

Recombinant Human Epidermal Growth Factor, DWP-401에 대한 마우스에서의 급성독성

김효정* · 서경원 · 오미현 · 선우유신 · 유영효¹ · 문병우

국립보건안전연구원
¹(주)대웅제약 중앙연구소

Acute Toxicity of Recombinant Human Epidermal Growth Factor, DWP-401 in Mice

Hyo Jung KIM*, Kyung Won SEO, Mi Hyune OH, You Sin SUNWOO,
Young Hyo YU¹ and Byung Woo MOON

National Institute of Safety Research, 5 Nokbundong, Eunpyunggu, Seoul 122-020, Korea
and ¹Research & Development Center, Daewoong Pharm. Co., 223-23 Sangdaewondong,
Joongwongu, Sungnam 462-120, Korea

(Received January 25, 1994; accepted March 19, 1994)

Abstract—The acute toxicity of recombinant human epidermal growth factor, DWP-401 was evaluated in ICR mice of both sexes. Six groups of mice were administered orally or subcutaneously with 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1 and 2 mg/kg of DWP-401. Abnormal clinical signs related to the compound were not observed, and no deaths occurred. Gross findings of necropsy revealed no evidence of specific toxicity related to DWP-401. LD₅₀ values for both male and female mice were evaluated to be over 2 mg/kg, which is approximately 2,000 fold of presumed clinical dose.

Keywords □ DWP-401, recombinant human epidermal growth factor, acute toxicity.

Epidermal growth factor(EGF)의 존재는 30여년 전 nerve growth factor에 대한 연구과정 중 우연히 밝혀졌다. Cohen(1959; 1962)은 마우스의 submaxillary gland 추출물을 신생자에게 투여했을 때, 내피성장과 케라틴화를 직접적으로 촉진시켜서 개안(eye opening) 및 치아봉출(teeth eruption)이 조기에 일어남을 보고했다. 그 후 Cohen(1962)은 내피성장과 케라틴화를 촉진하는 성분을 분리하였고, Taylor 등(1972)은 EGF가 53개의 아미노산잔기를 가진 single polypeptide임을 밝혔다. Mouse EGF(mEGF)의 1차 구조와 생리작용에 필수적인 역할을 하는 3개의 intramolecular disulfide bond의 위치가 밝혀졌으며(Taylor 등, 1972; Savage 등, 1972; Savage 등, 1973), 이를 Fig. 1에 나타내었다. 사람에도 역시 EGF가 존재하는데, Gregory(1975)는 임신부의 뇨 중에서 추출된 gastric antisecretory hormone, urogastrone이

human EGF(hEGF)와 동일한 것임을 증명하였고, 그 구조를 규명하였다. 현재까지 발표된 EGF의 다양한 생리작용들을 살펴보면, EGF가 체내에서 각막 등을 치유하는 작용 뿐만 아니라 조직의 복구와 유지 등 생리과정에 중요한 역할을 하는 분열유발물질임이 밝혀졌다. hEGF의 체내합성부위는 분명하게 밝혀져 있지 않으나 주로 Brunner's gland와 submaxillary gland일 것으로 추정되고 있으며, 사람의 체액 중에 널리 분포되어 있는데 특히 뇨, 초유, 모유, 정액 등에 주로 존재한다. EGF는 여러 가지 중요한 생리적 작용을 하지만 생체 내에는 미량으로 존재하기 때문에, 1983년 이후 hEGF 유전자를 화학합성하여 미생물에서 발현시켜 왔다. 또한 천연 hEGF와 유전자 재조합기법으로 합성된 EGF가 물리화학적·생물학적으로 동등함이 증명되었다.

본 실험에서는 유전자 재조합 기법으로 제조된 EGF인 DWP-401(대웅제약)에 대한 마우스에서의 급성경구독성과 급성피하독성을 평가하고자 하였다. 시험물질을 마

* To whom correspondence should be addressed.

