져 있는데 본 시험결과에 미루어 판단하면 DA-3002는 단독감작 및 Alum과 혼합 감작시 마우스에서 IgG나 IgM 계열의 항체를 형성시키는 것으로 사료되었다. 한편, somatropin의 경우 gel내 침강반응에서 양성의 결과를 보고하여 IgG형의 항체가 형성되는 것으로 알려져 있으며 그 원인은 이종단백질에 의한 것으로 보고되어 있다(약사일보사, 1989).

결 론

천연형 인성장호르몬인 DA-3002는 추정임상사용량 및 추정임상사용량의 10배 용량을 단독 혹은 면역보조제와 함께 감작하면 기니픽에서 능동 전신성 아나필락시스 쇼크를 유발하며 mouse에서 IgE, IgG, IgM 계열의 항체를 생성시켜, DA-3002는 기니픽과 마우스에서 항원성을 나타내었다. 그러나 이와같은 기니픽과 마우스에서의 항원성은 인성장호르몬이 기니픽과 마우스에는 이종단백질이므로 이에 대한 정상적인 생체반응의 결과로 나타난 것으로 사료되며, 동계열의 인성장호르몬에서도 공통적으로 인정되고 있다. 따라서, DA-3002가 인형 성장호르몬과 동일한 구조를 가지는 물질인 점을 고려하면 실제 임상에서의 부작용은 희박할 것으로 예측된다.

참고문헌

Beck, J. C., McGany, E. E., Dyrenfurt, I. and Venning, E. H. (1957). Metabolic effects of human and monkey growth hormone in man. *Science* **125**, 884-885.

Flodh, H. (1987). Update on clinical use and experience of Somatonorm(Somatrem). *Acta Paediatrica Scandinavica* **337** (suppl.), 130-133.

Goeddel, D. V., Heynecker, H. L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yunsura, D. G., Ross, M. J., Miozzari, G., Crea, R. and Seeburg, P. H. (1979). Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature* **281**, 544-548.

Kaplan, S. L., Underwood, L. E., August, G. P., Bell, J. J., Bletthen, S. L., Blizzard, R. M., Brown, D. R., Folney, T. P., Hintz, R. L., Hopewood, N. J., Johansen, A., Kirkland, R. T., Plotnick, L. P., Rosenfeld, R. G. and van Wyk, J. J. (1986). Clinical studies with recombinant-DNA-derived methionyl human growth hormone in growth hormone deficient children. *Lancet* **697-700**.

Milner, R. D. G., Barnes, N. D., Buckler, J. M. H., Carsen, D. J., Hadden, D. R., Hughes, I. A., Johnston, D. I., Parkin, M. J., Price, D. A., Rayner, P. H. W., Savage, D. C. L., Savage, M. O., Smith, C. S. and Swift, P. G. F. (1987). United Kingdom multicenter clinical trial of somatrem. *Archives of Disease in Children* **62**, 776-779.

Preece, M. A. (1986). Creutzfeldt-Jakob disease: Implications for growth hormone deficient children. *Neuropathol. and Appl. Neurobiol.* **107**, 220-239.

Raben, M. (1958). Treatment of a pituitary dwarf with human growth hormone. *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism* **18**, 901-903.

Stratis Avrameas, Bernadette Taudou and Sylvaine Chuilon. (1969). Glutaraldehyde, Cyanuric chloride and Tetrazotized o-diannisidine as coupling reagents in the passive hemagglutination test, *Immunochemistry* **6**, 67-76.

Tylstrom, J., Karlen, B. and Guilbaud, O. (1986). Somatonorm (Somatrem): immunologic aspects. In immunologic aspects of Human Growth Hormone(R.D.G. Milner and H. Flodh Ed.), pp.19-31. Medical Education Services, Oxford.

藥事日報社. (1989). 成長ホルモン製劑; (1)ソマトロピン製劑. 最近の新藥, **40**, pp.197-198.