

Erythropoietin의 개발과 이에 따른 안전성 및 효능 평가

하 종렬

(주) 중외제약 종합연구소, 경기도 화성군 태안읍 안녕리 146-141

1. 기원 및 개발의 경위, 외국에서의 사용현황

에리스로포이에틴은 오랜 역사를 지니고 있다. 1906년 경에 Carnot와 Deflandre는 hematopoietin이라 불리우는 체성인자가 적혈구의 형성을 조절한다고 추정했었다. Reissmann과 Erslev가 이 추정을 확인하는데까지는 40년이라는 시간이 걸렸다. 몇 년후 Jacobsen에 의해 신장이 적혈구 생성의 일차적인 부위라는 것이 발견되었고, 20년이 지나서 Miyake 등이 현대 생화학적 방법으로 에리스로포이에틴을 분리하는데 성공했다. 유전공학으로 치료용, 특히 임상용으로 대량의 호르몬을 생산할 수 있도록 한 에리스로포이에틴 유전자를 분리 및 발현하는 것이 극히 짧은 시간내에 가능하게 되었다. 에리스로포이에틴 유전자의 cloning과 최초의 임상시험 결과가 3년이 못되는 기간내에 이루어졌다는 것을 연구개발진행 역사를 보면 알수 있다.

에리스로포이에틴 연구의 역사

- 1906: Carnot and Deflandre
 - 빈혈토끼의 혈장을 정상 동물에 주입하여 헤마토크릿치를 상승시킴
 - “헤마토포이에틴”
- 1950-1955: Reissmann, Erslev
 - 적혈구 생성의 체성조절인자를 확인: “에리스로포이에틴”
- 1957: Jacobsen
 - 신장이 에리스로포이에틴 생성의 일차부위
- 1977: Miyake
 - 재생불량성 빈혈환자의 뇨에서 에리스로포이에틴을 분리, 정제
- 1985-1986: Jacobs 등, Lin 등
 - EPO gene의 cloning 및 에리스로포이에틴을 분리, 정제
- 1986. 11-1987.1: Winearls 등, Eschbach 등
 - 유전자 재조합 에리스로포이에틴을 임상에 사용
 - 최초의 임상시험 결과

Recormon[®]의 주성분은 Epoetin beta(CAS No. 1223 12-54-3)이다. Recormon[®]에 함유되어있는 Epoetin beta는 발현장치로 차이니스 햄스터 난소세포(CHO cells)를 사용한 생명공학적 발효공정

으로 얻어졌다. GI사는 사용된 이 CHO cell을 분리하여 Master cell bank로 된 DN2-3a로 표시된 CHO cells의 clone으로부터 만들었다. CHO cell의 DN2-3a 3는 GI에 의해 적절한 발현 vector로 통합된 사람 에리스로포이에틴 cDNA를 함유하도록 유전공학적인 공정을 거친 CHO cell로부터 분리되었다.

Epoetin beta는 약 40%의 탄수화물과 165개의 아미노산으로 구성된 약 34,000 Dalton의 분자량을 가진 당단백질이다. cDNA로부터 예상된 아미노산 sequence에 비해 Epoetin beta 분자는 C-말단에 아르기닌이 없다. 아르기닌의 분리는 단백질이 세포를 떠나기 전에 일어난다.

Epoetin beta는 재생불량성 빈혈환자의 뇨에서 취한 EPO와 동등하다.

Epoetin beta를 주성분으로 하는 에리스로포이에틴 제제는 다음과 같다.

