

천연형 인성장호르몬 DA-3002의 변이원성 연구

강경구* · 김옥진 · 김동환 · 백남기 · 안병옥 · 김원배 · 양중익
동아제약(주)연구소

Mutagenicity Study of DA-3002, an Authentic Recombinant Human Growth Hormone(rhGH)

Kyung Koo KANG*, Ok Jin KIM, Dong Hwan KIM, Nam Gi BAIK,
Byoung Ok AHN, 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 November 11, 1995; accepted December 8, 1995)

Abstract—DA-3002, an authentic recombinant human growth hormone(rhGH), was examined for mutagenicity in the reverse mutation test on bacteria, in the chromosomal aberration test on cultured mammalian cells and in the micronucleus test on mice. The reverse mutation test was performed by a plate incorporation method with or without a metabolic activation system(S9 Mix) using *Salmonella typhimurium* strain TA100, TA1535, TA98 and TA1537. DA-3002 did not significantly increase revertant colonies in any of the test strains under any conditions at dose levels ranging from 0.0125 to 0.4 IU/plate, compared with the vehicle control. In the chromosomal aberration test using cultured Chinese hamster lung(CHL) cells, DA-3002 did not increase the number of aberrant cells in the presence or absence of S9 mix at concentrations of 0.0125 IU/ml to 0.4 IU/ml, compared with the vehicle control. In the micronucleus test, male ICR mice were given DA-3002 intraperitoneally at a dose level of 20, 40 and 80 IU/kg. The incidence of bone marrow micronucleated polychromatic erythrocytes in the DA-3002 treated mice did not differ from that of the vehicle control. These results indicate that DA-3002 doesn't have mutagenic potential under the present test conditions.

Keywords □ DA-3002, recombinant human growth hormone, mutagenicity

사람의 성장호르몬은 뇌하수체 전엽에서 분비되는 191개의 아미노산으로 구성된 분자량 22,000 dalton의 펩타이드호르몬의 일종으로 세포의 크기 및 분열의 촉진에 의한 체세포성장과 조골세포 자극에 의한 골, 연골의 성장을 촉진시킬 뿐 아니라 근육의 지방분해촉진 및 단백질합성촉진 등의 대사작용을 나타내기도 하며, 성장호르몬 결핍성 왜소증, Turner 증후군, 연골무형성증(achondroplasia) 등에 사용된다(Beck 등, 1957; Stahke, 1984). 인성장호르몬(human growth hormone, hGH)은 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 환자에서 Creutzfeldt-Ja-

kob 증후군에 의한 사망이 보고되면서 1985년 이후 사용이 중지되었다(Preece, 1986). 그러나, 1970년대 후반부터 유전공학 기법에 의하여 대장균이나 효모에서 인성장호르몬의 대량생산이 가능케 되면서(Goeddel 등, 1979) 1981년 이후 임상에 널리 사용되었다(Kaplan 등, 1986; Flodh, 1987). 그러나 이와같은 재조합 인성장호르몬(recombinant hGH, rhGH)은 숙주벡터에서 유래한 methionine이 첨가되어 192개의 아미노산으로 구성된 methionyl-hGH (Somatrem)으로 뇌하수체 유래의 성장호르몬과 생물학적 활성은 동일하나, 천연형과의 구조적차이에 기인한 항체발현에 관한 보고가 종종 발표되었다(Tylstrom 등, 1986; Milner 등, 1987). 따라서 최근에는 methionyl-hGH의 N-terminal의 methionine을 제거하여 천연형 인성장호르몬과 동일한 구조를 가진 rhGH(Somatropin)의 사용이 점차 증가되고 있는 추세이다.

*To whom correspondence should be addressed.

DA-3002는 동아제약(주) 연구소에서 유전자재조합기술을 이용하여 *E. coli*에서 발현시킨 인성장호르몬(rhGH)으로서 N-terminal의 methionine기를 제거하여 사람에서의 성장호르몬과 동일한 아미노산 배열로 구성되어 있는 물질이다. 본 연구에서는 천연형 인성장호르몬인 DA-3002의 안전성 연구의 일환으로 세균을 이용한 복귀돌연변이시험과 포유류의 배양세포를 이용한 염색체이상시험 및 설치류를 이용한 소핵시험을 실시하여 변이원성을 평가하였다.

