

재조합 사람 과립구 콜로니 자극인자인 CJ50001의 중합체의 생물학적 활성과 급성독성에 관한 연구

하석훈* · 이현수 · 김기완 · 정종상 · 김달현 · 임동문 · 김종호 · 조효진 · 고흥곤
제일제당(주) 종합연구소

Biological Activity and Acute Toxicity of the Multimers of CJ50001, Recombinant Human Granulocyte Colony-stimulating Factor (rHuG-CSF), Produced in *E. coli*

Suk Hoon HA*, Hyun Soo LEE, Ki Wan KIM, Jong Sang CHUNG, Dal Hyun KIM, Dong Moon LIM, Jong Ho KIM, Hyo Jin CHO and Hyung Kon KOH

Research and Development Center, CHEILJEDANG Corporation, 522-1, Dokpyung-Ri, Majang-Myon, Ichon-Si, Kyonggi-Do, Korea

(Received November 3, 1997; accepted December 11, 1997)

Abstract – CJ50001 is a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rHuG-CSF) that stimulates the formation of neutrophils from bone marrow stem cells. It was produced in *E. coli* and purified through refolding and several processes. We produced CS970125(300) using purified CJ50001 and additives in order to test the stability of CJ50001. When CS970125(300) was stored at 50°C for more than 1 week, high molecular weight proteins were formed and those proteins were detected by non-reducing SDS-PAGE, gel filtration HPLC, and Western blot. Those proteins showed single band at the same position of CJ50001 in reducing SDS-PAGE. These data indicated that those high molecular weight proteins were the multimers of CJ50001. In biological assays, *in vitro* and *in vivo*, the multimers did not have biological activity and inhibitory action to that of CJ 50001. The mutimers did not induce toxicity in mice and rats in acute toxicity test. These results suggest that if CS970125(300) containing CJ50001 is stored at 50°C, CJ50001 will be the multimers that do not have biological activity and inhibitory effect to CJ50001 and do not induce acute toxicity.

Keywords □ CJ50001, rHuG-CSF, multimer, biological activity, acute toxicity

사람 과립구 콜로니 자극인자(human granulocyte colony stimulating factor, hG-CSF)는 마크로파지, 활성화 T 세포, 섬유아세포, 내피세포에 의해 주로 생성되며, 골수에서 호중구 전구세포에 작용하여 성숙 호중구로의 분화와 증식을 촉진하고(Welte 등, 1985) 골수로부터 호중구의 방출을 촉진시키는 작용이 있어(Welte 등, 1987; Hansen 등, 1995) 골수이식이나 항암치료에 있어서 화학요법에 의한 호중구 감소증의 치료에 효과적으로 사용되고 있다. hG-CSF는 1986년 그 유전자의 염기 서열이 밝혀진 후(Souza 등, 1986; Nagata 등, 1986) 상품화를 전제로 한 효율적이고 저렴한 여러 가지 대량 생산 방법이 시도되었으며(Devlin 등, 1988; Souza 등, 1989; Gills 등, 1988; Ono 등, 1989), 대장균 내에서 발현된 재조합 사람 과립구 콜로니 자극인자(rHuG-CSF)

가 천연형 hG-CSF에 비해 활성에서 동등함을 보였고(Souza 등, 1986; Metcalf 등, 1985), 체내에서 면역 반응, 독성 등을 유도하지 않았으며, 제제화하였을 때 rHuG-CSF의 안정성이 충분히 유지되는 등의 연구결과(AHFS drug information, 1997)를 기초로 하여 일부 연구자들은 가장 효율적인 방법으로 대장균에 의한 대량 생산방법을 선택하게 되었다. 그 후 대장균 발현 rHuG-CSF를 동결시키거나 30°C 이상의 온도에서 보관할 때 aggregate가 형성된다거나 중성 pH에서 단기간의 안정성만 보인다는 등의 사실이 밝혀졌으나, pH 3.8-4.2의 범위 내에서 냉장보관이 유지될 때에는 2년 이상 안정성이 유지되는 사실 또한 보고되었다(AHFS drug information, 1997).

