

## CJ-50001 (rG-CSF)의 골수이식모델 마우스에 대한 호중구수 회복 촉진효과

임동문 · 조효진 · 김종호 · 김달현\* · 고형곤 · 김제학 · 김현수  
제일제당 종합연구소

### Effect of CJ-50001 (rG-CSF) on the Recovery of the Neutrophil Numbers in the Mice with Bone Marrow Transplantation (BMT)

Dong Moon LIM, Hyo Jin CHO, Jong Ho KIM, Dal Hyun KIM\*, Hyung Kon KOH, Je Hak KIM and Hyun Su KIM

R&D Center, Cheil Jedang Corp., 522-1 Dokpyong-Ri, Majang-Myon, Ichon-Si, Kyonggi-Do 467-810, Korea

(Received June 14, 1997; accepted August 8, 1997)

**Abstract** – The peripheral neutrophil recovery test was conducted to determine the efficacy of CJ-50001, a drug developed in Cheil Jedang R&D center as a recombinant granulocyte-colony stimulating factor (rG-CSF). Grasin was used as control drug. CJ-50001 and Grasin were subcutaneously administered to  $\gamma$ -ray irradiated mice for 21 days at a dose of 10  $\mu$ g/kg after bone marrow transplantation and the recovery of neutrophil number was examined on the days of 9, 13, 17, and 21 after the drug administration. It was observed that the peripheral neutrophil number of the vehicle control group was recovered to the normal level on the day of 13 after the transplantation whereas the group administered with CJ-50001 and Grasin respectively, showed the normal level of peripheral neutrophil number on 9th day after the bone marrow transplantation. The number of peripheral neutrophils reached the highest level on the 21st day of drug administration, and was recovered to the normal level on the 4th day after ceasing of the drug administration (on the 25th day of the transplantation). Thus, it was presumed that CJ-50001 showed efficacy similar to Grasin on the peripheral neutrophil recovery after bone marrow transplantation.

**Keywords** □ BMT, peripheral neutrophil, rG-CSF, mouse

골수이식(bone marrow transplantation)은 면역결핍증, the lassemia 등의 유전질환, 재생불량성 빈혈 및 백혈병 등을 치료하기 위하여 공여자의 골수를 수여자에 이식하여 모든 혈액 시스템(myeloid, erythroid, lymphoid, and macrophage)을 교체해주는 방법으로, 최근 현저한 발전을 보이고 있다(Champlin, 1995). 그러나 골수이식 후 중증의 세균 및 진균 감염, 급·만성 GVHD(graft-versus host disease)와 백혈병의 재발 등 문제가 발생하기도 하는데(Champlin, 1995), 이는 골수이식 직후에는 혈중 호중구수가 상당히 감소되어 있으며 이식된 골수가 혈구생산을 하고 그 혈구가 수증자의 말초혈액 내에서 활동을 시작하려면 2~4주가 걸려서 면역기능의 회복이 늦기 때문이다. 따라서 골수이식 이후에 항생제를 사용하거나 과립구를 수혈하여 문제 발생을

억제하기도 하지만, 이에 대한 근본적인 해결 방법은 호중구 생산을 촉진시켜서 골수이식 후 혈중 과립구수가 감소되어 있는 무과립기를 가능한 한 짧게 해주는 것이다. 따라서 임상에서는 골수 이식후 G-CSF를 사용하여 세균 감염, 급만성 GVHD와 백혈병의 재발을 억제하고 있다(Locatelli 등, 1996; Negrin과 Greenberg, 1992; Schriber, 1993).

G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor)는 섬유아세포, 내피세포, 성세포와 단구/대식구 등의 세포에서 만들어지며 골수내의 호중구계 세포들에 작용하여 호중구 전구세포의 분화와 증식을 자극하여 혈중 호중구 수준을 일정하게 유지하도록 해주며, 성숙 호중구에도 작용하여 활성화(탐식능과 bactericidal/fungicidal activity 향상, 항체의존성 세포독성)를 특이적으로 향상시키는 조절인자의 일종이다(Frampton 등, 1994; Nagata, 1994; Ottmann 등, 1987). 최근에는 유전자 재조합기술의 발달로 사람 G-CSF의 cDNA를

\* To whom correspondence should be addressed.

*E. coli*나 동물세포에 삽입시켜 대량으로 발현시킬 수 있게 되었고(Nagata 등, 1986), 이로서 얻어진 재조합 G-CSF의 임상적용이 실용화되었다. CHO cell을 발현계로 사용하여 발현시킨 재조합 G-CSF를 골수이식 모델 mouse에 투여한 실험에서는 과립구 조절을 항진시켜 말초호중구수를 증가시키는 작용을 가지고 있음이 확인되었다(Tamura 등, 1990).