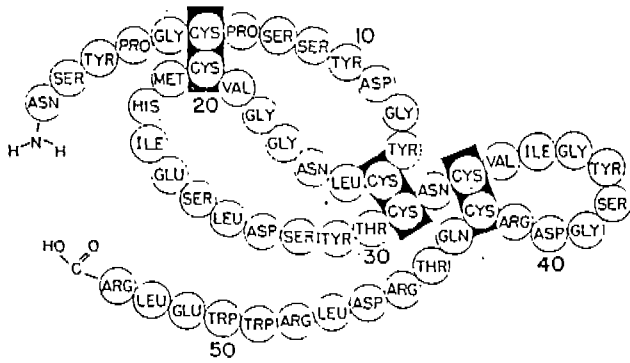


Fig. 1. The amino acid sequence of EGF with placement of disulfide bonds.

우스에 1회 투여한 후 급성경구 독성시험에서는 14일간, 급성피하 독성시험에서는 7일간 대조군 및 시험물질 투여군의 모든 동물에 대하여 임상증상을 관찰하고 체중을 측정하였다. 시험종료 후에는 생존한 모든 동물을 부검하여 육안적 병소를 관찰하고, LD₅₀치를 구하여 시험물질에 대한 급성독성을 평가하고자 하였다.

실험방법

실험동물 및 사육조건

국립보건안전연구원 동물실험실에서 모든 실험을 실시하였으며, 청정구역에서 생산된 SPF계 ICR마우스(특정병원체 부재)를 온도 23 ± 1°C, 습도 55 ± 5%, 배기 10~18회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 300~500 Lux의 사육환경에서 플라카보네이트 사육 상자(175W×240L×145H mm)에 5마리씩 넣어 사육하였다. 1주일간의 적응기간을 두었으며, 사료는 신촌사료주식회사의 실험동물

사료를, 음수는 멸균수돗물을 실험동물에 자유롭게 섭취시켰다.

시험물질의 조제 및 투여

시험물질은 (주)대웅제약에서 수령한 DWP-401을 사용하였으며 본 물질은 무정형의 동결건조한 흰색의 분말로서 -20°C 이하에서 냉동보관하였다.

시험물질의 조제는 투여 당일 DWP-401 2.77 mg이 충전되어 있는 vial에 생리식염수를 가한 후 가볍게 흔들여 용해하였다. 피하 투여시에는 시험물질을 주사기를 이용하여 1회 투여 하였고, 경구 투여시에는, 실험동물을 12시간 절식시킨 후 시험물질을 마우스용 존데(sonde)를 이용하여 투여하였다. 투여량은 투여 직전의 체중에 따라 산출하였다. 경구 및 피하 투여시 각 용량군당 암·수 각각 5마리가 사용되었으며, 투여액량은 10 ml/kg였다.

투여량의 결정 및 군구성

평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용하여 군분리를 실시하였다. 동물의 개체 식별은 피모색소 표시법 및 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다. 실험동물의 연령은 약 6주령이었으며, 실험동물의 체중은 시험물질을 투여하기 직전에 측정하였으며, 수컷은 25.4~33.5 g, 암컷은 21.8~26.5 g 이었다.

투여 용량은, 본 시험물질이 내인성의 유전자 재조합 의약품이므로 최고용량군을 추정임상적용량의 2,000배인 2.0 mg/kg로 하고, 공비를 0.5로 하여 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 mg/kg로 정하였으며, 대조군에는 생리식염수를 투여하였다.

관찰 및 검사항목

모든 실험동물에 대하여 투여당일은 투여 후 6시간 동안 매 시간마다, 경구독성의 경우는 투여익일부터 14일까지, 피하독성의 경우는 투여익일부터 7일까지 1일 1회씩 동물의 일반증상, 중독증상 및 사망발현 유무를

Table 1. Mortality and LD₅₀ values in mice administered orally or subcutaneously with DWP-401^a

Sex	Dose (mg/kg)	Oral administration									Subcutaneous administration								
		0	1	2	...	12	13	14	Mortality	LD ₅₀ (mg/kg)	0	1	2	...	6	7	Mortality	LD ₅₀ (mg/kg)	
		days after administration									days after administration								
Male	0	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	0.125	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	0.25	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	>2.0	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	>2.0
	0.50	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5
	1.0	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5
	2.0	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5
Female	0	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	0.125	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	0.25	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	>2.0	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	>2.0
	0.50	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5
	1.0	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5
	2.0	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5

^aValues are expressed as dead number/total number of animals.