국 가 명	제 품 명	회 사 명
독 일	Recormon	Boehringer Mannheim
스 웨 덴	Recormon	Boehringer Mannheim
영 국	Recormon	Boehringer Mannheim
네델란드	Recormon	Boehringer Mannheim
일 본	Epogin	Chugai
한 국	리 코 몬	(주) 중외제약

2. IN VITRO and IN VIVO EFFICACY STUDY

1) In vitro 효력시험

① 마우스 비장세포에 대한 효력

EPO의 생물학적인 효력을 시험하기 위해, 마우스에 phenylhydrazine을 투여하여 심한 용혈 빈혈을 유발하면, 조혈작용이 촉진되어 비장의 유헤세포가 아주 많이 증가된다(Hara 등, 1976). 이 마우스에서 비장세포부유액을 만들고 rhEPO를 가하고 22시간 배양한 다음, ³H-thymidine을 첨가하고 2시간동안 추가배양하였을 때, 적혈구계 유헤비장세포로의 ³H-thymidine incorporation은 10-100 mU rhEPO 농도에서 농도의존적으로 증가되었다. 이는 적혈구계유헤세포가 rhEPO에 의해 자극되어 증식되었음을 의미한다.

② EPO 작용의 선택성

rhEPO의 omnipotent stem cell(CFU-GEMM), immature erythroid bone marrow stem cells(BFU-e), granulocytic-monocytic bone marrow cells(CFU-GM) 그리고 megakaryocytic bone marrow cells (CFU-MK)에 대한 영향을 조사한 결과, 용량의존적인 BFU-e 형성의 증가가 인정되었으며, 면양혈장에서 분리한 EPO보다 rhEPO가 CFU-GEMM의 in vitro에서의 증식을 더욱 촉진하였다. 하지만 면양혈장분리 EPO와 rhEPO 모두 CFU-MK의 증식에는 영향을 미치지 않았다.

2) 다염적혈구(polycythemic) 마우스에서의 유효성

EPO의 생물학적인 작용은 내인성의 EPO의 생산이 억제된 동물에서 더욱 쉽고 명확하게 증명할 수 있는데, 그런 모델중의 하나가 polycythemic mouse model이다. 즉, 동종의 마우스 혈액을 과잉수혈하면, polycythemia 상태가 되어 내인성의 조혈작용이 억제되어, 과잉수혈후 3일에서 18일까지의 reticulocyte count는 거의 영에 가깝게 유지된다. Reticulocyte count와 Fe^{59} incorporation rate 사이에는 밀접한 상관관계가 있는데, 실험결과 rhEPO를 100mU, 1000 mU/animal 로 투여했을때, 적혈구로의 Fe^{59} incorporation은 용량의존적으로 증가하였다(Gudim 등, 1979).

3) 개(dog)에서의 조혈작용 촉진

아급성독성시험에서 개에 30, 300 또는 3000 U/kg의 rhEPO를 정맥투여했을때, 저농도에서도 적혈구수, 헤마토크릿치, 헤모글로빈량이 증가하였으며, 이 증가의 통계학적 유의성은 투여개시 3주후부터 나타났다.

4) 정상 랫드와 마우스에서의 효력

① 5일 연속투여 시험

정상상태의 랫드에서 1.6, 8, 40 U/kg의 rhEPO를 24시간 간격으로 정맥주사했을때에는 조혈작용의 촉진이 나타나지 않았지만, 200, 1000, 5000 U/kg를 투여한 랫드에서는 망상적혈구의 수가 증가하고, 말초혈액의 헤모글로빈 농도가 증가하였다. 또한 마우스에서도 160, 4000 U/kg의 rhEPO를 투여하였을때 비슷한 효과가 나타났다.

② 투여경로에 따른 효과

랫드에 50U/kg의 rhEPO를 매일 6일간 정맥, 피하, 근육내 또는 피내주사하였을때, 투여경로에 관계없이 망상적혈구수가 48시간후부터 증가하였으며, 시간적으로는 다소 지연되었지만, 헤모글로빈농도도 증가하였다. 따라서 조혈촉진작용의 투여경로에 따른 차이는 인정되지 않았다.

