

기니픽과 마우스에서 천연형 재조합 사람 Erythropoietin (EPO), DA-3285의 항원성

김범준 · 남석우¹ · 박종선 · 강경구² · 김원배² · 한정환¹ · 이병무¹ · 이항우¹ · 홍성렬*
성균관대학교 유전공학과, 약학대학¹, 동아제약(주) 연구소²

Antigenicity of DA-3285, Recombinant Human Erythropoietin, in Guinea Pigs and Mice

Bumjun KIM, Suk Woo NAM¹, Jongsun PARK, Kyung Koo KANG², Won Bae KIM²,
Jeung Whan HAN¹, Byung Mu LEE¹, Hyang Woo LEE¹ and Sungyoul HONG*

Department of Genetic Engineering and

¹College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

²Research Laboratories, Dong-A Pharmaceutical Co., Ltd. Yongin 449-900, Korea

(Received September 4, 1996; accepted October 22, 1996)

Abstract-Antigenicity of DA-3285, human recombinant erythropoietin which was produced from mammalian cells, was examined in guinea pigs and mice. In active systemic anaphylactic test, mild anaphylactic signs were observed in guinea pigs sensitized subcutaneously with DA-3285 or DA-3285 incorporated with complete Freund's adjuvant(CFA) when challenged with high dose(1000 IU/Kg) of DA-3285. Other groups showed negative responses. In mouse-rat passive cutaneous anaphylaxis test, 20% sera of mice immunized with DA-3285 or DA-3285 mixed with aluminum hydroxide(alum) showed mild positive responses. In the case of indirect haemagglutination reaction(IHA) test, when sheep red blood cells coated with DA-3285 was incubated with mouse serum, all the serum samples were showed negative responses. These results suggest that DA-3285 has a very weak antigenic potential and probably would not induce systemic allergic reactions in clinical uses.

Keywords □ erythropoietin, DA-3285, antigenicity, ASA, PCA, IHA.

DA-3285는 동아제약(주) 연구소에서 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조한 천연형 재조합 사람 erythropoietin (rHu-EPO)이다. 이 rHu-EPO는 재조합 유전자를 포유동물 세포에 삽입하여 무혈청 배지에서 배양하여 제조하였다. Erythropoietin(EPO)은 골수내 erythroid progenitor cell의 분화와 증식을 촉진하여 적혈구 산생을 유도하는 성장호르몬으로서(Eschbach와 Adamson, 1989), 태아기에는 주로 간에서, 성숙기에는 주로 신장에서 생성된다(Koury 등, 1988). Erythropoietin은 과거에는 뇨에서 정제하여 만성 빈혈 및 조혈장애의 치료에 사용되어 왔으나, 1985년 사람 EPO 유전자의 염기배열이 알려진 후(Jacobs 등, 1985), 여러 가지 host cell들에서 발현되어 생산되고 있다.

Erythropoietin은 193 아미노산 잔기로 구성된 단백질로

합성 된 후, N-말단 27개 아미노산 잔기로 되어 있는 leader sequence와 C-말단의 arginine이 절단되어 165 아미노산 잔기로 구성된 단백질로 혈액 속에 존재하게 된다. 분자 내에 두 개의 disulfide bridge가 있으며, 세곳의 N-linked 그리고 한곳의 O-linked oligosaccharide side chain이 결합되어 있다(Sasaki 등, 1987). Erythropoietin은 당단백질로서 전체 분자의 분자량은 35-39 kDa이고, 펩타이드 사슬만의 이론적 분자량은 18.2 kDa이기 때문에, 당 함량이 약 40-55% 정도로 간주되고 있다. 그리고 당체의 종류와 길이는 개인에 따라서 다르며, 또한 재조합 유전자를 이용하여 생산시 host cell, 배양조건 등에 따라서 차가 있는 것이 보고된 바 있다(Tsuda 등, 1988).

본 실험에서는 DA-3285(rHu-EPO)의 항원성을 평가하기 위하여 기니픽과 마우스를 이용하여 능동 전신성 아나필락시스(active systemic anaphylaxis: ASA)반응시험과 수동적

* To whom correspondence should be addressed.

부아나필락시스(passive cutaneous anaphylaxis: PCA) 반응 시험, 간접적혈구 응집 반응시험(indirect haemagglutination reaction: IHA)을 국립보건안전연구원 제 94-3호, 의약품 등의 독성시험기준과 독성시험 표준작업지침서에 따라 실시하였다.

