

## 재조합 사람 적혈구 조혈인자 DA-3585의 랫드에 대한 단회 및 4주반복 정맥투여 독성시험

김동환 · 조 현 · 강경구 · 백남기 · 김원배\*

동아제약(주) 연구소

### Single and Four-week Intravenous Toxicity Studies of DA-3585, a Recombinant Human Erythropoietin, in Rats

Dong Hwan KIM, Hyeon CHO, Kyung Koo KANG, Nam Gi BAIK and Won Bae KIM\*

Research Laboratories, Dong-A Pharm. Co., Ltd.,  
47-5, Sanggal-ri, Kiheung-up, Yongin-si, Kyunggi-do 449-900, Korea

(Received February 5, 1998; accepted June 5, 1998)

**Abstract** – DA-3585 is a recombinant human erythropoietin produced by Dong-A pharmaceutical Co. Ltd. using recombinant DNA technique. Recently, recombinant human erythropoietin (rHu-EPO) has been used to treat various types of anemia. In this study, we examined acute and subacute toxicity of DA-3585 in rats. DA-3585 was intravenously administered to rats at dose levels of 0, 6,250, 12,500 and 25,000 IU/kg for single dose toxicity study and at dose levels of 0, 100, 500 and 2,500 IU/kg daily for 4 week-repeated dose toxicity study. In the single dose toxicity study, there were no death, clinical signs and changes in body weight gain related to the treatment. Necropsy revealed no evidence of toxicity related to DA-3585. In the repeated dose toxicity study, all the rats survived throughout the study. There were no treatment-related changes in clinical signs, food and water intake, and body weight. Hematological examination showed increases in the number of erythrocytes, hemoglobin concentration, hematocrit value and mean corpuscular volume, and decrease in the number of platelet in 500 and 2,500 IU/kg dosed groups. Extramedullary hematopoiesis in the spleen and erythroid hyperplasia in the bone marrow were noted as treatment-related histological changes. Toxicologically significant changes were not observed in blood biochemistry, urinalysis, organ weights and in any other examinations. The treatment-related changes observed in this study were hematological or histological changes associated with pharmacological effects of DA-3585. On the basis of the results of this study, LD<sub>50</sub> value of DA-3585 was above 25,000 IU/kg and the no-observed-adverse-effect-level was estimated to be 100 IU/kg.

**Keywords** □ DA-3585, acute toxicity, subacute toxicity, rat

Erythropoietin(EPO)은 분자량 30,400 달톤의 당단백(glycoprotein)으로 태아의 경우 주로 간에서 생성되지만, 성숙 동물에서는 80-90%정도가 신장의 피질과 수질외측의 모세 혈관을 둘러싸고 있는 내피세포에서 형성되고 나머지는 간이나 기타 다른 조직에서 형성된다(Koury 등, 1988). 형성된 EPO는 혈류를 따라 이동하여 골수내 erythroid progenitor cell(CFU-E)의 특이수용체와 작용하여 이들의 분화, 증식을 촉진함으로써 적혈구생성을 항진시킨다(Eschbach와 Adamson, 1989). EPO는 신동맥 내의 산소포화도 저하, 신장으로의 산소운반량 저하, 신장이외의 신체 다른부위의

빈혈상태 등에 의해서 생성이 촉진되며, norepinephrine, ephinephrine 및 수종의 prostaglandine과 같은 물질에 의해서도 생성이 증가되는 것으로 알려져 있다(Guyton, 1991). 임상적으로는 만성빈혈, 신성빈혈, end stage renal disease, 화학요법에 의한 빈혈, 자가수혈 등에 널리 사용되고 있지만(Jacobs 등, 1985; Lin 등, 1985; Fisher, 1993; Vaziri 등, 1994; Gebbia 등, 1991), 초기에는 EPO의 항체를 이용하여 재생불량성 빈혈환자의 노에서 정제하여 사용하였기 때문에 원료수급에 문제가 있었고, 노중에 존재하는 다량의 불순물 때문에 순수한 형태의 단백질로 정제하는데 어려움이 따랐다(Koeffler와 Goldwasser, 1981). 그러나 근래에 들어서 유전자재조합기술의 발달로 인하여 EPO 유전자의 재조

\* To whom correspondence should be addressed.

합과 대량생산이 가능하게 되었다.

본 실험은 동아제약(주)에서 BHK(baby hamster kidney) cell과 무혈청배지를 이용하여 자체 개발한 재조합 사람 erythropoietin(DA-3585)의 안전성평가의 일환으로 랫드에 대한 정맥내 단회 및 4주 반복투여 독성실험을 '의약품 등의 독성시험기준'(식품의약품안전본부, 1996)에 준하여 실시하였다.

## 실험방법

### 시험물질

시험에 사용한 재조합 EPO는 동아제약(주)에서 BHK cell을 이용하여 생산한 것(lot No. B-004, 순도 99%이상, 표시역가 27,419 IU/ml)으로 -20℃에서 보관하며 사용직전에 녹여서 희석용 용액에 희석시켜 사용하였다. 희석용액은 증류수 1 ml당 D-mannitol 30 mg, sodium chloride 2 mg, sodium phosphate(monobasic) 1.5 mg 등을 첨가한 후 sodium hydroxide를 첨가하여 pH 7.0로 조정하여 용액으로 냉장보관하며 시험에 사용하였다.

### 실험동물 및 사육환경

4주령의 SPF Sprague-Dawley계 랫드 암·수 각 70마리를 Charles River Japan사에서 구입하여 2주간 청정구역내에서 검역 및 순화사육한 다음 6주령의 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 검역 순화사육기간 및 시험기간중 동물을 온도 23±2℃, 습도 55±15%, 환기횟수 15-20회/시간, 조도 150-300 Lux, 조명시간 12시간(07:00-19:00)의 환경 조건에서 사육하였다. 실험동물은 순화검역기간에는 5마리씩, 시험기간 중에는 2마리씩 각각 암·수 분리하여 랫드용 폴리카보네이트계 사육상자에 수용하였다. 사료는 랫드용 고형사료(2.0 M rad 방사선멸균품, 제일사료)를, 음수는 자외선멸균 수도수를 자유섭취시켰다.