③ 장기간 투여시의 효과

랫드에 EPO를 매일 투여했을때, 1주째에 헤모글로빈농도가 유의성있게 증가하였으며, 2주이상 투여를 계속했을때에도 헤모글로빈의 농도는 증가하였다. 하지만 계속하여 4주까지 투여하였을때, 3주째까지는 헤모글로빈 농도가 증가하였으나, 4주째에는 약간 감소하는 경향을 보였으며, 이는 불명확하기는 하지만 rhEPO에 대한 항체의 생성때문인것으로 생각되었다.

5) 빈혈성 랫드에서의 유효성

① Renal anemia

EPO를 매일 4 units씩 33일간 성장기의 5/6신장절제술을 실시한 랫드에 투여하였을때(acute uremia model), 신성빈혈이 완전히 치유되었으며, 이와더불어 헤모글로빈농도와 헤마토크릿치도 증가하였다.

3×20 U/kg/week rhEPO를 5/6신장절제술을 실시한 랫드에 피하로 투여하였을때(chronic anemia), 헤마토크릿치는 3-4주사이에 급격히 증가하였으며, 그이후 다시 감소하였다.

② Non-renal anemia

5-fluorouracil을 투여하면, 심한빈혈이 급성으로 유발되며, 이에따라 혈장중의 EPO가 급격히 증가하고 조혈작용이 촉진된다. 이 상태에서 140 U/kg의 rhEPO를 투여해주면 상대적으로 빠르게 빈혈이 회복된다.

Cisplatin을 투여하면 심한빈혈이 유발되지만, 5-FU에서와는 달리 EPO의 농도는 증가하지 않으며, 망상적혈구도 증가하지 않는다. 이는 cisplatin이 신장에서 EPO를 생산하는 세포에 손상을 주기 때문으로 생각되며, rhEPO를 정맥주사하였을때, 약 20일후에 빈혈이 회복되었다.

류마치스성관절염에서의 빈혈도 동물실험에서 재조합 EPO를 투여하였을때 교정되었다 (Birgegard 등, 1987).

Freund's complete adjuvant를 랫드에 피내주사한후에 빈혈을 유발하고, EPO를 투여하였을 때 용량의존적인 빈혈치유반응이 관찰되었다.

3. PHARMACOKINETICS

여러가지 동물모델에서 EPO의 약동력학과 대사를 연구하기 위하여, 여러가지 bioassay나 ¹²⁵I-labeled EPO가 사용되었는데(Stohlman 등, 1962), 이 모델들의 단점은 내인성과 외인성의 EPO를 구별하기 어렵다는 점과 ¹²⁵I-EPO가 생물학적으로 활성을 갖지 않는다는 점에 있다. 하지만 ³⁵S-labeled EPO는 생물학적인 활성을 가지는데, 이를 사용한 연구결과 rhEPO의 반감기는 정상랫드와 uremic 랫드에서 큰 차이가 없었다. 또한 분포용적 측면에서도 별다른 차이를 나타내지 않았는데, 분포용적은 체중의 약 17%로서 extracellular volume보다 약간 낮았다. 이는 EPO가 세포를 투과하지도 않고 세포에 의해 흡수되지도 않는다는 것을 의미한다.

Total body clearance는 두 군간에 동일하였는데, renal clearance는 정상동물보다 uremic 군에서 유의성있게 증가하였다. 이는 uremic rat에서 보이는 단백뇨 때문인것으로 판단된다. 즉, 정상적인 랫드는 하루에 5mg 정도의 단백질을 배설하지만, uremic 랫드는 평균 134mg의 단백질을 배설한다. Uremic rat에서 Total body clearance가 동등하지만 renal clearance가 높다는 것은 extracellular clearance가 낮다는 것을 의미한다. EPO의 30%는 신장에서 대사되기 때문에 낮은 extrarenal clearance는 신장실질의 5/6의 손실때문으로 풀이된다(Emmanuel 등, 1984).

4. GENERAL PHARMACOLOGY

1) Irwin Test

군당 6수의 마우스에서 methamphetamine(stimulant)과 diazepam (sedative) 투여군을 대조로 하여, rhEPO를 300 또는 1000 U/kg을 복강주사하고 0.5, 3시간후에 관찰한 결과, 행동학적인 변화가 관찰되지 않았다.