실험방법

시험물질

시험물질로 동아제약 연구소에서 제조한 재조합 인간 Erythropoietin (DA-3285, Lot No. ETS-002)을 사용하고, 양성 대조물질로는 bovine serum albumin (BSA, Sigma Chemical Co. U.S.A.)을 사용하였다. Adjuvant로는 전신능 동성 아나필락시스 반응시험에서는 complete Freund's adjuvant (CFA, Difco Laboratories, U.S.A.)를 사용하였고, 수동피부 아나필락시스 반응시험과 간접 적혈구 응집 반응시험에서는 aluminum hydroxide gel(alum, Serva, Sweden)을 사용하였다. 그 외 시약은 Evans blue (Acros, U.S.A.), 희석용 완충액(동아제약(주), Lot No. ETB-001, pH 7.1), 면양 적혈구(Korea Media, Korea), tannic acid(Kokusen, Japan), 생리식염수(광명약품공업), gelatin(Sigma Chemical Co. U.S.A.), phosphate buffered saline (pH 7.2)을 사용하였다.

사용동물

능동 전신성 아나필락시스 반응시험에는 Hartley계 수컷 guinea pig(체중 250-350 g, 5주령) 40마리를, 수동 피부 아나필락시스 반응시험과 간접 적혈구 응집 반응시험의 감작시에는 BALB/C계 수컷 마우스(체중 20-30 g, 5주령) 40마리를, 수동 피부 아나필락시스 반응 야기에는 Sprague-Dawley계 수컷 랫드(체중 250-300 g, 9주령) 70마리를 실험동물 공급사(B & K)로 부터 구입하여 1주이상 예비 사육 후에 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 동물 사육은 온도 23±2℃, 습도 45-65%, 그리고 조명 시간 12시간(조명 8:00-20:00)으로 설정된 사육실에서 마우스와 랫드에는 마우스용 사료를, guinea pig는 guinea pig용 고형 사료와 양배추를, 그리고 음용수는 자유롭게 섭취시켰다.

시험군 구성

항원성시험의 군구성은 Table I, II와 같이 1군은 음성대조

군, 2군은 양성대조군 3군은 DA-3285 저용량 투여군, 4군은 DA-3285 고용량 투여군, 그리고 5군은 고용량과 면역보조제 혼합 투여군으로 구성하여 DA-3285에 대한 항원성시험을 수행하였다. 저용량은 실제 임상에서 사용될수 있는 양으로 설정하였고 고용량은 저용량의 10배로 설정하였다.

감작항원 및 야기항원 조제

감작항원의 조제는 guinea pig 감작시 DA-3285를 시험군에 따라 소요되는 투여량을 희석용 완충액에 용해하여 조제하였다. 음성대조군은 희석용 완충액만 투여하며, 면역보조제 혼합 투여군은 DA-3285를 희석용 완충액에 용해시킨 후, 동량의 CFA와 혼합하여 조제하였다. BSA 감작항원은 BSA를 희석용완충액에 용해시켜 조제하였고 마우스 감작시 감작항원의 조제는 guinea pig의 감작시와 모두 동일하나 면역보조제로 alum을 사용하였다.

야기항원의 용량은 DA-3285의 경우 1000 IU/kg으로, BSA는 10 mg/head로 하였다. 야기항원의 조제는 DA-3285와 BSA로 단독 유발시는 각각의 물질만을 희석용 완충액에 용해시켜 조제하였다.

능동 전신성 아나필락시스

구성된 군당 6마리의 수컷 guinea pig에 감작항원을 음성대조군 및 DA-3285 단독 감작군은 주 2회, 면역보조제와 혼합감작군은 주 1회씩 3주간 피하로 개체당 0.5 ml을 5개소에 분할 투여하여 감작하였다. 최종 감작 후 2주 경과 후에 유발항원을 정맥내 투여하여 아래의 아나필락시스 쇼크 반응시험 판정 기준에 따라 관찰한 결과를 반응기록지에 기록하여 판정하였다.

“아나필락시스 쇼크 반응시험 판정기준” (의약품 등의 독성시험기준)

- 0 : 무증상.
- I : 불안, 기모, 진진, 코를 문지르거나 핏몸.
- II : 재채기, 기침, 호흡촉진, 배뇨, 배변, 유루
- III : 호흡곤란, 짹짹거리는 소리, 청색증, 보행불안, 도약, 헛떡거리고 몸부림침, 경련, 황와, chyne-strokes 호흡.
- IV : 사망.

