

## 기니픽에서 재조합 Erythropoietin의 항원성시험

백남진 · 김달현 · 임동문 · 김영훈 · 이동억 · 김현수 · 박관하\*

제일제당 종합연구소

### Antigenicity of Recombinant Human Erythropoietin in Guinea Pigs

Nam Jin Baek, Dal Hyun Kim, Dong Moon Lim, Young Hoon Kim,  
Dong Eok Lee, Hyun Su Kim and Kwan Ha Park\*

R & D Center, Cheil Foods and Chemicals Inc.,  
522-1 Dokpyong-ri, Majang-myon, Ichon-kun, Kyonggi-do 467-810

(Received March 15, 1995)

(Accepted April 2, 1995)

**ABSTRACT :** Antigenic potential of genetically-engineered human erythropoietin (EPO) was assessed in guinea pigs (active systemic anaphylaxis [ASA] ; passive cutaneous anaphylaxis [PCA]) and in vitro (hemagglutination test [PHA]). In ASA, EPO at 70~700 U/kg elicited a weak anaphylactic response whereas the positive control ovalbumin (OVA) did cause intensive responses leading to death in 40% animals. However, the extract of CHO cells, to which EPO gene was introduced, did not cause any symptom. In PCA and PHA tests, neither EPO nor CHO cell extract induced positive responses. OVA, in contrast, produced high titers in both PCA and PHA tests. It was concluded that, in light of the fact that EPO was slightly antigenic only in ASA but not in PCA or PHA and also that human EPO is a foreign protein to guinea pigs, the present EPO may not be antigenic in humans.

**Key Words :** Erythropoietin, Antigenicity test, ASA, PCA, PHA, Guinea pigs.

## I. 서 론

Erythropoietin(EPO)은 적혈구 전구세포의 분열과 분화를 촉진하는 당단백 호르몬으로서, 태아때에는 간에서 생성되지만 출생 6주후부터는 신장에서 만들어지기 시작한다(Fisher, 1993). 사람 EPO 유전자는 1980년대 중반에 클로닝되어 유전자서열이 밝혀졌다(Jacobs *et al.*, 1985; Lin *et al.*, 1985). 이에 따라 재조합 사람 EPO의 대량생산이 가능해져서, 임상에서 신성 빈혈, 만성 빈혈, 조산에 의한 빈혈 등 여러 형태의 빈혈환자 치료에 사용되고 있다. 최근 제일제당(주)에서는 유전자 재조합 기술을 이용하여 재조합 사람 EPO를 Chinese Hamster Ovary(CHO) cell에서 생산하는 데 성공하였다. 본 논문에서는 당사가 개발한 재조합 사람 EPO에 대한 비임상시험중 항원성시험 결과를 발표하는 바이다. Guinea pig에서의 항원성시험은 국립보건안전연구원에서 고시한 "의약품등의 독성시험기준" (1994)에 따라 실

\*To whom correspondence should be addressed.

시하였다.

## II. 실험방법

### 1. 시험물질

시험 물질은 제일제당에서 개발한 EPO (Lot No. EP 940922, 13,020 U/ml, specific activity  $2.36 \times 10^5$  U/mg)을 멸균생리식염수에 희석하여 사용하였다. 양성대조물질로서는 ovalbumin(OVA, Sigma Lot# 19F-8105)을 멸균생리식염수에 녹여서 사용하였다. Fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL Lot# 31P2138)은 56°C에서 30분동안 불활성화시켜 사용하였다. CHO cell extract는 다음과 같이 준비하였다. EPO를 발현하지 않는 CHO cell을 배양한 후, 배양액을 버리고 적당량의 PBS를 가하여 scrappcr로 회수하였다. Homogenization에 의해 cell을 분쇄하고 원심분리(9,000×g, 10 min)하여 상침액을 얻었다. Bradford법(Bio-Rad)에 의해 단백질 농도를 결정한 후,

평균생리식염수에 희석하여 사용하였다.

## 2. 면역보조제

Freund's complete adjuvant(FCA) 혹은 Freund's incomplete adjuvant를 시험물질 또는 양성대조물질과 혼합(1:1, v/v)하여 사용하였다.

## 3. 실험동물 및 사육조건

200-300 g의 Hartley계 웅성 guinea pigs(삼육실험동물)를 사용하였다. 실험동물은 1주일 이상의 예비순화기간을 거친 후 시험에 사용하였으며, 사료 및 물은 자유로이 섭취하도록 하였다.

