

Recombinant Human Erythropoietin(DA-3285)의 효력 및 일반약리작용

김동환 · 안병옥 · 손문호 · 신명수 · 이성희 · 김원배 * · 양중의
동아제약주식회사 연구소

Efficacy and General Pharmacology of Recombinant Human Erythropoietin(DA-3285)

Dong Hwan KIM, Byoung Ok AHN, Moon Ho SON, Myeong Soo SHIN,
Sung Hee LEE, Won Bae KIM* and Junnick YANG

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

(Received February 26, 1996; accepted March 6, 1996)

Abstract – Efficacy and general pharmacology of recombinant human erythropoietin (rHu-EPO), were investigated. Efficacy studies were conducted in normal, cisplatin- and acute hemorrhage-induced anemic rats. Normal and anemic animals were treated intravenously with rHu-EPO for 5 days and the changes in the numbers of red blood cells (RBC), hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct) and reticulocytes (Ret) were examined. In normal rats, rHu-EPO significantly increased RBC, Hb, Hct and Ret at doses of 50~1250 IU/kg/day. Cisplatin-induced anemic rats showed significant increase of RBC, Hb, Hct and Ret in a dose-dependent manner after administration of rHu-EPO (50~200 IU/kg/day). And in acute hemorrhage-induced anemic rats, rHu-EPO(4~100 IU/kg/day) accelerated recovery of anemia with significant increase in Ret. These changes disappeared gradually after cessation of the treatment. The general pharmacological effects of rHu-EPO were investigated in mice, rats, guinea-pigs, rabbits and cats. rHu-EPO had no influences on central nervous, cardiovascular, gastrointestinal and blood coagulation system. It also had no influence on the contraction of phrenic nerve-diaphragm preparation. rHu-EPO produced significant increase of urine volume at a dose of 7000 IU/kg. These results suggest that rHu-EPO might be useful for the therapy of anemia without serious side effect.

Keywords □ rHu-EPO, efficacy, erythropoiesis, acute hemorrhagic, cisplatin, general pharmacology

Erythropoietin(EPO)은 분자량 30,400 달톤의 당단백(glycoprotein)으로 적혈구의 산생을 촉진하는 hormone의 일종으로서 태아의 경우 주로 간에서 생성되지만, 성숙동물에서는 80~90% 정도가 신장의 피질과 수질외측의 모세혈관을 둘러싸고 있는 내피세포에서 형성되고 나머지는 간이나 기타 다른 조직에서 형성되며(Koury 등, 1988), 형성된 EPO는 혈류를 따라 이동하여 골수내 erythroid progenitor cell(CFU-E)의 특이수용체와 작용하여 이들의 분화, 증식을 촉진함으로써 적혈구산생을 향진시킨다고 한다(Eschbach와 Adamson, 1989). EPO는 신동맥내의 산소포화도 저하, 신장으로의 산소운반량 저하, 신장이외의 신체다른부위의 빈혈상태 등에 의해서 생성이 촉진되며, norepi-

nephrine, ephinephrine 및 수종의 prostaglandine과 같은 물질에 의해서도 생성이 증가되는 것으로 알려져 있다(Guyton, 1991). 임상적으로는 만성빈혈, 신성빈혈, ESRD (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 뇨에서 정제하여 사용하였기 때문에 원료수급에 문제가 있었고, 뇨중에 존재하는 다량의 불순물 때문에 순수한 형태의 단백질로 정제하는데 어려움이 따랐다(Koeffler와 Goldwasser, 1981). 그러나 근래에 들어서 유전자재조합기술의 발달로 인하여 EPO의 재조합이 가능하게 되었으며 대량생산이 가능하게 되었다.

본 실험에 사용한 재조합 사람 erythropoietin(rHu-EPO)

* To whom correspondence should be addressed.

은 동아제약(주)에서 CHO cell과 무혈청배지를 이용하여 자체 개발한 rHu-EPO(DA-3285)로서, 본 연구에서는 정상 동물, 신장해동물 및 급성실혈동물등의 모델을 이용하여 rHu-EPO의 약효를 평가하고 사람에서 나타날지도 모르는 부작용을 예견하고자 일반약리작용을 검토하였다.

실험방법

시험물질

시험에 사용한 rHu-EPO은 동아제약(주) 연구소 생물공학실에서 CHO cell을 이용하여 생산한 rHu-EPO(DA-3285)로 Lot No.는 ETS-001이며, 순도는 RP-HPLC 분석시 98% 이상이었다. 투여전 시험물질은 -20°C에서 보관하였고 사용직전에 희석용 용매에 희석시켜 사용하였으며 이 희석용매는 대조군에 vehicle로 사용하였다. 희석용 용매의 조성은 중류수 1 ml 당 D-mannitol 30 mg, sodium chloride 2 mg, sodium phosphate(monobasic) 1.5 mg 등을 첨가한 후 sodium hydroxide를 첨가하여 pH 7.0이 되게 하였다. 희석용 용매의 조제를 위한 시약 및 기타 시약은 모두 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

시험동물 및 사육환경

체중 250 g 전후의 웅성 Sprague-Dawley rat과 20~25 g의 웅성 ICR mouse는 일본 Charles River사에서 구입하였고 guinea pig, New Zealand white rabbit과 고양이는 국내 업자로부터 공급받아 순화기간을 거친 후 사용하였다. 순화기간과 실험기간중의 동물 사육환경은 온도 23±2°C, 습도 55±10%, 조명시간 12시간(07 : 00~19 : 00)의 조건을 유지하였으며, 사료와 물은 자유섭취시켰다. 단 일반약리 실험중 장관수송능에 대한 영향 평가시에는 ICR mouse를 24시간 절식 후 실험에 사용하였다.

rHu-EPO의 약효시험

정상랫드에서의 효과

rHu-EPO의 투여는 정상 뱃드에 0, 50, 250, 1250 IU/Kg/day의 용량으로 5일간 정맥투여하였다. 투여전, 투여후 3, 7, 10, 14일째 안와정맥총을 통하여 채혈하고 자동혈구계산기(Minos VetTM, ABX)를 사용하여 적혈구수, hemoglobin농도, hematocrit치 등을 측정하였다. Reticulocyte의 측정은 new methylene blue 염색후 도말표본을 제작한 다음 현미경으로 검정하여 적혈구 1000 개당 reticulocyte수를 계측한 후 백분율로 나타내었다(Brecher 1949).