관찰하였다. 실험동물의 체중은, 경구독성의 경우 투여 당일, 투여 후 1일, 4일, 7일, 11일 및 14일째에, 피하독성의 경우 투여당일, 투여 후 1일, 3일, 7일째에 측정하였다. 시험 종료 후 모든 동물을 부검하여 외관 및 내부장기의 이상유무를 육안적으로 상세히 관찰하였다.

통계학적 분석

본 시험에서 얻어진 자료에 대한 통계학적인 분석은 Bartlett's test로 분산 검정을 실시하여 등분산일 경우 one way analysis of variance(ANOVA) 검정, 부등분산일 경우 Kruskal-Wallis법으로 유의성 검정을 하였다. One way analysis of variance(ANOVA) 검정에서 유의한 경우에는 Scheffe법으로, Kruskal-Wallis법에서 유의성이 인정될 경우는 Distribution-free multiple comparison법에 의해 대조군과 각 투여군간에 다중비교를 실시하였다. LD₅₀치와 그 95% 신뢰 한계는 Pharmacologic Calcula-

tion System(Ver.4.1: Springer-Verlag, NY, 1986)을 이용하여 Litchfield-Wilcoxon법에 의하여 산출하였다.

실험결과

LD₅₀치와 임상증상

추정임상적용량의 2,000배인 2.0 mg/kg의 최고용량군을 포함한 모든 투여군에서 시험물질로 인한 사망예가 관찰되지 않았으며(Table I) 경구투여 후 14일간, 피하투여 후 7일간의 임상증상 관찰결과에서도 비정상적인 임상증상이 관찰되지 않았다(Table II). 따라서 본 시험물질의 경구와 피하투여에 의한 LD₅₀치는 암·수 공히 2.0 mg/kg 이상으로 나타났다.

체중변화

경구독성의 경우는 투여당일, 투여 후 1일, 4일, 7일,

Table II. Clinical signs in mice administered orally or subcutaneously with DWP-401

Sex	Dose (mg/kg)	Clinical sign	Administration																								
			Oral administration														Subcutaneous administration										
			hours						days								hours							days			
1	2	3	4	5	6	1	2	3	...	12	13	14	1	2	3	4	5	6	1	2	3	...	6	7			
Male	0	NAD ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	0.125	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	0.25	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	0.5	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1.0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2.0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Female	0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	0.125	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	0.25	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	0.5	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1.0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2.0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

^aNAD, -: no abnormality detected.

Table III. Changes of body weight in mice administered orally with DWP-401^a

Sex	Dose (mg/kg)	Days after administration						
		0	1	4	7	11	14	
Male	0	28.4±1.2	32.4±1.7	33.7±0.7	35.3±1.3	37.2±1.5	37.7±1.3	
	0.125	27.4±1.3	32.3±1.4	34.1±1.2	34.6±1.8	35.5±1.7	36.2±1.5	
	0.25	28.3±2.0	33.0±2.3	34.7±3.3	35.2±2.7	36.3±2.6	37.6±2.5	
	0.5	28.6±2.9	33.0±2.6	35.2±2.6	35.9±2.5	36.6±2.9	37.5±2.5	
	1.0	27.8±1.6	33.1±1.7	34.4±2.3	34.9±2.1	36.0±1.5	37.2±2.1	
	2.0	28.0±1.2	32.2±1.2	33.5±0.5	34.2±0.8	35.8±0.3	36.2±0.6	
Female	0	24.1±1.5	25.7±2.0	25.4±2.0	26.0±1.5	27.5±1.6	27.9±2.7	
	0.125	23.8±1.2	24.5±1.1	24.9±1.4	25.5±0.8	26.0±1.0	26.8±1.2	
	0.25	25.0±0.9	25.3±1.6	25.7±0.8	26.5±1.2	26.9±1.1	26.7±1.1	
	0.5	24.4±1.4	25.7±2.2	25.4±0.9	26.4±1.0	27.6±2.2	28.1±1.5	
	1.0	24.4±0.5	24.8±0.6	25.3±0.8	25.4±1.7	26.2±1.0	27.5±1.9	
	2.0	23.8±0.8	25.2±1.3	25.2±1.2	25.2±1.1	25.7±1.1	26.3±1.3	

^aValues represent means±S.D. for 5 mice.

