

## 정상 ICR mouse 및 SD rat에서 CJ-50001 (rG-CSF)의 단회투여후 말초호중구수의 변동 및 용량상관성

임동문 · 조효진 · 김달현\* · 이현수 · 김제학 · 김현수

제일제당 종합연구소

## The Effect of a Single Administration of rG-CSF on the Peripheral Neutrophil Levels and Its Dose Responsiveness in Normal ICR mice and SD rats

Dong Moon LIM, Hyo Jin CHO, Dal Hyun KIM\*, Hyun Soo LEE,  
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 24, 1997; accepted August 8, 1997)

**Abstract** - CJ-50001 is a recombinant granulocyte-colony stimulating factor (rG-CSF) developed by Cheil Jedang R&D Center. The effects of CJ-50001 on the increase of peripheral neutrophil count following intravenous and subcutaneous single administration at a dose of 20  $\mu$ g/kg in normal ICR mice and SD rats, respectively, were compared with those of Grasin, a control drug. Both CJ-50001 and Grasin significantly increased the peripheral neutrophil number in four treatment groups and the maximum number of neutrophil was achieved at 12 to 18 h in rats and mice, respectively. The dose dependency test was studied for CJ-50001 only in normal mice by intravenous or subcutaneous administration. When administered i.v or s.c at the various doses in normal mice, CJ-50001 significantly increased the neutrophil number over the dose of 160 ng/kg, compared with the vehicle control group. From these results, it was concluded that CJ-50001 showed efficacy similar to Grasin in the peripheral neutrophil count increase.

**Keywords** □ CJ-50001, rG-CSF, mice, rats, neutrophil

G-CSF(recombinant granulocyte-colony stimulating factor)는 골수내의 호중구계 세포들에 작용하여 호중구 전구세포의 분화와 증식을 자극하여 혈중 호중구 수준을 일정하게 유지하도록 해주며, 과립구 조혈세포들의 혈류로의 이동을 촉진하여 순환계호중구 수준을 일정하게 유지하도록 해주고 순환계호중구의 침윤도 일으킨다(Frampton 등, 1994; Nagata, 1994; Ottmann 등, 1987). 또한 병원체에 대하여 호중구의 화학주성과 탐식작용, bactericidal/fungicidal activity를 향상시키며 호중구의 apoptosis를 늦추는 것으로도 알려져 있다(Nagata, 1994). rG-CSF(recombinant granulocyte-colony stimulating factor)는 대장균(*E. coli*) 또는 동물세포를 발현계로 이용하여 유전자 재조합법으로 생산되는 당단백질이다(Nagata 등, 1986). 이 rG-CSF는 말초혈액의 성숙호중구수를 특이적 또한 용량 의존적으로 증가시켜(Tamura

등, 1990) 호중구수감소 등 호중구 기능의 저하에 기인하는 각종 질환 및 호중구가 주로 탐식살균능을 발휘하는 각종 세균감염증의 치료 또는 예방에 유익하다고 생각되어 임상에서 사용되고 있다(Lieschke와 Brgess, 1992). 제일제당(주) 종합연구소에서는 대장균(*E. coli*)을 발현계로 이용하여 유전자 재조합법으로 생산한 새로운 rG-CSF(CJ-50001)의 약효시험의 일환으로 기존제품인 그라신(제일약품)을 비교약물로 하여 정상 rat 및 mouse에서 단회투여에 의한 시간에 따른 호중구 증가작용 및 용량의존성시험을 수행하였다.

### 실험방법

#### 시험물질

시험에 사용한 CJ-50001(Lot No. CS961025)은 제일제당(주) 종합연구소에서 대장균(*E. coli*)을 발현계로 이용하여 유전공학 재조합법으로 생산하였고, 양성대조물질로는 제

\* To whom correspondence should be addressed.

일그라신 주사액 300[제일약품(주) Lot No. GS6301A]을 사용하였다. 두물질 모두 물질안정제로 Tween 80(0.048 mg/1.2 ml)을 첨가한 acetate buffer(acetic acid 10 mM, pH 4.0)를 사용하여 2 µg/ml(mouse) 및 4 µg/ml(rat)로 용해하여 투여하였으며 음성대조군에는 acetate buffer(vehicle)를 투여하였다.