Cisplatin유발 빈혈랫드에서의 효과

Cisplatin에 의한 빈혈에 미치는 rHu-EPO의 영향은 Matsunaga 등(1991)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 6주령 뱃드에 cisplatin(8 mg/Kg, i.v.)을 단회투여하여 신장해를 유발시킨 후 16 일째부터 신장해 뱃드에 rHu-EPO를 0, 50, 100, 200 IU/Kg/day의 용량으로 5일간 정맥투여하였다.

Cisplatin 투여후 5, 12, 16, 19, 23, 26, 30, 33일째 안와정맥총을 통하여 채혈하였다. 이후의 측정방법은 정상동물에서의 실험과 동일하게 하였다. Cisplatin 투여에 의한 신손상과 골수의 변화양상을 조직학적으로 확인하기 위하여 cisplatin 투여후 33일째 실험동물을 ether마취시켜 부검을 실시한 후, 신장과 흉골을 적출하여 통상적 조직처리과정을 거쳐 H-E염색후 검경하였다.

실험랜드에서의 효과

rHu-EPO 투여전처치료 뱃드 체중의 1.5%에 해당하는 혈액을 심장채혈법으로 채혈하여 실혈동물 model을 만든 후 rHu-EPO를 0, 4, 20, 100 IU/Kg/day의 용량으로 5일간 정맥 투여하고 안와정맥을 통하여 투여전, 투여후 3, 7, 10, 14일째 채혈하였다. Reticulocyte의 측정은 정상동물에서의 실험과 동일하게 하였다.

일반약리작용

용량설정

실험동물에 정맥내 투여시에는 예상 임상용량인 70 IU/kg 부터 100배 높은 용량인 7000 IU/kg까지 10배 용량 단위로 투여하였고, *in vitro* 실험에서는 실험동물에 100 IU/kg 정맥내 투여시 혈중농도의 100배 높은 농도인 700 IU/ml를 최고 농도로 설정하였다.

증추신경계 및 행동에 미치는 영향

일반행동에 미치는 영향

ICR mouse에 rHu-EPO를 정맥내 투여한 후, 일정시간에 실험용 관찰 케이지에 넣어 관찰하였다. Haloperidol을 대조물질로 사용하여 주로 Irwin(1968)의 방법에 준하여 실시하였다.

자발운동량에 미치는 영향

ICR mouse에 rHu-EPO를 정맥내 투여하고 일정시간에 Opto-Varimax(Columbus사)를 이용하여 3분동안 자발운동량을 측정하였다. 이때 측정시간에 따른 오차를 줄이기 위해 약물투여군과 대조군의 개체 1마리씩을 동시에 각각 다른 측정용 cage에 넣고 동시에 측정하였다.

Hexobarbital-Na의 수면작용에 대한 영향

ICR mouse를 사용하여 rHu-EPO를 정맥내 투여하고 15분 후에 hexobarbital-Na 40 mg/kg을 복강주사하여 정향반사 소실시점을 수면유발시점으로 하고 정향반사 소실부터 회복때까지의 시간을 수면시간으로 하였다. 대조약물로 사용한 chlorpromazine은 20 mg/kg을 경구투여하였다.

정상체온에 대한 영향

ICR mouse를 군당 10마리씩 사용하였으며, 약물투여 직전에 직장체온을 측정하고, rHu-EPO를 정맥내투여한 후 15분, 30분, 1시간, 2시간 및 4시간에 직장체온을 측정하였다. 대조물질로는 aminopyrine을 사용하였으며 50 mg/kg을 경구투여 하였다.

통각에 대한 작용

ICR mouse를 각 군당 10마리씩 사용하였으며, rHu-EPO를 정맥투여하고 투여한 15분 후에 0.6% acetic acid-saline 용액을 0.1 ml/10 g의 용량으로 복강주사한 다음, 초산 투여 후 10분부터 10분 동안의 총 writhing syndrome의 발생 횟수를 측정하여 기록하였다. 대조약물로는 acetaminophen 20 mg/kg을 경구투여하였다.

경련 증강 작용

ICR mouse를 군당 5마리씩 사용하여 rHu-EPO를 정맥내 투여하고 5분 후에 ataxia 발생유무를 관찰하였다. 약물 투여 15분 후에 중류수에 녹인 pentetetrazole 50 mg/kg 또는 strychnine 1.0 mg/kg을 복강내 투여하고 간대성 경련 및 강직성 경련의 발현률을 30분 동안 관찰하였다.

혈압 및 심박수에 대한 영향

체중 3.0~3.4 kg의 웅성 고양이에 pentobarbital 30 mg/kg 을 복강주사하여 마취를 유도한 뒤, physiograph와 연결된 cannula를 대퇴동맥에 삽입하여 동맥압 및 심박수를 측정하였다. 약 1시간 경과 후 alpha-chloralose 0.5 g/kg을 대퇴정맥으로 주입하여 마취심도를 일정하게 유지시키고 rHu-EPO 을 70, 700 및 7000 IU/kg을 각각 정맥내 투여하고 투여 5분, 15분 및 30분에 혈압 및 심박수를 측정하였다(n=5).

적출장기에 대한 작용

체중 200~300 g의 웅성 기니픽의 기관 또는 회장을 적출하여 organ bath (37°C, Krebs-Henseleit액, 95% O₂ and 5% CO₂)에 현수하고 약 1시간 안정화시킨 후 다음의 실험을 실시하였다.

(1) 적출회장에 대한 작용

rHu-EPO의 직접작용 및 histamine 또는 carbachol에 의한 수축력에 미치는 효과를 검토하였으며, 표본을 전기자극(0.1 Hz, 1 msec and 70 volts)하여 수축을 유발시킨 후 rHu-EPO(7, 70 and 700 IU/ml) 또는 atropine(1~1,000 nM)을 가하여 농도반응곡선을 구하였다. 이때 나타나는 수축력의 변화는 약물투여전 수축력에 대한 %로 나타내었다.

(2) 적출기관에 대한 작용

rHu-EPO의 직접작용 및 histamine 또는 carbachol에 의한 수축력에 미치는 효과를 검토하였다.

신경근 표본에 미치는 영향

SD rat를 pentobarbital 마취하에서 개복하여 혈액을 제거한 후 개흉하고 좌측 phrenic nerve 가 좌측 횡격막에 부착된 상태로 표본을 적출하고 삼각형 모양으로 절단한 후 37°C Krebs-Henseleit 용액이 담긴 organ bath에 현수하였다. Phrenic nerve를 0.2 Hz, 0.5 msec, 20 volts로 전기자극하여 약 30분간 안정화시킨 후 rHu-EPO를 누적적으로 가하고 약물투여전 수축력에 대한 %로 약물반응을 나타내었다.

