

마우스에서 항암제 유발 호중구감소에 대한 CJ-50001의 회복촉진효과

백남진 · 강재구 · 최재목 · 김기완 · 김달현* · 김제학 · 김현수
제일제당 종합연구소

Therapeutic Effect of CJ-50001 (rG-CSF) on Neutropenia Caused by Anticancer Agents in Mice

Nam-Jin BAEK, Jae Ku KANG, Jae Mook CHOI, Ki Wan KIM, Dal Hyun KIM*,
Je Hak KIM and Hyun Su KIM

R&D Center, Cheil Jedang Corp., 522-1 Dokpyong-Ri, Majang-Myon, Ichon-Si, Kyonggi-Do 467-810, Korea

(Received September 19, 1997; accepted October 28, 1997)

Abstract - Neutropenia is a major dose-limiting side effect of cancer chemotherapy. The therapeutic effects of CJ-50001 were examined on neutropenia caused by anticancer agents. Neutropenia was induced by cyclophosphamide (130 mg/kg), doxorubicin (4.5 mg/kg), and vincristine (1 mg/kg) in normal ICR mice and by cyclophosphamide (200 mg/kg) in CT26 adenocarcinoma bearing BALB/C mice. After the subcutaneous injection of anticancer agents, we administered subcutaneously recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (100 µg/kg/day) to mice in order to stimulate neutrophil production. In normal and tumor-bearing mice, neutrophil production efficacy of CJ-50001 (rG-CSF) was similar to that of Grasin. These results suggest that CJ-50001 could be effective in its clinical use for neutropenia treatment.

Keywords □ CJ-50001, rG-CSF, Neutropenia, Chemotherapy

G-CSF(granulocyte-colony stimulating factor)는 단구/대식구, 섬유아세포, 성세포 및 내피세포에 의해 만들어져서 골수내에서 호중구 생산과 호중구 전구세포의 증식, 분화, 그리고 마지막 단계에서 호중구의 활성화를 특이적으로 향상시키는 조절 인자의 일종이다(Nagata, 1994). 인간의 G-CSF는 유전자 재조합기술을 이용하여 대장균 혹은 동물 세포로부터 대량 발현시킬 수 있게 되었고(Souza 등, 1986; Nagata 등, 1986), 이것에 의해 임상 적용이 실용화됨에 따라 골수억제성 항암제 치료 환자의 감염 기회 감소, 골수이식 환자들에서 골수의 회복 촉진, 재생불량성 빈혈 환자의 호중구 기능 향상, 그리고 항암제 치료에 의해 야기되는 호중구감소증 치료 등에 사용되고 있다.

제일제당(주) 종합연구소에서는 대장균을 발현계로 사용한 유전자재조합기술로 recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (rG-CSF, CJ-50001)를 생산하였다. 본 시험에서는 CJ-50001에 대한 유효성시험의 일환으로서 정상 및 담압마우스에서 항암제에 의해 유발된 호중구 감소증의 회복촉진효과를 검토하였다.

실험방법

시험물질 및 재료

제일제당 종합연구소에서 대장균을 이용하여 생산한 CJ-50001을 10 mM acetic acid 완충액(pH 4.0, 40 µg/ml tween 80, 5% mannitol)에 희석하여 사용하였다. 비교물질로는 시판중인 filgrastim(Grasin, 제일약품)을 위와 동일한 완충액에 희석하여 사용하였다. Cyclophosphamide는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, Missouri, USA), doxorubicin(에이디엠주)은 동아제약, vincristine(온코빈 정주)은 대웅필리 제품을 각각 사용하였다.

실험동물

정상 마우스를 이용한 복합항암제 투여 모델에는 6주령의 웅성 ICR 마우스를, 담압 마우스 모델에는 5주령의 웅성 BALB/C 마우스를 Charles River Japan(Atsugi, Japan)에서 각각 구입하여 일주일 이상의 순화기간을 거친 후 시험에 사용하였다. 항암제 투여시 ICR 마우스는 33.0~40.6 g, BALB/C 마우스는 19.9~24.6 g이었다. 사육실은 온도 23±3°C, 상대습도 50±10%, 환기횟수 12~13회/hr, 조도 150~300 Lux, 명암 주기는 12시간 조건하에 유지하였다. 검역기

* To whom correspondence should be addressed.