### 급성독성시험

2주일간의 순화 사육 후, 건강한 동물을 선발하여 각 구간 체중 평균치가 균일하게 군 당 암·수 각 5마리씩 분리하여, DA-3585 투여군 3개군과 매체대조군 1군을 포함하여 총 4개군으로 하였다. DA-3585 투여군의 용량설정은 조제가능한 최고농도인 25,000 IU/kg을 고용량군으로 하고 이하 공비 1/2로 하여 중용량군은 12,500 IU/kg, 저용량군은 6,250 IU/kg으로 설정하여 예상 임상 적용 경로인 정맥으로 투여하였다. 시험물질의 투여는 1 ml/kg의 액량으로 1회 실시하였다. 폐사 및 임상증상관찰은 시험물질 투여당일은 매시간마다 관찰하였고, 다음날부터는 하루 한번씩 오전 중에 폐사유무와 임상증상을 관찰하였다. 체중은 군 분리일 및 시험물질 투여후 3일과 7일째에 측정하였다. 시험도중 폐사된 동물은 발견 즉시 부검을 실시하고, 생존한 동물은 7일간의 관찰기간 종료 후, ether 마취하여 방혈치

사시킨 다음 각 장기를 육안적으로 관찰하여 기록하였다. 육안적 이상소견이 관찰된 장기조직은 10% neutral buffered formalin에 24시간동안 고정하고, paraffin을 포매한 후 조직절편을 제작하여, 광학현미경으로 병리조직학적 관찰을 수행하였다.

### 4주 반복투여 아급성 독성시험

#### 투여용량의 설정 및 투여방법

임상에정용량(50~100 IU/kg)을 기준으로 저용량을 100 IU/kg/day로 정하고 중용량과 고용량을 각각 공비5로 하여 500, 2,500 IU/kg/day으로 설정하였으며, 매체용액만을 투여한 대조군을 두었다. 투여는 임상적용경로인 정맥투여로 1일 1회 4주간(28일) 실시하였다. 각 개체의 투여량은 kg당 1 ml로 주 2회 측정하는 체중치로 산출하였다.

#### 시험군의 구성

검역 및 순화사육 후 건강한 동물을 선발하여 체중을 측정 후 전체평균에서 2 S.D.를 넘는 동물은 제외시키고 나머지 동물을 이용하여 무작위법으로 군분리를 실시하였으며 군분리 후 체중의 구간 유의차가 인정될 경우에는 유의차가 없을 때까지 반복하여 균일하게 군분리하였다. 각 투여군의 사용동물수는 대조군 및 DA-3585 100, 500 및 2,500 IU/kg/day 투여군 모두 암·수 각각 10마리씩으로 구성하였다.

#### 검사항목

**폐사 및 임상증상** 투여개시일부터 투여종료일까지 1일 2회, 오전과 오후에 각 개체의 사망유무와 일반상태를 관찰하였다.

**체중, 사료섭취량 및 음수섭취량** 투여기간 동안 전군에 대하여 매주 2회씩 체중, 사료섭취량 및 음수섭취량을 측정하였다. 사료와 음수섭취량은 케이지별로 측정하여 마리당 1일 평균소비량을 산출하였다.

**안검사** 투여종료 후 모든 동물에 대하여 안검사용 검안경을 이용하여 좌우안의 각막 및 홍채 등의 이상유무를 관찰하였다.

**혈액학적 검사** 투여종료 후 각군의 동물 전례에 대하여 혈액학적 검사를 실시하였다. 혈액은 ether 마취한 동물의 복대동맥으로부터 채취하여 EDTA와 구연산나트륨 등의 항응고제를 이용하여 각각 혈액학적검사와 혈액응고시간의 측정에 이용하였다. 혈액학적검사에서는 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 혈색소량(Hb), 헤마토크리트치(Hct), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소량(MCH), 평균적혈구혈색소농도(MCHC), 혈소판수(PLT) 등에 대하여 혈구자동측정기(Minos Vet, Minos)를 이용하여 측정하였으며, 혈액응고시간 측정은 자동응고시간측정기(Automated Coagulation Laboratory, Instrumentation Laboratory)를 이용하여 prothrombin time(PT)과 activated partial thromboplastin time(APTT)을 측정하였다. 한편, 백혈구백분율을 조사

하기 위하여 혈액을 슬라이드에 도말하여 건조시킨 후 0.5 % Modified Giemsa 염색액으로 50분간 염색하여 광학현미경으로 400배의 배율에서 혈구의 형태를 관찰하고 백혈구 감별계수를 실시하여 백분율을 구하였다.

**혈청생화학적 검사** 혈액학적검사를 위하여 채취한 혈액의 잔여혈액을 응고시킨 후 혈청을 분리하여 혈청생화학적검사를 실시하였다. 혈청생화학적 검사는 혈액자동분석기(Spectrum, Abbott)를 이용하여 alanine transferase(ALT), aspartate transferase(AST), total bilirubin, urea nitrogen(BUN), cholesterol, triglyceride, alkaline phosphatase, calcium(Ca), glucose, total protein, inorganic phosphorus, creatinine, albumin 등을 측정하고 자동이온측정기(Lytening system 30, Baxter Diagnostic Inc.)를 이용하여 sodium(Na), potassium (K), chloride(Cl)를 측정하였다.

**뇨검사** 투여종료 후 랫드용 metabolic cage에 한마리씩 분리수용하여 검사전일 오후 4시부터 16시간 채뇨하였다. 채취한 뇨에 대해서 외관, 뇨량(volume), 침사(sediment) 등을 관찰한 후 뇨분석기(Clinitek 100, Ames)를 사용하여 glucose, bilirubin, ketone body, 비중(specific gravity), pH, protein, urobilinogen, nitrate, 잠혈(occult blood), 백혈구(WBC) 등에 관하여 검사하였다. 뇨침사가 인정된 개체에 대하여는 시료를 1,500 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 버린 후 남은 여액과 침전물을 잘 섞고 slide glass에 한 방울 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 검체를 준비하고 광학현미경을 이용하여 200배의 시야에서 뇨침사의 결정 형태를 관찰하였다.