**실험동물**

5주령의 ICR계 웅성 mouse 및 Sprague-Dawley계 웅성 rat를 Charles River(Atsugi, Japan)에서 구입하여 1주일 동안의 환경적응 및 적응기간을 거쳐 건강한 동물만을 사용하여 시험을 수행하였고 시험개시일의 동물은 6주령이었다. 사육실은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 환기횟수 12-13회/hr, 조도 150-300 Lux 조건하에 유지하였다. Mouse 및 rat의 적응기간 및 시험기간중에는 실험동물용 고형사료(제일제당)를 섭취시켰으며, 음수는 수돗물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

**투여**

Rat와 mouse 모두 미정맥 또는 등부위 피하에 투여하였다. 투여액량은 mouse 10 ml/kg, rat 5 ml/kg으로 투여하였고 대조군에는 시험군과 같은 액량의 acetate buffer를 투여하였다. 투여 용량은 참고문헌(Tamura 등, 1990)을 검토하여 시간에 따른 말초 호중구수 변화를 측정하는 실험에서는 rat와 mouse 모두 20 µg/kg으로, 용량 상관성을 측정하는 실험에서는 32, 160, 800, 4,000 및 20,000 ng/kg으로 투여하였다.

**채혈 및 말초혈구수측정**

시간에 따른 호중구수 변동시험에서는 투여후 각각의 시간 경과후 실험동물의 안와정맥총에서 500 µl씩, 용량상관성 시험은 시간에 따른 시험결과를 참고로 약효가 확실하게 발현되는 시간을 설정하여 정맥내 투여는 투여후 4시간, 피하투여는 투여후 6시간째에 mouse의 안와정맥총에서 500 µl씩 채혈하여 EDTA가 첨가된 microtainer(Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA)에 담아 혈액이 응고되지 않도록 잘 혼합하여 말초혈구수측정에 사용하였다. 말초적혈구수, 총백혈구수, 혈색소량, 적혈구 및 용적비 등은 자동혈구분석기(Minos-Vet, ABX, Montpellier, France)로 측정하고 말초호중구수, 임파구수, 호산구수 및 단구수는 Giemsa 염색을 한 박층 도말 슬라이드를 이용하여 백혈구 100개를 감별측정 한 후 각 세포수 출현빈도를 총백혈구수에 곱하여 산출하였다. Rat의 경우는 군당 8마리를, mouse의 경우는 군당 6마리를 사용하였으며, 한번 채혈한 mouse는 채혈에 다시 사용하지 않았고, rat는 필요한 횟수 만큼 시간 경과에 따라 채혈하였다.

**통계학적 방법**

각 시험 결과 측정치는 Student's t-test 처리하여 vehicle 투여군과의 유의성 검정을 하였다.

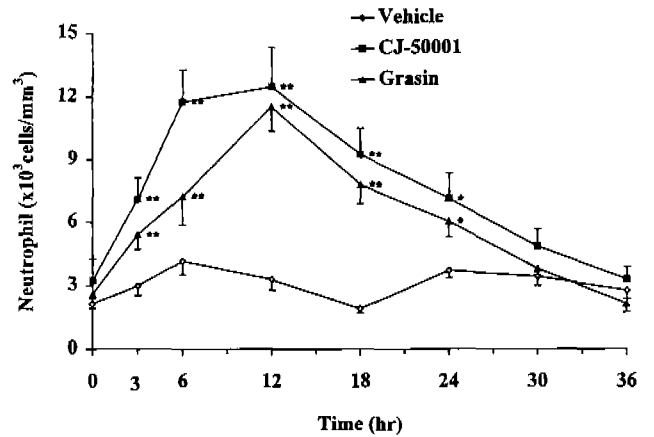


Fig. 1. Effect of CJ-50001 on neutrophils in number in male SD rat treated with 20 µg/kg of the compound (n=8). CJ-50001 and Grasin were given by single intravenous injection. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