장관 수송능에 대한 영향

24시간 절식시킨 ICR mouse를 각 군당 10마리씩 사용하였다. rHu-EPO를 정맥내투여하고 15분 후에 5% charcoal

meal(0.5% sodium CMC에 혼탁)을 0.2 ml씩 경구투여하였다. 투여 20분 후에 mouse를 치사시켜 소장을 적출하고, 유문부에서 맹장입구까지의 이송율을 측정하여 백분율로 환산 표시하였으며 대조약물로는 morphine 10 mg/kg을 사용하였다.

뇨량 및 전해질 배설에 대한 영향

SD rat를 18시간 절식시킨 후 rHu-EPO 정맥주사 직전에 생리식염수를 2.5 ml/100 g 경구투여하였다. 정맥주사후 metabolic cage에 rat 1마리씩 넣은 후 5시간동안 뇌를 채취하여 뇌량, 뇌중 Na⁺, K⁺ 및 Cl⁻ 농도를 Na/K/Cl Instant ISE analyzer(LYTENING System 30)를 이용하여 측정하였다.

혈액응고계에 미치는 영향

혈액응고에 미치는 영향

SD rat에 rHu-EPO를 정맥주사하고 15분 후에 채혈하여 1/10 용량의 3.8% sodium citrate액을 가하고, 3,000 rpm에서 10분 원심분리하여 plasma를 채취하였다. 자동혈액응고 장치(Automated Coagulation Laboratory)를 이용하여 prothrombin time과 fibrinogen 함량을 구하였다.

혈소판응집에 미치는 영향

체중 2.5~3 kg의 웅성 토끼 귀정맥에서 혈액을 채취한 후 1/10 용량의 3.8% sodium citrate를 처치하고 1,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 platelet rich plasma(PRPP)를 분리하고, 하층액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 platelet poor plasma(PPP)를 분리하였다. 자동혈구계산기(Minos VetTM, ABX)를 이용하여 PRPP의 혈소판 개수는 $5 \times 10^5/\mu\text{l}$ 로 조절하였다. PRPP 500 μl 에 rHu-EPO 또는 vehicle을 10 μl 가하고 3분후에 ADP(최종농도 3×10^{-7} ~ 310^{-5} M)를 10 μl 를 가하여 ADP에 의한 농도의존적인 혈소판 응집을 aggregometer(Biodata, PAP-4)를 이용하여 측정하였다.

통계처리

모든 실험결과는 평균치와 표준오차를 사용하여 나타내었고, 각 군간의 차이는 ANOVA와 Dunnett's t-test로 비교하였으며, 대조군과 비교하여 p값이 5% 미만일 때를 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

실험결과

rHu-EPO의 약효시험

정상랜드에 대한 효과

정상랜드의 적혈구수는 rHu-EPO투여개시 7일째 최고치를 나타내었으며 그후 점차 감소하는 경향을 보였으며(Fig. 1) 250, 1250 IU/kg을 투여한 동물군에서 대조군에 비해 유의성있는 증가를 나타내었고, 10일째는 1250 IU/kg을 투여한 군에서만 유의성있는 증가가 나타났다. Hemoglobin 농도의 경우도 rHu-EPO 투여개시 7일째 최고치를 나타내었

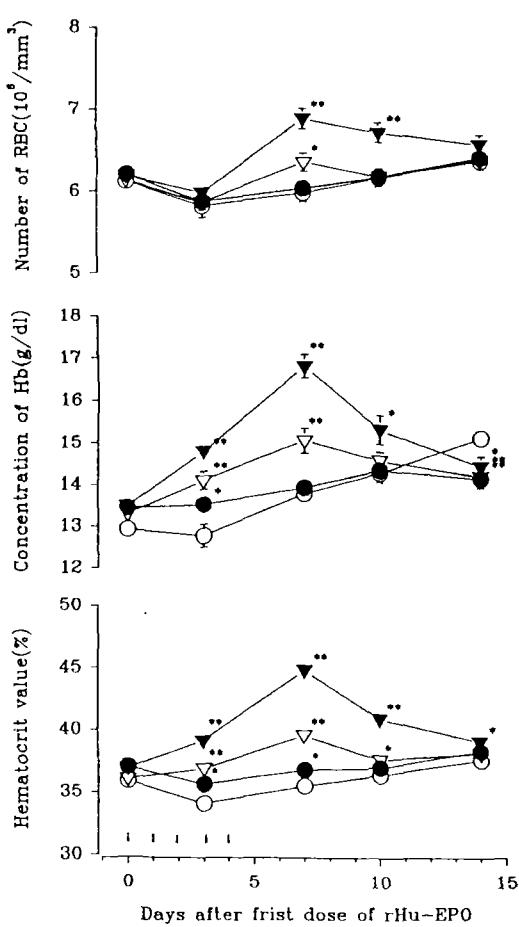


Fig. 1. Effects of rHu-EPO on erythropoiesis in normal rats injected intravenously once a day for 5 days. ↓; The day of rHu-EPO administration(0 IU/kg, ○; 50 IU/kg, ●; 250 IU/kg, ▽; 1250 IU/kg, ▼). Each point represents the mean±S.E.M. * p<0.05, **p<0.01 : Significantly different from control(○).

으며 그후 점차 감소하는 경향을 보였고 rHu-EPO 투여개시 3일째부터 50, 250, 1250 IU/kg을 투여한 동물군 모두에서 대조군에 비해 유의성있는 증가를 나타내었다. 그러나 14일째는 50, 250, 1250 IU/kg을 투여한 동물군 모두에서 큰 폭은 아니지만 대조군에 비해 유의적인 감소경향이 나타났다. Hematocrit치의 경우도 적혈구수와 hemoglobin과 유사한 경향을 나타냈으나 14일째의 감소경향은 나타나지 않았다. 한편 reticulocyte는 rHu-EPO 투여개시 3일째 250및 1250 IU/kg을 투여한 군에서 유의성있는 용량의 준적 증가가 나타났으며(Fig. 2), 1250 IU/kg을 투여한 군에서는 7일째에도 유의성있는 증가가 인정되었다. Reticulocyte의 최고치는 투여후 3일째로 나타났고 그후 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 1250 IU/kg-투여군에서 투여개시 10일째 유의성있는 감소경향을 나타내었다.