실험방법

시험물질

시험물질인 DA-3002(Lot No. TS-94201)는 동아제약(주) 연구소 생물공학연구소에서 공급받은 백색괴상의 동결건조품으로 순도는 SDS-PAGE법에 의한 분석으로 95% 이상이었고 역가는 면역측정검사법으로 측정시 4 IU/vial이었다. 시험물질은 냉장차광으로 보관하였으며 사용시 멸균증류수를 사용하여 4 IU/ml로 조제한 후 시험물질 전용매체인 1% glycine buffer(pH 6.7)로 희석하여 사용하였다.

대조물질

양성대조물질로는 복귀돌연변이시험에서는 sodium azide (Sigma), 2-aminofluorene(Sigma), 9-aminoacridine (Sigma), 2-aminoanthracene(Sigma), 2-nitrofluorene(Sigma)을, 염색체이상시험에서는 mitomycin C(Sigma), benzo[a]pyrene(Sigma)을 각각 증류수나 DMSO에 용해하여 사용하였으며, 소핵시험에서는 mitomycin C(Sigma)를 증류수에 용해하여 사용하였다. 음성대조물질로는 증류수와 glycine phosphate buffer를 사용하였다.

세균을 이용한 복귀돌연변이시험

시험균주

시험에는 histidine 영양 요구성의 *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 4균주를 이용하였다. 각 시험균주는 한국화학연구소에서 분양받아 -70°C에 동결보존한 것으로 histidine 영양 요구성, 자외선감수성, 막변화 rfa 특성, 약제내성인자(R-factor plasmid)의 유무 및 자연복귀변이의 정도 등의 형질을 확인한 다음 시험에 사용하였다.

배지

시험균주의 전배양은 2.5% nutrient broth No.2(Oxoid)를 이용하였다. 최소 glucose 한천평판배지(minimal glucose agar plate)는 bacto-agar(Difco) 1.5%에 Vogel-Bonner medium E(50X)와 glucose(40%)를 각각 2% 및 5%되게 첨가한 것으로 plate당 20 ml씩 분주하여 사용하였다. Top agar는 bacto-agar 0.6%, NaCl 0.5% 용액에 0.5 mM L-histidine·HCl / 0.5 mM D-biotin 수용액을 10:1의 비율(V/V)로 첨가하여 사용하였다. 그외 본 시험에서 필요한 배지는 Maron과 Ames(1983)의 방법에

준하여 제조하여 사용하였다.

S9 mix

S9 분획은 8-10주령의 수컷 Sprague-Dawley 랫드에서 Aroclor 1254를 효소 유도제로 사용하여 Ames 등(1975)의 방법에 따라 조제하여 시판하는 rat liver S-9 products (Organon Teknika corporation)를 구입하여 사용하였으며, S9용 cofactor는 시판 cofactor(Oriental 酵母工業株式會社)를 구입하여 사용하였다. S9 mix는 cofactor를 9ml의 증류수에 용해한 후 S9 분획 1 ml를 사용직전에 혼합하여 조제하였다.

시험균액

시험균액은 해동한 동결보존균액 0.1 ml를 취해 25 ml의 Nutrient broth 배지에 접종하여 차광된 배양기 내에서 37°C, 120 rpm의 조건으로 약 16시간 진탕배양한 후 시험에 사용하였다.

초기독성시험(용량설정근거)

본시험의 용량설정을 위하여 예비 용량설정시험을 *Sal. typhimurium* TA 100을 이용하여 실시하였다. 시험물질인 DA-3002의 용량은 제형(4 IU/ml)의 최고농도인 0.4 IU/plate를 최고용량으로하고 이하 공비 5로 0.08, 0.016, 0.0032, 0.00064, 0.000125 IU/plate까지 6개 용량으로 시험을 실시한 결과, 모든 용량군에서 대조군과 비교하여 복귀변이 colony수의 증가가 인정되지 않았다. 따라서, 본시험에서는 0.4 IU/plate 부터 공비 2로 0.0125 IU/plate 까지 6개 용량을 설정하였다.