간 및 시험기간중에는 실험동물용 고형사료를 섭취시켰으며, 음수는 수도물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

정상마우스에서 복합항암제와 CJ-50001의 병용투여

Cyclophosphamide(CPA) 130 mg/kg, doxorubicin(DXR) 4.5 mg/kg 및 vincristine(VCR) 1 mg/kg을 10 ml/kg의 용적으로 ICR 마우스의 복강내로 단회 투여하였다. 항암제 투여 후 1일째부터 4일째까지 매일 오전 9시경에 CJ-50001(Lot No. CS4) 혹은 Grasin을 100 µg/kg/day 용량으로 임상에서 보편적으로 사용되는 피하주사를 하였다. 항암제 투여후 2, 4, 6, 10 및 14일째에 채혈을 하였다. 채혈시간은 약물투여 6시간 후인 오후 3시경에 하였으며, 각 군당 6~8마리씩의 마우스로부터 0.3~0.5 ml의 혈액을 안와정맥총에서 채혈하였다.

담암마우스에서 cyclophosphamide와 CJ-50001의 병용투여

마우스 이식에 사용한 CT26(mouse colon adenocarcinoma) 세포는 서울대 의대 허대석 교수님으로부터 분양받았다. CT26 세포 5×10⁵개를 BALB/C 마우스의 등 피하에 주사하였다. 1주일 후 암조직의 생장이 육안으로 확인된 개체만을 선별하여 시험에 사용하였다. Cyclophosphamide(CPA) 200 mg/kg을 복강내 주사하고, 다음날부터 4일간 오전 9시경에 CJ-50001(Lot No. CS961025) 혹은 Grasin을 100 µg/kg/day 용량으로 임상에서 보편적으로 사용되는 피하주사를 하였다. CPA 투여후 2, 4, 5, 8, 11 및 14일째에 채혈을 하였다. 채혈시간은 약물투여 6시간 후인 오후 3시경에 각 군당 6~7마리씩의 마우스로부터 0.3~0.5 ml의 혈액을 안와정맥총에서 채혈하였다. 채증은 채혈 직전에 측정하였으며, 채혈후 각 동물로부터 종양을 적출하여 그 무게를 측정하였다.

혈구수 측정

혈액중의 백혈구수, 적혈구수 및 혈소판수는 Minos Vet hematology analyzer(ABX, Montpellier, France)에 의해 측정하였다. 일부의 혈액은 박충도말슬라이드를 제작하여 Giemsa염색한 후 100개의 백혈구중 호중구수를 계수하여 혈액중의 호중구수를 산출하였다.

통계처리

혈구수, 종양무게 및 체중은 Student's t-test에 의해 용매 대조군 혹은 무처리군과의 통계적 유의성을 검증하였다.

실험 결과

정상마우스에서 복합항암제와 CJ-50001의 병용투여 효과 호중구수의 변화

항암제만을 투여한 vehicle군에서는 2일 및 4일째 호중구수가 감소하였으며, 6일째부터 회복되기 시작하여 14일째에는 정상수준의 약 2배로까지 증가하였다(Fig. 1). CJ-50001 투여군에서는 2일째에 호중구수가 무처리군에 비하

