응용약물학회지, The Journal of Applied Pharmacology 6, 50-55(1998)

천연형 사람 적혈구 조혈인자의 항원성시험

강경구* · 조 현 · 백남기 · 김원배
동아제약(주)연구소

Antigenicity Study of Recombinant Human Erythropoietin

Kyung Koo KANG*, Hyeon CHO, Nam Gi BAIK, Won Bae KIM
47-5, Sanggal-ri, Kiheung-up, Youngin-si, Kyunggi-do, Korea 449-900
Research Laboratories, Dong-A Pharmaceutical Co. Ltd.

(Received October 14, 1997; accepted December 25, 1997)

Abstract – Antigenic potential of a recombinant human erythropoietin (rhEPO) produced by Dong-A Pharm. Co. Ltd. was examined by active systemic anaphylaxis (ASA) test in guinea pigs, mouse-rat passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reaction and passive hemagglutination (PHA) test. In ASA test, rhEPO induced the signs of restlessness, rubbing or licking nose, sneezing and coughing in the animals immunized with rhEPO 1000 IU/kg alone or rhEPO 1000 IU/kg incorporated into Freund's complete adjuvant. In the mouse-rat PCA test, only one of six sera from the animals immunized with rhEPO 1000 IU/kg incorporated into Alum showed positive result. In the PHA test, rhEPO revealed negative results in all of the rhEPO-immunized groups. From these results, rhEPO was considered to produce IgE in guinea pigs and mice, but not IgG and/or IgM in mice. The results of this study were similar to those of the other recombinant human erythropoietin and these positive results were thought to be caused due to the fact that rhEPO were heterogeneous proteins to guinea pigs and mice. Considering the fact that rhEPO has an identical structure with indigenous human erythropoietin, rhEPO is not thought to cause immunological problems in clinical use.

Keywords□ Recombinant Human Erythropoietin, Antigenicity

Erythropoietin(EPO)은 적혈구 조혈인자로 골수에서 적혈구 전구세포의 분화, 증식과 성장을 촉진하며(Joseph과 John, 1989; Ridley 등, 1994), 주로 신장의 세뇨관 주변세포(peritubular cell)나 내피세포 및 세뇨관 상피세포에서 생성되고 일부는 간에서 생성된다(Anagnostou, 1985; Michael과 Charles, 1989). EPO는 1977년 aplastic anemia 환자의 뇨에서 처음으로 순수하게 분리된 이래, 유전자 cloning과 아미노산 배열이 확인되었고 최근에는 유전공학기술을 이용한 재조합 사람 적혈구 조혈인자(recombinant human erythropoietin, rhEPO)의 대량생산이 가능해졌다(Miyake. 등, 1977; Jacobs 등, 1985; Lin 등, 1985; Goto 등, 1988). 이와 같은 rhEPO는 사람 뇨 유래의 천연형 EPO(urinary human erythropoietin, uhEPO)와 동일한 생리화학적, 면역학적, 약리학적 성질을 가져(Egrie 등, 1986; Davis 등, 1987) 실제 임상에서 큰 부작용없이 실혈이나 철분과 엽산의 결핍 혹은 성숙적혈구의 수명감소 등에 의한 빈혈과 만성 신부전에 의해 나타나는 빈혈의 치료제로 사용되고 있다. 또한 최근에는 감염 및 갑상선 호르몬 결핍, 류마티스성 관절염과 같은 만성질환, 악성종양, 적혈구 미성숙, 자가 수혈, AIDS 또는 종양의 치료제로 쓰이는 세포독성 물질 등에 의한 빈혈과 겸상 적혈구성 빈혈(sickle cell anemia)과 같은 다른 원인에 의한 빈혈의 치료에 까지 광범위하게 쓰이고 있다(Merrill, 1979; Cotes, 1988; Michale과 Charles, 1989; Vreugdenhil 등, 1993).

동아제약(주) 연구소에서는 유전자재조합기술을 이용하여 사람 적혈구 조혈인자와 동일한 아미노산 배열로 구성된 rhEPO를 baby hamster kidney(BHK) 세포에서 생산하였으며 만성신부전 및 기타 다른 원인에 의한 빈혈의 치료제로 개발 예정이다. 본 시험은 rhEPO의 안전성 연구의 일환으로 면역독성을 평가하기 위하여 실시하였다.

실험방법

시험물질

* To whom correspondence should be addressed.