시험방법

시험은 국립보건안전연구원의 독성시험 표준작업지침서(1993)에 준하여 대사활성계를 적용한 경우와 대사활성계를 적용하지 않은 2가지 경우에 대하여 평판법(direct incorporation method)으로 실시하였다. 즉, 시험물질용액 0.1 ml, S9 mix(비대사활성계의 경우 D.W.) 0.5 ml, 균 배양액 0.1 ml 및 top agar 2 ml를 45°C로 예열한 멸균 tube에 혼합하고 즉시 vortex mix로 2~3초간 진탕한 후 minimal glucose agar plate에 중층하였다. 음성대조군은 glycine phosphate buffer 혹은 증류수(무처리대조군) 0.1 ml를, 양성대조군은 각각의 양성대조물질 용액 0.1 ml를 시험물질 대신 가하여 동일한 방법으로 실시하였다. 중층한 top agar가 굳은 후 37°C에서 48시간 배양한 다음 출현한 복귀변이 colony수를 계측하고 생육저해 및 시험물질의 침전여부를 관찰하였다. 시험물질 각 용량군당 3개의 plate를 이용하였으며 복귀변이 colony 수의 평균치가 용매대조군에 비하여 용량의존적으로 증가하고 그 수가 음성대조군의 2배 이상 이거나 통계학적 유의성을 나타낼때 양성으로 판정하였다.

포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

세포 및 배지

시험에는 Chinese hamster lung(CHL) 세포를 이용하였다. 세포의 배양은 Eagle's MEM (Gibco) 배지에 FCS(Fetal calf serum, Gibco)를 10%(V/V)되게 첨가한

배지를 사용하여, 37°C, 5% CO₂, 포화수증기 상태의 항온배양기에서 배양하였다.

S9 mix

S9 분획은 8~10주령의 수컷 Sprague-Dawley 랫드에서 Aroclor 1254를 효소 유도제로 사용하여 Ames 등(1975)의 방법에 따라 조제하여 시판하는 rat liver S-9 products(Organon Teknika corporation)를 구입하여 사용하였으며, S9용 cofactor는 시판 cofactor(Oriental 醱母工業株式會社)를 구입하여 사용하였다. S9 mix는 cofactor를 7 ml의 증류수에 용해한 후 S9 분획 3 ml을 사용직전에 혼합하여 조제하였다.

세포독성시험(용량설정시험)

본시험의 용량설정을 위한 예비시험으로 세포독성시험을 국립보건안전연구원의 독성시험 표준작업지침서(1993)에 따라 실시하였다. DA-3002 제형(4 IU/ml)의 최고농도인 0.4 IU/plate를 최고농도로 하고 이하 공비 5로 0.08, 0.016, 0.0032, 0.00064, 0.000125 IU/ml의 6개 용량으로 24시간 처리 직접법으로 실시하였다. 즉, 직경 35 mm petri-dish(배양액 2 ml)에 1.2×10^4 cell/ml의 세포를 파종하여 3일간 배양한 후 각 용량군의 시험물질로 처리하여 1일간 배양하였다. 배양 종료후, 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 분산 수거한 다음 trypan blue로 염색하고 hemocytometer를 이용하여 생세포수를 계수하여 시험물질의 세포에 대한 독성발현여부를 관찰하였다. 시험결과 시험가능한 최고농도인 0.4 IU/ml 이하의 모든 용량군에서 대조군과 비교하여 세포증식억제가 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에서의 용량은 제형의 시험 가능 최고농도인 0.4 IU/ml을 최고농도로 하고 이하 공비 2로 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 IU/ml까지 6개 용량군으로 설정하였다.

한편, 음성대조군으로는 glycine phosphate buffer 혹은 무처리군으로 설정하였으며, 양성대조군은 직접법의 경우에는 MMC 0.05 µg/ml, 대사활성화법의 경우에는 Benzo[a]pyrene 20 µg/ml를 각각 사용하였다.

시험방법

시험은 국립보건안전연구원의 독성시험 표준작업지침서(1993)에 준하여 대사활성계를 적용하지 않은 직접법과 대사활성계를 적용한 대사활성화법 2가지로 실시하였다.

(1) 직접법(비대사활성화법)

직경 60 mm의 petri-dish(배양액 5 ml)에 1.0×10^5 개의 세포를 파종하여 3일간 배양하여 단층세포(monolayer cell)를 만든 후, 각 용량군의 시험물질로 처리하여 24시간 또는 48시간 배양한 다음 세포를 수거하여 염색체 표본을 제작하였다. 이때 세포 수거 2시간전에 colcemid를 최종농도 0.2 µg/ml이 되게 첨가하여 세포분열을 정지시켰다.