## 4. 감작 및 혈청 채취

감작량 및 감작횟수, 감작경로는 Table 1과 같다. EPO 및 ovalbumin은 모두 평균생리식염수에 희석 혹은 용해하여 사용하였다. 단독투여군에는 1주일에 3회, 총 7회 피하 주사하였다. 면역보조제 혼합투여군의 경우 1회 감작시에는 Freund's complete adjuvant(FCA)와 시험물질의 1:1(v/v)혼합액을, 그리고 2,3회째에는 Freund's incomplete adjuvant와의 1:1(v/v)혼합액을 1주일에 1회씩 총 3회 피하 주사하였다. 최종 감작 13일 후, 감작된 guinea pig의 심장채혈에 의해 1 ml씩의 혈액을 채취하여, 각 개체별로 혈청을 분리하였다. 항혈청은 -20°C에 보존하였다가 homologous PCA(passive cutaneous anaphylaxis) 및 passive hemagglutination test(PHA) 반응에 사용하였다.

## 5. Active systemic anaphylaxis (ASA) test in guinea pigs

혈액채취 2일 후, 야기항원(EPO 700 U/kg, CHO cell

extract 0.8 mg/kg 혹은 OVA 2.5 mg/kg)을 귀 정맥내로 투여하였다. 30분동안 전신의 증상을 관찰하여 다음의 기준에 따라 아나필락시스 증상을 판정하였다:

-(Asymptomatic)

±(Mild): 불안, 기모, 진전, 코를 문지르거나 핏몸

+(Moderate): 재채기, 기침, 호흡촉진, 배뇨, 배변, 유루

++(Severe): 호흡곤란, 짹짹거리는 소리, 청색증, 보행불안, 도약, 혈떡거리고 몸부림침, 경련, 황와, Cheyne-Stokes 호흡

+++ (Death)

## 6. Homologous PCA (passive cutaneous anaphylaxis) test in guinea pigs

EPO 및 음성대조물질 감작에 의해 얻은 항혈청은 PBS(phosphate buffered saline)로 2배씩 8단계(4배-512배) 희석하였으며, OVA 감작에 의해 얻은 항혈청은 16배에서 2048배까지 연속배수 희석하였다. 항혈청 100 µl씩을 guinea pigs등에 피내주사한 지 4시간 후에, 1% Evans Blue에 존재하는 야기항원 (EPO 700 U/kg, CHO cell extract 0.8 mg/kg, fetal bovine serum [FBS] 4 ml/kg 혹은 OVA 2.5 mg/kg)을 정맥내 주사하였다. 30분 후에 ether 마취에 의해 도살하여 항혈청 주사부위에 나타나는 청색반점을 피부 내면에서 관찰하였다. 청색반점의 직경이 5 mm 이상인 것을 양성으로 하고, 양성을 나타내는 항혈청의 최대 희석배율을 그 항혈청의 항체가로 결정하였다.

## 7. Passive hemagglutination (PHA) test

면양 적혈구(한국 Media) 8 ml을 원심분리(740×g, 10 min)하여 상장액을 버리고 생리식염수로 부유액을 만들었다. 원심분리에 의한 세척과정을 3회 반복하였다. 마지막 원심분리시 침전된 적혈구 1 ml과 항원(EPO 0.5 mg, cell extract 0.5 mg(as protein), FBS 50 µl 혹은 OVA 0.5 mg)이 포함된 1 ml, 0.0067% 염화크롬(saline에 용해) 10

**Table 1.** Sensitization schedule of guinea pigs

Group	Substance	Dose	No. of shots	No. of animal	Route
A1	EPO	70 U/kg	7 <sup>1</sup>	5	sc
A2	EPO	700 U/kg	7 <sup>1</sup>	5	sc
A3	EPO + FCA	700 U/kg	3 <sup>2</sup>	5	sc
A4	EPO + FCA	700 U/kg	3 <sup>2</sup>	5	sc
A5	OVA + FCA	2.5 mg/kg	3 <sup>2</sup>	5	sc
A6	Saline	1 ml/kg	7 <sup>1</sup>	5	sc
A7	Saline	1 ml/kg	7 <sup>1</sup>	5	sc

<sup>1</sup> 3 times per week; <sup>2</sup> once per week.