본 연구소 생물공학연구실에서 생산한 rhEPO(Lot No.: B-003)를 사용하였으며, 양성대조물질로는 bovine serum albumin(BSA, Sigma)를 사용하였다. 면역보조제는 기니픽을 이용한 시험에서는 Freund's complete adjuvant(FCA, Difco)를, 마우스를 이용한 시험에서는 aluminium hydroxide gel (Alum, Serva)을 각각 사용하였다. 그외에 Evan's blue (Sigma), 생리식염수(대한약품공업(주)), 시험물질 전용매체대(pH 7.0), 면양적혈구(Korea Media Corp.), glutaraldehyde(Sigma), PBS(Sigma) 등을 사용하였다.

시험동물

C57BL/6계 수컷 마우스(5주령), Hartely계 기니픽(5주령) 및 Sprague-Dawley계 랫드(12주령)를 Charles River Japan 사로 부터 구입하여 1주이상 검역 및 예비사육후에 시험에 사용하였다. 시험기간 중 모든 동물은 온도 23±2℃, 습도 55±15%, 환기횟수 15-20회/시간, 조명시간 12시간(08:00-20:00)의 조건을 유지하였다. 음수는 자외선 멸균 수도수를, 사료는 랫드와 마우스에는 Purina 시험동물용 사료(방사선 멸균제)를 기니픽에는 기니픽용 고형사료(Oriental Yeast Co.)를 자유섭취 시켰다.

능동 전신성 아나필락시스(Active systemic anaphylaxis)

감작

군당 6마리의 guinea pig에 1군에는 매체대조물질, 2군에는 예정 임상 사용량인 EPO 100 IU/kg, 3군에는 예정 임상 사용량의 10배량인 EPO 1000 IU/kg의 감작항원을 주 2회씩 3주간 개체당 0.5 ml의 액량으로 5개소에 피하로 분할 투여 하였다. 4군에는 EPO와 FCA 동량 혼합액 1000 IU/kg을, 5군에는 BSA와 FCA 동량 혼합액 1 mg/head를 주 1회씩 3주간 동일한 방법으로 감작하였다(Table I).

유발

최종감작 3주후에 각군의 유발항원을 정맥내로 투여하여 ASA 반응을 관찰하였다. 증상은 유발항원 주사 후 2시간 동안 입모, 재채기, 배뇨, 호흡곤란, 경련, 기침, 폐사 등을 기록하여 아래의 기준에 준하여 판정하였다.

Grade 0(-) : 무증상
I(±) : Mild: 1-4의 증상
II(+) : Moderate: 1-10의 증상
III(++) : Severe: 1-19의 증상
IV(+++) : Death: 사망

0: 무증상, 1: restlessness, 2: piloerection, 3: tremor, 4: rubbing or licking nose, 5: sneezing, 6: coughing, 7: hyperpnea, 8: urination, 9: evacuation, 10: lacrimation, 11: dyspnea, 12: rhonchus, 13: cyanosis, 14: staggering gait, 15: jumping, 16: gasping and writhing, 17: convulsion, 18: side position, 19: Cheyne-Stokes respiration, 20: death.

Mouse-rat 수동 피부 아나필락시스(Passive cutaneous anaphylaxis)

감작

군당 6마리의 C57BL/6계 마우스에 1군에는 매체대조물질, 2군에는 EPO 100 IU/kg, 3군에는 EPO 1000 IU/kg의 감작항원을 주 2회씩 3주간 피하로 투여하였다. 4군에는 EPO와 Alum 동량 혼합액 1000 IU/kg을, 5군에는 BSA와 Alum 동량 혼합액 5 μg/head를 주 1회씩 3주간 복강내로 투여하여 감작하였다(Table II). 투여액량은 모두 10 ml/kg으로 하였다.

채혈

Table I. Experimental design for active systemic anaphylaxis test of rhEPO in guinea pigs

Group	No. of animals	Sensitization Ag[a]	Route of sensitization	Challenging Ag
1	6	Vehicle[b]	s.c.	Vehicle
2	6	EPO, 100 IU/kg	s.c.	EPO, 1000 IU/kg
3	6	EPO, 1000 IU/kg	s.c.	EPO, 1000 IU/kg
4	6	EPO+FCA, 1000 IU/kg	s.c.	EPO, 1000 IU/kg
5	6	BSA+FCA, 1 mg/head	s.c.	BSA, 10 mg/head

[a]Antigen b; Buffer.