(2) 대사활성화법

직접과 동일하게 배양한 단층세포에 S9 mix 1 ml과 각 용량군의 시험물질이 혼합된 배양액 4 ml로 처리하여

6시간 배양한 다음, 정상 배지로 교환하여 18시간 배양한 후 24시간에 세포를 수거, 염색체 표본을 제작하였다. 이때, 세포수거 2시간전에 직접법에서와 동일하게 colcemid를 처리하였다.

(3) 염색체표본의 제작 및 표본의 관찰

시험물질 처리가 종료된 후 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 분산 수거한 다음 원심분리(1000 rpm, 5 min.)하여 세포를 모았다. 이 세포에 저장액인 0.075 M KCl을 가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 methanol : acetic acid(3 : 1, V/V) 용액으로 고정시켜 원심분리 하였다. 수거된 세포에 다시 냉각 고정액을 가하여 원심분리하는 동일한 조작을 3회 반복하여 세포를 완전히 고정시키고 최종적으로 적당한 밀도의 세포부유액을 만든 다음, 고정된 세포부유액을 slide glass위에 1방울씩 떨어뜨려 상온에서 완전히 건조시켰다. 건조된 슬라이드는 5% Giemsa액에서 20분간 염색하여 수세 후 광학현미경($\times 1000$)으로 관찰하였다. 표본의 관찰은 슬라이드당 100개의 분열중기상 염색체에 대하여 염색체 및 염색분체의 구조이상(Structural aberrations : Chromatid gap, Chromatid break, Chromatid exchange, Chromosome gap, Chromosome break, Chromosome exchange)과 수적이상(Numerical aberrations : Polyploid, Endoreduplication)으로 나누어 관찰하였고, 이상의 종류를 1개 이상 가진 세포를 양성 세포 1개로 계수하여 그 종류와 비율을 구하였다.

(4) 결과판정

이상세포의 출현빈도는 5% 미만일 경우는 음성, 5~10%일 경우는 의양성, 10% 이상일 경우는 양성으로 판정하였으며, 하나 이상의 용량단계에서 재현성있게 양성반응을 나타내는 경우 혹은 음성대조군과 비교하여 이상세포의 출현빈도가 유의성있게 용량 의존적으로 증가하는 경우를 변이원성이 있는것으로 판정하였다.

설치류를 이용한 소핵시험

시험동물

시험에 사용된 동물은 6주령의 웅성 ICR계 특정병원체부재(SPF) 마우스로 50마리를 Charles River Japan사로 부터 공급받아 1주일간의 순화사육을 거친뒤 7주령의 동물을 사용하였다. 사육환경은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 15\%$, 조도 150~300 Lux, 조명시간 12시간(07 : 00~19 : 00)의 통상조건을 유지하였으며, 마우스용 PC 케이지에 6마리씩 수용하였고 사료(마우스용 방사선멸균 고형사료, 제일사료)와 물(자외선 멸균 상수도수)은 자유섭취시켰다.

투여량설정 및 표본채취시간 결정

“의약품 등의 독성시험 기준”(1994)에 따르면 소핵시험에서 시험물질의 투여용량은 LD₅₀의 1/2양을 최고용량으로하는 것이 권장되고 있으나 DA-3002는 급성독성 시험시 임상사용 예정량의 약 1200배에 해당하는 80 IU/kg 용량에서도 경구 및 피하적용시 독성이 발현되지

않아 LD₅₀를 구하기 어려우므로(Kim 등, 1994) 급성독성시험의 최고용량인 80 IU/kg를 본 시험에서의 최고용량으로 설정 하였다. 소핵다염성적혈구 출현의 적합한 시간대를 결정하기 위한 예비시험으로 12마리의 마우스에 DA-3002 80 IU/kg를 투여 후 각각 3마리씩을 18, 24, 48 및 72 시간에 골수를 채취하여 소핵다염성적혈구 수와 정염성적혈구와 다염성적혈구의 비를 비교한 결과 유의한 변화가 관찰되는 시간대를 발견할 수 없었으므로 표본의 채취시간은 일반적으로 많이 이용하는 시간대인 시험물질 투여 후 24시간(Salmone 등, 1980)으로 결정 하였다.

