

랫드에서 인체 재조합 적혈구 조혈인자, rHu-EPO의 급성정맥독성시험

곽승준 · 김형식 · 임소영 · 천선아 · 홍채영 · 박현선 · 김원배¹ · 김병문¹ · 안병옥¹ · 이병무*

성균관대학교 약학대학 독성학교실, ¹동아제약(주) 연구소

Acute Toxicity Study of Recombinant Human Erythropoietin(rHu-EPO) in Rats

Seung Jun KWACK, Hyung Sik KIM, So Young LIM, Sun Ah CHUN, Chae Young HONG, Hyun Sun PARK, Won Bae KIM¹, Byoung Moon KIM¹, Byoung Ok AHN¹ and Byung Mu LEE*

Division of Toxicology, School of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Kyunggi-Do, Suwon 440-746, Korea

¹Dong-A Pharm. Co., LTD., 47-5, Sanggal-Ri, Kiheung-Up, Yongin-Gun, Kyunggi-Do, 449-900, Korea

(Received August 14, 1996; accepted October 22, 1996)

Abstract - Acute intravenous toxicities of rHu-EPO (recombinant human erythropoietin) were investigated in Sprague-Dawley rats. Seven days after administration of rHu-EPO, we examined the clinical signs, mortalities, body weight and etc. No clinical signs and mortalities of toxicity were observed in animals. Also, a significant change of body weights was not observed. These results suggest that LD₅₀ value was >25,000 unit/kg in Sprague-Dawley rats and the acute intravenous toxicities of rHu-EPO were not significant.

Keywords □ rHu-EPO, acute toxicity, LD₅₀

rHu-EPO(유전자 재조합 인간 erythropoietin)는 내분비성 성장호르몬인 glycoprotein이다. Erythropoietin은 대부분 신장에서 생합성되어 순환계로 분비되며 일부 간에서도 합성된다(Erslev 등, 1980). 인간 erythropoietin은 분자량이 30.4 KD으로 erythroid burst-forming units(BFU-E)와 erythroid colony-forming units(CFU-E)의 분비와 증식을 촉진한다(Davis 등, 1987). rHu-EPO제제는 만성신장성 부전과 관련된 빈혈 및 혈우병환자에게 매우 효과가 있는 것으로 보고되어 있으며 HIV환자에서 2차적으로 유발되는 빈혈등에도 효과가 있는 것으로 보고되었다(Winearls, 1988; Evans 등, 1990; Fisher, 1993). 최근 이와같은 제제의 대량생산방법으로 유전자재조합기술이 도입되고 있으며 그에 따라 여러 실험동물에 대한 안전성시험도 보고되어 있다(Spicer and Wisler, 1990; Mino 등, 1990; Lim 등, 1994)

본 제제인 rHu-EPO는 동아제약(주)에서 유전자재조합 기술에 의해 개발한 제제로 대량생산이 가능하게 되었다. 따라서 본 제제에 대한 전임상시험의 일환으로 랫드에 대한 급성정맥독성시험을 실시하여 안전성을 평가하고자 실시하였다.

실험재료 및 방법

시험물질

시험물질인 rHu-EPO (DA3285)는 동아제약(주) 중앙연구소로부터 제공받아 시험에 사용하였다. 본 시험물질은 무색, 무취의 액체로 시험개시전까지 -20℃에서 보관하였다.

시험계 및 사육환경

시험구역은 성균관대학교 약학대학내 청결실험동물실에서 실시하였으며, 청정구역에서 생산된 SPF(특정병원체 부재) Sprague-Dawley계 랫드(Charls River)를 우정화학(주)로부터 분양 받아 온도 23±1℃, 습도 55±5%, 배기 10-18회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 300~500 Lux의 사육환경에서 마우스용 폴리카보네이트 사육상자(220 W×270 L×125H mm) 케이지에 5마리씩 넣어 사육하였다. 1주일의 순화사육기간 동안에 일반증상관찰을 시행하여 정상적인 동물만 시험에 사용하였다. 사료는 제일상사의 실험동물사료를 구입하여 실험동물에 자유로이 공급하였으며, 음수는 멸균수도물을 자유롭게 섭취시켰다.

군분리 및 투여용량의 설정

순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을

* To whom correspondence should be addressed.