Table II. Experimental design for mouse-rat passive cutaneous anaphylaxis reaction

Group	No. of animals	Sensitization Ag[a]	Route of sensitization	Challenging Ag
1	6	Vehicle[b]	s.c.	Vehicle
2	6	EPO, 100 IU/kg	s.c.	EPO, 1000 IU/kg
3	6	EPO, 1000 IU/kg	s.c.	EPO, 1000 IU/kg
4	6	EPO+Alum, 1000 IU/kg	i.p.	EPO, 1000 IU/kg
5	6	BSA+Alum, 5 μg/head	i.p.	BSA, 5 mg/head

[a]Antigen b; Buffer.

최종감작 2주 후에 각군 동물의 혈액을 채취하여 혈청을 분리, 냉동보관하였다.

24시간 mouse-rat PCA 반응

분리한 혈청을 생리식염수로 2배 단계희석하여 4-1024배로 희석한 다음 0.1 ml씩을 랫드 등부의 피내에 주사하고 주사 24시간 후에 1% Evan's blue를 함유한 각각의 유발항원 1ml을 랫드 미정맥내로 투여하였다. 그리고 30분 후에 랫드를 방혈치사시켜 피부 내측에 유출된 Evan's blue spot을 확인하여 반점의 장단경 평균이 5 mm 이상인 경우를 양성으로 판정하였으며, 항체가는 양성을 나타낸 최대 희석배수로 나타내었다.

간접 적혈구 응집반응

감작 및 채혈

Mouse-rat PCA 반응시험에서 얻어진 마우스 혈청을 이용하였다.

감작 적혈구의 제조

EPO로 피복된 감작 면양 적혈구는 Stratis 등(1969)의 방법에 준하여 제조하였다. 면양 적혈구를 PBS(0.15 M, pH 7.2)로 3회 세척한 다음, 적혈구 부유액에 EPO를 첨가하고 여기에 2.5% glutaraldehyde를 가하여 실온에서 1시간 동안 일정하게 stirring 하면서 반응시켰다. 반응 종료후 원심분리하여 적혈구를 세척하고 최종 1% 감작 적혈구 부유액을 제조하였다. BSA로 피복된 감작 면양 적혈구 부유액도 동일한 방법으로 제조 하였다.

Passive hemagglutination test

각 군 6마리의 혈청을 PBS를 이용하여 96 well microplate에 50 μl씩 2배 단계 희석하고(2-1024배), 각각의 항원으로 피복된 감작 면양 적혈구 부유액을 동량 첨가하였다. 각 well을 잘 혼합한 다음 실온에서 2-3시간 반응시켜 control의 혈구가 완전히 가라 앉은 후 각 well의 혈구 응집여부를 판정하였다. 항체가는 응집을 나타낸 혈청의 최대희석배수로 하였다.

실험결과

능동 전신성 아나필락시스

기니픽을 이용한 능동 전신성 아나필락시스 시험 결과는 Table III에 나타내었다. EPO 100 IU/kg을 감작한 군에서는 유발항원 주사후에 모든 동물이 증상을 나타내지 않

Table IV. Results of mouse-rat passive cutaneous anaphylaxis of rhEPO

Test substance	Dose	Route	No. of serum	Challenging Antigen		
				Vehicle	EPO	BSA
Vehicle[a]	-	s.c.	1	<4[b]	-[c]	-
			2	<4	-	-
			3	<4	-	-
			4	<4	-	-
			5	<4	-	-
			6	<4	-	-
EPO	100 IU/kg	s.c.	1	-	<4	-
			2	-	<4	-
			3	-	<4	-
			4	-	<4	-
			5	-	<4	-
			6	-	<4	-
	1000 IU/kg	s.c.	1	-	<4	-
			2	-	<4	-
			3	-	<4	-
			4	-	<4	-
			5	-	<4	-
			6	-	<4	-
EPO+Alum	1000 IU/kg	i.p.	1	-	4	-
			2	-	<4	-
			3	-	<4	-
			4	-	<4	-
			5	-	<4	-
			6	-	<4	-
BSA+Alum	5 μg/head	i.p.	1	-	-	64
			2	-	-	256
			3	-	-	64
			4	-	-	256
			5	-	-	128
			6	-	-	128

[a]Buffer, [b]PCA titer, [c]Not tested.