시험방법

본 시험은 국립보건안전연구원 고시 제 94-3호 “의약품 등의 독성시험 기준”(1994)에 준하여 실시하였다. 시험군의 구성은 Table I과 같다. DA-3002는 80 IU/kg 용량을 최고용량군으로 하고 40 및 20 IU/kg 3 용량군에 20 ml/kg의 액량으로 투여하였으며, 음성대조군에는 glycine buffer를, 양성대조군에는 MMC 2 mg/kg를 복강내로 단회투여 하였다. 투여 후 24시간에 각 군의 동물을

경추탈구로 도살한 다음 대퇴골을 분리하여 양끝단을 절단하고 1 ml의 주사용생리식염수로 골수를 분리한 후 1000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 분리된 상층액을 버리고 남은 침전물을 고르게 현탁하여 슬라이드에 도말하였다. 건조된 도말표본은 methanol에 5분간 고정한 후 2.5% modified Giemsa액(Sigma)에 50분간 염색하여 광학현미경으로 1000배 배율에서 관찰하였다. 1000개의 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE)를 관찰 시 소핵을 가진 다염성적혈구(micronucleous polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 수를 세고 동시에 동일 시야에 존재하는 정염성적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)의 수를 세어 정염성적혈구와 다염성적혈구의 비율을 구하였다.

통계학적 처리

DA-3002 및 MMC 투여군의 소핵다염성적혈구(MNPCE)의 출현빈도에 대해서는 Kastenbaum과 Bawman의 방법(1970)에 의하여 유의성을 검정하였고 정염성적혈구와 다염성적혈구의 비율(NCE/PCE)의 각 구간 유의차는 student's t-test로 $\alpha=0.05$ 수준에서 검정하였다.

Table I. Experimental design for micronucleus test with DA-3002 in mice.

Group	Compound	Dose (/kg)	Adm. Volume (ml)	Route	No. of animals
T1	Buffer ^a	—	20	i.p.	6
T2	DA-3002	20 IU	20	i.p.	6
T3	DA-3002	40 IU	20	i.p.	6
T4	DA-3002	80 IU	20	i.p.	6
T5	MMC ^b	2 mg	10	i.p.	6

^aGlycine phosphate buffer, ^bMitomycin C

실험결과

세균을 이용하는 복귀돌연변이시험

시험결과는 Table II와 같다. 시험에 사용한 4군주 모두 대사활성제의 유무에 관계없이 복귀변이 colony수는 음성대조군의 colony수와 비슷한 범위에 속하였으며, 용량 의존적으로 증가하거나 음성대조군의 2배 이상의 복귀 변이 colony 수의 증가를 나타내지 않았다. 또한, DA-3002를 처리한 모든 용량군에서 치사효과나 침전 등의

Table II. Number of colonies per plate in the reverse mutation test of DA-3002 using bacteria

Test materials	Dose (IU/plate)	Revertants/ plate ^a							
		TA 100		TA 1535		TA 98		TA 1537	
		-S9 ^b	+S9 ^c	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Untreated	—	85±3	86±6	20±2	21±3	26±3	26±3	14±4	13±1
Vehicle ^d	—	80±4	87±3	20±4	21±2	21±1	30±3	14±5	17±2
DA-3002	0.0125	79±1	90±9	23±3	20±4	22±3	28±2	15±1	12±1
	0.025	80±4	87±3	21±5	23±6	21±7	31±2	15±2	16±3
	0.05	82±3	83±2	28±3	20±4	21±3	28±2	14±4	16±3
	0.1	85±7	88±6	21±3	23±2	21±4	30±4	16±4	16±4
	0.2	83±3	89±4	21±3	23±6	20±2	30±2	13±2	13±4
	0.4	83±2	87±6	22±2	21±6	24±3	32±7	16±3	13±3
SA ^e	1 µg	779±23	—	585±20	—	—	—	—	—
2-AA ^f	1 (2) ^g µg	—	758±61	—	365±18	—	—	—	354±46
2-NF ^h	1 µg	—	—	—	—	224±20	—	—	—
2-AF ⁱ	1 µg	—	—	—	—	—	213±14	—	—
9-AA ^j	50 µg	—	—	—	—	—	—	435±40	—

^aValues are the mean±S.D. of the data from three plates, ^bWithout metabolic activation system (S9 Mix), ^cWith metabolic activation system (S9 Mix), ^dGlycine phosphate buffer, ^eSodium azide, ^f2-aminoanthracene, ^g2-nitrofluorene, ^h2-aminofluorene, ⁱ9-aminoacridine, ^jThis dosage (2 µg/plate) was used only in *Sal. typhimurium* TA 1537

독성도 나타나지 않는 것으로 관찰되었다. 한편, 각 군주의 양성대조물질은 각각의 군주에 대하여 2배 이상의 현저한 복귀면이 colony수의 증가를 나타내었다.