측정하고 평균체중(180±10 g)에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 군분리를 실시하였다. 투여용량은 25, 000, 5,000, 1,000 및 200 IU/kg의 4단계 용량을 암, 수 각 3마리에 정맥투여하여 1주간 관찰하는 예비실험을 하였다. 예비실험결과 최고용량에서도 폐사가 인정되지 않았으므로 본 시험조건에서는 25,000 IU/kg 용량군과 매체대조군만 설정하여 암, 수 각 5마리에 투여후 1주간 관찰하였다.

시험물질의 조제 및 투여

시험물질의 조제는 담체로 rHu-EPO 희석용 완충액(ETB-001)을 사용하여 투여직전 용시 조제하였다. 투여경로는 미정맥으로 1회 2 ml/kg씩 투여하였다. 또한 투여량은 투여직전 체중의 변화에 따라 산출하였으며, 사료 및 음수는 자유로이 섭취할 수 있도록 공급하였다.

관찰 및 검사항목

일반증상관찰

투여당일은 투여후 10분, 30분, 1, 2, 4시간, 익일로부터는 1일 1회, 7일간 관찰하였다(National Institute of Safety Research, 1994).

체중측정

체중은 시험물질 투여전과 투여후 1일, 3일, 7일 및 사망동물발견시에 측정하였다. 생존예에 대해서는 평균치 및 체중증가량을 산출하였다.

혈액학적 및 혈청생화학적 검사

시험물질 투여 7일후에 모든 동물을 에테르 마취하에서 복부대동맥으로부터 채혈하여 EDTA-3K로 항응고처리를 하고 coulter counter를 이용하여 적혈구수, hemoglobin량, hematocrit치, 평균적혈구해모글로빈양, 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소농도(MCHC), 백혈구수, 및 혈소판수등을 측정하였으며, 혈액응고시간은 sodium citrate로 처리한 혈액으로부터 프로트롬빈 시간 및 활성화 부분 프

로트롬빈 시간을 측정하였다. 혈청학적 검사는 혈액학적검사와 동시에 혈청을 분취하여 총단백, albumin, 혈당, 총콜레스테롤, triglyceride, 요소질소, 뇨산, creatinine, 총 bilirubin, AST, ALT, ALP, CPK, LDH, sodium, potassium 및 calcium에 대하여 측정하였다.

병리학적검사

사망예에서는 발견직후에, 생존예에 대해서는 투여후 7일에 에테르 마취하에서 방혈 거사하고 모든동물에 대해서 부검하여 전신의 주요한 장기, 조직을 육안적으로 관찰하였다.

LD₅₀치

폐사가 인정될 경우 LD₅₀치 및 95% 신뢰한계는 7일간의 누적사망률로 부터 Litchfield and Wilcoxon법에 따라 산출하였다(Zbinden and Flury-Roversi, 1981; Lorke, 1983).

통계학적검사

통계학적 처리는 Student's-t 검정을 행하고 P<0.05, P<0.01의 수준으로 대조군과 시험물질투여군을 비교하였다.

결 과

사망동물에 및 임상증상

약 8주령의 랫드에 시험물질 rHu-EPO를 최고용량인 25,000 IU/kg을 정맥투여한 결과 투여군과 대조군에서 모두 사망에는 없었다(Table I). 또한 시험물질 투여후 대조군에 비해 특이적으로 관찰된 일반증상의 변화는 없었다(Table II).

체중측정결과

실험군과 대조군과의 모든 동물은 정상적인 체중증가를 나타냈으며 두군 사이에 유의한 차이를 나타내지는 않았다(Table III).

혈액학적 및 혈청생화학적 소견

Table I. Mortality of Sprague-Dawley rats intravenously treated with rHu-EPO for a week

Sex	Dosage (IU/kg)	Days after treatment								Final mortality
		0	1	2	3	4	5	6		
Male	0	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
	25,000	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
Female	0	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
	25,000	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5

Table II. Clinical signs of Sprague-Dawley rats intravenously treated with rHu-EPO for a week

Sex	Dosage (IU/kg)	Clinical signs	Hours after treatment						Days after treatment						
			1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7
Male	0	N D ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25,000	N D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Female	0	N D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25,000	N D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^aN D: Not detected.

Table III. Change of Body weights in Sprague-Dawley rats intravenously treated with rHu-EPO for a week

Sex	Dosage (IU/kg)		Days after treatment			
			0	1	3	6
Male	0	Mean	230	236	241	258
		SD ^a	4.8	5.3	5.1	3.6
		(n) ^b	5	5	5	5
	25,000	Mean	228	234	241	257
		SD	7.1	6.7	6.5	4.6
		(n)	5	5	5	5
Female	0	Mean	207	211	219	232
		SD	10.1	8.9	5.4	4.6
		(n)	5	5	5	5
	25,000	Mean	209	213	218	231.1
		SD	5.4	4.4	2.1	2.7
		(n)	5	5	5	5

^aSD=Standard Deviation. ^b(n)=number of animals.