**결 과**

**Rat에 단회투여후 시간에 따른 말초혈구수변화**

1) 말초호중구수 변화

정상 rat에 20 µg/kg 용량의 CJ-50001과 그라신을 정맥내 또는 피하로 단회 투여한 후 호중구수의 시간 경과적인 변화를 Fig. 1 및 2에 각각 나타내었다. 정맥내 투여에서는 CJ-50001 및 그라신 투여군 모두 투여후 3시간째부터 호중구수가 vehicle 투여군에 비하여 유의성 있게(P<0.01) 증가하였고 24시간째까지 vehicle 투여군에 비하여 유의성있는 차이가 지속되었다. CJ-50001 및 그라신 투여군 모두 12시간째에 호중구수의 증가는 최대가 되었고, 그라신 투여군과 CJ-50001 투여군 사이의 호중구수는 전시간에 걸쳐 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 피하투여에서는 CJ-

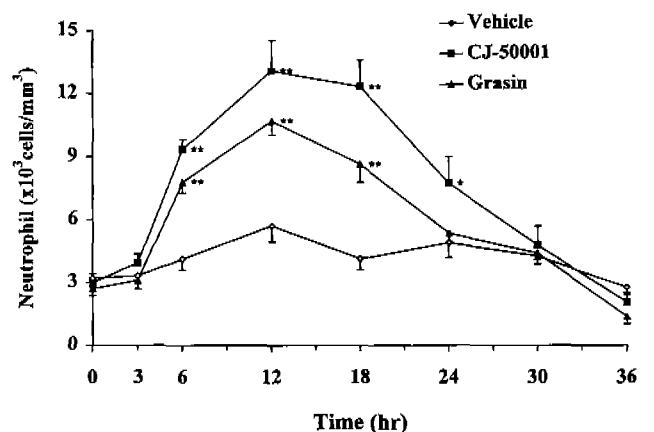


Fig. 2. Effect of CJ-50001 on neutrophils in number in male SD rat treated with 20 µg/kg of the compound (n=8). CJ-50001 and Grasin were given by single subcutaneous injection. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

50001 및 그라신 투여군 양쪽 모두 투여후 6시간째부터 호중구수가 vehicle 투여군에 비하여 유의성 있게( $P<0.01$ ) 증가하였고, 이 호중구수의 증가의 유의성있는 차이가 CJ-50001 투여군은 24시간, 그라신 투여군은 18시간 후까지 지속되었다. 호중구수 증가가 최대로 되는 시간은 CJ-50001 및 그라신 모두 투여후 12시간째였다.

2) 호중구수 이외의 말초혈구수에 대한 변화

CJ-50001 및 그라신을 정상 rat에 정맥내 또는 피하로 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 용량으로 단회투여하였을 때 임파구수, 호산구수, 단구수, 적혈구수, 적혈구용적비 및 혈소판수는 vehicle 투여군과 비교해 별다른 변화를 발견할 수 없었다.

Mouse에서 단회투여후 시간에 따른 말초혈구수 변화

1) 말초호중구수 변화

정상 mouse에 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  용량의 CJ-50001 및 그라신을 정맥내 및 피하로 단회투여한 후 말초호중구수의 시간에 따른 변화를 Fig. 3 및 4에 각각 나타내었다. 정맥내 투여에서 그라신 투여군은 투여후 3시간, CJ-50001 투여군은 6시간째부터 호중구수가 vehicle 투여군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며 3시간째에 그라신 투여군과 CJ-50001 투여군과의 유의성있는 차이는 없었다. Vehicle 투여군에 비하여 호중구수 증가의 차이는 그라신 투여군은 30시간, CJ-50001 투여군은 24시간째까지 계속되었으나, 30시간째에도 CJ-50001 투여군과 그라신 투여군 사이에 유의성은 없었다. 호중구수의 증가가 최대로 되는 시간은 그라신 투여군은 투여후 18시간째, CJ-50001 투여군은 12시간째였다. 피하로 투여하였을 때는 CJ-50001 및 그라신 투여군 양쪽 모두 투여후 6시간째부터 vehicle 투여군과 비교하여 호중구수가 유의성 있게( $P<0.01$ ) 증가하였고 Vehicle 투여군에 비하여 호중구수 증가의 차이는 양쪽 모두 24시간째까지