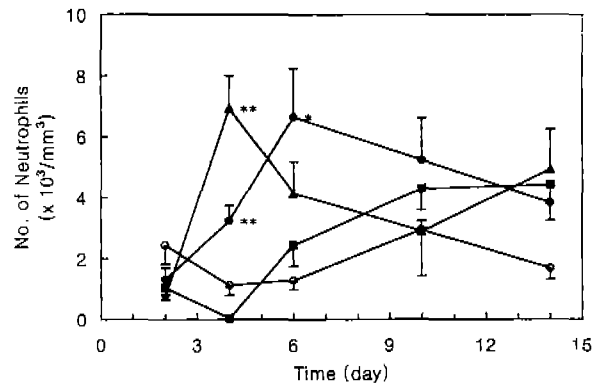


Fig. 1. Effects of CJ-50001 or Grasin on the number of neutrophils in normal mice injected with cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine. A mixture of cyclophosphamide (130 mg/kg), doxorubicin (4.5 mg/kg), and vincristine (1 mg/kg) was intraperitoneally administered into male ICR mice of 7-weeks old on day 0. CJ-50001 or Grasin (100 µg/kg/day) was injected subcutaneously from day 1 to day 4. Each value represents mean±S.E. (n=6~8). Statistical significance against vehicle group was analyzed by Student's t-test (*p<0.05; **p<0.01). —●— CJ-50001, —▲— Grasin, —■— Vehicle, —○— Non-treated.

여 약간 감소하였으나, 4일째 (p<0.01) 및 6일째 (p<0.05)에는 vehicle 투여군에 비하여 유의하게 증가하였다. 10일 및 14일째에는 호중구수가 점차 감소하였으나, 무처리군에 비하여는 높은 수준을 계속 유지하였다. Grasin 투여군에서도 CJ-50001 투여군과 비슷한 호중구수의 변동이 관찰되었다.

백혈구수의 변화

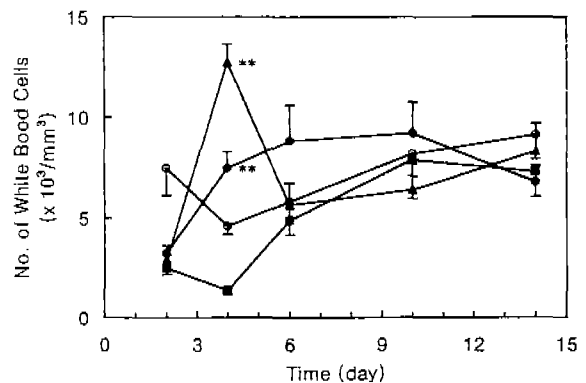


Fig. 2. Effects of CJ-50001 or Grasin on the number of white blood cells in normal mice injected with cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine. A mixture of cyclophosphamide (130 mg/kg), doxorubicin (4.5 mg/kg), and vincristine (1 mg/kg) was intraperitoneally administered into male ICR mice of 7-weeks old on day 0. CJ-50001 or Grasin (100 µg/kg/day) was injected subcutaneously from day 1 to day 4. Each value represents mean±S.E. (n=6~8). Statistical significance against vehicle group was analyzed by Student's t-test (*p<0.05; **p<0.01). —●— CJ-50001, —▲— Grasin, —■— Vehicle, —○— Non-treated.

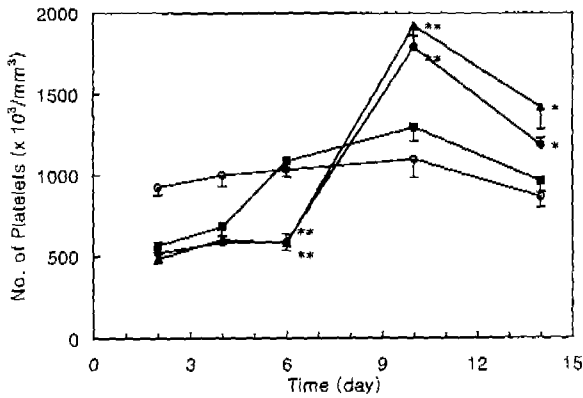


Fig. 3. Effects of CJ-50001 or Grasin on the number of platelets in normal mice injected with cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine. A mixture of cyclophosphamide (130 mg/kg), doxorubicin (4.5 mg/kg), and vincristine (1 mg/kg) was intraperitoneally administered into male ICR mice of 7-weeks old on day 0. CJ-50001 or Grasin (100 μ g/kg/day) was injected subcutaneously from day 1 to day 4. Each value represents mean \pm S.E. (n=6~8). Statistical significance against vehicle group was analyzed by Student's *t*-test (**p*<0.05; ***p*<0.01). ● CJ-50001, ▲ Grasin, ■ Vehicle, ○ Non-treated.