시험물질을 1회 정맥으로 25,000 IU/kg을 투여후 관찰한 혈액학적 소견에서는 암컷의 적혈구수에서 대조군보다 약간 증가하였으나 유의성은 없었다. 또한 헤모글로빈 및 헤마토크리트치에 있어서도 대조군과 유의한 차이를 나타내지는 않았다(Table IV). 혈청학적 검사소견에서도 대조군과 시험물질 투여군간의 유의성 있는 차이를 보이는 소견들은 없었다(Table V).

육안적 해부소견

대조군과 시험물질투여군간의 유의성 있는 차이를 나타내지는 않았다(Table VI).

고 찰

약 8주령의 랫드에 시험물질 rHu-EPO를 최고용량인 25,000 IU/kg을 정맥투여한 결과 투여군과 대조군에서 모두

Table IV. Hematological findings of rats intravenously treated with rHu-EPO for a week

Item	Sex Dosage (IU/kg)	Male		Female	
		CON ^a	25,000	CON	25,000
WBC	(10 ³ /mm ³)	20.08±10.47	13.58± 2.81	8.27± 2.37	11.60± 2.53
RBC	(10 ⁶ /mm ³)	11.58± 5.92	11.42± 5.01	9.61± 4.30	10.61± 5.48
HGB	(g/dl)	15.26± 1.76	15.02± 2.17	13.14± 0.92	13.46± 1.29
HCT	(%)	44.02± 4.93	42.92± 6.66	38.88± 2.05	38.06± 3.78
MCV	(fl)	58.04± 1.42	57.98± 1.18	57.02± 1.15	57.54± 1.09
MCH	(pg)	20.1 ± 0.53	20.3 ± 0.51	19.28± 1.22	20.28± 6.30
MCHC	(g/dl)	34.64± 0.32	35.04± 0.42	33.8 ± 1.98	35.30± 0.17
PLT	(10 ³ /mm ³)	1242.2±91.85	1165.2±213.5	995.0±90.80	1050.3±124.2
Lymphocyte %	(%)	67.04±23.02	86.36± 7.15	85.8 ± 3.32	85.54± 4.22
PT	(Sec.)	16.62± 1.32	16.56± 0.58	16.74± 0.65	16.64± 0.93
PTT	(Sec.)	24.51± 1.08	23.72± 0.64	24.62± 0.85	24.34± 0.73

^aCON; Treated with rHu-EPO dilution buffer. Data are the mean±S.D. (n=5).

Table V. Biochemical serum values of rats intravenously treated with rHu-EPO for a week

Item	Sex Dosage (IU/kg)	Male		Female	
		CON ^a	2,500	CON	2,500
T. P.	(g/dl)	6.9 ± 0.69	7.0 ± 0.26	7.42± 0.13	7.02± 0.30
ALB	(g/dl)	1.38± 0.41	1.52± 0.19	1.86± 0.22	1.80± 0.10
GOT	(U/l)	108.6±25.21	90.2±15.96	81.6± 7.44	78.00± 2.71
GPT	(U/l)	34.6 ±15.22	35.2± 4.97	46.0± 7.55	41.6± 7.09
LDH	(U/l)	191.8±42.8	198.6±68.5	219.4±69.3	198.6±68.5
ALP	(U/l)	284.0±89.11	214.4±71.18	252.8±64.04	272.6±95.4
GLU	(mg/dl)	177.4±35.68	184.2±14.74	188.0±15.03	186.8±14.17
CHOL	(mg/dl)	48.6 ±14.71	53.8± 8.84	50.0± 9.0	49.2± 9.63
Ca	(mmol/l)	10.3 ± 0.35	10.5 ± 0.42	11.3± 0.19	11.02± 0.25
Na	(mmol/l)	145.0± 3.90	144.1±2.82	139.7± 8.32	141.9± 1.34
K	(mmol/l)	4.31± 0.47	4.56± 0.32	3.56± 0.47	4.12± 0.35
TG	(mg/dl)	48.4±28.45	45.75±17.33	89.8±32.06	128.4±49.46
BUN	(mg/dl)	16.8± 1.64	18.0± 3.24	19.0± 1.00	19.4 ± 2.70
CREAT	(mg/dl)	0.36± 0.05	0.32± 0.11	0.4± 0.0	0.48± 0.15
T. BIL	(mg/dl)	0.42±0.15	0.52± 0.11	0.34± 0.11	0.48± 0.11

^aCON; Treated with rHu-EPO dilution buffer. Data are the mean±S.D. (n=5).