CJ50001은 천연형의 hG-CSF의 N말단에 하나의 methionine기가 첨가된 총 175개의 아미노산으로 구성되어 있으며, hG-CSF 유전자의 염기 서열의 일부를 조정하여 아

* To whom correspondence should be addressed.

미노산 서열은 천연형과 같으면서 고수율로 발현이 되도록 만들어진 플라스미드에 의해 형질전환된 대장균 내에서 봉입체 상태로 발현이 되어 정해진 방법에 의해 순수하게 정제된 것이다(미발표자료 a, b). CJ50001의 보관 중 생성되는 부산물에 대하여 조사하기 위해 가혹 조건(50°C)에서 보관하며 생성되는 물질을 조사하였을 때, 주로 생산되는 물질은 gel filtration HPLC 상에서 CJ50001보다 먼저 용출되는 단백질이었으며 SDS-PAGE와 Western blot으로 확인하였을 때 CJ50001의 중합체(multimer)임을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 CJ50001의 보관 중 생성될 수 있는 주부산물인 CJ50001의 중합체임을 확인하였으며, 이들 중합체의 *in vitro*와 *in vivo* 활성 및 CJ50001의 활성에 미치는 영향을 조사하였고, 중합체의 안전성 연구의 일환으로 mouse와 rat를 사용한 급성독성 시험을 실시하였다.

실험방법

시험물질

시험에 사용된 CJ50001 시료는 제일제당(주) 이천 2공장 에서 제조한 Lot No. CS970125(300)을 사용하였다. CJ50001은 약 18,800 달톤인 rHuG-CSF로 reversed phase HPLC로 정량시 99% 이상의 순도를 보였다. CS970125(300)은 1 바이알 중 300 µg의 CJ50001, 0.95 mg의 acetate, 50 mg의 mannitol, 0.035 mg의 sodium ion을 포함하며 전체 용량은 약 1.4 ml이었다.

시험물질의 확인

SDS-PAGE용 시료는 CS970125(300)를 10배 희석한 후 이 희석액 20 µl에 5 µl의 5배 환원성(β-mercaptoethanol을 포함하는) 또는 비환원성(β-mercaptoethanol을 포함하지 않는) 시료 조제용액을 섞어 조제하였다. Polyacrylamide gel로는 NOVEX사의 pre-casted gel 4-20%를 사용하였고 각 lane당 200 ng 썩의 단백질을 전개시켰다. 전개 후 은 염색 시약(SilverXpress Silver Staining Kit, NOVEX사)을 사용하여 염색하였다.

Western blot으로 확인하기 위하여 은 염색의 경우보다 10배에 해당하는 양의 단백질을 전개시킨 후 Electrotransfer Nitrocellulose Paper Kit(NOVEX사)를 사용하여 nitrocellulose membrane으로 단백질을 transfer하였다. 항 hG-CSF 염소 다클론항체(R&D System AB-214-NA)로 1차 항체반응시킨 후 알칼라인 포스퍼타이즈 결합 항 염소항체 토끼항체(Kirkegaard Perry Lab. 151306)로 CJ50001을 확인하였다.

Gel filtration HPLC column으로는 TSK Gel G 3000 SW (Tosoh사)를 사용하였고 0.1% 트리플로로아세트산을 포함하는 40% 노말 프로판올 용액으로 전개시켰다. 280 nm 자외부 흡광도계를 사용하여 단백질 피이크를 측정하였고 CJ50001의 리텐션 타임(RT)이 약 26분이 되게 조정하였다.