본 실험은 제일제당(주) 종합연구소에서 대장균을 발현계로 이용하여 유전자 재조합법으로 생산한 새로운 recombinant granulocyte-colony stimulating factor(rG-CSF)를 임상적용하기 위한 실험의 일환으로 골수이식모델 mouse에서 rG-CSF에 의한 말초호중구수 회복촉진효과를 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 투여물질

시험에 사용한 CJ-50001(Lot No. CS961025)은 제일제당(주) 종합연구소에서 대장균을 이용하여 생산하였고, 양성 대조물질로는 제일그라신 주사액 300(그란) 제일약품(주) Lot No. GS6301A)을 사용하였다. 두 물질 모두 물질안정제로 Tween 80(0.048 mg/1.2 ml)을 첨가한 acetate buffer(acetic acid 10 mM, pH 4.0)를 사용하여 1 µg/ml로 용해하여 투여하였으며 음성대조군에는 시험군과 같은 액량의 acetate buffer(vehicle)를 투여하였다.

### 실험동물

7주령의 웅성 C57BL/6N mouse를 Charles River(Atsugi, Japan)에서 수입하여 1주일 동안의 환경적응 및 검역기간을 거쳐 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 시험개시일의 동물은 8주령이었다. 사육실험실은 온도 23±3°C, 상대습도 50±10%, 환기횟수 12-13회/hr, 조도 150-300 Lux 조건하에 유지하였다. 실험동물의 검역기간 및 시험기간중에는 실험동물용 고품사료(제일제당)를 섭취시켰으며, 음수는 수돗물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

실험 동물은 각군당 6마리로 총 16군으로 구성하였으며, 각군의 구성은 다음의 같이 하였다.

- 1) γ-ray를 조사하지 않고 투여도 하지 않은 정상군
- 2) γ-ray를 조사한 후 vehicle을 투여한 군으로 9, 13, 21 및 25일째에 각각 채혈한 군
- 3) γ-ray를 조사한 후 CJ-50001을 투여한 군으로 9, 13, 17, 21 및 25일째에 각각 채혈한 군
- 4) γ-ray를 조사한 후 그라신을 투여한 군으로 9, 13, 17, 21 및 25일째에 각각 채혈한 군

실험 동물은 채혈한 후에 도살하여 각 날짜별로 독립된 개체를 사용하였다.

### 골수이식

γ-ray(TCR-120-01, cobalt-60, Toshiba, Japan)를 mouse의 전신에 750 rads(75 rads/min)로 조사후 즉시 방사선조사를

받지 않은 정상 C57BL/6N mouse의 대퇴에서 채취한 골수 세포를 각 mouse 당 2×10<sup>6</sup> cells을 미정맥으로 이식하였다.

### 투여방법

골수이식 다음날부터 21일째까지 CJ-50001 및 그라신 10 µg/kg을 10 ml/kg의 액량으로 매일 등부에 피하투여하고 대조군으로 vehicle을 역시 같은 액량인 10 ml/kg으로 등부에 피하투여하였다. 투여 용량은 Tamura 등(1990)의 논문을 참고로 선정하였다.

### 채혈 및 측정

γ-ray 조사전 (0) 및 조사후 9, 13, 17, 21 및 25일째에 각 군당 6마리씩 무작위로 선별하여 안와정맥총에서 채혈한 혈액을 EDTA 용기(Microtainer, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA)에 응고가 되지 않도록 잘 혼합한 후 측정에 사용하였다. 자동혈구분석기(Minos Vet, ABX, Montpellier, France)를 사용하여 혈액학적 parameter를 측정하고 백혈구백분율은 Giemsa 염색을 한 박층도말슬라이드를 이용하여 각 슬라이드당 100개의 백혈구를 감별계산하여 측정하였다.

### 통계학적 방법

각 시험 결과 측정치는 Student's *t*-test 처리하여 vehicle 투여군과의 유의성검정을 하였다.

## 결 과

### 호중구수 변화

골수이식후 다음날부터 CJ-50001 및 그라신을 각각 10 µg/kg의 용량으로 매일 등부에 피하투여한 다음 말초호중구수가 회복되는 정도를 Fig. 1에 나타내었다. CJ-50001 투여군 및 그라신 투여군 모두 9일째부터 말초호중구수가 vehicle 투여군과 비교해 유의성(P<0.05)있게 증가하여 투