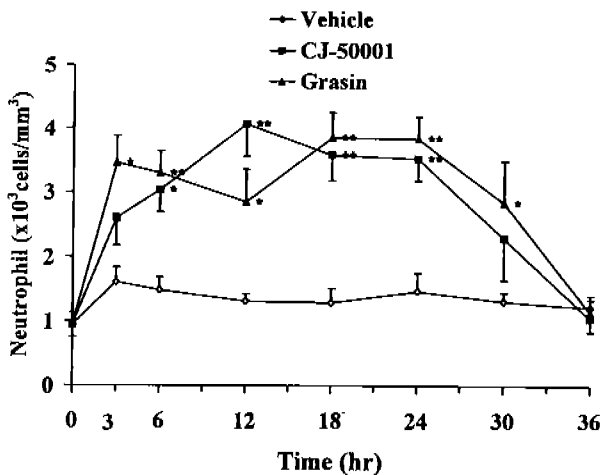


Fig. 3. Effect of CJ-50001 on neutrophils in number in male ICR mouse treated with 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of the compound (n=6). CJ-50001 and Grasin were given by single intravenous injection. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

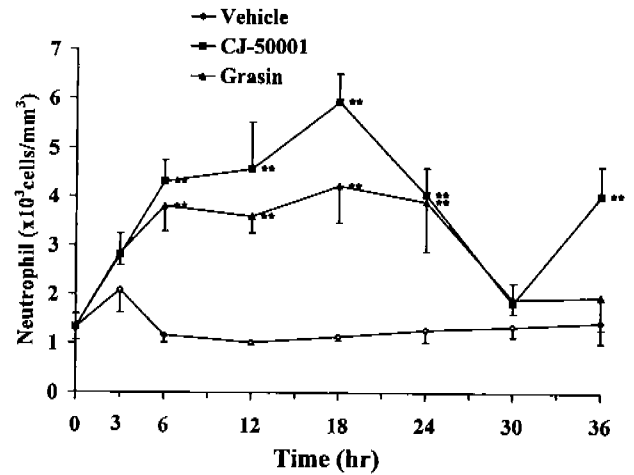


Fig. 4. Effect of CJ-50001 on neutrophils in number in male ICR mouse treated with 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of the compound (n=6). CJ-50001 and Grasin were given by single subcutaneous injection. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

지속되었다. 호중구수의 증가는 그라신 투여군은 30시간째부터는 정상으로 된 반면 CJ-50001 투여군은 30시간째에는 정상치로 되었다가 36시간째에는 다시 vehicle 투여군 및 그라신 투여군과도 유의성 있게( $P<0.05$ ) 증가하였다. 호중구수의 증가가 최대로 되는 시간은 양쪽 모두 투여후 18시간째였다.

2) 호중구수 이외의 말초혈구수에 대한 변화

CJ-50001 및 그라신을 정상 mouse에 정맥내 또는 피하로 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 용량으로 단회투여하였을 때 림프구수, 호산구수, 단구수, 적혈구수, 적혈구용적비 및 혈소판수는 vehicle 투여군과 비교해 별다른 변화를 발견할 수 없었다.

Mouse에서 용량상관성 시험

1) 말초호중구수변화

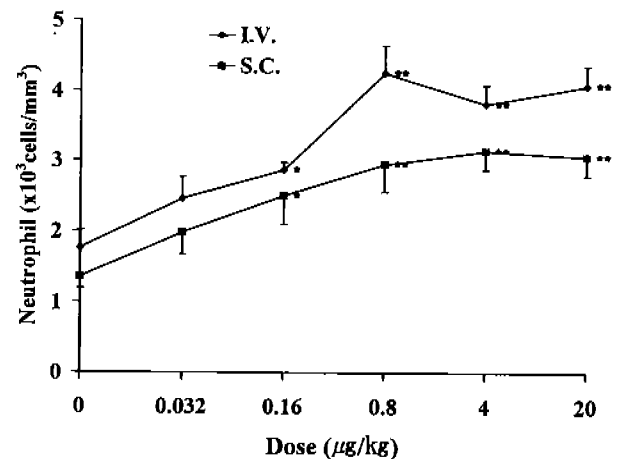


Fig. 5. Effect of CJ-50001 on neutrophils in number in male ICR mouse treated at various doses of CJ-50001 (n=6), 4 h after intravenous injection and 6 h after subcutaneous injection. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