Table I. Active systemic anaphylaxis

Group	No. of animals	Sensitizing antigen	Route	Challenging antigen
1	6	Vehicle	s.c. ^a	Vehicle
2	6	BSA, 1 mg/head	s.c.	BSA, 10 mg/head
3	6	DA-3285, 100 IU/Kg	s.c.	DA-3285, 1000 IU/Kg
4	6	DA-3285, 1000 IU/Kg	s.c.	DA-3285, 1000 IU/kg
5	6	DA-3285+CFA, 1000 IU/Kg	s.c.	DA-3285, 1000 IU/kg

^as.c.: subcutaneously.

Table II. Mouse-rat passive cutaneous anaphylaxis

Group	No. of animals	Sensitizing antigen	Route	Challenging antigen
1	6	Vehicle	s.c. ^a	Vehicle+1% Evans blue BSA, 10 mg/head
2	6	BSA+alum, 1 mg/head	i.p. ^b	1% Evans blue
3	6	DA-3285, 100 IU/Kg	s.c.	DA-3285, 1000 IU/Kg
4	6	DA-3285, 1000 IU/Kg	i.p.	1% Evans blue
5	6	DA-3285+alum, 1000 IU/Kg	i.p.	A-3285, 1000 IU/Kg

^as.c.: subcutaneously. ^bi.p.: intraperitoneally.

수동 피부 아나필락시스

각군 6마리의 수컷 BALB/C 마우스에 음성대조군 및 DA-3285 단독 감작군은 주 2회, 면역보조제와의 혼합감작군은 주 1회씩 3주간 감작시켰다. 즉 1, 3, 4군은 제모한 등 부위의 피하에 투여하고, 2, 5군은 복강 내로 투여하였다. 5군은 DA-3285와 alum 동량 혼합액 1000 IU/kg을 주1회씩 3주간 투여하여 감작 하였다. 투여액량은 모두 10 ml/kg으로 하였으며 피하 투여의 경우에는 5개소에 나누어 감작하였다. 최종 감작일로부터 2주 후에 각군의 동물 모두에서 혈액 1ml 이상 채취하여 혈청을 분리한 후, 랫드를 이용한 PCA 시험을 실시하기전까지 -20 °C에서 냉동 보관하였다.

Heterologous PCA test는 마우스로부터 얻은 혈청을 사용하여 랫드에서 실시하였다. 즉 마우스 혈청을 생리식염수로 4배부터 연속 배수 희석하여(4-1024배 희석), 각각의 희석혈청 0.1 ml을 제모한 랫드의 등부위 피내에 주사하고 24시간 후에 각각의 유발항원과 1% Evans blue 혼합용액 1 ml을 랫드의 꼬리정맥 내로 주사하였다. 30분 경과 후에 랫드를 방혈치사시켜 Evans blue spot을 확인하고 직경 5 mm 이상인 경우를 양성으로 판정하여 양성을 나타낸 최대 희석배수를 혈청의 항체가로 하였다. 마우스 혈청 1개당 2마리의 랫드를 사용 duplicate로 PCA 반응시험을 실시하였다.

간접 적혈구 응집 반응시험

수동 피부 아나필락시스 실험에서 사용한 항혈청을 96-Well U bottom-plate에서 희석액(gelatin in saline, 2 mg/ml)으로 연속 배수(4-1024) 희석한 후 (50 µl/well), DA-3285로 피복된 1% (V/V) 면양적혈구 부유액 50 µl을 넣어 혼화하였다. 대조군으로는 희석액과 항원 처리된 면양 적혈구 부유액을 동량(50 µl) 혼화하였다. 혼합액을 상온에서 2-3시간 이상 반응시킨 후, 응집 유무를 관찰하였다. 응집상이 관찰된 항혈청의 최대 희석배수를 그 항혈청의 응집가로 하였다.