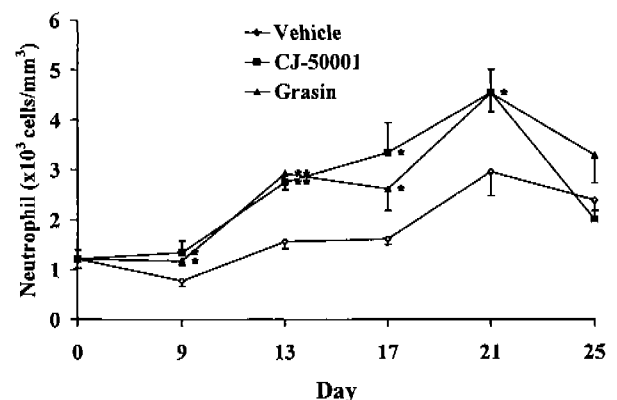


Fig. 1. Effect of CJ-50001 on neutrophils in number in C57BL/6 mouse treated with 10 µg/kg of the compound after bone marrow transplantation (n=6). CJ-50001 and Grasin were given by subcutaneous injection for 21 days. \*P<0.05, \*\*P<0.01.

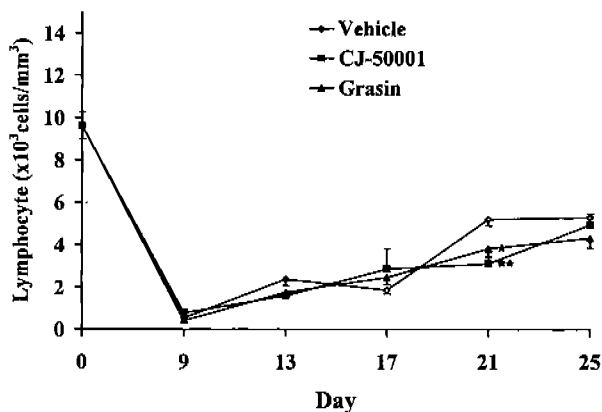


Fig. 2. Effect of CJ-50001 on lymphocytes in number in C57BL/6 mouse treated with 10  $\mu$ g/kg of the compound after bone marrow transplantation (n=6). CJ-50001 and Grasin were given by subcutaneous injection for 21 days. \*P<0.05, \*\*P<0.01.

여 최종일인 21일째에는 최고치에 달하였다. 투여를 중단한 후 4일째의 말초호중구수는 vehicle 투여군과 비교하여 유의성이 없었다.

#### 호중구수 이외의 말초혈구수에 대한 영향

호중구수 이외의 말초혈구수의 변화를 Fig. 2, 3 및 4에 나타내었다. 골수이식 21일째 CJ-50001 투여군(P<0.01) 및 그라신 투여군(P<0.05)이 vehicle 투여군과 비교해 림프구수가 유의성 있게 감소하였으며, 적혈구수 및 혈소판 수는 vehicle 투여군과 비교해 변화를 발견할 수 없었다.

## 고 찰

본 연구소에서 개발한 rG-CSF 제제인 CJ-50001의 약효를 검토하기 위한 일환으로써, 시판되고 있는 rG-CSF 제제

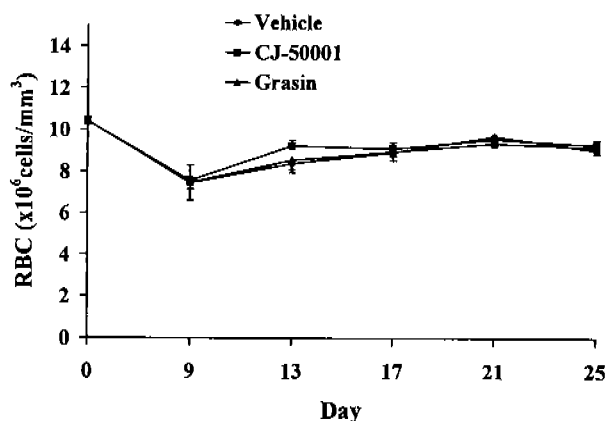


Fig. 3. Effect of CJ-50001 on RBCs in number in C57BL/6 mouse treated with 10  $\mu$ g/kg of the compound after bone marrow transplantation (n=6). CJ-50001 and Grasin were given by subcutaneous injection for 21 days.

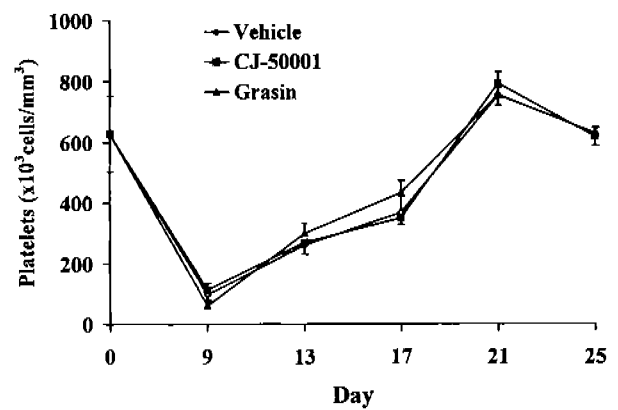


Fig. 4. Effect of CJ-50001 on platelets in number in C57BL/6 mouse treated with 10  $\mu$ g/kg of the compound after bone marrow transplantation (n=6). CJ-50001 and Grasin were given by subcutaneous injection for 21 days.