시험물질의 생물학적 활성분석

M-NFS-60(ATCC CRL-1838)을 10% fetal calf serum을 포함하는 RPMI 1640에서 배양하며 filgrastim(r-met-HuG-CSF, Amgen)을 최종 농도 1-10 ng/ml이 되도록 첨가하였다. Bioassay가 행해지기 1일 전에 세포들을 새로 계대하였으며, 실험 직전 인산완충 생리식염수(PBS)로 3회 세척하여 잔류 filgrastim을 완전히 제거한 후 실험을 수행하였다. MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)법(Mosmann 등, 1983)의 경우, 세척된 M-NFS-60 세포부유액을 1×10^5 세포/ml이 되도록 조정하고 이 부유액 50 µl씩을 96 평판 플레이트의 각 well에 분주하였다. 시료는 우선 배양배지로 20만배 희석 후 공비 3 계단희석으로 단계적 시료를 준비하고 이 시료 50 µl씩을 해당 well에 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3일간 배양하였다. 각 well당 10 µl의 MTT시약(5 mg MTT/ml PBS)을 넣고 동일 배양조건에서 4시간을 더 배양한 후 다시 40 mM HCl을 포함하는 isopropyl alcohol 100 µl씩을 넣어 침전물이 녹을 때까지 피펫팅을 하고 630 nm를 reference로 하며 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. ³H-thymidine 법의 경우에는 M-NFS-60 세포주를 96 평판 플레이트에 분주하는 것은 MTT법과 같으나 44시간 배양 후 0.5 µCi 방사능에 해당하는 ³H-thymidine을 각 well에 넣고 동일 배양조건에서 4시간을 더 배양한 후 여과지로 세포체를 회수하고 신틸레이션액으로 용출 후 방사능을 측정하였다. 표준품으로서는 자체 제작한 시료를 영국 NIBSC(National Institute of Biological Standards and Control)에 시험의뢰하여 1.1×10^8 IU/mg의 비활성을 확인받은 상용표준품을 사용하였다.

In vivo assay는 수입 후 검역 및 환경 적응 기간을 거친 건강한 음성 ICR mouse만을 사용하였고 각 투여용량별로 음성 ICR mouse의 꼬리 정맥에 10 ml/kg의 투여액량으로 투여하였다. 투여 전과 투여 후에 안와정맥총에서 500 µl씩 채혈하여 EDTA가 첨가된 microtainer(Becton Dickinson사)에 혈액이 응고되지 않도록 잘 혼합하여 분석에 사용하였다. 자동혈구분석기(Mionos-Vet, ABX)를 사용하여 말초 적혈구수, 총백혈구수, 혈색소량, 적혈구 용적비를 측정하고 백혈구는 Giemsa 염색을 한 박층 도말 슬라이드를 이용하여 호중구수, 임파구수, 호산구수 및 단구수를 정확히 감별 측정한 후 각 세포수는 출현빈도를 총 백혈구수에 곱하여 산출하였다. 각 측정치는 F-test 처리 후 유의성 있는 결과치에 대하여 Student's t-test를 이용하여 처리하였다.

급성독성

음성 ICR mouse 및 SD rat에서 최고 용량을 5,000 µg/kg으로 하여, 공비 0.1 계단희석으로 각각 3개의 용량군을 설정하였다. 투여액량은 10 ml/kg으로 하여 각각 꼬리 정맥 내로 투여하였다. 투여 후 30분간은 계속하여 발현 증상과 폐사 여부를 관찰하였고 시험 기간 중에는 하루에 한 번씩

폐사 및 일반상태를 관찰하였으며 체중은 투여 직전과 투여 후 1, 3, 및 8 일째에 측정하였다. 관찰 기간 종료 후 ether로 방혈치사시키고 육안으로 모든 장기의 이상유무를 상세히 관찰하고 기록하였다.

실험결과

SDS-PAGE 및 Western blot에 의한 시험물질의 확인

CS970125(300)을 4°C에서 11개월 동안 계속 보관 중인 시료와 50°C에서 8주 및 20주간 보관한 시료를 4-20% polyacrylamide gel 상에서 전기영동한 후 은 염색법으로 염색하거나 항체를 사용하여 Western blot한 결과는 Fig. 1과 같다. Fig. 1(A)는 비환원성 시료조제용액을 사용하고 은 염색하였을 때의 결과로 50°C에서 보관한 시료에서 큰 분자량의 단백질 밴드가 관찰되었으며 생성된 큰 단백질들은 50°C에서의 보관기간에 따라 더 큰 단백질로 되었음을 보인다. Fig. 1(B)는 비환원성 시료 조제용액을 사용하여 전개하고 항 hG-CSF 항체를 사용하여 Western blot을 수행하였을 때 Fig. 1(A)와 동일한 위치에서 발색된 밴드가 나타남을 보여주며, Fig. 1(C)는 환원성 시료조제용액을 사용하고 은 염색하였을 때의 결과로 환원시 Fig. 1(A)에서 나타