**부검 및 장기중량측정** 투여종료 후 1일간 절식시킨 다음 각 군의 동물을 ether로 마취시켜 외관의 이상유무를 육안적으로 관찰하고 채혈을 실시하였다. 채혈후 방혈치사시킨 동물에 대해 부검을 실시하여 체강과 각 실질장기에 대해 육안적검사를 하였다. 각각의 병변을 관찰, 기록한 후 뇌, 뇌하수체, 흉선, 심장, 폐장, 간장, 비장, 신장, 부신, 고환(난소), 전립선 등을 주위조직과 분리하여 각 장기의 절대중량을 측정하였으며, 상대중량은 각 개체의 체중에 대한 비율의 1,000배로 산출하였다.

**병리조직학적검사** 중량을 측정된 장기들과 위, 소장, 대장, 장간막임파절, 방광, 안구, 타액선, 갑상선, 정낭, 질(vagina) 등의 장기를 10% 중성포르말린에 1주이상 고정시킨 다음 통상적인 방법을 거쳐 조직절편을 제작하였으며, 골 및 골수검사를 위해 각 동물의 흉골을 절제하여 10% 중성포르말린에 1주이상 고정시키고 다시 탈회용액(10% formic acid in 10% formalin)에 2주이상 넣어 탈회시킨 후 통상적인 방법으로 조직절편을 제작하였다. 제작된 조직절편은 hematoxylin-eosin 염색을 한 후 광학현미경으로 병리조직학적 검사를 대조군과 고용량군에 대하여 실시하였으며, 고용량군에서 이상을 나타내는 장기와 육안병변이 인정된

장기에 대해서는 다른 용량군에 대해서도 병리조직학적 검사를 실시하였다.

**통계학적 분석**

본 시험에서 얻어진 자료에 대한 통계학적 분석은 Bartlett test로 분산검정을 실시하여 등분산일 경우 일원배치 분산분석법(one-way analysis of variance:ANOVA)으로, 부등분산일 경우 Kruskal-Wallis법으로 유의성검정을 하였다. 일원배치 분산분석법에서 유의한 경우 Scheffe법을, Kruskal-Wallis법에서 유의성이 인정되는 경우에는 distribution-free multiple comparison법에 의해 대조군과 각 투여군간의 다중비교를 실시하였다. 분산검정의 통계처리에는 SAS(Statistical Analysis System) 통계프로그램을 이용하였다.

**결 과**

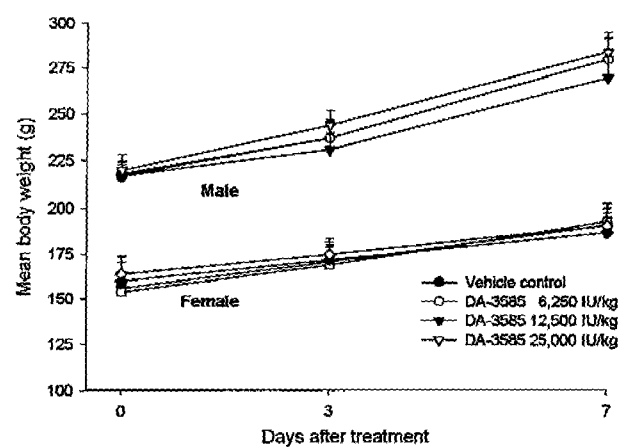
**급성독성시험**

폐사율과 임상증상을 관찰한 결과(Table I) 전 시험기간 중 폐사된 동물은 관찰되지 않았으므로 LD<sub>50</sub> 치는 암·수 모두 25,000 IU/kg 이상으로 나타났으며, 시험물질에 의한 것으로 판단되는 임상증상도 관찰되지 않았다. 시험동물의 체중을 측정된 결과, 모든 시험물질 투여군에서 대조군과

**Table I.** Clinical abnormalities and mortalities in rats after a single intravenous administration of DA-3585

Dose (IU/kg)	Clinical abnormality		Mortality	
	Male	Female	Male	Female
0 (control)	0/5	0/5	0/5	0/5
6,250	0/5	0/5	0/5	0/5
12,500	0/5	0/5	0/5	0/5
25,000	0/5	0/5	0/5	0/5

Each value represents the number of animals



**Fig. 1.** Body weight changes in rats after single intravenous administration of DA-3585.

비교해서 통계학적으로 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 1). 시험 종료 후 부검을 실시한 결과 육안적 이상 소견을 나타낸 장기는 관찰되지 않았다.

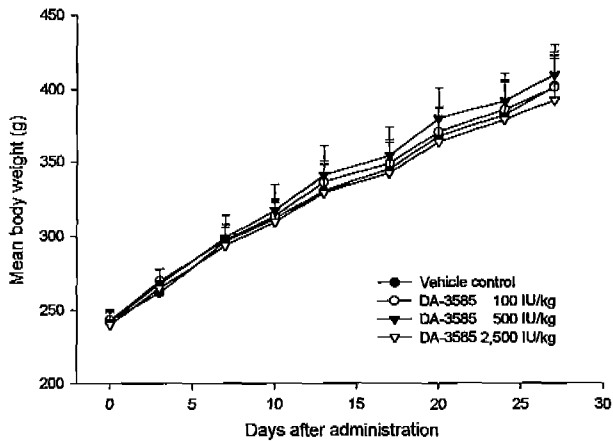
**4주 반복 아급성 독성시험**

**폐사율 및 일반증상**

투여기간중 폐사율은 나타나지 않았으며, 일반증상관찰에서도 투약과 관련된 것으로 보이는 증상은 관찰되지 않았다.

**체중변화, 사료섭취량 및 음수량**

각 군의 암·수 모든 동물에서 투약기간중 체중은 순조로운 증가를 나타내었으며, 약물투여로 인한 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 2, 3). 사료섭취량은 투여 20일째 DA-3585 2,500 IU/kg을 투여한 암컷 동물군이 대조군에 비하여 유의성있는 감소를 보였으나(p<0.05) 이외 전 실험 기간을 통하여 암·수 전군에서 사료섭취량의 변화는 인정되지 않았다(Table II). 음수섭취량은 각 군의 암·수 모든 동물에서 투약기간중 대조군과 비교하여 유의성있는 변화는 인정되지 않았다(Table III).