포유류 배양세포를 이용하는 염색체이상시험

염색체이상시험 결과, DA-3002를 처리한 모든 농도군에서 대사활성제의 유무에 관계없이 염색체의 구조적 이상세포나 배수성세포의 출현율은 5% 미만으로 음성대조군과 비교하여 증가하지 않았다. 한편, 양성대조물질인 MMC(비대사활성화법)의 경우에는 24시간 또는 48시간 처리시 각각 43% 및 53%의 이상세포 출현율을 보여 음성대조군과 비교하여 유의성있는 증가를 나타내었으며(Table III), benzo[a]pyrene(대사활성화법)의 경

우에도 36%의 현저한 구조적 이상세포의 증가를 나타내었다(Table IV).

설치류를 이용하는 소핵시험

DA-3002의 소핵시험 결과는 Table V와 같다. 예비시험 결과를 토대로 약물 투여 후 24시간에 도말표본을 작성하여 검사한 결과 소핵을 가진 다염성적혈구(MNPCE)의 수는 용매대조군과 DA-3002 투여 전군에서 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 반면, 양성대조군인 MMC 2 mg/kg 투여군에서는 MNPCE의 유의성있는 증가를 보였다. 정염성적혈구와 다염성적혈구의 비율(NCE/PCE)에서도 용매대조군과 DA-3002 각 용량군 사이에서 유의한 변화를 관찰할 수 없었다.

Table III. Chromosomal aberration test of DA-3002 on CHL cell without S9 mix

Test Compound	Dose (IU/ml)	Treatment time (hr)	No. of cells observed	No. of cells having aberrant chromosome (%)	Type of aberration ^d								
					ctg	csg	ctb	csb	cte	cse	pol	end	
Untreated	—	24	100	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Buffer ^a	—	24	100	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0
DA-3002	0.4	24	100	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0
	0.2	24	100	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.1	24	100	3	1	0	0	0	1	0	1	0	0
	0.05	24	100	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	0.025	24	100	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	0.0125	24	100	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0
MMC ^c	0.05 μ g/ml	48	100	43	22	6	6	1	11	3	5	0	0
Untreated	—	48	100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Buffer	—	48	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DA-3002	0.4	48	100	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0
	0.2	48	100	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	0.1	48	100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	0.05	48	100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.025	48	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.0125	48	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MMC	0.05 μ g/ml	48	100	53	39	12	13	4	27	6	1	0	0

^aGlycine phosphate buffer, ^bMitomycin C, ^cCtg: Chromatid gap, Ctb: Chromatid break, Cte: Chromatid exchange, Csg: Chromosome gap, Csb: Chromosome break, Cse: Chromosome exchange Pol: Polyploid, End: Endoreduplication.

Table IV. Chromosomal aberration test of DA-3002 on CHL cell with S9 mix.

Test Compound	Dose (IU/ml)	Treatment time (hr)	No. of cells observed	No. of cells having aberrant chromosome (%)	Type of aberration ^d								
					ctg	csg	ctb	csb	cte	cse	pol	end	
Untreated	—	6	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Buffer ^a	—	6	100	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
DA-3002	0.4	6	100	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.2	6	100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	0.1	6	100	2	0	2	0	0	1	0	0	0	0
	0.05	6	100	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.025	6	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.0125	6	100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
B(a)P ^b	0.05 μ g/ml	6	100	36	16	6	4	4	5	6	1	0	0
B(a)P ^c	0.05 μ g/ml	6	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^aGlycine phosphate buffer, ^bBenzo[a]pyrene, ^cBenzo[a]pyrene without S9 mix. ^dCtg: Chromatid gap, Ctb: Chromatid break, Cte: Chromatid exchange, Csg: Chromosome gap, Csb: Chromosome break, Cse: Chromosome exchange Pol: Polyploid, End: Endoreduplication

Table V. Results of micronucleus test with DA-3002 in mice.