Cisplatin유발 빈혈랫드에 대한 효과

Cisplatin을 투여한 후 33일째 뱃드을 도살하여 신장과

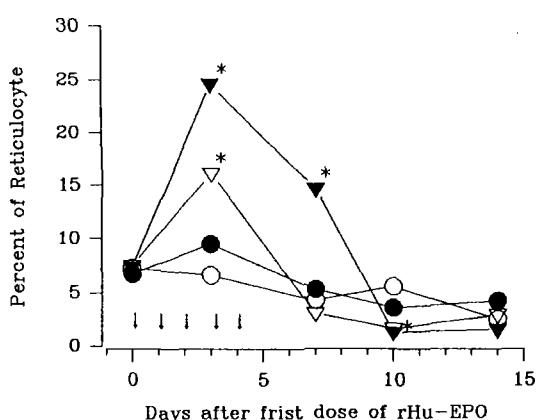


Fig. 2. Effects of rHu-EPO on reticulocytosis in normal rats injected intravenously once a day for 5 days. ↓; The day of rHu-EPO administration(0 IU/kg, ○; 50 IU/kg, ●; 250 IU/kg, ▽; 1250 IU/kg, ▼). Each point represents the mean. * p<0.05 : Significantly different from control(○).

골수를 조직학적으로 검사한 결과 신장 피질부의 일부 세뇨관이 확장되어 주변조직이 압박되거나 결합조직의 증식이 관찰되었다. 또한 일부세뇨관의 관강내에는 호산성 뇨원주도 관찰되었으며 골수의 경우에도 지방구(fatty droplet)의 증가와 세포밀도의 감소가 관찰되어 cisplatin투여로 인한 신장의 손상과 골수에서의 조혈기능의 저하가 현저히 나타났다. 이러한 rat에 rHu-EPO를 5일간 투여한 결과 rHu-EPO 투여개시 후 7일부터 14일까지 200 IU/kg을 투여한 동물군에서 적혈구수가 현저히 증가하였으며, hemoglobin의 경우 3일부터 14일까지 유의성있는 증가가 인정되었다(Fig. 3). 또한 hematocrit치의 경우 200 IU/kg 투여군에서는 3일에서 14일까지, 100 IU/kg 투여군에서는 10일째에 유의성있는 증가가 인정되었다(Fig. 4). Reticulocyte량은 투여개시 후 3일째에 100 및 200 IU/kg 투여군에서는 유의성있는 증가가 인정되었으나, 7일째에는 50 IU/kg 투여군에서 유의성있는 감소가 인정되었다.

실혈랫드에 대한 효과

실혈랫드에 rHu-EPO를 투여하면 투여 3일째에 reticulocyte량은 20, 100 IU/kg 투여군에서 대조군에 비해 유의성있는 현저한 용량의 준적 증가경향을 나타내었으며, 100 IU/kg 용량으로 투여한 동물에서는 투여후 7일째까지 유의성있는 증가가 나타났다(Fig. 5). 그러나 20 IU/Kg 투여군에서는 투여후 7일째 부터 reticulocyte치가 급격히 감소하여 대조군과 동일한 정도의 수치를 나타내었다.

일반약리작용

증추신경계 및 행동에 미치는 영향

(1) 일반행동에 미치는 영향

rHu-EPO 투여군에서는 이상행동이 나타나지 않았으나 대조물질인 haloperidol 투여군에서는 catalepsy, 체위이상, 촉반응과 경계성 저하, 굴근반사 저하 및 사지긴장도 저하

등의 다양한 반응이 나타났다(n=10/group).

(2) 자발운동량에 미치는 영향

Mouse 자발운동량을 120 분간 일정시간대에 측정했을

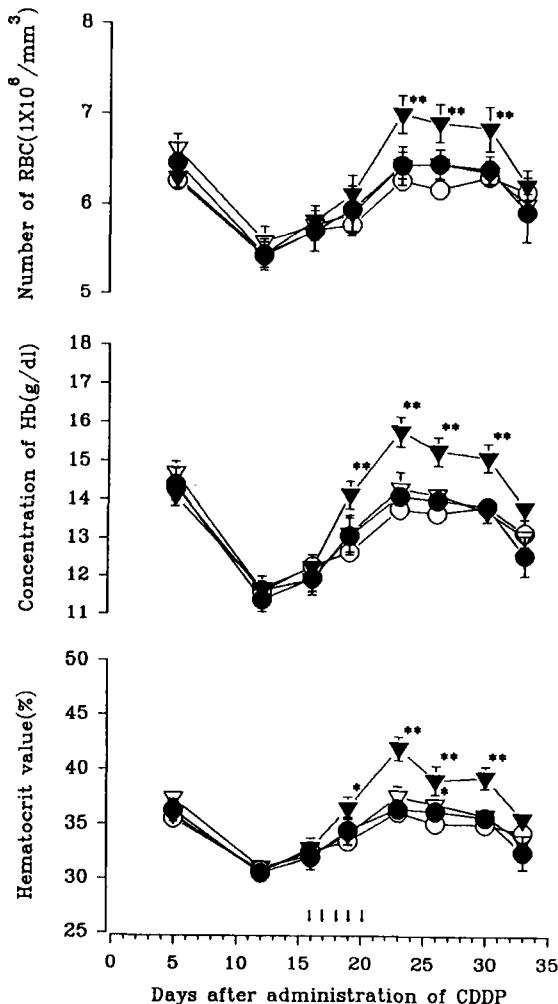


Fig. 3. Effects of rHu-EPO on erythropoiesis in acute renal failure rats. Animals were administered cisplatin(8 mg/kg, i.v.) and injected rHu-EPO intravenously once a day for 5 days. ↓ ; The day of rHu-EPO administration(0 IU/kg, ○; 50 IU/kg, ●; 100 IU/kg, ▽; 200 IU /kg, ▼). Each point represents the mean ± S.E.M. of 8 rats. *p<0.05, **p<0.01 : Significantly different from control(○).

때 시간경과에 따라 운동량의 현저한 감소가 나타났으나, 각 측정시간대에서 대조군과 rHu-EPO 투여군의 자발운동

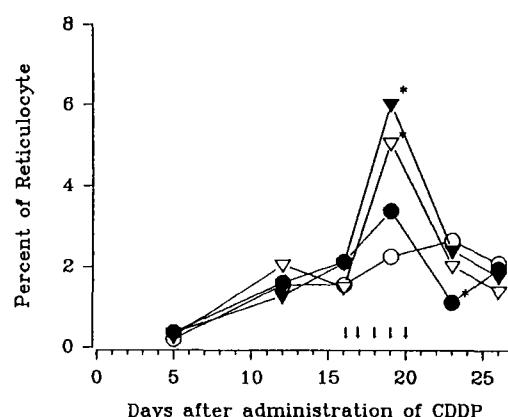


Fig. 4. Effects of rHu-EPO on reticulocytosis in acute renal failure rats. Animals were administered cisplatin(8 mg/kg, i.v.) and injected rHu-EPO intravenously once a day for 5 days. ↓ ; The day of rHu-EPO administration(0 IU/kg, ○; 50 IU/kg, ●; 100 IU/kg, ▽; 200 IU /kg, ▼). Each point represents the mean. *p<0.05 : Significantly different from control(○).