인 그라신(제일약품)을 비교 약물로 사용하여 골수이식 모델 mouse에서의 호중구수 회복촉진효과를 검토하였다. 골수이식 후 9일째 vehicle 투여군의 호중구수는 골수이식을 하지 않은 정상 mouse의 64% 였지만, CJ-50001 투여군은 111%, Grasin 투여군은 96%로 vehicle 투여군과 비교해 호중구수의 유의성 있는(P<0.05) 증가를 나타내었다. vehicle 투여군의 말초호중구수가 정상치로 회복하는데는 11~13일 정도 걸린다고 생각되므로, 위의 결과는 rG-CSF 투여에 의해 골수이식 후 말초호중구수가 정상으로 회복하는 기간이 단축된 것으로 생각된다. 이 호중구수의 증가는 계속되어 투여 마지막날인 21일째 말초호중구수의 증가는 최고치에 달하였고 투여를 중단한 25일째의 말초호중구수는 vehicle 투여군과 비교하여 유의성이 없는 수준으로 떨어졌다. 호중구수 이외의 말초혈구수 변화에서는 21일째 림프구수의 rG-CSF 투여군의 림프구수가 vehicle 투여군과 비교해 감소하였지만, 이는 rG-CSF 제제의 약리작용으로 호중구수의 증가가 최고치에 달함으로써 상대적으로 감소하였다고 사료된다. 이외의 적혈구수 및 혈소판수는 vehicle 투여군과 비교해 별다른 변화를 발견할 수 없었다.

이상의 모든 결과를 종합하여 볼 때, 본 연구소에서 개발한 rG-CSF 제제인 CJ-50001은 골수이식 후 연속투여에 의해 말초호중구수 회복을 촉진시키는 효과가 기존 rG-CSF 제품인 그라신과 동등한 약효를 가지고 있다고 사료된다.

## 감사의 말씀

본 연구를 수행하는데 있어서 필요한 방사선조사는 삼성의료원 치료방사선과와 지방공사 강남병원 치료방사선과에서 많은 도움을 주셨습니다. 이에 진심으로 감사드립니다.

## 참고문헌

- Champlin, R.E. (1995). Bone marrow transplantation. In *Cancer Treatment* (4 th Ed.), pp. 188-204. Saunders, Philadelphia.
- Frampton, J. E., Lee, C. R. and Faulds, D. (1994). Filgrastim. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in neutropenia. *Drugs*, **48**, 731-760.
- Locatelli, F., Pession, A., Zecca, M., Bonetti, F., Prete, L., Carra, A. M., Prete, A., Montagna, D., Comoli, P., Taibi, R. M. and Paolucci, G. (1996). Use of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in children given allogeneic bone marrow transplantation for acute or chronic leukemia. *Bone Marrow Transplant.*, **17**, 31-37.
- Nagata, S. (1994). Granulocyte colony stimulating factor and its receptor in *The Cytokine Handbook* (Thompson, A. Ed.), pp. 371-385. Academic Press, New York.
- Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Kaziro, Y., Yamazaki, T., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oheda, M., Nomura, H. and Ono, M. (1986). Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte-stimulating factor. *Nature*, **319**, 415-418.
- Negrin, R. S. and Greenberg, P. L. (1992). The use of colony stimulating factors in clinical bone marrow transplantation. *Curr. Opin. Immunol.*, **4**, 567-570.
- Ottmann, O. G., Welte, K., Souza, L. M. and Moore, M. A. (1987). Proliferative effects of a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rG-CSF) on highly enriched hematopoietic progenitor cells. *Hematol. Bluttransfus.*, **31**, 244-247.
- Schriber, J. R., Negrin, R. S., Chao, N. J., Long, G. D., Horning, S. J. and Blume, K. G. (1993). The efficacy of granulocyte colony-stimulating factor following autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma with monoclonal antibody purged bone marrow. *Leukemia*, **7**, 1491-1495.
- Tamura, M., Yoshino, T., Fujiwara, M., Hattori, K., Kawamura, A. and Imai, N. (1990). Effect of recombinant human G-CSF (rG-CSF) on the recovery of the peripheral blood neutrophil counts in the mice undergoing bone marrow transplantation (BMT). *Pharmacology and Therapeutics*, **18**, 299-317.