2) Locomotor Activity

군당 6수의 마우스에서 methamphetamine(stimulant)과 diazepam (sedative) 투여군을 대조로 하여, rhEPO를 30, 100, 300 그리고 1000 U/kg을 복강투여하고, 투여전과 투여후 20, 60, 120, 180, 240분에 locomotor activity를 관찰한 결과, 300, 1000U/kg 투여후 locomotor activity가 약간 증가(20%)하였다.

3) Circulatory and Respiratory Function

의식상태의 비글견에서 혈액동력학적, 혈액생화학적 parameter에 대한 영향을 측정한 결과, haemodynamic variables(심박수, 혈압, ECG)은 정상적인 범위에 속하였으며, ECG times(PQ, QRS, QT)도 변화가 없었다. 동맥의 수축기혈압이 약간상승하였으나(160mmHg에서 176mmHg로), 생리학적인 범위로 인정되었다.

5. TOXICOLOGY

1) Acute Toxicity (i.v.) in Mice

암수 각각 5수의 마우스에 4000 U/kg의 rhEPO를 일회 정맥주사하고 14일간 관찰시 임상증상은 나타나지 않았고 사망례도 없었다.

2) Acute Toxicity (i.v.) in Rats

① Initial experiment: 암수 각각 5수의 랫드에 4000 U/kg의 rhEPO를 일회 정맥주사하고 14일간 관찰시 독성작용은 관찰되지 않았고, 체중증가도 정상적이었다.

② Second experiment: 3, 0, 300, 3000, 30000 U/kg의 rhEPO를 암수 각각 5수의 랫드에 일회 정맥주사하였을때, 약물에 의한 임상증상은 없었다. 투여 8, 9일째에 혈액검사를 실시한결과 peripheral polycythemia를 동반하는 조혈증가가 관찰되었다.

3) Single (i.v.) Administration to Dogs

암수 각각 3수의 비글견에 6000 U/kg의 rhEPO를 정맥주사하고 8일째에 살처분하여 검사한 결과, 약물에 의한 임상증상은 나타나지 않았다.

4) Local Tolerance (s.c.) of rhEPO Finished Product

RhEPO finished product (200 units/vial)을 1ml의 증류수에 녹여 0.5ml을 랫드 대퇴상부에 피하주사하고 3일간 관찰하였을때, 별다른 부작용을 나타내지 않았다.

5) Local Tolerance (i.v.) of rhEPO Finished Product in the Rabbit Ear

RhEPO finished product (200 units/vial)을 2ml의 증류수에 녹여 1ml을 5수의 토끼의 outer marginal vein에 주사하고 24시간 관찰한다음, 조직학적인 검사를 실시한 결과, 이상은 발견되지 않았다.

6) I.V. Toxicity Study with rhEPO in Dogs over 3 Weeks Treatment with a Subsequent Recovery Period of 3 Weeks

3주간 매일 cephalic vein에 rhEPO를 30, 300, 3000 U/kg을 투여하고, 투여종료후 3주간 관찰하였을때, 약물에 의한 임상증상은 나타나지 않았으며, 아나필락시스반응도 나타나지 않았다. 3000U/kg 투여군에서 용매투여군에 비해 체중과 식이섭취량이 감소하였으나, 휴지기에는 정상으로 돌아왔다. 혈액검사결과 적혈구수, 헤모글로빈농도, 헤마토크릿치, 망상적혈구수는 용량의존적으로 증가하였으며, MCV, MCHC, MCH는 감소하였다. 또한 혈청내의 포도당과 요소성질소치도 용량의존적으로 감소하였다. 약물투여기간동안 비장은 종대되었으며, 적골수의 증가도 나타났다. 또한 투여종료후 간장과 비장에서의 조혈도 증가하였으나, 휴지기에는 정상수준으로 회복되었다.