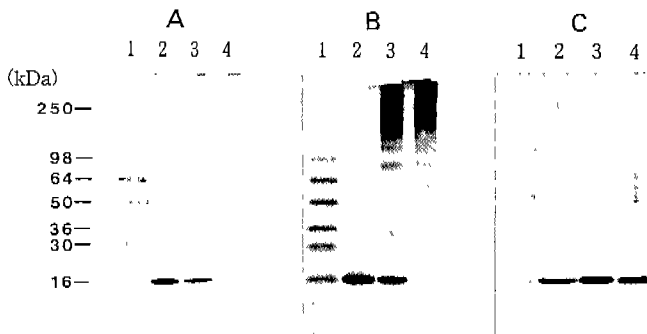


Fig. 1. Non-reducing and reducing SDS-PAGE of CS970125(300). A, Silver staining of non-reducing SDS-PAGE. B, Western blot of non-reducing SDS-PAGE using anti-hG-CSF Ab. C, Silver staining of reducing SDS-PAGE. Lane 1, molecular weight marker (NOVEX SeeBlue); Lane 2, CS 970125(300) 4°C, 11 months; Lane 3, CS970125(300) 50°C, 8 weeks; Lane 4, CS970125(300) 50°C, 20 weeks.

난 큰 단백질 밴드들이 환원되어 4°C에서 보관한 시료의 CJ50001과 동일한 위치에서 밴드를 형성하였다. 이 결과들로 부터 50°C에서의 시료의 보관중 CJ50001이 중합체로 되었으며, 50°C에서의 보관기간의 경과에 따라 이 중합체들이 더 큰 중합체로 되었음을 알 수 있다.

HPLC에 의한 시험물질의 확인

대장균 유래 CJ50001은 위의 조건대로 실험하였을 때 그 리텐션 타임(RT)이 26-28분에 나오는 것에 반해 중합체는 18-20분 사이에 용출되어 나오며 CS970125(300)을 50°C에 보관하여 0, 1, 2, 4, 6, 8, 20주 경과되었을 때의 chromatogram은 Fig. 2(A~G)와 같았다. 6주까지는 11% 정도의 낮은 비율로 생성되던 중합체가 8주 부터 80% 이상으로 급격히 증가되었고 20주에 이르러서는 거의 모두 중합체로 되었다. Fig. 2(H)는 4°C에서 11개월간 보관된 시료의 chromatogram으로 4°C에서는 장기간의 보관에도 중합체가 전혀 생성되지 않음을 보여주었다.

In vitro bioassay

Filgrastim(r-met-hG-CSF)에 적응된 M-NFS-60 세포주를 사용하여 *in vitro* bioassay를 수행하였다. 시료로써 CS 970125(300)을 4°C에서 11개월간 보관한 것과 50°C에서 20주간 보관한 것을 사용하여 MTT법과 ³H-thymidine법으로

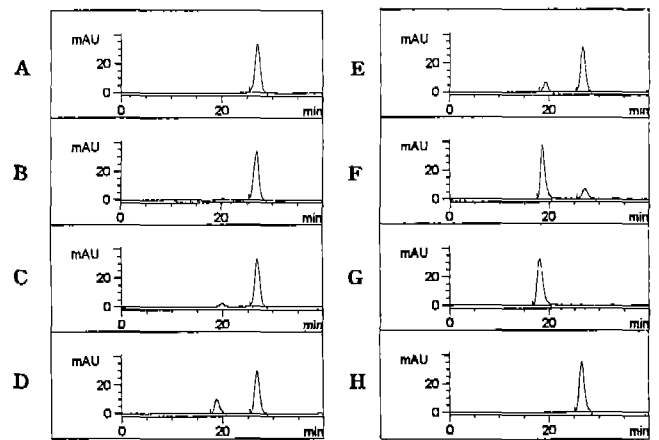


Fig. 2. HPLC chromatograms of CS970125(300) stored at 50°C. A, 0 time; B, 1 week; C, 2 weeks; D, 4 weeks; E, 6 weeks; F, 8 weeks; G, 20 weeks; H, 4°C 11 months.