**Fig. 2.** Body weight changes in male rats intravenously administered with DA-3585 for 4 weeks.

**안검사**

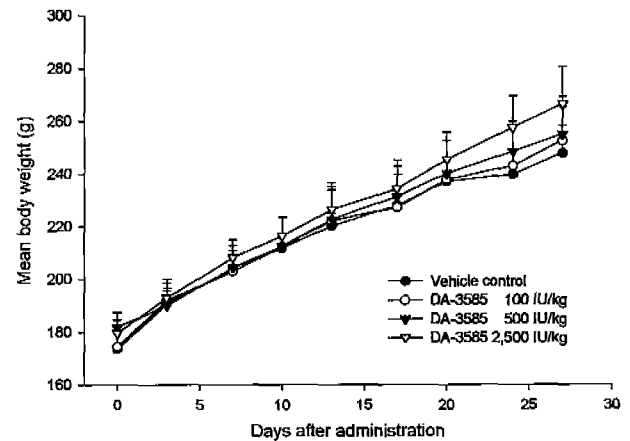
투여종료후 실시한 안과학적검사결과, 모든 투여군에서 시험물질의 영향으로 판단되는 변화는 관찰되지 않았다.

**혈액학적검사**

DA-3585를 4주간 투여한 후의 혈액학적 검사결과는 Table IV와 같다. RBC, Hb, Hct, MCV 등은 암·수 모두에서 용량의존적 증가를 나타내었으며, MCH는 수컷 저용량군에서 유의성있는 감소를 암컷 중용량과 고용량에서는 유의성있는 증가를 나타내었다. MCHC의 경우 수컷에서는 약물투여 전군에서 대조군에 비해 유의성있는 감소를 나타내었으며 암컷에서는 저농도군에서만 유의성 있는 감소가 나타났다. 그의 대조군과 비교하여 통계학적 유의성을 나타낸 항목으로 PLT는 암컷 고용량군에서, APTT는 수컷 고용량군에서 증감이 관찰되었으나 모두 용량상관성은 없었다(p<0.05).

**혈청생화학학적검사**

DA-3585를 4주간 투여한 후의 혈청생화학학적검사결과는 Table V와 같다. 암·수 모든 시험군에서 투여한 시험물질과 용량상관성을 보이며 증가하거나 감소하는 항목은 관찰



**Fig. 3.** Body weight changes in female rats intravenously administered with DA-3585 for 4 weeks.

**Table II.** Food consumption in rats intravenously administered with DA-3585

(g/day/head)

Sex	Male				Female			
	Control	100	500	2,500	Control	100	500	2,500
DAY3	24.6±0.9	25.0±1.0	26.0±1.2	24.4±2.1	17.4±1.1	17.2±0.5	16.8±0.8	17.6±1.5
DAY7	25.4±1.5	27.2±1.5	26.4±1.8	26.2±3.0	17.2±1.1	17.8±1.3	18.2±1.3	18.2±1.1
DAY10	25.2±1.3	24.6±2.1	25.3±2.1	23.8±1.9	17.0±1.2	17.4±0.9	15.6±2.7	17.0±0.7
DAY13	24.4±1.5	23.2±1.3	25.0±2.1	24.2±2.2	16.6±1.1	17.0±0.7	16.4±1.7	16.8±0.8
DAY17	26.0±2.5	25.4±0.9	28.6±2.1	26.2±1.9	18.8±3.7	17.4±0.9	19.0±0.7	17.4±1.7
DAY20	24.2±1.1	23.6±1.5	25.2±1.9	23.4±2.0	17.6±1.7	16.4±1.5	15.2±1.9	14.4±3.0*
DAY24	24.0±0.7	25.6±1.8	25.0±1.9	25.0±3.2	15.6±2.0	16.6±0.9	16.4±1.5	17.4±1.1
DAY27	25.2±1.3	24.6±2.0	25.4±3.1	24.2±3.2	16.2±2.5	16.4±1.2	15.2±1.9	16.6±1.3

Each value represents the mean ± S.D. \*Significantly different from the control (p<0.05)

**Table III.** Water consumption in rats intravenously administered with DA-3585 (ml/day/head)

Sex	Male				Female				
	Dose (IU/kg)	Control	100	500	2,500	Control	100	500	2,500
DAY3		43.8±14.3	43.6±4.0	41.6±6.2	42.8±6.6	26.6±7.5	29.2±4.1	32.2±3.6	31.0±3.0
DAY7		37.6±4.7	41.0±3.8	42.4±6.8	38.6±6.6	25.2±3.0	25.2±1.3	28.0±4.0	27.8±1.9
DAY10		43.0±10.7	39.6±2.3	43.6±8.9	44.8±9.0	26.6±3.3	28.8±6.1	24.4±5.7	29.2±2.9
DAY13		34.8±4.2	36.6±2.7	39.2±8.4	42.0±15.6	26.8±6.4	25.2±3.0	25.2±5.0	30.2±4.8
DAY17		37.2±4.1	39.2±2.8	42.2±9.3	39.8±7.1	31.8±3.0	27.8±3.6	29.4±3.4	28.8±5.1
DAY20		39.0±5.0	40.2±3.2	42.8±7.5	42.2±7.7	30.0±2.6	28.8±2.9	26.8±5.5	27.0±5.1
DAY24		36.0±3.0	39.4±3.4	44.8±10.1	41.6±7.2	28.0±6.9	25.6±5.4	28.4±2.1	31.0±3.5
DAY27		36.6±4.3	38.2±4.2	40.2±6.6	40.0±5.0	25.4±3.9	23.4±2.7	26.0±3.3	29.0±4.4

Each value represents the mean ± S.D.