Table III. Active systemic anaphylaxis

Group	Sensitizing antigen	Route	Challenging antigen	No. of animals	Severity ^a				
					0	I	II	III	IV
1	Vehicle ^b	s.c.	Vehicle	6	6	0	0	0	0
2	BSA 1 mg/head	s.c.	BSA, 1 mg/head	6	0	0	0	6	0
3	DA 3285 100 IU/Kg	s.c.	DA 3285 1000 IU/Kg	6	6	0	0	0	0
4	DA 3285 1000 IU/Kg	s.c.	DA 3285 1000 IU/Kg	6	3	2	1	0	0
5	DA 3285+CFA 1000 IU/Kg	s.c.	DA 3285 1000 IU/Kg	6	4	2	0	0	0

^a0: Negative I: Mild, II: Moderate, III: Severe, IV: Death.

^bBuffer solution for dilution, pH 7.1(Lot No. ETB-001).

실험결과

능동 전신성 아나필락시스

Guinea pig을 이용한 전신 능동성 아나필락시스 반응시험 결과는 Table III과 같다. DA-3285, 1000 IU/Kg으로 감작한 시험물질 고용량 투여군(4군)에서 6마리중 3마리가 불안 증상을 보였으며, 이 중 1마리에서 코를 문지르거나 핏몸과 배뇨 증상이 나타났고, DA-3285 와 면역보조제(CFA)로 감작된 군(5군)에서는 6마리중 2마리에서 불안 증상을 보여, 4군과 5군은 Mild로 판정되었다. DA-3285 100 IU/Kg으로 감작한 시험물질 저용량 투여군(3군)과 매체대조군은 어떠한 증상도 관찰되지 않았다. 양성대조군인 BSA로 감작한 군에서는 유발항원 주사후 10분 경과 후 부터 6마리 모두 기침, 황와, 호흡축진, 경련, 유루 등의 증상을 보였고 이중 2마리는 도약 증상을 보였다.

Table IV. Mouse-rat passive cutaneous anaphylaxis

Group	Sensitization Antigen	Dose	Route	No. of serum	Challenging Antigen	Titer ^a
1	Vehicle	0.5 ml /head	s.c.	1	Vehicle	-
				2		-
				3		-
				4		-
				5		-
				6		-
2	BSA+alum	1 mg /head	i.p.	1	BSA, 10 mg/head	>64
				2		>128
				3		>256
				4		>256
				5		>128
				6		>128
3	DA-3285	100 IU/Kg	s.c.	1	DA-3285, 1000 IU/Kg	-
				2		≤4
				3		-
				4		-
				5		-
				6		-
4	DA-3285	1000 IU/Kg	s.c.	1	DA-3285 1000 IU/Kg	≤4
				2		-
				3		-
				4		-
				5		-
				6		-
5	DA-3285 +alum	1000 IU/Kg	i.p.	1	DA-3285, 1000 IU/Kg	≤4
				2		-
				3		-
				4		-
				5		-
				6		-

^a마우스 혈청 1개당 2마리의 랫드에서 PCA 반응 관찰, 그 최소 희석배수를 해당 혈청의 항체가로 판정하였다.

수동 피부 아나필락시스

수동 피부 아나필락시스 반응시험 결과는 Table IV와 같다. 희석용 완충액으로 감작시킨 1군에서는 항체가 검출되지 않았고, DA-3285 단독 투여군인 3, 4군과 면역보조제와 같이 투여한 5군에서는 각각 1개의 혈청에서만 최대 4이하의 항체를 보이는 항체가 검출되었다. 양성대조군에서는 전 예에서 64이상의 항체를 보였고 이중 2마리의 혈청에서는 256이상의 항체를 관찰할 수 있었다.

간접 적혈구 응집 반응시험

감작된 마우스의 항혈청을 이용하여 실시한 간접 적혈구 응집 반응시험의 결과는 Table V와 같다. DA-3285로 항원 처리된 면양적혈구에 의해 BSA와 alum 혼합액으로 감작된 양성대조군은 1024배까지 응집현상을 관찰할 수 있었다. 매체대조군과 DA-3285 고용량(1000 IU/Kg)과 DA-3285 저용량(100 IU/Kg)으로 감작된 3, 4군에서는 항체를 확인할 수 없었다. alum과 DA-3285 고용량으로 감작된

5군에서도 응집을 관찰할 수 없었다.

고 찰

유전자 재조합기술을 이용하여 생산된 human erythropoietin인 DA-3285의 항원성을 조사하기 위해 DA-3285의 추정되는 임상사용량, 임상사용량의 10배 및 임상사용량의 10배와 면역보조제 혼합물을 guinea pig과 마우스에 감작한 후, 능동전신성 아나필락시스 반응시험, 수동 피부 아나필락시스 반응시험 및 간접 적혈구 응집반응시험을 실시하였다.