ml을 섞어서 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 원심분리 (740×g, 10 min)하여 상침액을 제거하고 생리식염수에 부유시키는 세척과정을 3회 반복한 뒤, 최종적으로 0.5% (v/v)가 되도록 PBS(pH 7.4)에 부유시켰다. EPO 및 음성 대조물질 감작에 의해 얻은 항혈청은 PBS로 4배부터 8192배까지 12단계 연속배수희석하였으며, OVA 감작에 의해 얻은 항혈청은 24단계 연속배수희석하였다. 항원처리한 0.5% 적혈구 부유액 50 µl에 항혈청희석액 50 µl씩을 혼합하여 상온에 12시간 이상 방치한 후에, 적혈구의 응집유무를 육안으로 관찰하였다. 응집이 관찰된 항혈청의 최고희석배율을 그 항혈청의 응집가로 결정하였다.

### III. 실험결과

#### 1. Active systemic anaphylaxis (ASA) test in guinea pigs

시험 결과는 Table 2와 같다. EPO로 감작한 모든 군에서 EPO에 의한 anaphylaxis 증상이 일부 개체에서 관찰되었다. 그러나, EPO 감작군에서 CHO cell extract에 의한 anaphylaxis 증상은 관찰되지 않았다. 양성대조물질인 ovalbumin으로 감작 및 야기하였을 때에는 모든 동물에

서 심한 아나필락시스 반응이 관찰되었고, 2/5는 사망하였다.

#### 2. Homologous Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test in guinea pigs

Guinea pig에서의 수동피부 아나필락시스반응 시험결과는 Table 3과 같다. EPO 70 U/kg으로 감작한 군에서는 EPO 야기에 의한 PCA 반응이 관찰되지 않았으며, EPO 700 U/kg을 단독감작 혹은 면역보조제와 함께 투여한 군에서도 EPO, CHO cell extract 또는 FBS(fetal bovine serum) 야기에 의한 PCA 반응은 관찰되지 않았다. 양성대조물질인 ovalbumin으로 감작 및 야기한 군에서는 1024 이상의 PCA 항체가를 보였다.

#### 3. Passive hemagglutination (PHA) test

Guinea pig 항혈청에 대한 간접적혈구응집반응시험 (PHA)의 결과는 Table 4에 나타내었다. EPO를 단독감작한 군의 혈청은 EPO-coated RBC의 응집반응을 일으키지 않았으며, 면역보조제와 함께 투여한 군에서도 EPO, CHO cell extract, FBS 등으로 coating된 적혈구의 응집

**Table 2.** Results of active systemic anaphylaxis (ASA) test in guinea pigs

Sensitizing antigen	Challenging antigen	Symptoms of Anaphylaxis					Positive ratio
		-	±	+	++	+++	
EPO 70 U/kg	EPO 700 U/kg	2	1	1	1		2/5
EPO 700 U/kg	EPO 700 U/kg	2	2	1			1/5
EPO + FCA 700 U/kg	EPO 700 U/kg	1		3	1		4/5
EPO + FCA 700 U/kg	cell extract 0.8 mg/kg	5					0/5
OVA + FCA 2.5 mg/kg	OVA 2.5 mg/kg				3	2	5/5
Saline 1 ml/kg	EPO 700 U/kg	5					0/5
Saline 1 ml/kg	cell extract 0.8 mg/kg	5					0/5

<sup>1</sup> from EPO-nonproducing CHO cells, as protein content

**Table 3.** Results of PCA titer in 4-hr homologous passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test

Sensitizing antigen	Challenging antigen <sup>1</sup>	Challenging antigen <sup>1</sup>			
		EPO	cell extract	FBS	OVA
EPO 70 U/kg	< 4 (0/5) <sup>2</sup>	-	-	-	-
EPO 700 U/kg	< 4 (0/5)	< 4 (0/5)	< 4 (0/5)	< 4 (0/5)	-
EPO + FCA 700 U/kg	< 4 (0/5)	< 4 (0/5)	< 4 (0/5)	< 4 (0/5)	-
OVA + FAC 2.5 mg/kg	-	-	-	-	1024 ~ > 2048 (5/5)
Saline 1 ml/kg	< 4 (0/5)	< 4 (0/5)	< 4 (0/5)	< 4 (0/5)	-