Table IV. Changes of body weight in mice administered subcutaneously with DWP-401^a

Sex	Dose (mg/kg)	Days after administration			
		0	1	3	7
Male	0	34.0±1.8	34.1±1.7	34.5±2.4	33.3±1.6
	0.125	32.0±1.3	32.7±1.7	33.6±1.7	32.3±1.6
	0.25	32.1±0.7	32.2±1.0	32.8±0.8	32.4±1.0
	0.5	32.9±0.5	33.3±1.7	33.7±0.9	34.2±1.1
	1.0	32.2±1.5	32.2±1.7	32.8±2.2	32.1±2.8
	2.0	32.0±1.1	32.5±0.9	33.1±1.1	33.4±2.1
Female	0	24.4±0.4	25.0±0.5	25.1±0.6	24.7±0.2
	0.125	25.9±0.7	25.5±0.7	26.1±0.8	25.4±0.9
	0.25	24.8±1.1	24.5±1.0	24.9±1.6	24.1±1.0
	0.5	24.5±0.7	24.9±1.0	24.6±1.9	24.2±1.0
	1.0	24.6±0.9	25.1±0.7	25.9±0.6	25.0±0.9
	2.0	24.8±1.3	24.6±1.1	25.3±0.4	24.6±0.8

^aValues represent means±S.D. for 5 mice.

11일 및 14일째에, 피하독성의 경우는 투여당일, 투여 후 1일, 3일, 7일째에 체중을 측정하여, 시험물질 투여군과 대조군 사이에 유의성 있는 체중변화가 관찰되지 않았다(Table III, IV).

육안적 해부소견

생존동물 모두를 ether로 마취하여 외관 및 내부장기의 이상유무를 육안적으로 상세히 관찰한 결과, 약물에 기인한 내부장기의 이상소견은 관찰되지 않았다(Table V).

고 찰

1953년 Watson과 Crick이 핵산의 이중나선구조를 발표한 이후 꾸준히 발전해 온 생명과학은 인류에게 많은 혜택을 전해주었다. 특히 각종 질병의 예방, 진단 및

치료를 위한 의약품의 개발에 공헌하여, 현재까지 많은 생물공학 제품이 인류의 건강을 위해 사용되고 있다. 시험물질인 EGF, DWP-401 역시 유전자 재조합 기법으로 제조되었으며, 다양한 상피세포의 강력한 세포성장 촉진 작용이 있는 것으로 알려졌다. 1962년 Stanley Cohen에 의해 mouse submaxillary gland로부터 mouse epidermal growth factor(mEGF)가 최초로 발견된 이후 (Cohen, 1962), EGF의 다양한 생리작용이 발표되었다. EGF는 *in vivo*에서 각막상피세포의 증식과 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있다(Savage and Cohen, 1973; Frati 등, 1972; Ho 등, 1974). 또한 *In vitro* 실험에서 단백질합성과 RNA합성을 강화시키고(Hooper and Cohen, 1967a; 1967b; Cohen and Stastny, 1968), glycolysis의 촉진(Diamond 등, 1978) 및 hyaluronic acid 등의 macromolecular synthesis를 증가시킨다(Lembach, 1976). 1975년에는 사람의 노에서 human epidermal growth factor(hEGF)가 밝혀졌다(Cohen and Carpenter, 1975; Starkey 등, 1975). Gregory(1975)는 위산분비를 억제하는 urogastrone이 hEGF와 생리·화학적으로 동일한 것을 증명하였으며, mEGF와 마찬가지로 hEGF도 세포 증식을 촉진하고(Carpenter, 1978), gastric acid의 분비를 억제함이 알려졌다(Gregory, 1975).