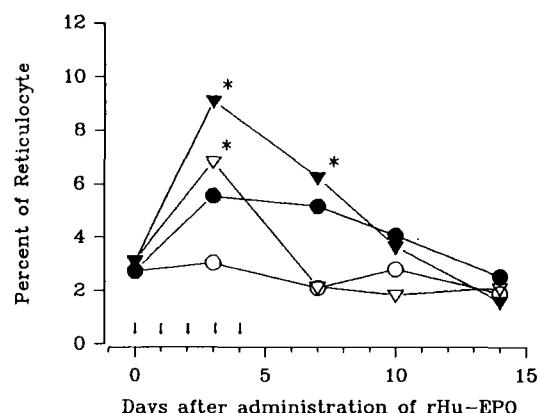


Fig. 5. Effects of rHu-EPO on reticulocytosis in bled rats. Animals were injected rHu-EPO intravenously once a day for 5 days. ↓ ; The day of rHu-EPO administration(0 IU/kg, ○; 4 IU/kg, ●; 20 IU/kg, ▽; 100 IU /kg, ▼). Each point represents the mean. *p<0.05 : Significantly different from control(○).

Table I. Effect of rHu-EPO on spontaneous activities of mice for 120 min

Time (min)	No. of animals	Traveled Distance (cm)					
		70 IU/kg		700 IU/kg		7,000 IU/kg	
		Vehicle	rHu-EPO	Vehicle	rHu-EPO	Vehicle	rHu-EPO
5	10	1120±136	1142±121	1206±142	1209±108	1183±123	1221± 61
30	10	848±122	890±187	1023±168	935±101	1005±163	997±118
60	10	490± 96	703±172	611±139	643±100	635±137	776± 83
90	10	463±133	393±125	432±124	516± 85	388±109	579± 55
120	10	367± 90	394± 95	396±111	518± 97	400±115	527±108

량에 유의적인 차이는 없었다(Table I).

(3) Hexobarbital-Na의 수면작용에 대한 영향

rHu-EPO 70, 700 및 7000 IU/kg 투여군의 수면 유도시간과 수면시간은 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 양성 대조 물질로 사용한 chlorpromazine 20 mg/kg 투여군의 경우는 수면시간이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다(Table II).

(4) 정상체온에 대한 영향

정상 mouse의 체온에 대해 rHu-EPO은 투여후 4시간 까지 유의적인 변화를 나타내지 않았으나 양성 대조물질인 aminopyrine 투여군에서는 15분 후부터 60분까지 유의적으로 체온이 저하되었다(Table III).

(5) 통각에 대한 작용

rHu-EPO 70, 700, 7000 IU/kg 투여군의 writhing syndrome

Table II. Effect of rHu-EPO on hexobarbital-induced sleeping time in ICR mice

Treatment	Dose (IU/kg)	No. of animals	Sleep-inducing Time (min)	Sleeping Time (min)
Vehicle	-	10	2.5±0.3	54.8±6.5
rHu-EPO	70	10	2.0±0.3	51.6±4.1
	700	10	2.1±0.2	49.5±6.1
	7000	10	1.8±0.3	55.1±4.1
Chloropromazine	20	10	2.3±0.3	139.8±6.1**

Significantly different from control group (p<0.01).

Table III. Effect of rHu-EPO on the body temperature in mice (n=10/group)

Time after administration (min)	Body Temperature (°C)			
	Vehicle	rHu-EPO (IU/kg)	Aminopyrine (50 mg/kg)	
0	37.4±0.3	37.1±0.2	37.1±0.3	37.6±0.2
15	37.6±0.2	37.1±0.3	37.5±0.2	37.7±0.1
30	37.6±0.2	37.1±0.2	37.5±0.2	37.5±0.2
60	37.2±0.2	37.2±0.2	37.1±0.1	37.4±0.2
120	36.8±0.3	37.1±0.1	36.8±0.2	37.1±0.2
240	36.4±0.1	36.6±0.1	36.4±0.2	36.7±0.2

Significantly different from control group (p<0.01)

Table VI. Effect of rHu-EPO on blood pressure (MBP) and heart rate (HR) in anesthetized cats

Dose (IU/kg, iv)	Parameters	Before Administration	After Administration		
			5 min	15 min	30 min
70	MBP(mmHg)	82.8±4.5	82.2±4.3	81.4±4.0	81.8±3.4
	HR(beats/min)	129.0±4.0	127.6±4.0	127.2±4.0	124.2±4.4
700	MBP(mmHg)	81.8±3.4	81.2±3.5	82.0±3.1	79.8±1.9
	HR(beats/min)	124.2±4.4	126.0±5.0	125.8±5.0	126.0±4.9
7000	MBP(mmHg)	79.8±1.9	79.4±2.5	79.6±2.9	77.4±2.3
	HR(beats/min)	126.0±4.9	126.8±5.2	126.0±5.4	125.3±6.2

은 대조군에 비해 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 한편 acetaminophen 투여군은 11.2±1.6 회의 writhing syndrome을 나타내었으며, 이것은 대조군에 비해 43.4%의 통증감소를 나타낸 것으로 유의적인 억제 현상이었다(Table IV).

(6) 경련증강작용

사용된 pentetrazole 또는 strychnine의 용량은 동물의 사망을 유발하지 않고 경련을 유발시키는 용량으로 설정하였다. rHu-EPO을 정맥내 투여한 모든 군에서 ataxia는 나타나지 않았으며 pentetrazole에 의한 간대성 경련의 발현률은 vehicle 투여군과 차이를 보이지 않았고 strychnine에 의한 강직성 경련의 발현률도 모든 군에서 차이가 없었다(Table V).

혈압 및 심박수에 대한 작용

rHu-EPO을 마취고양이에 정맥내 투여후 30분동안 평균 혈압 및 심박수는 약물투여전에 비해 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Table VI).