Group	Compound	Dose (/kg)	MNPCE/PCE ^b	NCE/PCE ^c
T1	Vehicle ^a	-	1.33± 0.52 (1~2)	1.016± 0.017 (0.998~1.043)
T2	DA-3002	20 IU	0.67± 0.52 (0~1)	1.051± 0.074 (0.976~1.038)
T3		40 IU	1.83± 1.17 (0~3)	0.993± 0.036 (0.932~1.038)
T4		80 IU	1.50± 1.05 (0~3)	1.016± 0.015 (0.996~1.040)
T5	MMC	2 mg	24.33± 6.47* (18~36)	1.128± 0.170 (0.809~1.269)

^aGlycine phosphate buffer, ^bThe percentage of polychromatic erythrocytes with micronuclei was calculated from 1000 polychromatic erythrocytes. Mean Standard deviation (Minimum-Maximum), ^cThe ratio of normochromatic erythrocytes to polychromatic erythrocytes was calculated from 1000 erythrocytes. Mean± Standard deviation(Minimum-Maximum) * Significantly different from the vehicle control (p<0.05)

고 찰

천연형 인성장호르몬 DA-3002의 안전성평가의 일환으로 세균을 이용한 복귀돌연변이시험, 포유류의 배양세포를 이용한 염색체이상시험 및 설치류를 이용하는 소핵시험을 실시하여 변이원성을 검토하였다.

세균을 이용한 복귀돌연변이 시험계는 염기쌍(base pair)의 위치교환 돌연변이를 검출하는 *Sal. typhimurium* TA100, TA1535와 frameshift형의 돌연변이를 검출하는 *Sal. typhimurium* TA98, TA1537로 구성되어 있으며(Yoshiko Nagasawa 등, 1994), 화학물질의 변이원성을 검토하는 시험계로 널리 이용되고 있다(Maron과 Ames, 1983). 본 시험에서도 *Sal. typhimurium* TA100, 1535, 98 및 1537 네 균주를 이용하여 base pair mutation 혹은 frameshift-type mutation 유발여부를 검토하였다. 시험결과, DA-3002는 0.4 IU/plate 이하 전 용량군에서 대사활성계의 유무에 관계없이 모든 균주에 대하여 His⁻ → His⁺로의 복귀변이원성을 유발하지 않는 물질로 관찰되었으며, 시험균주에 대한 독성도 관찰되지 않았다. 이와같은 결과는 동계열의 의약품인 somatropin(藥事日報社, 1989)과 somatorm(Flodh, 1986) 등의 결과와 유사하였으며, 또한 본 연구소의 1세대 인성장호르몬인 DA-3001의 경우에서도 1.6 IU/plate 이하 모든 농도군에서 복귀돌연변이가 유발되지 않았던 결과와 유사하였다(한국화학연구소(시험번호: S-283), 1993). 일반적으로 복귀돌연변이 시험에서 채택되는 시험물질의 최고농도는 5~10 mg/plate 인데, 본 시험에서 실시한 DA-3002의 경우에 처리 최고농도는 0.16 mg(=0.4 IU)/plate로서 상당히 낮은 농도이다. 그러나 이 농도는 DA-3002의 제형이 4 IU/ml로 되어있기 때문에 이 시험물질 용액으로 시험가능한 최고농도는 0.16 mg(=0.4 IU)/plate이며, 또

한 사람에서 성장호르몬의 표준혈중농도가 1~5 ng/ml인 점을 고려하면 본 시험의 최고 농도인 0.16 mg/plate는 정상인 혈중농도의 약 1600배 이상의 충분히 높은 농도가 되어 시험결과와 해석에는 무리가 없을것으로 사료된다. 특히, 시험물질인 DA-3002는 일반 화학물질이 아닌 생물학적제제(단백질)이며, 단백질의 aggregation 등의 원인 때문에 원액제조시 농축에 한계가 있는점 등을 고려하면 절대량 보다는 생물활성을 지표로 하여 농도를 설정하는 것이 타당할 것으로 사료된다.