골수의 섬유화가 고농도군(임상용량의 233배 용량)에서 관찰되었는데, 섬유아세포의 증식은 정상적인 반응으로 생각되며, 심한 조혈작용 때문인것으로 판단된다(Weiss, 1986).

7) I.V. Toxicity Study with rhEPO in Dogs After 3-month Treatment Period and a 5-month Recovery Period

3개월간 100, 500, 3000 U/kg의 rhEPO를 정맥투여하고 5개월간 휴지기를 두고 관찰한 결과, 100U/kg 투여군에서도 조혈촉진작용이 나타났으며, rhEPO에 특이적인 반응도 용량의존적으로 나타났다. 저용량에서는 임상증상의 변화는 관찰되지 않았으나, 투여기간이 길어짐에 따라 중,고농도군에서 연변증상과 흥분 그리고 호흡기능이 부전에 따른 혼수상태가 중용량에서 20%, 고용량에서 50%의 동물에서 나타났는데, 이는 rhEPO에 의해 헤마토크릿치가 80% 이상으로 상승함에 따른 이차적인 작용으로 보인다.

안검사 결과, 망막의 동맥과 정맥의 용량의존적인 충혈이 나타났으며, 부분적인 부종도 관찰되었지만, 휴지기를 거치면서 이러한 증상은 소실되었다.

조직학적 검사결과 골수에서 myelofibrosis가 중용량에서 50%, 고용량에서 100% 관찰되었다.

8) Genetic Toxicology

① Ames Mutagenicity Test

Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537 그리고 TA1538 균주를 사용하여 변이원성시험을 실시한 결과 0.1-3000 U/plate의 rhEPO를 적용했을때, 유의성있는 돌연변이는 관찰되지 않았다.

② In Vivo Micronucleus Test in the Mouse

암수 NMRI 마우스에 4000 U/kg의 rhEPO를 단회정맥주사하고 14, 24, 48시간후에 각각 동물을 살처분하여 골수를 채취하여 micronucleated polychromatized erythrocytes를 계수한 결과 음성대조군과 비교하여 유의성있는 차이는 나타나지 않았다.

③ In Vitro Mammalian Cell HGPRT Test

Chinese hamster V79 cell line을 사용하여 유전자의 돌연변이를 일으키는지 여부를 검사하였다. 60-1000 U/ml 용량에서 metabolic activation 존재여부에 무관하게 rhEPO는 돌연변이를 일으키지 않았다.

④ *In Vitro* Metaphase Analysis in Human Lymphocytes

배양한 human lymphocyte에서 60-1000 U/ml 농도에서 rhEPO가 chromosomal aberration 을 일으키는지를 검사한 결과, metabolic activation 존재여부에 무관하게 염색체 손상을 일으키지 않았다.

9) Reproduction Toxicology Studies

① Intravenous Teratogenicity Study in Rabbits

임신한 토끼에 rhEPO를 인공수정후 6일에서 18일사이에 100, 500, 3000 U/kg 용량으로 정맥투여한 결과, 어미에서 용량의존적인 체중의 감소가 나타났으며, 태자의 평균체중도 감소하였다. 하지만 약물에 의한 태자의 손상은 발견되지 않았다.

② Intravenous Teratogenicity Study in the Rat

임신한 토끼에 rhEPO를 임신 6일에서 15일사이에 100, 500, 3000 U/kg 용량으로 미정맥에 투여한 결과 착상후 embryo loss가 용매투여군과 고용량군에서 관찰되었는데, 이는 용매에 포함된 leucine 성분때문으로 판단되었다. 고용량투여군의 어미에서 비장의 종대가 관찰되었는데, 이는 조혈작용의 촉진때문이다. 고용량투여군의 태자는 체중이 유의성있게 감소하였으며, 골격의 발달이 지연되었으나, 내장장기나 골격의 기형은 관찰되지 않았다.