**Table IV.** Hematological parameters in rats intravenously administered with DA-3585 for 4 weeks

Sex	Male				Female				
	Dose (IU/kg)	Control	100	500	2,500	Control	100	500	2,500
WBC ( $10^3/\mu\text{l}$ )		10.8±3.7	11.1±3.2	9.5±2.7	8.7±3.0	6.6±2.6	7.7±2.8	8.3±1.5	7.7±1.1
Neutrophil (%)		18.2±1.9	17.5±2.1	18.0±2.5	16.7±2.4	15.2±3.1	14.3±2.8	15.1±2.4	15.3±2.9
Eosinophil (%)		1.20±1.14	0.80±0.79	0.90±0.74	0.50±0.85	1.30±1.25	1.11±1.05	1.20±1.23	1.10±0.99
Basophil (%)		0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Lymphocyte (%)		76.5±2.7	76.7±2.7	76.5±3.4	78.5±2.5	81.8±3.5	82.9±2.7	81.6±3.9	81.4±4.3
Monocyte (%)		4.00±1.33	5.00±1.41	4.60±1.78	4.10±1.60	2.20±1.62	1.67±1.41	1.90±1.52	2.00±1.41
RBC ( $10^6/\mu\text{l}$ )		7.02±0.27	7.72±0.84	8.95±0.51*	9.88±1.29*	6.68±0.34	7.36±0.31	8.54±1.14*	10.5±0.3*
Hb (g/dl)		16.5±1.29	16.2±1.5	20.6±1.4*	22.1±3.7*	14.7±0.7	15.6±0.6	20.0±2.9*	25.0±0.7*
Hct (%)		34.1±1.7	37.4±3.5	46.1±2.7*	49.2±6.8*	32.9±1.3	35.7±1.45	44.0±6.1*	55.5±0.9*
MCV (fL)		48.6±1.3	48.4±1.6	51.6±1.0*	49.8±2.7*	49.2±0.9	48.4±1.0	51.5±1.4*	52.7±2.0*
MCH (pg)		23.3±1.2	21.0±0.8*	23.0±0.5	22.2±1.9	22.0±0.7	21.1±0.5	23.3±1.0*	23.8±1.3*
MCHC (g/dl)		48.7±2.8	43.4±0.9*	44.6±0.7*	44.7±2.0*	44.7±0.7	43.6±0.5*	45.3±0.9	45.0±1.0
PLT ( $10^3/\mu\text{l}$ )		241±79	250±67	183±58	159±54	206±51	230±29	212±41	145±22*
PT (sec)		15.9±0.6	16.1±0.6	6.3±1.2	18.7±4.8	18.1±2.2	17.3±0.5	18.0±0.7	19.0±0.9
APTT (sec)		21.9±4.0	21.9±3.8	21.6±7.3	29.8±5.3*	21.9±3.6	20.6±1.4	22.2±3.0	24.0±4.3

Each value represents the mean ± S.D. \*Significantly different from the control(p<0.05)

되지 않았다. 그러나, 수컷 중용량군의 AST값과 수컷 저용량 및 중용량군의 total bilirubin치는 유의성있는 감소를 나타내었으며, 암컷 저용량군에서는 BUN의 증가가 관찰되었고 cholesterol치는 암·수 모두에서 감소경향을 나타내며 고용량군에서 유의성이 인정되었다. 또한 수컷 저용량군에서는 triglyceride치의 유의성있는 감소가 나타났으며, ALP값은 암·수 모두에서 증가경향을 나타내었으나 수컷 중용량군에서만 유의성있는 증가를 나타내었다. 그리고, glucose의 경우는 수컷 저용량 및 중용량군에서 유의성있는 증가가 인정되었다. 혈중전해질량을 측정한 결과, 수컷 고용량군에서 Na와 Cl의 유의성있는 증감이 관찰되었고 암컷에서는 inorganic phosphorus의 유의성있는 증가가 전 투여군에서 나타났고, 또한 Ca의 경우도 암컷 중용량군에서 유의성있는 증가가 인정되었다. 이외 다른 혈청생화학 적 결과에서는 모두 매체대조군에 비해 유의성있는 변화를

나타내지 않았다.

#### 노검사

투약종료후 실시한 노검사 결과(Table VI) DA-3585를 투여한 암·수동물에서 bilirubin량의 약한 증가와 잠혈, 백혈구출현 등이 일부 동물에서 관찰되었으며, 이외 다른 관찰 항목에서는 특이한 변화가 관찰되지 않았다.

#### 병리학적 검사

**부검소견** 암컷 2,500 IU/kg 투여군 2예에서 흉선의 약한 충혈 반점이 관찰되었으며 그 외의 동물에서는 약물의 영향으로 생각되는 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

**장기중량** 부검 후 장기중량을 측정한 결과 수컷과 암컷의 저용량군에서 뇌무게의 감소 혹은 증가가 나타났으나 상대중량에서는 유의성이 인정되지 않았으며, 암컷 고용량군의 심장무게도 매체대조군에 비교하여 절대중량의 유의성있는 증가는 나타났으나 상대중량에서는 유의성이 인정

**Table V.** Blood biochemistry summary in rats intravenously administered with DA-3585 for 4 weeks

Dose (IU/kg)	Sex			
	Male		Female	
	Control	100	500	2,500
ALT (IU/l)	25.0±2.7	22.6±6.7	28.4±7.2	27.8±4.5
AST (IU/l)	216±64	171±44	144±35*	245±36
Albumine (g/dl)	4.48±0.21	4.46±0.18	4.41±0.26	4.42±0.12
Alkaline phosphatase (IU/l)	126±28	151±32	163±26*	156±41
BUN (mg/dl)	16.3±2.8	16.5±3.1	15.7±3.4	17.6±3.7
Cholesterol (mg/dl)	55.1±5.3	51.7±9.7	44.2±9.8	34.8±8.9*
Creatinine (mg/dl)	0.69±0.08	0.68±0.10	0.68±0.07	0.59±0.08
Glucose (mg/dl)	102±21	176±19*	152±26*	87±23
Total bilirubin (mg/dl)	0.43±0.18	0.34±0.12*	0.34±0.14*	0.59±0.15
Total protein (g/dl)	6.18±0.35	6.31±0.47	6.20±0.47	6.09±0.20
Triglyceride (mg/dl)	86.8±14.9	64.2±9.3*	74.5±28.0	82.4±16.8
Inorganic Phosphorus (mg/dl)	7.99±0.69	7.99±0.89	8.27±0.52	7.72±0.89
Ca (mmol/l)	10.0±0.6	10.3±0.5	10.4±0.4	10.0±0.2
Na (mEq/l)	154±2	152±3	154±3	158±2*
K (mEq/l)	5.47±0.70	5.64±0.43	5.69±0.43	5.89±0.49
Cl (mEq/l)	105±4	103±3	104±2	101±2*
	Control	100 (10)	500 (10)	2,500 (10)
	32.2±28.1	30.6±11.5	21.9±6.4	25.2±15.6
	168±30	169±34	128±25	127±44
	5.16±0.50	5.26±0.27	5.14±0.19	5.03±0.30
	72.1±28.4	95.8±35.5	87.0±37.9	102±31
	15.8±2.3	22.8±6.0*	17.1±3.5	16.4±2.8
	66.3±9.1	61.6±10.3	61.6±11.5	52.4±8.9*
	0.70±0.07	0.77±0.09	0.69±0.09	0.65±0.08
	117±24	128±34	139±27	120±42
	0.34±0.12	0.42±0.18	0.54±0.24	0.53±0.15
	6.10±0.34	6.15±0.28	6.29±0.29	6.19±0.21
	55.5±11.7	59.0±16.6	48.4±12.2	48.4±8.4
	6.55±0.64	7.97±0.65*	7.99±0.99*	7.93±0.53*
	9.66±0.43	9.92±0.55	10.40±0.79*	10.29±0.35
	147±1	151±2	154±3	155±4
	5.46±0.38	5.40±0.58	5.48±1.20	6.47±1.25
	104±3	105±4	96±8	106±14