Table VI. Incidence of necropsy findings in Spradue-Dawley rats intravenously treated with rHu-EPO for a week

Sex	Male		Female		
	Dosage (IU/kg)	CON ^a	25,000	CON	25,000
No. of rats		5	5	5	5
Adrenal Gland	L.	0	0	0	0
	R.	0	0	0	0
Brain		0	0	0	0
Heart		0	0	0	0
Liver		0	0	0	0
Kidney		0	0	0	0
Interstitial Pneumonia		1	0	0	0
Calcification					
Spleen		0	0	0	0
Testis	L.	0	0	0	0
	R.	0	0	0	0
Stomach		0	0	0	0

^aCON; Treated with rHu-EPO dilution buffer.

사망에는 없었다. 또한 시험물질 투여후 대조군에 비해 특이적으로 관찰된 일반증상의 변화는 없었다. 실험군과 대조군과의 모든 동물은 정상적인 체중증가를 나타냈으며 두 군 사이에 유의한 차이를 나타내지는 않았다. 시험물질을 1회 정맥으로 25,000 IU/kg 투여후 관찰한 혈액학적 소견에서는 암컷의 적혈구수에서 대조군보다 약간 증가하였으나 유의성은 없었다. 또한 헤모글로빈 및 헤마토크리치에 있어서도 대조군과 유의한 차이를 나타내지는 않았다. 혈청학적 검사소견에서도 대조군과 시험물질 투여군간의 유의성 있는 차이를 보이는 소견들은 없었다. 육안적 해부소견에 있어서도 대조군과 시험물질투여군간의 유의성 있는 차이를 나타내지는 않았다.

따라서 본 실험조건에서 rHu-EPO의 랫드에 대한 정맥 LD₅₀치는 암, 수 모두 25,000 IU/kg 이상이었으며, 상기의 일반 증상, 체중변화 및 부검소견등에 별다른 독성이 관찰되지 않았으므로 rHu-EPO의 랫드에 대한 급성독성은 없는

것으로 평가 되었다.

참고문헌

Davis, J. M., Arakawa, R., Strickland, T. W. and Yphantis, D. A. (1987). Characterization of recombinant human erythropoietin production in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* **26**, 2633-2638.

Erslev, A. J., Caro, J., Kansu, E. and Silver, R. (1980). Renal and extrarenal erythropoietin production in anaemic rats. *Br. J. Haematol.* **45**, 65-72.

Evans, R. W., Rader, B., Manninen, D. L. and the Co-operative Multicenter EPO Clinical Trial Group (1990). The quality of life of hemodialysis recipients treated with recombinant human erythropoietin. *JAMA.* **263**, 825-830.

Fisher, J. W. (1993). Recent advances in erythropoietin research. pp. 293-311. in: *Progress in Drug Research*, Vol. 41. eds. Ernst Jucker, Birkhauser Verlag Basel, Switzerland. pp 293-331.

Lim, D. M., Jeong, S. M., Cho, H. J., Kim, D. H., Park, K. H., Oh, M. S. and Kim, H. S. (1994). Acute toxicity of recombinant human erythropoietin. *Korean J. Toxicol.* **10**, 237-241.

Lorke, D. (1983). A new approach to practical toxicity testing. *Arch. Toxicol.* **54**, 275-287.

Mino, T., Ohmura, T., Hiraoka, Y., Sugino, T. and Hayashi, H. (1990). General Pharmacological studies of erythropoietin (TYB-5220). *藥理と治療.* **18**, 953-971.

National Institute of Safety Research (1994). Toxicity test guideline for safety evaluation of drugs for human use, No. 94-3 Korea.

Spicer, E. J. F. and Wisler, J. A. (1990). Acute subcutaneous and intravenous toxicity studies in rats and monkeys with TYB-5220. *藥理と治療.* **18**, 973-1034.

Winearls, C. G. (1988). Treatment of the anemia of chronic renal failure with recombinant human erythropoietin. *Drugs.* **38**, 342-345.

Zbinden, G. and Flury-Roversi, M. (1981). Significance of the LD₅₀ test for toxicological evaluation of chemical substance. *Arch. Toxicol.* **47**, 77-99.