CJ-50001을 32, 160, 800, 4,000 및 20,000 ng/kg의 용량으로 정맥내 또는 피하로 각각 투여하고 정맥내 투여는 투여후 4시간째, 피하투여는 6시간째에 각각 채혈하여 측정된 말초호중구수의 변화를 Fig. 5에 나타내었다. 정맥 및 피하투여 모두 160 ng/kg 투여군부터 vehicle 투여군과 비교하여 말초호중구수가 유의성 있게 증가하였다.

2) 호중구수 이외의 말초혈구수에 대한 변화

CJ-50001을 여러 용량으로 정맥 또는 피하로 투여하였을 때, 호중구수 이외의 말초혈구수에서는 vehicle 투여군과 비교해 CJ-50001의 용량에 의존한 어떠한 변화도 관찰할 수 없었다.

고 찰

본 연구소에서 개발한 rG-CSF인 CJ-50001의 약효를 검토하기 위하여 시판되고 있는 그라신(제일약품)을 비교약물로 사용하여, 정상 mouse와 rat에 정맥 또는 피하로 단회투여하여 말초호중구수의 시간에 따른 증가효과와 CJ-50001만의 용량상관성시험을 정상 mouse에서 정맥 또는 피하투여하여 실시하였다. 시간에 따른 증가효과 시험에서는 CJ-50001과 그라신 모두 투여경로 및 실험동물에 관계없이 투여 3~6시간 후에는 vehicle 투여군에 비하여 호중구수가 유의성 있게 증가하였다. 이 호중구수의 증가는 투여후 24~30시간째까지 계속됐으며 30~36시간째에는 vehicle 투여군과 비교하여 정상치로 되었다. 이와같이 빠른 rG-CSF의 약효는 rG-CSF가 골수 또는 혈관내벽변연의 호중구 pool에서 말초혈중으로 호중구가 나가는 것을 촉진시키는 작용에 의한 것으로 생각된다(Tamura 등, 1990). Mouse 피하투여에서 36시간째 CJ-50001 투여군의 호중구수가 다시 증가한 것은 실험적 오차에 의한 것이라고 사료된다. Mouse에서 정맥 또는 피하로 투여한 용량상관성 시험에서는 정맥 또는 피하투여 모두 160 ng/kg 이상의 용량에서

vehicle 투여군에 비하여 호중구수가 증가되었다. 이 증가는 800 ng/kg까지는 용량 의존적으로 증가하지만 그 이상의 용량인 4,000 및 20,000 ng/kg에서는 포화되어 용량의존성을 보이지 않았다. 또한 호중구수 이외의 말초혈구수에 대한 변화에서도 아무런 변화를 보이지 않았다. 이상의 모든 결과를 종합하여 볼 때 제일제당(주)에서 유전자재조합법으로 개발한 rG-CSF CJ-50001은 정상 mouse 및 rat에서 단회투여에 의해 말초호중구수를 증가시키는데 기존 제품인 그라신과 동등한 효과를 갖고 있다고 사료된다.

참고문헌

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.

Lieschke, G. J. and Bruggess, A. W. (1992). Granulocyte colony stimulating factor and granulocyte macrophage colony stimulating factor (1), (2). *N. Engl. J. Med.* **327**, 28-35, 99-106.

Nagata, S. (1994). Granulocyte colony stimulating factor and granulocyte and its receptor in *The Cytokine Handbook* (Thompson, A. Ed.), (Academic Press, New York), 371-385.

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.

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.

Tamura, M., Hattori, K., Sato, K., Oh-izumi, I., Yamamoto, O., Kaihou, S., Ochi, N., Kubota, N., Nagai, H., Imai, N., Ohkawa, H., Oh-ishi, T. and Nakano, T. (1990). The effect of a single administration of rG-CSF on the peripheral neutrophil levels and its dose responsiveness in normal animals. *Jpn. Pharmacol. Ther.* **18**, 249-260.