Each value represents the mean ± S.D. \*Significantly different from the control (p<0.05)

**Table VI.** Urinalysis in rats intravenously administered with DA-3585 for 4 weeks

Dose (IU/kg)	Sex			
	Male		Female	
	Control (10)	100 (10)	500 (10)	2,500 (10)
Volume (ml)	7.14±1.74	5.50±1.65	7.05±1.36	6.95±1.86
Sediment	-(10)	-(10)	-(10)	-(10)
Bilirubin	-(10)	-(6), +(4)	-(8), +(2)	-(9), +(1)
Glucose	-(10)	-(10)	-(7), ±(3)	-(9), ±(1)
Ketone body	±(3), +(7)	±(1), +(8), 2+(1)	-(3), +(5), 2+(2)	-(1), ±(4), +(5)
Nitrate	-(9), +(1)	-(8), +(2)	-(6), +(4)	-(8), +(2)
Occult blood	-(10)	-(7), ±(2), +(1)	-(9), ±(1)	-(6), +(4)
pH	7.15±0.34	7.05±0.60	6.90±0.40	7.05±0.33
Protein	+(5), 2+(5)	+(8), 2+(1), 3+(1)	-(3), +(1), 2+(6)	-(1), +(1), 2+(8)
Specific gravity	1.027±0.003	1.029±0.002	1.028±0.003	1.030±0.002
UB <sup>a</sup> (BU/dL)	0.1(10)	0.1(10)	0.1(10)	0.1(10)
WBC	-(10)	-(8), ±(2)	-(6), ±(2), +(2)	-(8), ±(1), +(1)
	Control (10)	100 (10)	500 (10)	2,500 (10)
	4.75±1.23	4.75±1.23	5.15±1.45	5.55±0.86
	-(9), +(1)	-(10)	-(8), +(2)	-(7), +(3)
	-(10)	-(10)	-(9), ±(1)	-(10)
	-(4), ±(6)	-(8), +(2)	-(7), ±(3)	-(7), ±(3)
	-(10)	-(10)	-(9), +(1)	-(8), ±(1), +(1)
	6.60±0.46	6.60±0.46	6.50±0.24	6.55±0.35
	±(4), +(5), 2+(1)	±(2), +(6), 2+(2)	±(2), +(7), 2+(1)	±(2), +(7), 2+(4)
	1.027±0.002	1.028±0.004	1.028±0.003	1.028±0.003
	0.1(10)	0.1(10)	0.1(10)	0.1(10)
	-(8), 2+(1), 3+(1)	-(8), 2+(1), 3+(1)	-(9), ±(1), +(1)	-(9), ±(1)

Volume and specific gravity values represent the mean ± S.D. -: grade 0(negative); ±: grade 1; +: grade 2; 2+: grade 3; 3+: grade 4. <sup>a</sup>Urobilinubin.

( ): number of animals

**Table VII.** Absolute organ weight in rats intravenously administered with DA-3585 for 4 weeks (unit=g)

Sex	Male				Female			
	Control	100	500	2,500	Control	100	500	2,500
Dose (IU/kg)								
Adrenal gland	0.07±0.01	0.08±0.02	0.07±0.01*	0.08±0.02	0.09±0.01	0.09±0.01	0.08±0.01	0.09±0.02
Brain	2.08±0.06	1.94±0.21*	2.04±0.12	2.05±0.12	1.82±0.24	1.96±0.07*	1.93±0.06	1.93±0.10
Heart	1.40±0.11	1.29±0.14	1.32±0.10	1.30±0.13	0.78±0.27	0.85±0.09	0.84±0.05	0.95±0.08*
Kidney	2.95±0.32	2.89±0.20	2.94±0.25	2.88±0.24	1.79±0.18	1.87±0.06	1.80±0.10	1.94±0.16
Liver	11.20±1.07	11.63±1.01	11.66±0.81	11.15±1.05	7.34±0.68	7.59±0.52	7.51±0.58	7.96±0.58
Lung	1.56±0.14	1.52±0.13	1.58±0.11	1.66±0.22	1.26±0.05	1.32±0.32	1.24±0.10	1.39±0.13
Pituitary	0.02±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.01	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
Spleen	0.75±0.07	0.72±0.09	0.86±0.09*	1.18±0.15*	0.50±0.06	0.54±0.06	0.61±0.09	0.94±0.16*
Testes/Ovaries	3.13±0.69	3.16±0.34	3.29±0.16	3.33±0.26	0.14±0.01	0.15±0.02	0.15±0.01	0.16±0.03
Thymus	0.54±0.07	0.52±0.09	0.52±0.11	0.53±0.12	0.45±0.08	0.49±0.08	0.47±0.07	0.48±0.06
Prostate gland	0.57±0.10	0.61±0.19	0.60±0.10	0.56±0.11				

Each value represents the mean±S.D. \*Significantly different from the control (p<0.05)