10) Carcinogenic Potential

① Effect of rhEPO on the growth of human skin cells

피부섬유아세포, 모세혈관내피세포, 각질세포, HaCaT cell, melanoma cell에서 50-1000 U/ml의 rhEPO는 각질세포에서만 고용량에서 성장촉진 작용을 나타내었다.

② Effects of rhEPO on human tumour cells *in vitro*

8가지의 human tumor cell line(melanoma, hepatoma, renal carcinoma 3종, adenocarcinoma 3종)에 대한 5000 U/ml 농도까지의 rhEPO의 영향을 검사한 결과, 어떤 세포종에 대해서도 rhEPO는 증식촉진작용을 나타내지 않았다.

③ Effect of rhEPO on the growth of solid tumours

Dunning tumour와 ovarian carcinoma의 성장에 미치는 rhEPO의 영향을 *in vivo*에서 실험한 결과, 3×40, 3×400, 3×4000 I.U./kg/week의 rhEPO를 22일까지 투여하였을때, 피하 및 근육 내에 이식한 종양의 성장에 대해 rhEPO는 영향을 미치지 않았다.

④ 3-month subcutaneous cancer DRF study in mice with recombinant murine EPO

마우스에 피하로 10, 20, 50, 100, 500 U/kg의 murine EPO를 3개월간 주사하고 4.5개월의 휴지기를 두었다. 실험결과 50 U/kg 이상 투여군에서 hypervolaemia, splenomegaly가 나타났고, 적혈구수와 PCV가 증가하였다.

⑤ Interim report of a mice carcinogenicity study with recombinant murine EPO

50, 100, 500 U/kg 용량으로 1주에 3회씩 1년간 투여한 결과 자연적인 종양의 발생을 유발

하거나 촉진하는 증거는 발견되지 않았다.

6. 임상 유효성 및 부작용

1) 유효성

① 말기 신부전 및 에리스로포이에틴 결핍

투석치료로 많은 uremia 증상과 수분의 불균형을 감소시킬수 있으며, 전해질, 산-염기 평형도 보정되며, 혈청내 축적된 ureamic toxin의 대부분도 제거시킬수 있다. 그럼에도 불구하고 최적 투석 regimen으로 환자는 중등도의 환경으로 밖에 유지되지 않는다. 심순환부전, 신 osteopathy, 신부전성빈혈, 여러 ureamic 증상들은 투석에 잘 반응하지 않거나 또는 하더라도 만족스럽지 못하다. 신부전성 빈혈의 병태는 다양한데, 개인차가 있으나, EPO 결핍이 가장 중요한 인자로 나타나고 있다(Eschbach, 1988)

정상적으로 헤마토크리치와 혈청 EPO량은 서로 negative semilogarithmic 관계가 있다(Caro, 1988). 이러한 관계는 모든 투석환자들이 EPO 결핍을 보이는 것처럼 말기신부전에서는 오지되지 않는다(Urabe, 1987).

② 신부전 치료를 위한 rh-EPO 사용

Multicenter 용량결정 연구에서 환자에 56주나 그이상 투여하였다. rhEPO를 정맥경로로 투석기간 종료시에 주당 3회씩, 40, 80, 120 U/kg을 투여하였다. 투여후 일주일후부터 혈액생성이 촉진되었는데, 헤마토크리치가 주당 평균 0.69-1.64% 증가하였다.

③ 혈액투석 환자에서 철분과다에 대한 효과

반복되는 수혈의 경우에 철분과다로 인한 철침착과 장기손상이 유발되는데 특히 신장, 간, 내분비선 등이다. rhEPO 치료로 철분과다가 완화되는데 이는 철 이용속도가 증가하는 것에 기인한다(Eschbach, 1988; Wineals, 1987).

④ rh-EPO 치료시 수혈의 필요성

252명 수혈의존성 환자를 대상으로 한 연구에서 매월 수혈이 필요한 환자가 50%였으나, 투여 1개월째에는 10.5%로 감소하였고, 2개월, 3개월째에는 2%로 크게 떨어졌다.