Table III. Results of active systemic anaphylaxis in guinea pigs

Test substance	Dose	Challenging Ag[b]	No. of animals	Severity[c]				
				0	I	II	III	IV
Vehicle[a]	-	Vehicle	6	6	0	0	0	0
EPO	100 IU/kg	EPO	6	6	0	0	0	0
	1000 IU/kg	EPO	6	4	2	0	0	0
EPO+FCA	1000 IU/kg	EPO	6	0	4	2	0	0
BSA+FCA	1 mg/head	BSA	6	0	0	0	0	6

[a]Buffer, [b]Antigen, [c]Grade, 0: Negative, I: Mild, II: Moderate, III: Severe, IV: Death.

Table V. Passive hemagglutination assay in the mice immunized with rhEPO

Test substance	Dose	Coated Ag[b]	No. of serum	Responsec						
				1	2	3	4	5	6	Mean
Vehicle[a]	-	EPO	6	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
EPO	100 IU/kg	EPO	6	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	1000 IU/kg	EPO	6	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
EPO+Alum	1000 IU/kg	EPO	6	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
BSA+Alum	5 μg/head	BSA	6	64	256	256	256	128	512	245.3

[a]Buffer, [b]Antigen, [c]PHA titer.

았다. EPO 1000 IU/kg으로 감작한 군에서는 6마리중 2마리에서 유발항원 주사후 코를 문지르거나 핥음, 불안 증상이 관찰되어 Grade I으로 판정되었으며, 4마리에서는 증상이 나타나지 않았다. EPO와 면역보조제를 혼합하여 감작한 군에서는 6마리중 4마리는 불안, 코를 핥거나 문지름의 증상이 나타나 Grade I으로 판정되었고, 6마리중 2마리에서는 불안, 코를 핥거나 문지름, 재채기, 기침의 증상을 보여 Grade II로 판정되었다. 한편, 양성대조군인 BSA 투여군에서는 유발항원 주사후 2-5분이내 재채기, 기침, 호흡곤란, 보행불안, 헉헉거리고 몸부림침, 횡와, 경련 등의 전형적인 아나필락시스 쇼크 증상을 보이며 모든 동물이 폐사하였다.

Mouse-rat PCA

마우스-랫드 PCA 시험결과는 Table IV와 같다. EPO를 단독으로 감작한 저용량군(100 IU/kg)과 고용량군(1000 IU/kg)에서는 모든 동물의 혈청에서 항체가 4이하로 검출한계 이하를 나타내었다. EPO와 Alum을 함께 감작한 군에서는 6마리중 1마리에서만 항체가 4를 나타내었고 나머지 5마리에서는 4이하의 항체가를 나타내었다. 한편 양성대조군인 BSA 감작군에서는 6마리중 2마리는 64, 2마리는 128, 2마리는 256의 항체가를 나타내었다.

간접 적혈구 응집반응

Mouse를 감작시켜 얻은 혈청으로 실시한 간접 적혈구 응집반응 시험 결과, EPO 100 및 1000 IU/kg 감작군과 EPO와 면역보조제를 혼합하여 감작한 시험군 모두에서 항체가가 2 이하로 검출한계 이하를 나타내었다. 한편, 양성대조군인 BSA 감작군에서는 모든 동물에서 64-512(평균 245.3)의 항체가를 나타내었다(Table V).

고 찰

동아제약(주) 연구소에서 유전자 재조합기술을 이용하여 BHK 세포에서 생산한 천연형 사람 적혈구 조혈인자의 항원성을 알아보기 위하여 기니픽에서 능동 전신성 아나필락시스 반응, 마우스-랫드에서 PCA 반응 및 간접 적혈구 응집반응을 실시하였다.