**Table VIII.** Relative organ weight in rats intravenously administered with DA-3585 for 4 weeks (unit=%×10)

Sex	Male				Female			
	Control	100	500	2,500	Control	100	500	2,500
Dose (IU/kg)								
Adrenal gland	0.19±0.02	0.21±0.05	0.17±0.03	0.23±0.05*	0.37±0.04	0.36±0.04	0.35±0.05	0.36±0.08
Brain	5.59±0.34	5.22±0.62	5.39±0.30	5.67±0.59	7.85±1.04	8.22±0.54	8.11±0.41	7.87±0.45
Heart	3.74±0.24	3.46±0.35	3.47±0.26	3.58±0.25	3.35±1.17	3.55±0.26	3.51±0.14	3.86±0.28
Kidney	7.90±0.77	7.76±0.34	7.74±0.56	7.94±0.40	7.71±0.74	7.84±0.56	7.55±0.36	7.89±0.57
Liver	30.0±2.2	31.2±2.1	30.7±1.4	30.7±1.2	31.6±2.4	31.9±2.2	31.4±1.8	32.3±1.6
Lung	4.18±0.36	4.08±0.30	4.16±0.32	4.57±0.42*	5.42±0.28	5.54±1.28	5.18±0.48	5.63±0.52
Pituitary gland	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.09±0.04	0.07±0.02	0.06±0.01	0.06±0.01
Spleen	2.00±0.18	1.93±0.22	2.28±0.23*	3.24±0.36*	2.17±0.28	2.28±0.27	2.66±0.53*	3.80±0.57*
Testes/Ovaries	8.42±1.94	8.47±0.74	8.71±0.68	9.19±0.85	0.58±0.06	0.62±0.09	0.61±0.05	0.64±0.08
Thymus	1.45±0.14	1.40±0.22	1.37±0.26	1.46±0.27	1.95±0.31	2.04±0.30	1.98±0.26	1.94±0.26
Prostate gland	0.74±0.65	0.63±0.42	0.69±0.52	0.65±0.56				

Each value represents the mean±S.D. \*Significantly different from the control (p<0.05)

되지 않았다. 폐의 무게는 수컷 고용량군의 경우 상대중량에서는 유의성있는 증가가 인정되었으나 절대중량에는 변화가 없었다. 부신의 경우 수컷의 중용량과 고용량에서 절대 및 상대중량의 감소 또는 증가가 각각 인정되었다. 비장의 중량은 상대 및 절대중량 모두에서 용량의존적으로 증가하였으며 중용량과 고용량군에서는 매체대조군에 비해 유의성을 나타내었다(p<0.05). 그외 각 군의 암·수 모든 동물에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의성있는 변화는 인정되지 않았다(Table VII, VIII).

**병리조직학적소견** 병리조직학적 검사결과(Table IX) 매체대조군과 고용량군중 일부동물에서 간의 공포변성과 약한 충혈이 관찰되었으며, 신장에서도 충혈이 일부동물에서 나타났다. 또한 DA-3585를 투여한 군 모두에서 골수내 세포밀도가 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으며, erythroblast의 수가 증가하였다. 또한 비장에서도 erythroblast의 수가 증가하였다. 그외 다른 장기에서는 매체대조군과 비

교하여 특이한 병변이 관찰되지 않았다.

## 고찰 및 결론

Erythropoietin(EPO)은 저산소증에 반응하여 신장에서 생성되어 적혈구 전구세포의 분화를 촉진시키고, 이미 분열된 erythroid세포의 헤모글로빈 합성을 항진시키는 작용을 가지고 있으며(Duncan 등,1994), 만성신부전증, 말기신장질환 등 다양한 원인에 의하여 발생한 빈혈 치료에 이용되고 있다(Vreundenhil 등, 1993).

본 실험은 동아제약(주)에서 BHK cell과 무혈청배지를 이용하여 자체 개발한 재조합 사람 erythropoietin(rHu-EPO)의 급성독성 및 반복투여독성을 평가하기 위하여 실시하였다. 단회투여 급성독성시험 결과 모든 시험물질 투여군에서 시험물질에 의한 동물의 폐사나 임상증상 및 체중변화는 관찰되지 않았으며, 부검조건에서도 육안적으로 이상을

**Table IX.** Histopathological findings in rats intravenously administered with DA-3585 for 4 weeks

Organs and findings	Dose (IU/kg)	Control		100		500		2,500	
	Sex	M	F	M	F	M	F	M	F
Adrenal gland		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Bone marrow (sternum)		(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Erythroid hyperplasia		0	0	10	10	10	10	10	10
Brain		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Eye		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Gastrointestinal tract		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Heart		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Kidney		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Congestion		3	1	0	0	0	0	2	2
Liver		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Vasculolar degeneration		3	1	0	0	0	0	2	3
Slight congestion		4	2	0	0	0	0	1	3
Lung		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Pituitary gland		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Salivary gland		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Skin		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Spleen		(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Erythroid hyperplasia		0	0	8	6	10	10	9	10
Thyroid gland		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Trachea		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Urinary bladder		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Prostate gland		(10)	-	(0)	-	(0)	-	(10)	-
Within normal limits		10	-	0	-	0	-	10	-
Seminal gland		(10)	-	(0)	-	(0)	-	(10)	-
Within normal limits		10	-	0	-	0	-	10	-
Testis		(10)	-	(0)	-	(0)	-	(10)	-
Within normal limits		10	-	0	-	0	-	10	-
Ovary		-	(10)	-	(0)	-	(0)	-	(10)
Within normal limits		-	10	-	0	-	0	-	10
Uterus		-	(10)	-	(0)	-	(0)	-	(10)
Within normal limits		-	10	-	0	-	0	-	10

M: male, F: female, Code: ( )=Number of animals examined.