적출장기에 대한 작용

(1) 적출 회장에 대한 작용

rHu-EPO 7, 70, 700 IU/ml을 직접 회장에 작용시켰을 때

Table IV. Effect of rHu-EPO on writhing syndrome induced by acetic acid in ICR mice

Treatment	Dose (IU/kg)	No. of animals	No. of writhing syndrome for 10 min
Vehicle	-	10	19.8±0.8
rHu-EPO	70	10	17.3±1.4
	700	10	19.0±1.8
	7000	10	18.4±1.2
Acetaminophen	20	10	11.2±1.6**

Significantly different from control group (p<0.01).

Table V. Effect of rHu-EPO on pentetrazole- and strychnine-induced incidence/ No. of mice used

Treatment	Dose (IU/kg, iv)	Pentetrazole (50 mg/kg)	Strychnine (1 mg/kg)
Vehicle	-	3/5	1/5
rHu-EPO	70	3/5	1/5
	700	3/5	1/5
	7000	2/5	1/5

회장의 수축력에는 변화가 없었고(data 생략), carbachol 또는 histamine에 의한 수축에도 아무런 작용이 없음을 알수 있었다(Fig. 6). 한편 전기자극으로 유발된 회장의 수축은 atropine에 의해 완전히 길항되나(EC₅₀=51.6 nM) rHu-EPO는 영향을 미치지 않았다.

(2) 적출 기관근에 대한 작용

적출기관근에 대하여 rHu-EPO 7, 70, 700 IU/ml을 직접 사용시켰을 때 기관근의 수축력에는 변화가 없었고(data 생략), carbachol 또는 histamine에 의한 수축에도 아무런 작용이 없음을 알 수 있었다(Fig. 7).

신경근 표본에 미치는 영향

Phrenic nerve의 전기자극에 의한 횡격막 표본의 수축(n=5/group)은 rHu-EPO 7, 70 및 700 IU/ml 농도에서 유의적인 변화가 관찰되지 않았다(data 생략)

장관 수송능에 대한 영향

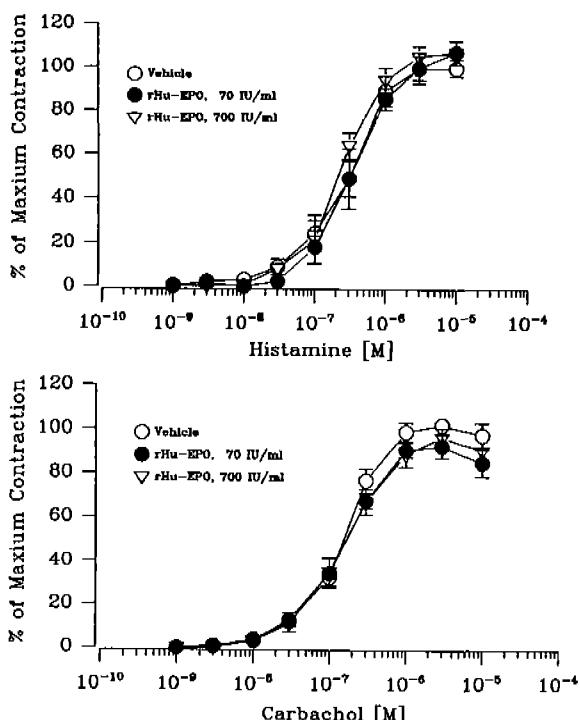


Fig. 6. Effects of rHu-EPO on histamine or carbachol-induced contractions in isolated guinea pig ileum (n=5/group).

대조군은 탄말현탁액 투여후 20분에 소장 전체의 56.2±2.0%까지 진행하였으며, rHu-EPO 70, 700, 7000 IU/kg 투여군은 각각 52.2±2.3, 54.5±1.4 및 51.9±3.2%로써 유의적인 변화가 없었고, 양성 대조물질로 사용된 morphine 10 mg/kg 투여군에서는 42.8±2.7%의 이송율을 나타내어 유의적인 감소를 보였다.

뇨량 및 전해질 배설에 대한 영향

rHu-EPO 70 및 700 IU/kg 투여군에서 노량 및 배설된 이온의 총량은 대조군에 비해 영향이 없었으나 7000 IU/kg 투여군에서는 대조군에 비해 유의적인 노량증가가 관찰되었고 배설된 이온의 총량도 증가하는 경향을 나타내었다 (Table VII).

혈액응고계에 미치는 영향

혈액응고에 미치는 영향

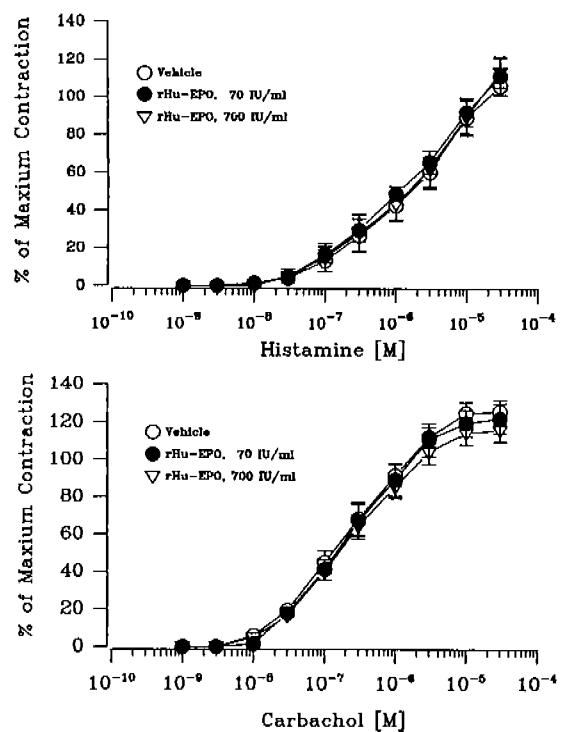


Fig. 7. Effects of rHu-EPO on histamine or carbachol-induced contractions in isolated guinea pig tracheal smooth muscle (n=5/group).

Table VII. Effect of rHu-EPO on urinary volume and electrolytes in saline-loaded rats (n=7-8)

Treatment	Dose (IU/kg, iv)	Urinary Volume (ml)	Urinary Electrolyte Excretion (μ Eq)		
			Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
Vehicle	-	2.2±0.2	281.4±38.4	197.9±19.8	363.2±37.9
rHu-EPO	70	2.8±0.3	293.7±39.8	167.6±29.4	306.1±40.0
	700	2.4±0.5	296.8±57.0	190.5±19.5	324.9±59.2
	7000	3.9±0.4*	468.4±55.4	287.9±29.3	489.8±42.2
Furosemide	15 mg/kg	6.6±0.6**	804.4±71.0**	304.1±28.7*	1067.1±77.5**

* , **Significantly different from control group (*p<0.05, **p<0.01).