Table I. *In vitro* bioassay of CS970125(300) using M-NFS-60 cell-line

Method	noculation Cell Concentration (cells/well)	Cell	Culture Time (hr)	Sample	Biological Activity ($\times 10^8$ IU/mg)	Result (%)
MTT	5×10^3		72	Standard	1.1	100
				CS970125(300) 4°C	1.18	107
				CS970125(300) 50°C	0.03	3
³ H-thymidine	5×10^3		44	Standard	1.1	100
				CS970125(300) 4°C	1.36	124
				CS970125(300) 50°C	0.03	3

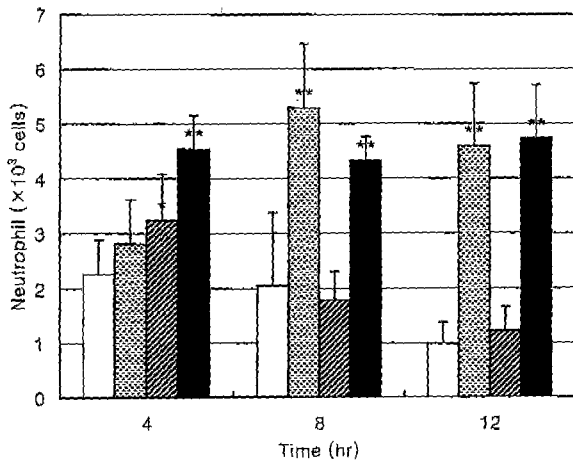


Fig. 3. Effects of CJ50001 and multimer on quantitative changes of neutrophil in male mice (n=6) after intravenous injection (*p<0.05, **p<0.01).

□ Vehicle, ■ CJ50001, ▨ Multimer, ■ CJ50001+Multimer.

분석한 결과는 Table I에 나타내었다.

Table I에서 4℃에서 11개월 동안 보관한 시료가 2가지 분석법에 의해 각각 107%와 124%를 나타낸 반면 50℃에서 20주 동안 보관한 시료는 3% 썩의 활성을 보였다. 이런 결과는 50℃에서 20주 동안 보관한 시료 내의 생성된 중합체가 *in vitro* 상에서 생물학적 활성을 가지지 못함을 보여 준다.

In vivo bioassay

용성 ICR mouse를 사용하여 중합체의 mouse 체내에서의 역가와 CJ50001에 대한 저해 작용 여부를 알아보기 위하여 *in vivo* assay를 수행하였을 때 그 결과는 Fig. 3과 같다. CS970125(300)을 4℃에서 11개월간 보관한 4℃ 시료(투여용량 20 µg/kg), 50℃에서 20주간 보관한 50℃ 시료(투여용량 20 µg/kg) 및 두 시료의 1:5 혼합시료[투여용량 4℃ 시료(20 µg/kg)+50℃ 시료(100 µg/kg)]를 각각 꼬리 정맥으로 투여한 후, 4시간 경과시 50℃ 시료와 혼합시료에서 호중구수의 증가가 관찰되었고 4℃ 시료에서는 유의성 있는 증가가 관찰되지 않았다. 그러나 8시간부터는 4℃ 시료와 혼합시료에서 호중구수의 유의성 있는 증가가 관찰되었고 그 증가 정도도 유사하였으나 50℃ 시료에서는 호중구수의 증가가 관찰되지 않았다.

모든 투여군의 호산구수, 단구수, 적혈구수, 혈색소, 적혈구 용적비 및 혈소판치에서 vehicle 투여군과 비교해 모든 투여군에서 별다른 변화를 관찰할 수 없었다.