나타낸 장기는 관찰되지 않았다. 이와 같은 시험결과는 CHO세포 유래 rHu-EPO의 랫드 급성독성시험결과 시험물질과 연관된 특기할 만한 임상증상이 관찰되지 않았고,

LD<sub>50</sub> 치는 암·수 모두 20,000 IU/kg 이상이라고 한 기존의 연구결과와 유사하였다(Spicer와 Wisler, 1990; Lim 등, 1994). 4주반복투여 아급성독성시험 결과 실험중 폐사한 동



물은 없었으며, 체중 및 사료, 음수 섭취량의 변화도 인정되지 않았다. 혈액학적 검사결과 나타난 RBC, Hb, Hct, MCV 등의 증가와 장기중량측정결과 나타난 비장 중량의 증가, 병리조직학적 소견에 나타난 골수와 비장에서의 erythroblast의 증가 등은 시험물질인 DA-3585의 약리학적 효과로 인하여 나타난 결과로 erythropoietin은 적아구계전구세포의 최종 단계의 CFU-E를 중심으로 한 표적세포에 작용하여 분화를 촉진시킴으로서 적혈구의 산생을 항진시킨다는 Graber와 Krantz(1978)의 주장과 일치한다. 이는 Cho 등(1996)이 비글견을 이용한 EPO의 4주 아급성시험에서 나타난 결과와 유사한 결과이며, Kim 등(1996)이 정상랫드와 빈혈유발 랫드에 EPO를 투여한 결과 RBC, Hb, Hct, reticulocyte 등이 증가하였다는 보고와도 유사한 결과이다. Platelet(PLT)의 감소경향은 EPO투여로 인해 RBC를 생산하는 erythrocytic cell line의 활성화되고 이와 결합적인 관계에 있는 megakaryocytic cell line이 감소함으로써 megakaryocytopenia가 일어나 혈중의 PLT의 감소가 유발된 것으로 생각된다. 이것은 대량의 EPO를 장기간 투여한 mice에서 thrombocytopenia가 유발되었다는 McDonald와 Sullivan(1993)의 보고와 일치하는 것이다. 혈액생화학적 변화에서는 일부에서 유의성있는 변화는 있었으나 모두 정상범위내의 변화이었으며, 용량상관성을 보이지 않아 약물투여에 의한 영향은 아닌 것으로 사료된다. 뇨검사 결과 나타난 bilirubin량의 약한 증가와 잠혈, 백혈구출현 등은 정상동물에서도 나타날 수 있는 정도의 양으로 독성학적 의의는 없었다. 부검시 암컷 고용량군 2예에서 나타난 흉선의 충혈은 조직검사결과 정상으로 나타나 부검시 출혈에 의한 반점으로 사료된다. 장기중량 측정에서 나타난 뇌, 심장, 폐, 부신 등의 무게변화는 절대 및 상대중량 모두에서 유의성을 나타내지 못하였으며, 용량상관성도 나타내지 않아 약물 투여에 의한 변화로 볼 수 없었다. 조직병리학적 관찰에서 나타난 간과 신장의 약한 공포변성이나 충혈은 정상동물에서도 일어날 수 있는 변화로 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 생각된다.

이상의 결과로 보아 동아제약(주)에서 생산한 DA-3585는 급성독성시험시 LD50치는 25,000 IU/kg이상인 것으로 사료된다. 또한 랫드에 4주간 정맥내 연속투여시 500 IU/kg 및 2, 500 IU/kg 투여군에서 RBC, Hb, Hct 등의 증가, 비장의 중량 증가, 골수 및 비장내 erythroblast의 증가 등의 변화가 관찰되었다. 이상의 결과로 보아 DA-3585의 NOAEL(no-observed-adverse-effect-level)은 100 IU/kg인 것으로 추정된다.

### 참고문헌

- Cho, M. H., Seong, H. J., Kim, H. S., Kwack, S. J., Lim, S. Y., Chun, S. A., Kim, W. B., Kim, B. M., Ahn, B. O. and Lee, B. M. (1996). Subacute toxicity of recombinant human erythropoietin(rHu-EPO) in beagle dogs. *J. Appl. Pharmacol.* **4**, 323-329.
- Duncan, J. R., Prasse, K. W. and Mahaffey, E. A. (1994). Erythrocytes. In *Veterinary laboratory medicine* (3rd Ed), pp. 3-36. Iowa state university press, Iowa.
- Eschbach, J. W. and Adamson, J. W. (1989). Guidelines for recombinant human erythropoietin therapy. *Am. J. Kidney Dis.* **14**(2) suppl. 1, 2-8.
- Fisher, J. W. (1993). Recent advances in erythropoietin research. *Prog. Drug. Res.* **41**, 293-311.
- Gebbia, V., Palmeri, S., Valenza, R., Rausam, L. and Citarrella, P. (1991). The in vivo effects of recombinant human erythropoietin on cisdiamminodichloroplatinum-induced anemia in Golden Syrian hamsters. *In Vivo* **5**, 149-152.
- Graber, S. E. and Krantz, S. B. (1978). Erythropoietin and control of red cell production. *Annu. Rev. Med.* **29**, 51-66.
- Guyton, A. C. (1991). In *Textbook of Medical Physiology* (8th ed.), W. B. Saunders Company, Philadelphia. pp. 344-364.
- Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S. D., Kaufman, R. J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S. S., Hewick, R., Fretsch, 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.
- Kim, D. H., Ahn, B. O., Son, M. H., Shin, M. S., Lee, S. H., Kim, W. B. and Yang, J. (1996). Efficacy and general pharmacology of recombinant human erythropoietin(DA-3285). *J. Appl. Pharmacol.* **1**, 68-77.
- Koury, S. T., Bondurant, M. C. and Koury, M. J. (1988). Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood* **71**, 524-527.
- Koeffler, H. P. and Goldwasser, E. (1981). Erythropoietin radioimmunoassay in evaluating patients with polycythemia. *Ann. Intern. Med.* **94**(1), 44-47.
- 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**(2), 237-241.
- Lin, F. K., Suggs, S., Lin, C. H., Browne, J. K., Smalling, R., Egrie, J. C., Cjen, K. K., Fox, G. M., Martin, F., Stabinsky, Z., Badrawi, S. M., Lai, P. H. and Goldwasser, E. (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7580-7584.
- McDonald, T. P. and Sullivan, P. S. (1993). Megakaryocytic and erythrocytic cell lines share a common precursor cell. *Exp. Hematol.* **21**(10), 1316-20.
- 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**(Suppl 5), 973-1034.
- Vaziri, N. D., Zhou, X. J. and Liao, S. Y. (1994). Erythropoietin enhances recovery from cisplatin-induced acute renal failure. *Am. Physiol. Soc.* **266**(35), F360-F366.
- Vreundenhil, G., Frenken, L. A. M. and Koene, R. A. P. (1993). Erythropoietin; mechanisms of action and indications. *Netherlands J. Med.*, **42**, 187-202.
- 의약품 등의 독성시험기준. (1996). 식품의약품안전본부 고시 제 96-8호.