Table VIII. Effect of rHu-EPO on blood coagulation in SD Rats (n=6-7)

Treatment	Dose (IU/kg, iv)	Prothrombin Time (sec)	Fibrinogen (mg/dl)
Vehicle	-	12.6±0.5	227.8±33.2
rHu-EPO	70	12.4±0.1	277.8±21.9
	70	12.6±0.3	233.7±25.5
	7000	12.2±0.2	251.2±12.1

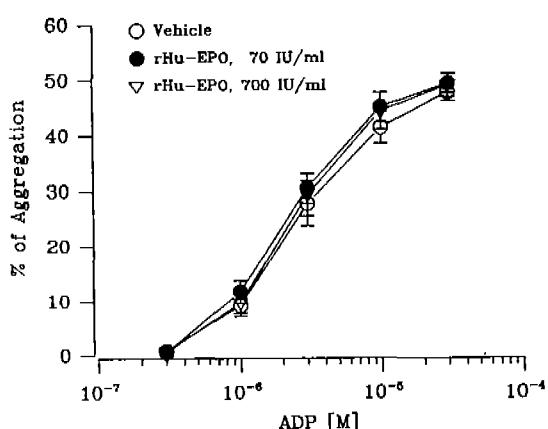


Fig. 8. Effects of rHu-EPO on ADP-induced platelet aggregation in plasma of rabbits (n=5/group).

rHu-EPO를 정맥내투여하고 채취한 혈액에서 측정한 prothrombin time과 fibrinogen량은 대조군의 혈액과 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Table VIII).

혈소판응집에 미치는 영향

ADP에 의해 혈소판은 농도의존적인 응집반응을 나타냈으며(Fig. 8) rHu-EPO의 전처치는 ADP에 의한 혈소판응집 반응에 영향이 없었다.

고찰 및 결론

rHu-EPO은 정상랫드에 투여시 용량의존적으로 적혈구 수, hemoglobin, hematocrit치, reticulocyte치 등을 상승시키는 효과가 있으며 7일째 가장 높은 값을 나타내었다. 그러나 reticulocyte치에서 나타난 결과로 볼때 5일간의 연속투여시 투여후 3일째 가장 높은 활성을 가지며 10일정도가 지나면 그 약리적 효과가 소멸됨을 알 수 있었다. 이것은 생성된 reticulocyte가 성숙적혈구로 변화되는 기간이 1~2일 정도 소요되며 랫드의 성숙적혈구 수명은 45~70일 정도이므로 생성된 reticulocyte가 성숙하여 정상적혈구가 되면서 축적된 결과라고 생각된다. 이러한 결과는 Masunaga 등(1986)이 신장을 부분절제한 랫드에 EPO를 투여한 결과 RBC 수 혹은 Hemoglobin 농도의 증가가 reticulocyte 수의 증가보다 약간 늦게 나타난다고 보고한 것과 일치하는 결

과이다. 본실험에서 투여 14일째에 Hemoglobin 농도가 약물처치군에서 대조군에 비하여 유의성있는 감소가 전반적으로 나타난 것은 Masunaga 등(1992)의 실험에서 7일간 EPO를 연속투여한 결과 혈액학적 수치가 2주째에 유의성 있게 감소하였다는 보고와 Fuchs 등(1992)이 정상토끼에 EPO를 150, 300, 600 IU/Kg을 투여한 후, 8일간 reticulocyte 수의 변화를 관찰한 결과, 투여후 4일째에 가장 높은 증가를 나타내었으며 그후 점차 감소하는 경향을 나타내었다고 보고한 것과 유사한 결과로, 생리적 항상성을 유지하기 위하여 내인성 EPO의 산생이 일시적으로 억제된 결과로 생각된다.

Cisplatin은 현재 각종 종양치료에 효과적으로 많이 사용되고 있는 약물이지만 신장해, 구토, 빈혈 등의 부작용이 있는 것으로 보고되어 있다(Rossof 등, 1980; Kuzur 등, 1981). Cisplatin에 의한 빈혈의 기전은 1) 신장해로 인한 EPO의 생성량 감소, 2) 조혈조직에 대한 EPO의 작용억제, 3) 골수내의 CFU-E에 직접적인 독성작용 등에 의해 일어난다고 한다(Rossof 등, 1972; Rothmann과 Weick, 1981; Doll과 Weiss, 1983; Rothmann 등, 1985). Wood 등(1995)은 cisplatin을 연속투여한 랫드에 EPO를 주 2회 2주간 투여한 랫드의 경우 cisplatin만을 투여한 동물에 비해 hematocrit치와 reticulocyte가 현저히 증가하였으며 reticulocyte의 경우 EPO투여 종료 후, 급격한 감소가 나타났다고 보고하였다. 또한 Matsumoto 등(1990)은 SD 랫드에 cisplatin(8 mg/kg i.v.)를 1회 투여하고 2주뒤 EPO를 2일 2회 투여한 결과 투여일까지는 reticulocyte가 농도의존적으로 증가하였으며, 투여후 점차 감소한다고 하였다. 이러한 결과는 본실험에서의 결과와 일치하는 것으로 rHu-EPO는 cisplatin에 의해 유발되는 빈혈을 효과적으로 막을 수 있을 것으로 생각된다.

급성빈혈을 유발시킨 랫드에 rHu-EPO를 투여하면 reticulocyte치는 투여후 3일째 유의성있는 용량의존적 증가를 나타내었으며, 7일째는 20 IU/kg 투여군에서 reticulocyte치는 급격히 감소하였다. 이러한 결과는 Kim 등(1994)의 실험에서 20% 급성실혈동물에 EPO를 7일간 10 IU/Kg씩 투여한 다음 reticulocyte치를 측정한 결과, 투여개시 3~5일에는 유의성있는 증가를 보이다가 그 후 급격히 감소하였다는 보고와 유사한 결과로 rHu-EPO이 급성 출혈성빈혈에도 효과적인 조혈작용을 가지는 것을 뜻한다.

한편 rHu-EPO의 조혈기능 이외의 특이한 약리작용 및 부작용 유무를 검토하기 위해 실시한 일반약리실험 결과, rHu-EPO은 일반행동, 자발운동량, 수면시간, 체온, 통각 및 경련 등에 유의적인 변화를 나타내지 않았고 따라서 예상 임상용량의 100배 범위내에서 중추신경계에 미치는 작용은 없을 것으로 추정된다. 순환기계에 대한 작용으로 rHu-EPO은 투여후 30분동안 혈압 및 심박수에 영향이 없었고,

소화기계에 있어서도 장관수송능에 의미있는 영향을 미치지 않았다. 적출평활근에 대해서도 약물자체의 수축, 이완작용은 관찰되지 않았고 histamine 또는 carbachol에 의한 수축반응에도 영향이 없었으며 또한 전기 자극에 의한 회장수축에도 영향이 없었으므로 말초신경계의 신경말단에서 acetylcholine의 유리에도 영향이 없을 것으로 판단된다. 또한 phrenic nerve의 전기자극에 의한 횡격막표본의 수축에도 영향이 없었으므로 골격근의 신경말단에 대한 작용도 없을 것으로 추정된다.