급성독성

4℃에서 11개월간 보관한 4℃ 시료, 50℃에서 20주간 보관한 50℃ 시료의 rat와 mouse를 사용한 급성독성 시험 결과는 Fig. 4와 같으며, 50 µg/kg에서 5,000 µg/kg까지의 농

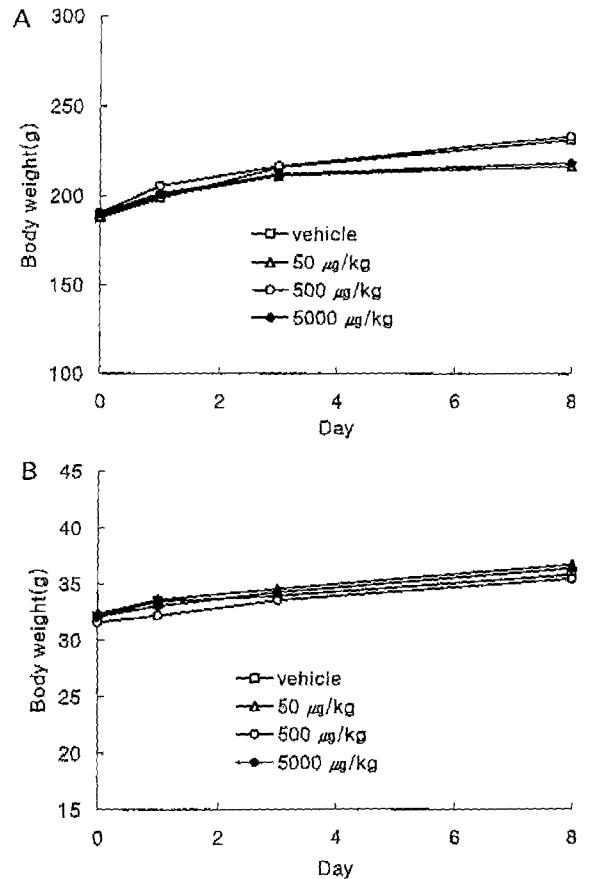


Fig. 4. Changes of body weight of male rats (A) and mice (B) after single intravenous administration of multimer.

도로 투여하였을 때 시료에 의한 것으로 생각되는 체중의 변화가 관찰되지 않았다. 전체 시험 기간을 통해 폐사동물은 전혀 관찰되지 않았고 시료에 의한 것으로 생각되는 어떠한 임상 증상도 관찰되지 않았으며, 부검 관찰 시에도 시료의 투여에 의한 것으로 생각되는 병변을 관찰하지 못하였다.

고 찰

비환원성 SDS-PAGE의 전개양상은 CJ50001이 고온(50℃)에서 시간이 경과함에 따라 큰 분자량의 단백질로 되었고 20주가 경과되면 거의 모두 중합체로 되었음을 보여주며, 항 hG-CSF 항체를 사용한 Western blot으로 그 단백질들을 확인할 수 있었다(Layton 등,1991). 위의 시료를 환원성 시료 용액과 혼합하여 약 5분 동안 끓였을 때 단백질들의 거의 대부분이 CJ50001과 동일한 위치에서 밴드를 형성하였는데, 이는 CJ50001의 보관중에 생성되는 큰 분자량의 단백질이 CJ50001의 중합체이며 이런 중합체의 형성은 disulfide 결합이나 hydrophobic interaction과 같은 비공유결합에 의하여 생성됨을 의미한다. 또한 rHuG-CSF의 액체

상태에서의 안정성을 연구하기 위해 행해진 N말단의 PE-Gylated rHuG-CSF에 대한 실험은 고온에서의 중합체 형성이 rHuG-CSF가 분해되는 기본적인 과정이며 생성된 중합체는 상당히 hydrophobic한 특성을 갖고 있음이 보고되고 있다(Kinstler, O. B. 등, 1996). 대장균 유래 rHuG-CSF가 중성 pH나 고온에서 불안정하다는 보고들은 이들 중합체의 형성에서 그 원인을 찾아 볼 수 있다(Masatoshi 등, 1990). 그러나 4°C에서는 장기간(11개월)동안 보관하여도 중합체가 전혀 생성되지 않음을 알 수 있다.