<sup>1</sup> Challenging dose : EPO, 700 U/kg; CHO cell extract, 0.8 mg/kg (as protein content); FBS, 4 ml/kg; OVA, 2.5 mg/kg

<sup>2</sup> PCA titer (positive ratio)

**Table 4.** Results PHA titer in passive hemagglutination (PHA) test

Sensitizing antigen		Absorbed antigen <sup>1</sup>			
		EPO	cell extract	FBS	ova
EPO	70 U/kg	<4 (0/5) <sup>2</sup>	-	-	-
EPO	700 U/kg	<4 (0/5)	-	-	-
EPO + FCA	700 U/kg	<4 (0/5)	<4 (0/5)	<4 (0/5)	-
OVA + FCA	2.5 mg/kg	-	-	-	16384 ~ 65536 (5/5)
Saline	1 ml/kg	<4 (0/5)	<4 (0/5)	<4 (0/5)	-

<sup>1</sup> EPO 0.5 mg; CHO cell extract 0.5 mg (as protein content); FBS 50 µl; OVA 0.5 mg

<sup>2</sup> PHA titer (positive ratio)

반응을 유도하지 않았다. 한편 양성대조군인 OVA 투여군의 혈청은 16384배 이상의 응집가를 보였다.

#### IV. 고 찰

EPO는 ASA 반응에서는 양성을 보였으나, PCA 및 PHA 반응에서는 EPO에 대한 특이적인 항체의 생성이 확인되지 않았다. 따라서 시험한 EPO는 이 보고서에서 사용한 동물시험계에서 약한 항원성이 있음을 시사하고 있다. EPO가 본래 사람에서 유래하는 물질로서 실험동물에서는 이종단백으로 간주되므로 양성의 항원성결과를 보이는 것은 당연하다고 생각이 되며, 본 시험의 3 항목중 1 항목에서만 양성반응이 나타난 것은 감작 및 야기 용량(임상용량의 1배 혹은 10배)의 차이에 기인한 것으로 생각된다. 이는 기존의 EPO에 대한 항원성시험 결과(McKenzie *et al.*, 1987), guinea pig에서의 ASA 및 PCA 양 시험계에서 양성으로 판정되었으며 PHA에서도 임상용량의 200배 감작군에서 EPO 특이적인 항체를 생산하였다는 사실과의 상이점을 설명해준다. 한편, EPO 감작군을 CHO cell extract로 야기한 경우 ASA, PCA 모두에서 음성의 결과가 얻어졌으며 PHA에서도 CHO cell extract 특이적 항체의 생성이 확인되지 않은 것은 시험물질로 사용된 EPO에 CHO cell extract 성분이 혼입되어 있지 않음을 시사한다. 마찬가지로 EPO 감작군을 CHO cell 배양시 첨가하는 FBS(fetal bovine serum)로 야기한 경우에도 PCA에서 음성의 결과가 얻어졌으며, PHA에서도 FBS 특이적인 항체의 생성은 확인되지 않았다. 이는 EPO에 FBS 성분이 혼입되어 있지 않음을 밝혀준다. 결론적으로, 3종의 시험계중 ASA에서 나타난 약

한 양성반응은 EPO 특이적인 항원성인 것을 알 수 있으며, 불순물의 혼입과는 관련이 없음을 확인할 수 있었다. 또한 이때의 약한 반응성은 인간 유래의 단백질을 guinea pig에서 시험하였기 때문에 나타날 수 있는 결과이므로, CHO cell에서 생산하여 정제한 EPO는 인체에 투여시에도 특이한 아나필락시스 반응을 유발하지 않을 것임이 예상된다.

#### 참고문헌

- 국립보건안전연구원 (1994): 의약품등의 독성시험 기준(국립보건안전연구원 고시 제 94-3호).
- Fisher, J.W. (1993): Recent advances in erythropoietin research, *Prog. Drug Res.*, **41**, 293-311.
- Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S.D., Kaufman, R.J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S.S., Hewick, R., Fritsch, 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.
- Lin, F.K., Suggs, S., Lin, C.H., Browne, J.K., Smalling, R., Egrie, J.C., Chen 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.
- McKenzie, B.E., Powers, W.J. and Davis, G.J. (1987): Antigenicity study of KRN 5702 (ORF 22512) in Recombinant human erythropoietin injection solution, pharmaceutical product information, (Cilag AG, Schaffhausen, Switzerland), Part III, pp 22-23.