뇨량 및 전해질배설에 있어서 rHu-EPO는 70 IU/kg까지는 뇌량 및 전해질배설에 영향이 없었으나 예상 임상용량의 100배 용량인 7000 IU/kg에서는 유의적인 뇌량증가가 확인되었는데, 이는 아직 명확하게 기전이 밝혀지지는 않았으나 현재 임상시험중인 EPO, TYB-5220에서도 관찰된 바 있다(三野照正等, 1990). 이같은 결과는 토끼에서 EPO가 신장의 혈류역학적인 변화 없이 sodium 이온의 재흡수를 촉진시키고(Nushiro 등, 1995) 사람에게서 GFR과 혈압 등에 변화 없이 sodium 이온의 배설을 억제(Bunke 등, 1994)한다는 보고와는 상반되는 결과지만, EPO의 임상적 용시 보고되는 부작용의 하나가 신장에서 angiotensin II 유리 증가에 기인한 sodium 이온의 저류에 따른 혈압 상승(Brier 등, 993)이란 점을 고려하면 rHu-EPO 고용량 투여시 나타나는 뇌배설증가 효과는 임상적으로 문제가 없을 것으로 판단된다. 한편 혈액응고계에 대해서 rHu-EPO는 혈액응고시간, fibrinogen 함량 및 혈소판응집에 영향이 없었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 본 실험에서 사용한 rHu-EPO는 의미있는 특이한 부작용 없이 정상랫드, 화학요법에 의해 유발된 급성신부전 랫드 혹은 급성실혈랫드에서 용량의존적인 조절작용을 가지는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Brecher, G. (1949). New methylene blue as a reticulocyte stain. *Am. J. Clin. Path.* **19**, 895.
- Brier, M. E., Bunke, C. M., Lathon, P. V. and Aronoff, G. R. (1993). Erythropoietin-induced antinatriuresis mediated by angiotensin II in perfused kidneys. *J. Am. Soc. Nephrol.* **3**, 1583-90.
- Bunke, M., Gleason, J. R. Jr., Brier, M. and Sloan, R. (1994). Effect of erythropoietin on renal excretion of a sodium load. *Clin. Pharmacol. Ther.* **55**, 563-8.
- Doll, A. H. and Weiss, R. B. (1983). Chemotherapeutic agents and the erythron. *Cancer Treat. Rev.* **10**, 185-200.
- Eschbach, J. W. and Adamson, J. W. (1989). Guidelines for recombinant human erythropoietin therapy. *Am. J. Kidney Dis.* **14**, suppl. 1, 2-8.
- Fisher, J. W. (1993). Recent advances in erythropoietin research. *Prog. Drug. Res.* **41**, 293-311.
- Fuchs, A. and Eder, H. (1992). Dose-dependent effects of recombinant human erythropoietin on the reticulocyte population of rabbits. *Arzheim.-Forsch./Drug. Res.* **42**, Nr. 10, 1266-1268.
- 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.
- Guyton, A. C. (1991). In *Textbook of Medical Physiology*(8th ed.), W. B. Saunders Company, Philadelphia. pp. 344-364.
- Irwin, S. (1968). Comprehensive observational assessment : A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologica* **13**, 222.
- 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, S. J., Ha, B. J., Lee, D. E., Oh, M. S., Kim, D. H., Park, K. H. and Kim, H. S. (1994). Efficacy of recombinant Erythropoietin from CHO cells. *J. Appl. Pharmacol.* **2**, 343-346.
- 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**, 44-47.
- Kuzur, M. E. and Greco, F. A. (1981). Cisplatin-induced anemia. *New Engl. J. Med.* **303**, 110-112.
- 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.
- Masunaga, H., Goto, M. and Ueda, M. (1986). Effects of purified erythropoietin in partially nephrectomized rats. *Acta Hematol. Jpn.* **49**, 807-815.
- Masunaga, H., Takahira, R. and Sawai, T. (1991). Effects of recombinant human erythropoietin on renal anemic rats induced by drugs. *Folia Pharmacol. Jpn.* **98**, 151-160.
- Matsumoto, T., Endoh, K., Kamisango, K., Akamatsu, K., Korkumi, K., Higuchi, M., Imai, N., Mitsui, H. and Kawaguchi, T. (1990). Effects of recombinant human erythropoietin on anticancer drug-induced anaemia. *British J. Hematol.* **75**, 463-468.
- Nobuhiro, Y., Yoshiko, K., Tadanori, S. and Yasuyoshi, T. (1993). Comparative studies in induction of micronuclei by three genetically recombinant and urinary human erythropoietins. *Mutagenesis* **8**, 237-241.
- Nushiro, N., Sakamaki, T., Misawa, S., Seino, M., Omata, K., Imai, Y., Sekino, H., Murata, K. and Abe, K. (1993). The Effects of intrarenal infusion of recombinant human erythropoietin on renal hemodynamics and renal function in anesthetized rabbits. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* **35**, 125-31.
- Rossof, A. H., Slayton, R. E. and Perlia, C. P. (1972). Pre-

- liminary clinical experience with cisdiamminedichloroplatinum(II). *Cancer* **30**, 1451-1456.
- Rothmann, S. A. and Weick, J. K. (1981). Cisplatin toxicity for erythroid precursors. *New Engl. J. Med.* **304**, 360.
- Rothmann, S. A., Paul, P., Weick, J. K., McIntyre, W. R. and Fantelli, F. (1985). Effects of cis-diamminedichloroplatinum on erythropoietin production and hematopoietic progenitor cells. *Int. J. Cell Cloning* **3**, 415-423.
- Vaziri, N. D., Zhou, X. J. and Liao, S. Y. (1994). Erythropoietin enhances recovery from cisplatin-induced acute renal failure. *Am. Physiol. Soc.* **266**, F360-F366.
- Wood, P. A. and Hrushesky, W. J. M. (1995). Cisplatin-associated anemia; an erythropoietin deficiency syndrome. *J. Clin. Invest. Inc.* **95**, 1650-1659.