능동전신성 아나필락시스 반응시험 결과 양성대조군을 제외한 매체대조군, DA-3285 고용량(1000 IU/Kg), DA-3285 저용량(100 IU/Kg) 그리고 DA-3285 고용량과 면역보조제의 혼합물 투여군들에서는 전 예중 몇 예에서만 약한 항원성이 관찰됐을 뿐 아나필락시스 쇼크 반응은 관찰할 수 없었다.

Mouse-rat heterologous PCA 반응시험에서는 면역보조제로 IgE형의 항체 형성을 촉진하는 alum을 사용하였다. 이 반응에도 DA-3285 단독 및 alum과 혼합물을 투여한 군에서 약간의 항원성(항체가 4이하)을 보이는 몇 예를 볼 수 있었으나, DA-3285에 대한 항원성으로는 사료되지 않는다.

면양적혈구를 이용한 적혈구 응집반응에서는 양성대조군 외에는 응집 반응을 일으키지 않는 것으로 확인하였다. 적혈구 응집 반응은 일반적으로 IgG 와 IgM이 관여하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 적혈구 응집반응 결과는 DA-3285는 IgG와 IgM 계열의 항체 생성은 유도하지 않는 것으로 판단된다.

이상의 결과들을 종합하면 사람에게서 유래한 유전자에 의해 생산된 DA-3285는 미약한 항원성을 가지고 있는 것으로 생각되며 임상적으로 사람에게 투여할 경우 항원성(antigenicity)에 의한 전신적 쇼크를 일으킬 가능성은 희박한 것으로 사료된다.

Table V. Indirect haemagglutination reaction

Group	Sensitizing antigen	Coating antigen	No. of serum	Titer
1	Vehicle	DA-3285, 56000 IU/ml	1	-
			2	-
			3	-
			4	-
			5	-
			6	-
2	BSA+alum, 1 mg/head	BSA, 2.5 mg/ml	1	>1024
			2	>1024
			3	>1024
			4	>1024
			5	>1024
			6	>1024
3	DA-3285, 100 IU/Kg	DA-3285, 56000 IU/ml	1	-
			2	-
			3	-
			4	-
			5	-
			6	-
4	DA-3285, 1000 IU/Kg	DA-3285, 56000 IU/ml	1	-
			2	-
			3	-
			4	-
			5	-
			6	-
5	DA-3285+alum 1000 IU/Kg	DA-3285, 56000 IU/ml	1	-
			2	-
			3	-
			4	-
			5	-
			6	-

∴ No agglutination.

참고문헌

Eschbach, J. W. and Adamson, J. W. (1989). Guidelines for recombinant human erythropoietin therapy. *Am. J. Kidney Dis.* **14**, suppl. 1, 2-8.

Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S. D., Kaufman, R. J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S. S., Hewick, R., Fritsch, E. F., Kawakita, M., Shimizu, T. and Miyake, T. (1985). Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* **313**, 806-810.

Koury, S. T., Bondurant, M. C. and Koury, M. J. (1988). Localization of erythropoietin of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by *in situ* hybridization. *Blood* **71**, 524-527.

- Nimtz M., Martin, W., Wray, V., Kloppel, K. D., Augustin, J. and Conradt, H. (1993). Structures of sialyated oligosaccharides of human erythropoietin expressed in recombinant BHK-21 cells. *Eur. J. Biochem.* **213**, 39-56.
- Sasaki, H., Bothner, B., Dell, A. and Hukuda, M. (1987). Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. *J. Biol. Chem.* **262**, 12059-12076.
- Tsuda, E., Goto, M., Murakami, A., Akai, K., Ueda, M., Kawanishi, G., Takakashi, N., Sasaki, R., Chiba, H., Ishihara, H., Mori, M., Tejima, S., Endo, S. and Arata, Y. (1988). Comparative structural study of N-linked oligosaccharides of urinary and recombinant erythropoietins. *Biochemistry* **27**, 5646-5654.
- 국립보건안전연구원. (1994). 제 94-4호. 의약품 등의 독성시험기준.
- 국립보건안전연구원. (1993). 독성시험 표준작업지침서.