생물공학적으로 제조된 DWP-401의 급성경구독성시험 및 급성피하독성시험을 마우스에 대해 실시한 결과, LD₅₀ 치가 암·수 모두 추정 임상적용량의 2,000배인 2.0 mg/kg 이상으로 평가되었다. 또한 전 시험기간 동안 대조군과 투여군 암·수 모두에서 사망한 동물이 없었고, 비정상적인 임상증상도 관찰되지 않았다. 모든 약물 투여군에서 대조군과 비교하여 유의성 있는 체중 변화가 나타나지 않았다. 시험종료 후 전 실험 동물을 부검한 결과, 각 장기에서 약물에 기인한 육안적 이상 소견은 나타나지 않았다.

Table V. Gross findings of necropsy in mice administered orally or subcutaneously with DWP-401^a

Sex	Dose (mg/kg)	Oral administration		Subcutaneous administration	
		Observation	Frequency	Observation	Frequency
Male	0	N.G.L. ^b	5/5	N.G.L.	5/5
	0.125	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	0.25	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	0.5	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	1.0	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	2.0	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
Female	0	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	0.125	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	0.25	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	0.5	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	1.0	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	2.0	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5

^aValues are expressed as animal numbers.

^bN.G.L.: No Gross Lesion.

이상의 결과로부터 본 시험 조건에서 상피조직의 강력한 내인성 세포성장촉진자인 DWP-401을 마우스에 1회 경구 또는 피하투여하여 급성독성시험을 실시한 결과, LD₅₀치는 암·수 모두 추정 임상적용량의 2,000배인 2.0 mg/kg 이상으로 판단되었다.

참고문헌

- Cohen, S. (1959). Purification and metabolic effects of a nerve growth-promoting protein from snake venom. *J. Biol. Chem.* **234**, 1129-1137.
- Cohen, S. (1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.* **237**, 1555-1562.
- Cohen, S. and Carpenter, G. (1975). Human epidermal growth factor: Isolation and chemical and biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**, 1317-1321.
- Cohen, S. and Stastny, M. (1968). Epidermal growth factor. III. The stimulation of polysome formation in chick embryo epidermis. *Biochim. Biophys. Acta* **166**, 427-437.
- Carpenter, G. (1978). The regulation of cell proliferation: advances in the biology and mechanism of action of epidermal growth factor. *J. Invest. Dermatol.* **71**, 283-287.
- Diamond, I., Legg, A., Schneider, J.A. and Rozengurt, E. (1978). Glycolysis in quiescent cultures of 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **253**, 866-871.
- Fрати, L., Daniele, S., Delogu, A. and Covelli, I. (1972). Selective binding of the epidermal growth factor and its specific effects on the epithelial cells of the cornea. *Exp. Eye Res.* **14**, 135-141.
- Gregory, H. (1975). Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature* **257**, 325-327.
- Hoover, J.K. and Cohen, S. (1967). Epidermal growth factor. I. The stimulation of protein and ribonucleic acid synthesis in chick embryo epidermis. *Biochim. Biophys. Acta* **138**, 347-356.
- Hoover, J.K. and Cohen, S. (1967). Epidermal growth factor. II. Increased activity of ribosomes from chick embryo epidermis for cell-free protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **138**, 357-368.
- Ho, P.C., Davis, W.H., Elliott, J.H. and Cohen, S. (1974). Kinetics of corneal epithelial regeneration and epidermal growth factor. *Invest. Ophthalmol.* **13**, 804-809.
- Lembach, K.J. (1976). Enhanced synthesis and extracellular accumulation of hyaluronic acid during stimulation of quiescent human fibroblasts by mouse epidermal growth factor. *J. Cell. Physiol.* **89**, 277-288.
- Savage, C.R., Jr. and Cohen, S. (1973). Proliferation of corneal epithelium induced by epidermal growth factor. *Exp. Eye Res.* **15**, 361-366.
- Savage, C.R., Jr., Inagami, T. and Cohen, S. (1972). The primary structure of epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **247**, 7612-7621.
- Savage, C.R., Jr., Hash, J.H. and Cohen, S. (1973). Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **248**, 7669-7672.
- Starkey, R.H., Cohen, S. and Orth, D.N. (1975). Epidermal growth factor: Identification of a new hormone in human urine. *Science* **189**, 800-802.
- Taylor, J.M., Mitchell, W.M. and Cohen, S. (1972). Epidermal growth factor: Physical and chemical properties. *J. Biol. Chem.* **247**, 5928-5934.