Vehicle군에서는 4일째까지 백혈구수가 감소하였으나 6일 이후부터는 무처치군과 비슷한 수준으로까지 회복되었다(Fig. 2). CJ-50001 투여군에서는 2일째에 vehicle군과 마찬가지로 백혈구수가 감소하였으나, 4일째에는 vehicle군에 비하여 현저히 증가 (*p*<0.01)하여 정상수준으로의 빠른 회복을 보였으며, 6일째에도 vehicle군에 비하여 높은 수준을 유지하다가 10일 이후부터는 vehicle군과 거의 비슷한 수준으로 감소하였다. Grasin 투여군에서도 4일째에 백혈구수의 현저한 증가(*p*<0.01)가 관찰되었으나 6일 이후로는 vehicle 투여군과 거의 유사한 값으로까지 감소하였다.

혈소판수의 변화

Vehicle군에서는 2일 및 4일째에 무처치군에 비하여 혈소판수가 감소하였으며, 6일 이후부터는 정상수준으로 회복되었다(Fig. 3). CJ-50001 투여군에서는 vehicle군과는 달리 혈소판수의 감소가 6일째(*p*<0.01)까지 지속되었으나, 10일째에는 정상수준을 훨씬 넘어설 정도로 혈소판수가 vehicle군에 비하여 유의한 증가(*p*<0.01)를 보였고, 14일째에도 약간 감소하긴 했지만 유의한 증가(*p*<0.05)상태를 계속 유지하였다. 비교물질인 Grasin 투여군에서도 CJ-50001과 유사한 변화가 관찰되었다.

적혈구수의 변화

항암제를 투여한 군들의 적혈구수는 무처치군에 비하여 적혈구수가 대체로 낮은 상태를 유지하였다. CJ-50001 투여군에서 10일째에 vehicle군에 비하여 적혈구수가 증가(*p*<0.05)한 것 이외에는, 시험기간 동안 CJ-50001 및 Grasin

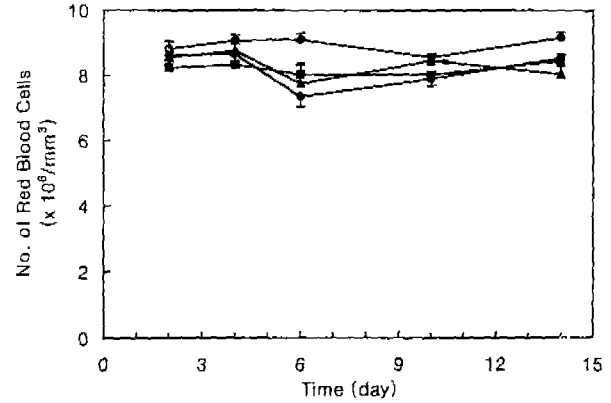


Fig. 4. Effects of CJ-50001 or Grasin on the number of red blood cells in normal mice injected with cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine. A mixture of cyclophosphamide (130 mg/kg), doxorubicin (4.5 mg/kg), and vincristine (1 mg/kg) was intraperitoneally administered into male ICR mice of 7-weeks old on day 0. CJ-50001 or Grasin (100 μ g/kg/day) was injected subcutaneously from day 1 to day 4. Each value represents mean \pm S.E. (n=6~8). Statistical significance against vehicle group was analyzed by Student's *t*-test (**p*<0.05; ***p*<0.01). ● CJ-50001, ▲ Grasin, ■ Vehicle, ○ Non-treated.

투여군 모두에서 vehicle군과 비교하여 유의성있는 적혈구수의 변동을 보이지 않았다(Fig. 4).