염색체 이상시험은 CHL cell을 이용하여 직접법으로 24 및 48시간 시험과 대사활성화법 시험을 실시한 결과, DA-3002를 처리한 모든 용량군에서 대사활성계의 적용에 관계없이 염색체 이상을 보인 세포의 출현빈도 증가나 용량의존성은 관찰되지 않았다. 이와같은 결과도 동계열의 의약품인 somatropin(藥事日報社, 1989), somatorm(Flodh, 1986)에서의 결과와 유사한 결과이며 또한 본 연구소의 1세대 인성장호르몬인 DA-3001의 경우에서도 유사하였다(한국화학연구소(시험번호: S-284), 1993). 한편, 염색체이상 시험에서도 일반적으로 채택되는 최고농도는 10 mM/plate로, 본 시험의 최고농도인 0.16 mg/ml은 상당히 낮은 농도라 할 수 있다. 그러나 세균을 이용한 복귀돌연변이시험에서 언급한 것과 같은 이유로 본 시험 결과의 해석에는 무리가 없을것으로 사료된다.

마우스를 이용한 소핵시험에서, DA-3002는 임상사용량의 약 1200배에 해당하는 80 IU/kg 및 그 이하 40, 20 IU/kg의 투여에 의하여 소핵을 가진 다염성적혈구의 유의한 증가나 정염성적혈구와 다염성적혈구의 비율 또한 변화를 나타내지 않았다. 이러한 시험결과로부터 천연형 인성장호르몬 DA-3002는 골수 적아구의 증식을 억제하거나 염색체 또는 분열장치에 이상을 유발하지 않는 물질인 것으로 판단된다.

결 론

천연형 인성장호르몬인 DA-3002의 변이원성시험 결과, DA-3002는 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험에서 대사활성계의 유무에 관계없이 모든 균주에 대하여 His⁻ → His⁺로의 복귀변이원성을 나타내지 않았으며, CHL 세포를 이용한 염색체이상시험에서도 대사활성계의 적용에 관계없이 염색체 이상을 유발하지 않았다. 또한 설치류를 이용하는 소핵시험에서도 소핵유발작용이 없는것으로 나타나 천연형 인성장호르몬인 DA-3002는 변이원성이 없는 물질로 판단되었다.

참고문헌

- Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test*. *Mutation Res.*

- 31, 347-364.
- 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. (1986). Human growth hormone produced with recombinant DNA technology: development and production. *Acta paediatr. Scan.(Suppl.)* **325**, 1-9.
- 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., Undewood, L. E., August, G. P., Bell, J. J., Blethen, 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* **i**, 697-700.
- Kastenbaum, M. A. and Bowman, K. O. (1970) Tables for determining the stastical significance of mutation reuqencies. *Mutation Res.* **9**, 527-549.
- Kim, O. J., Kang, K. K., Ahn, B. O., Baik, N. G., Lee, S. B., Kim, W. B. and Yang, J. I. (1994). Single and 13-week repeated dose toxicity of DA-3002, an authentic recombinant human growth hormone. *J. Appl. Pharmacol.* **2**, 161-172.
- Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983). Revised methods for Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.* **113**, 173-215.
- 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.
- Salmone, M., Heddle, J., Stuart, E. and Katz, M. (1980) Towards an improved micronucleus test: Studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutation Res.* **74**, 347-356.
- Stahke, N. (1984) Human growth hormone treatment in short children without growth hormone deficiency. *N. Engl. J. Med.* **104**, 801-803.
- Tylstrom, J., Karlen, B. and Guilbaud, O. (1986). Somatonorm (Somatren): immunologic aspects. In immunologic aspects of Human Growth Hormone(R.D.G. Milner and H. Flodh Ed.), pp.19-31. Medical Education Services, Oxford.
- Yoshiko Nagasawa, Yoshihisa Miwa, Takayuki Hongyo, Mori Suwagara and Shigeo Kawase(1994). Mutagenicity study of Mesalazine. *Oyoyakuri.* **48**, 501-509.
- 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.
- 국립보건안전연구원 (1993). 독성시험 표준작업지침서, p565-654.
- 의약품 등의 독성시험기준 (1994). 국립보건안전연구원 고시 제 94-3호.
- 한국화학연구소 안전성연구센터. (1993). DA-3001의 살모넬라 균을 이용한 복귀돌연변이시험(시험 번호: S-283).
- 한국화학연구소 안전성연구센터. (1993). DA-3001의 CHO-K1-BH4 세포를 이용한 염색체이상시험 (시험번호: S-284).