사용된 HPLC 칼럼은 단백질의 크기에 따라 분리되는 gel filtration 칼럼이므로, Fig. 2에서 20주 경과시 CJ50001이 거의 검출되지 않았으며 보관시간에 따라 중합체 peak의 retention time이 조금씩 짧아지는 것은 중합체가 보관시간에 따라 점점 커짐을 알 수 있다.

중합체의 생물학적 활성을 확인하며 이들이 CJ50001의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 *in vitro* assay와 *in vivo* assay를 실시하였다. hG-CSF의 *in vitro* assay에는 NFS-60와 G-NFS-60 세포주(hG-CSF의 assay를 위해 NFS-60 세포주로부터 선별된 세포주)가 주로 사용되고 있지만 입수에 어려움이 있어 구입이 용이한 M-NFS-60세포주(*in vitro* assay에 사용된 세포주 M-NFS-60은 사람 또는 mouse의 M-CSF, macrophage colony stimulating factor의 생물학적 활성을 분석하기 위해 사용되는 세포주로 J. F. Weaver 등에 의해 NFS-60 세포주로부터 선별된 세포주)를 ATCC로부터 구입하여 filgrastim으로 적응시킨 후 limiting dilution method(96평판 플레이트의 각 well에 1개의 세포만을 넣고 키워 클론을 얻음)로 rHuG-CSF에 의존성인 세포를 다시 선별하여 분석에 사용하였다(Weinstein 등, 1986; Nakoinz 등, 1990). M-NFS-60 세포주도 rHuG-CSF에 좋은 의존성을 보였으며 반복되는 여러 실험에서도 동일한 결과를 얻을 수 있었다. MTT assay는 분석의 종결시점에서의 살아있는 세포의 숫자와 그 활성을 대변하는 것이고 ³H-thymidine assay는 분석의 마지막 일정시간 동안의 DNA를 합성하는 세포의 숫자와 활성을 나타내는 것으로 본 연구에서는 두가지 방법 모두를 사용하여 4°C 시료와 50°C 시료의 생물학적 활성을 분석하였을 때, 전자는 표준품에 대해 유사한 수준인 107%와 124%를 보인데 반해 후자는 3%라는 낮은 활성을 보였다. 이로부터 50°C 시료의 중합체들은 *in vitro*에서 생물학적 활성을 보이지 못함을 확인하였다.

중합체의 체내에서의 호중구 형성능과 CJ50001에 대한 저해 작용을 확인하기 위해서 mouse를 사용하여 *in vivo* assay를 수행하였다. Fig. 3에서 보듯이 50°C 시료와 혼합시료는 접종 후 4시간 후에 호중구의 유의성 있는 증가를 보였으며 그 증가 정도는 중합체의 양에 비례하였으나(혼합시료 내의 중합체의 양이 50°C 시료에 비해 5배 많음), 8시간 이후에는 호중구수가 정상으로 되었다. 반면 표준품은

8시간 이후부터 호중구수의 유의성 있는 증가를 보였으며 8시간 이후의 표준품과 혼합시료의 호중구수 증가 효과는 같게 나왔다. 이는 중합체가 아주 짧은 시간 동안 작용을 하거나 또는 호중구의 분화와 증식은 유도하지 않은 채 이미 골수안에 분화가 완료되어 있던 호중구의 말초 혈액으로의 이동을 촉진하는 기능을 갖고 있음을 추측하게 하고(Welte 등, 1987; Hansen 등, 1995), 중합체가 CJ50001의 호중구 증가 작용을 저해하지 않음을 의미한다.

급성독성시험에 있어서 중합체는 mouse와 rat에서 아무런 독성을 나타내지 않았으므로 정맥투여 LD₅₀값은 각각 5,000 µg/kg 이상일 것으로 추측된다.

모든 결과를 종합하면 CJ50001은 50°C에서 보관함에 따라 중합체를 형성하며 그 중합체들은 생물학적 활성을 갖지 못할 뿐아니라 CJ50001의 작용을 방해하지 않으며 mouse와 rat에서 급성독성이 없는 것으로 사료된다.