담압마우스에서 cyclophosphamide와 CJ-50001의 병용투여 효과

종양무게

Fig. 5에서 보는바와 같이, 항암제를 투여하지 않은 무처

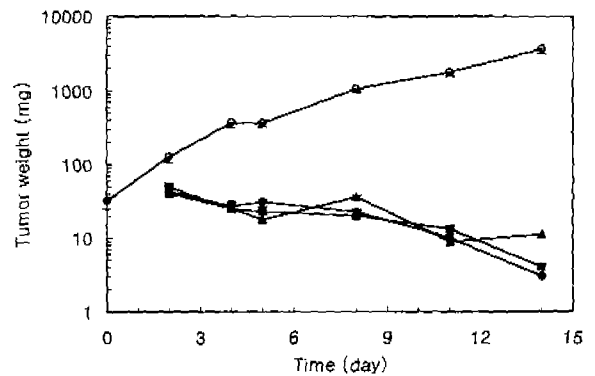


Fig. 5. Effects of CJ-50001 or Grasin on tumor weight in tumor-bearing mice injected with cyclophosphamide (CPA). CT26 mouse adenocarcinoma cells (5×10^5) were injected subcutaneously into male BALB/C mice of 6-weeks old on day 7. CPA (200 mg/kg) was administered intraperitoneally on day 0. CJ-50001 or Grasin (100 μ g/kg/day) was injected subcutaneously from day 1 to day 4. Each value represents mean \pm S.E. (n=6~7). All of the CPA injected group showed significant difference (*p*<0.01, Student's *t*-test) from non-treated group. ● CJ-50001, ▲ Grasin, ■ Vehicle, ○ Non-treated.

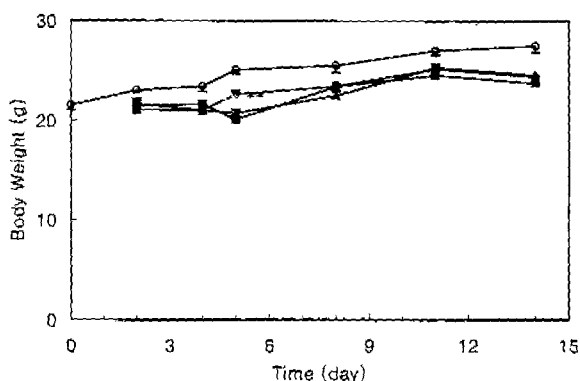


Fig. 6. Effects of CJ-50001 or Grasin on body weight in tumor-bearing mice injected with cyclophosphamide (CPA). CT26 mouse adenocarcinoma cells (5×10^5) were injected subcutaneously into male BALB/C mice of 6-weeks old on day 7. CPA (200 mg/kg) was administered intraperitoneally on day 0. CJ-50001 or Grasin (100 μ g/kg/day) was injected subcutaneously from day 1 to day 4. Each value represents mean \pm S.E. (n=6~7). Statistical significance against vehicle group was analyzed by Student's t-test (**p<0.01). All of the CPA injected group showed significant difference (p<0.05) from non-treated group. —●— CJ-50001, —▲— Grasin, —■— Vehicle, —○— Non-treated.

치군에 있어서 이식된 종양은 그 크기가 계속 증가하였다. 반면, cyclophosphamide를 투여한 모든 군에서는 종양의 무게가 감소하였으며, 무처치군의 종양무게와 비교하여 유의한 감소(p<0.01)가 시험기간 동안 지속되었다.