기니픽에서의 능동 전신성 아나필락시스 시험결과, EPO 저용량군(100 IU/kg)에서는 유발항원 주사후 모든 동물이 정상으로 나타났으며, 고용량군(1000 IU/kg)에서는 6마리중 2마리에서 불안, 코를 핥거나 문지름의 증상이 관찰되었고, 고용량과 면역보조제를 혼합하여 감작한 군에서는 6마리 모두에서 불안, 코를 핥거나 문지름, 재채기 등의 증상이 관찰되어 rhEPO는 고용량군 및 면역보조제와 혼합하여 투여한 시험군에서 약하나마 항원성이 있는 것으로 나타났다. 이와 같은 시험결과는 동계열의 약물인 epotin α와 epotin β의 면역독성시험에서도 나타난 것으로, epotin α는 토끼, 기니픽 및 마우스에서 항원성을 나타내었고, epotin β는 기니픽 PCA와 ASA 반응 시험에서 양성반응이 나타내었으나 임상시험에서는 항체생성이 관찰되지 않은 것으로 보고되어있다(日本醫藥情報センタ, 1996). 또한, 본 연구소에서 chinese hamster ovary(CHO) 세포에서 발현시킨 rhEPO의 면역독성시험에서도 ASA 시험결과 EPO 1000 IU/kg 투여군과 EPO+면역보조제 혼합 감작군에서 약한 항원성이 나타나 본 시험결과와 유사하였다(김 등, 1996). 그러나, 일반적으로 rhEPO는 면역학적 및 생물학적 활성이 사람 뇨 유래의 천연형 EPO와 동일하기 때문에 동물시험에서는 항원성이 인정되었으나 임상사용시 항체생성이나 면역관련 부작용은 문제되지 않는 것으로 알려져 있다(Casati 등, 1987; Cotes 등, 1987; Eschbach와 Adamson, 1988; Eschbach 등, 1987; Watson, 1989). 따라서 본 시험결과 EPO 고용량 투여군에서 나타난 항원성도 이종단백질인 rhEPO에 대한 동물의 정상적인 생체반응의 결과이며, 실제 임상에서 사용할 때는 사람의 천연형 EPO와 동일한 구조를 가져 큰 문제가 되지 않을 것으로 사료된다.

Mouse-rat 이종 PCA 반응은 IgE형의 항체 생성유무를 확인하는 시험계로 널리 이용되고 있다. 본 시험에서도 EPO를 단독 혹은 IgE형의 항체 형성을 촉진하는 Alum을 면역보조제로 사용하여 시험한 결과, EPO를 단독으로 감작한 저용량군과 고용량군에서는 모든 동물의 혈청에서 검출한

계 이하의 항체가를 나타내었고, EPO와 면역보조제를 혼합하여 감작한 군에서는 6마리중 1마리에서 항체가 4를 나타내어 rhEPO는 마우스에서도 약하나마 IgE 형의 항체생성능을 가지는 것으로 추정되었다. 이와 같은 시험결과 또한 동일계 약물인 epotin α와 epotin β의 면역독성시험에서 나타난 결과(日本醫藥情報センタ, 1996)와 동일하며, 본 연구소에서 CHO 세포를 이용하여 생산한 rhEPO의 항원성시험 결과(김 등, 1996)와도 동일한 것이었다.

간접 적혈구 응집반응에서는 EPO 저용량 및 고용량 감작군과 EPO와 면역보조제를 혼합하여 감작한 시험군의 모든 동물에서 2배이하의 항체가를 나타내 검출한계 이하였다. 일반적으로 PHA에는 IgG와 IgM이 관여하는 것으로 알려져 있는데 본 시험결과로 미루어 판단하면 rhEPO는 단독감작 및 Alum과 혼합 감작시 마우스에서 IgG나 IgM 계열의 항체는 형성시키지 않는 것으로 사료되었다. 이와 같은 시험결과 또한 본 연구소에서 CHO 세포에서 발현시킨 rhEPO의 면역독성시험의 결과와 유사한 것이었다.

이상의 기니픽 ASA, 마우스-랫드 PCA 그리고 PHA의 결과로부터 판단하면, rhEPO는 기니픽과 마우스에서 IgE 계열의 항체는 약하게 생성시키나 IgM 및 IgG 계열의 중화항체는 형성시키지 않는 것으로 사료된다. 그러나 이와 같은 시험결과는 기존의 epotin α나 epotin β와 같은 동일한 계열의 약물과 유사한 결과이고, 현재까지 임상에서 epotin α와 epotin β에 의한 항체형성이나 면역관련 부작용이 보고되지 않고 있는 점으로 미루어 이종단백질에 대한 동물의 정상적인 생체 반응의 결과로 사료되며, 실제 임상 사용시 rhEPO에 의한 면역관련 부작용은 없을 것으로 추정된다.

결 론

천연형 사람 적혈구 조혈인자 rhEPO의 안전성평가의 일환으로 면역독성시험을 실시한 결과, EPO는 기니픽을 이용한 능동 전신성 아나필락시스 반응에서 고용량 투여군과 고용량+면역보조제를 혼합하여 투여한 시험군에서 약한 항원성을 나타내었으며, 마우스-랫드 수동 피부 아나필락시스 반응에서는 EPO+면역보조제 혼합 투여군의 일부 동물에서만 약한 항원성을 나타내었다. 한편, 간접 적혈구 응집반응에서는 EPO를 투여한 모든 시험군에서 항체 형성이 관찰되지 않았다. 그러나 기니픽과 마우스에서 나타난 항원성은 재조합 사람 적혈구 조혈인자가 기니픽과 마우스에 이종단백질로 작용하기 때문에 나타난 정상적인 생체반응의 결과로 사료되며, 동계열의 적혈구 조혈인자에서도 공통적으로 인정되고 있다. 따라서, rhEPO가 사람의 천연형 EPO와 동일한 구조를 가지는 물질인 점을 고려하면 실제 임상에서는 rhEPO에 의한 면역관련 부작용은 희박할 것으로 예측된다.