⑤ rh-EPO 치료중 혈청내 EPO 농도

40 U/kg을 주당 3회 투여시 정상수준(137 units/ml)을 유지할 수 있다.

⑥ EPO 항체

rh-EPO를 1년이하 또는 그 이상 투여후에 rh-EPO에 대한 항체는 어떤 환자에서도 발견되지 않았다.

⑦ rh-EPO 치료중 단백질 대사의 변화

C¹³-leucine을 이용하여 측정시에 단백질 합성보다는 분해속도 감소에 의한 개선이 나타났다(Scigalla, 1989).

⑧ Physical capability의 개선

임상조사자의 평가에 따르면, 평균 8개월 치료후에 약 84.6% 가량이 개선되었다.

2) 부작용

가장 중요한 부작용은 *de novo* 고혈압, 기존 고혈압의 악화이다. 이러한 반응은 초기에 고혈압 혈액투석환자에서 많이 나타난다. 직접적인 약리학적 고혈압유발효과에 대한 증거는 없지만, rh-EPO 치료로 인하여 용량의존적인 형태로 혈압을 증가시키는것 같다.

초기 헤마토크리트치의 증가나 점도변화 등이 원인인자로의 연관성이 제기되고 있으나 분명치는 않고 환자마다 매우 다양한 것으로 보인다.

3) Uremic Children의 신성빈혈 치료작용

어른에서와 마찬가지로 신성빈혈을 교정할 수 있으며, PCV를 30-35%로 유지한 후에는 용량을 반으로 줄여 사용한다. 또한 특별한 경우를 제외하고는 별도의 수혈을 필요로 하지 않는다. 철분과다를 줄여주고, 신체적 활동성을 개선시킨다.

주요한 부작용으로는 고혈압유발 또는 악화작용인데, 혈압을 조절할 수 있을때에만 사용하여야 한다.

참고문헌

- Birgegard, G., Hallgren, R., and Caro, J. Serum erythropoietin in rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritis. Brit. J. Hematology 65: 479-483, 1987
- Caro J and A.J. Erslev Erythropoietin assays and their use in the study of anemias. Contr. Nephrol. 66: 54-62, 1988
- Emmanouel, D.S., Goldwasser, E., Katz, A.I. Metabolism of pure human erythropoietin in the rat. Am. J. Physiol. 247: F168-F176, 1984j
- Eschbach J.W. and J.W. Adamson Modern aspects of pathophysiology of renal anemia. Contr. Nephrol. 66: 63-70, 1988
- Gudim, V.I. et al. A methodlike biotestirovanya eritropoetina na mushach s polizitenney. Patol. Fiziol i Exper. Ter. Heft 2: 57-58, 1979

- Hara, H., Ogawa, M. Erythropoietic precursors in mice with phenylhydrazine-induced anemia. *Ann. J. Hematol.* 1: 453-458, 1976

- Stohlman, F., Howard, D. Humoral regulation of erythropoiesis. IX. Rate of disappearance of erythropoietin from the plasma. In: *Erythropoiesis*, ed. by L.O. Jacobsen et al. New York, 120-124, 1962.

- Urabe A., T. Saito, H. Fukamachi, M. Kubota and F. Takaku Serum Erythropoietin titers in the anemia of chronic renal failure and other hematological states. *International J. Cell Cloning* 5: 202-208, 1987

- Weiss, Douglas J. Antibody-mediated suppression of erythropoiesis in dogs with red blood cell anemia. *Am. J. Vet. Res.* 47: 2646-2648, 1986

- Winearls, C.G., P.M. Cotes, M. Pippard, C. Reid and D.O. Oliver Correction of anemia in haemodialysis patients with recombinant erythropoietin - follow up and results of pharmacokinetics, ferrokinetics and bone marrow culture studies. Xth International Congress of Nephrology, London, Abstr. 183:26-31, July 1987