체중의 변화

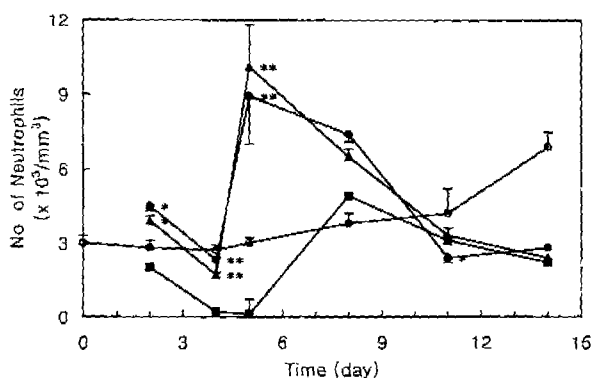


Fig. 7. Effects of CJ-50001 or Grasin on the number of neutrophils in tumor-bearing mice injected with cyclophosphamide (CPA). CT26 mouse adenocarcinoma cells (5×10^5) were injected subcutaneously into male BALB/C mice of 6-weeks old on day 7. CPA (200 mg/kg) was administered intraperitoneally on day 0. CJ-50001 or Grasin (100 μ g/kg/day) was injected subcutaneously from day 1 to day 4. Each value represents mean \pm S.E. (n=6~7). Statistical significance against vehicle group was analyzed by Student's t-test (*p<0.05; **p<0.01). —●— CJ-50001, —▲— Grasin, —■— Vehicle, —○— Non-treated.

항암제를 투여한 모든 군에서는 무처치군과 비교하여 유의성있는 체중의 감소(p<0.05)가 시험기간동안 지속적으로 관찰되었다(Fig. 6). 하지만, CJ-50001 및 Grasin 투여군과 vehicle군의 사이에는 특이한 차이가 나타나지 않았다.

호중구수의 변화

항암제만을 투여한 vehicle군에서는 2일째부터 호중구수가 감소하여 5일째까지 지속되다가, 8일째에 무처치군보다 약간 높은 수준으로 증가한 후, 11일 및 14일째에는 감소하였다(Fig. 7). CJ-50001 투여군에서는 호중구수가 2일째에 무처치군보다 증가하였고 vehicle군에 비하여도 유의한 증가(p<0.05)를 보였다. 4일째에는 약간 감소하였지만 vehicle군보다는 증가한 상태를 유지하였고(p<0.01), 5일째에는 무처치군의 약 3배정도까지 증가하였으며 vehicle군과의 유의한 차이(p<0.01)도 관찰되었다. 8일째에도 무처치군 및 vehicle군보다 높은 수준을 유지하였으나 vehicle군과의 유의성은 관찰되지 않았고, 11일부터는 vehicle군과 거의 비슷한 수준으로 감소하였다. 비교물질인 Grasin 투여군에서도 CJ-50001 투여군과 거의 비슷한 양상을 나타냈다.

백혈구수의 변화

Vehicle군에서는 5일째까지 백혈구수가 감소하였으나, 8일째에는 무처치군과 비슷한 수준으로 회복된후 11일부터는 다시 약간 감소하였다(Fig. 8).

CJ-50001 투여군에서는 2일째에 백혈구수가 무처치군보다는 감소하였지만 vehicle군에 비하여는 유의한 증가(p<0.05)를 보였고, 4일째에도 vehicle군보다는 유의한 증가(p<0.01)를 보였다. 5일째에는 백혈구수가 급격히 증가하여

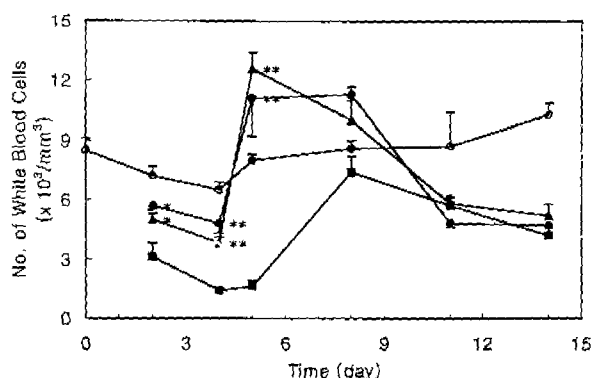


Fig. 8. Effects of CJ-50001 or Grasin on the number of white blood cells in tumor-bearing mice injected with cyclophosphamide (CPA). CT26 mouse adenocarcinoma cells (5×10^5) were injected subcutaneously into male BALB/C mice of 6-weeks old on day 7. CPA (200 mg/kg) was administered intraperitoneally on day 0. CJ-50001 or Grasin (100 μ g/kg/day) was injected subcutaneously from day 1 to day 4. Each value represents mean \pm S.E. (n=6~7). Statistical significance against vehicle group was analyzed by Student's t-test (*p<0.05; **p<0.01). —●— CJ-50001, —▲— Grasin, —■— Vehicle, —○— Non-treated.