참고문헌

- AHFS drug information. (1997). Hematopoietic agent: Filgrastim. American hospital formulary service USA.
- Devlin, P. E., Drummond, R. J., Toy, P., Mark, D. F., Watt, K. W. and Devlin, J. J. (1988). Alteration of amino-terminal codons of human granulocyte colony-stimulating factor increases expression levels and allows efficient processing by methionine aminopeptidase in *E. coli*. *Gene* **65**, 13-22.
- Gillis, S., Urdal, D. L., Clevenger, W., Klinke, R., Sassenfeld, H., Price, V. and Cosman, D. (1988). Production of recombinant human colony stimulating factors in yeast. *Behring. Inst. Mitt.* **83**, 1-7.
- Hansen, P. B., Knudsen, L. M., Johnsen, H. E. and Hansen, N. E. (1995). Stimulation tests for the bone marrow neutrophil pool in malignancies. *Leuk. Lymphoma.* **16**, 237-246.
- Kinstler, O. B., Brems, D. N., Lauren, S. L., Hamburger, J. B. and Treuheit, M. J. (1996). Characterization and stability of N-terminally PEGylated rhG-CSF. *Pharm. Res.* **13**(7), 996-1002.
- Layton, J. E., Morstyn, G., Fabri, L. J., Reid, G. E., Burgess, A. W., Simpson, R. J., and Nice, E. C. (1991). Identification of a functional domain of human granulocyte colony stimulating factor using neutralizing monoclonal antibodies. *The Journal of Biological Chemistry* **266**, 23815-23823.
- Masayoshi, O., Masakazu, H., Kunihiro, H., Hitoshi, K., Tetsuo, K., Tetsuro, O., Kikuo, T., Tatsumi, Y. and Norimichi, O. (1990). O-linked sugar chain of human granulocyte colony-stimulating factor protects it against polymerization and denaturation allowing it to retain its biological activity. *The Journal of Biological Chemistry* **265**(20), 11432-11435.
- Metcalf, D. (1985). The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Science* **229**, 16-22.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunological Methods* **65**, 55-63.

- Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Kaziro, Y., Yamazaki, T., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oheda, M., Nomura, H. and Ono, M. (1986). Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature* **319**, 415-418.
- Nakoinz, I., Lee, M. T., Weaver, J. F., Ralph, P. (1990). Differentiation of the IL-3-dependent NFS-60 cell line and adaptation to growth in macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.* **145**, 860-864.
- Ono, M. (May 23, 1989). Novel CSF and method for obtaining the same. *U.S. Patent* 4,833,127.
- Souza, L. M., Boone, T. C., Gabrilove, J., Lai, P. H., Zsebo, K. M., Murdock, D. C., Chazin, V. R., Bruszewski, J., Lu, H. and Chen, K. K. (1986). Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: Effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science* **232**, 61-65.
- Souza, L. M. (March 7, 1989). Production of pluripotent granulocyte colony-stimulating factor. *U.S. Patent* 4,810,643.
- Weinstein, Y., Ihle, J. N., Lavu, S. and Reddy, E. P. (1986). Truncation of the c-myc gene by a retroviral integration in an interleukin 3-dependent myeloid leukemia cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 5010-5014.
- Welte, K., Bonilla, M. A., Gabrilove, J. L., Gillio, A. P., Potter, G. K., Moore, M. A. S., O'reilly, R. J., Boone, T. C. and Souza, L. M. (1987). Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor: *in vitro* and *in vivo* effects on myelopoiesis. *Blood Cells* **13**, 17-30.
- Welte, K., Platzer, E., Lu, L., Gabrilove, J. L., Levi, E., Mertelsmann, R. and Moore, M. S. (1985). Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 1526-1530.
- 미발표자료 a. (1997). 인간 과립구 콜로니 자극인자 유전자 및 발현벡터.
- 미발표자료 b. (1997). 크로마토그래피에 의해 유전자 재조합 인간 과립구 콜로니 자극인자를 정제하는 방법.