참고문헌

Anagnostou, A. (1985). Erythropoietin: a hematopoietic hormone produced by the kidney. *Semin. Nephrol.* **5**, 104-114.

Casati, S., Passerini, P., Campise, M. R., Graziani, G., Cesana, B., Perisic, M. and Ponticelli, C. (1987). Benefits and risks of protracted treatment with human recombinant erythropoietin in patients having haemodialysis. *Br. Med. J.* **295**, 1017-1020.

Cotes, P. M. (1988). Erythropoietin: the developing story. *Br. Med. J.* **296**, 805-806.

Cotes, P. M., Pippard, M. J., Reid, C. D. L., Oliver, D. O. and Winearls, C. G. (1987). Continuing correction of anemia by treatment with recombinant erythropoietin in patients maintained by haemodialysis. *Exp. Hematol.* **15**, 437.

Davis, J. M., Arakawa, T., Strickland, T. W. and Yphantis, D. A. (1987). Characterization of recombinant human erythropoietin produced in chinese hamster ovary cell. *Biochemistry.* **26**, 2633-2638.

Egrie, J., Strickland, T. W. and Lane, J. (1986). Characterization and biological effects of recombinant human erythropoietin. *Immunobiology.* **172**, 213-224.

Eschbach, J. W. and Adamson, J. W. (1988). Recombinant human erythropoietin; Implications for nephrology. *Am. J. Kidney Dis.* **11**, 203-209.

Eschbach, J. W., Egrie, J. C., Downing, M. R., Browne, J. K., Adamson, J. W. (1987). Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin: result of a phase I and II clinical trial. *N. Engl. J. Med.* **316**, 73-78.

Goto, M., Akai, K., Murakami, A., Hashimoto, C., Tsuda, E., Ueda, M., Kawanishi, G., Takahashi, N., Ishimoto, A., Chiba, H. and Sasaki, R. (1988). Production of recombinant human erythropoietin in mammalian cells: host-cell depency of the biological activity of the cloned glycoprotein. *Bio/Technology.* **6**, 67-71.

Jacobs, K., Shoemaker, C. and Rudersdorf, R. (1985). Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature.* **313**, 806-810.

Joseph, W. E. and John, W. A. (1989). Guideline for recombinant human erythropoietin therapy. *Am. J. Kidney Dis.* **2**, 2-8.

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. Soc. USA.* **82**, 7580-7584.

Merrill, R. H. (1979). Iron metabolism in end stage renal disease, *Dialysis and transplantat.* **8**, 898-904.

Michael, H. S. and Charles, E. H. (1989). Recombinant human erythropoietin. *DICP.* **23**, 528-536.

Miyake. T., Kung, C. K. H. and Goldwasser, E. (1977). Purification of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* **252**, 5558-5564.

Ridley, D. M., Dawkins, F. and perlin, E. (1994). Erythropoietin: A review. *J. Natl. Med. Assoc.* **86**, 129-135.

Stratis, A., Bernadette, T. and Sylvaine, C. (1969). Glutaraldehyde, Cyanuric chloride and Tetrazotized o-diannisidine as coupling reagents in the passive hemagglutination test. *Immunochemistry.* **6**, 67-76.

Vreugdenhil, G., Frenken, L. A. M. and Keone, R. A. P. (1993). Erythropoietin: Mechanisms of action and indications for treatment. *Neth. J. Med.* **42**, 187-202.

Watson, A. J. (1989). Adverse effects of therapy for the correction of anemia in haemodialysis patients. *Semin. Nephrol.* **9**, 30-34.

日本醫藥情報センタ. (1996). 日本醫藥品集, pp. 279-284. 藥業時報社, 日本.

김범준, 남석우, 박종성, 강경구, 김원배, 한정환, 이병무, 이향우, 홍성렬. (1996). 기니픽과 마우스에서 천연형 재조합 사람 erythropoietin(EPO), DA-3285의 항원성. 응용약물학회지. **4**, 334-338.