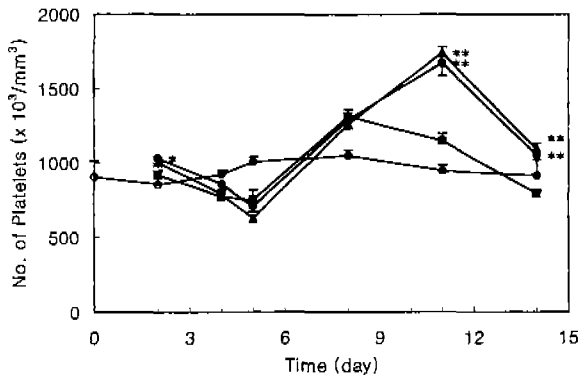


Fig. 9. Effects of CJ-50001 or Grasin on the number of platelets in tumor-bearing mice injected with cyclophosphamide (CPA). CT26 mouse adenocarcinoma (5×10^5) cells were injected subcutaneously into male BALB/C mice of 6-weeks old on day 7. CPA (200 mg/kg) was administered intraperitoneally on day 0. CJ-50001 or Grasin (100 μ g/kg/day) was injected subcutaneously from day 1 to day 4. Each value represents mean \pm S.E. (n=6~7). Statistical significance against vehicle group was analyzed by Student's *t*-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). ●— CJ-50001, ▲— Grasin, ■— Vehicle, ○— Non-treated.

무처치군보다도 높은 수준을 보였고 vehicle군과의 유의한 차이($p < 0.01$)도 관찰되었다. 8일째에는 vehicle군보다 높은 수준을 유지하였으나 유의성은 관찰되지 않았고, 11일부터는 vehicle군과 거의 비슷한 수준으로 감소하였다. 비교물질인 Grasin 투여군에서도 CJ-50001 투여군과 거의 비슷한 양상을 나타냈다.

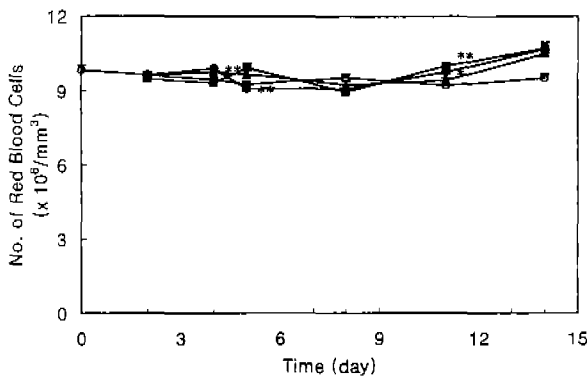


Fig. 10. Effects of CJ-50001 or Grasin on the number of red blood cells in tumor-bearing mice injected with cyclophosphamide (CPA). CT26 mouse adenocarcinoma (5×10^5) cells were injected subcutaneously into male BALB/C mice of 6-weeks old on day 7. CPA (200 mg/kg) was administered intraperitoneally on day 0. CJ-50001 or Grasin (100 μ g/kg/day) was injected subcutaneously from day 1 to day 4. Each value represents mean \pm S.E. (n=6~7). Statistical significance against vehicle group was analyzed by Student's *t*-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). ●— CJ-50001, ▲— Grasin, ■— Vehicle, ○— Non-treated.

혈소판수의 변화

Vehicle군에서는 5일째까지 혈소판수가 점차적으로 감소하다가 8일째에 무처치군보다 약간 높은 수준으로 회복되었으며, 11일째부터는 점차 감소하기 시작하였다(Fig. 9). CJ-50001 투여군에서도 8일째까지는 vehicle군과 같은 양상을 보였으나, 11일째에는 혈소판수가 감소하지 않고 오히려 높게 증가하여 vehicle군과 유의한 차이($p < 0.01$)를 보였으며, 14일째에는 약간 감소하였지만 vehicle군과의 유의한 차이($p < 0.01$)는 계속되었다. 비교물질인 Grasin 투여군에서도 CJ-50001 투여군과 거의 비슷한 변화를 확인하였다.

적혈구수의 변화

항암제를 투여한 군들의 적혈구수는 무처치군과 거의 비슷한 상태를 유지하다 14일째에만 약간 증가하였다. 그리고 CJ-50001 및 Grasin 투여군중의 일부에서 vehicle군과 비교하여 유의한 차이를 나타내기는 했지만, 적혈구수에 있어서 특이할만한 변동은 관찰되지 않았다(Fig. 10).

고 찰

본 연구에서는 대장균을 발현제로 사용하여 생산한 CJ-50001의 유효성을 검토하기 위하여 임상에서 암화학 요법으로 일반적으로 채용되는 복합항암제를 처리한 정상 ICR 마우스와 실제 암에서의 효과를 알아보기 위해 담암마우스를 실험에 사용하였다. 약물의 투여 경로는 감염의 우려가 적은 피하투여를 선택하였다.

정상 ICR 마우스에 cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine의 복합항암제를 투여하였을 때 나타난 백혈구 및 호중구의 감소는 6일째에 정상수준으로 회복되었으나, CJ-50001 투여에 의해서는 Grasin 투여군과 마찬가지로 4일째에 정상수준 이상으로 증가하였다. 적혈구수에 대해서는 아무런 영향을 미치지 않았다. 담암 BALB/C 마우스에서도, cyclophosphamide(CPA) 투여에 의해 나타난 백혈구 및 호중구의 감소는 8일째에 정상수준으로 회복되었으나, CJ-50001 투여군에서는 Grasin 투여군과 마찬가지로 5일째에 정상수준 이상으로 회복된 후 8일째까지 높은 수준을 유지하였다. 적혈구수의 변화에 있어서는 특이한 차이를 관찰할 수 없었다.

전체 백혈구중 호중구의 비율이 2일, 4일 및 5일째에 각각 77.3, 47.7, 79.6%(data not shown)임에 비취볼 때, 2일째의 호중구 증가는 marginal pool의 호중구 방출에 의한 것이고 5일째의 호중구 급증은 CJ-50001에 의해 호중구 전구세포가 증식 및 분화에 의한 것으로 사료된다. 따라서 CJ-50001은 호중구의 전구세포에 특이적으로 작용하여 말초 호중구의 증가를 일으킨다고 생각된다. CJ-50001을 항암제와 병용투여시 혈소판수가 약간 감소하였다가 일시적으로 증가한 후 다시 무처치군과 비슷한 수준으로 회복되었는

데, 이는 CJ-50001이 혈소판수의 감소에 대해서 다소 촉진적으로 작용하기 때문이라고 사료된다. 그러나 이러한 혈소판수의 감소 현상은 사람에서는 나타나지 않으므로 그 원인은 알 수 없지만 마우스에서 비교적 출현하기 쉬운 현상으로 생각된다.

이상의 결과로, CJ-50001은 시판중인 Grasin과 마찬가지로 정상 및 담임마우스에서 항암제 투여에 의한 호중구 감소의 회복을 촉진시키는 효과가 있음을 확인하였다. 따라서 CJ-50001은 임상에서의 호중구 감소증 치료에 유용하리라고 사료된다.

참고문헌

- Nagata, S. (1994). Granulocyte colony stimulating factor and its receptor. In *The Cytokine Handbook* (Thompson, A. Ed.), pp. 371-385. Academic Press, London.
- Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oheda, Masayoshi, Nomura, H. and Yamazaki, T. (1986). The chromosomal gene structure and two mRNAs for human granulocyte colony-stimulating factor. *EMBO J.* 5(3), 575-581.
- Souza, L. M., Boone, T. C., Gabilove, J., Lai, P. H., Zsebo, K. M., Murdock, D. C., Chazin, V. R., Bruszewski, J., Lu, H., Chen, K. K., Barendt, J., Platzer, E., Moore, M. A. S., Mertelsmann, R. and Welte, K. (1986). Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science.* 232, 61-65.

Nagata, S. (1994). Granulocyte colony stimulating factor and