

사람 적혈구 조혈인자 DA-3585의 토끼에 대한 단회 및 4주 반복투여 독성시험

조 현* · 김동환 · 강경구 · 백남기 · 김원배
동아제약(주)연구소

Single and 4-Week Repeated Dose Toxicity Studies of DA-3585, a Recombinant Human Erythropoietin, in Rabbits

Hyeon CHO*, Dong Hwan KIM, Kyung Koo KANG, Nam Gi BAIK and Won Bae KIM

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

(Received March 23, 1998; accepted June 1, 1998)

Abstract – DA-3585, a biosynthetic recombinant human erythropoietin has been developed as a treatment for anemia associated with chronic renal failure in Dong-A pharmaceutical Co. Ltd. This study was carried out to assess its acute and subacute toxicities in rabbits. DA-3585 was intravenously administered to rabbits at dose levels of 6250, 12500 or 25000 IU/kg for single dose toxicity study and at dose levels of 100, 500 or 2500 IU/kg/day for 4-week repeated dose toxicity study. In the acute toxicity study, dose up to 25000 IU/kg had no adverse effect on the behavior or body weight gain. Pathological examinations revealed no abnormal gross lesions related to DA-3585. In the subacute toxicity study, all animals survived until termination of treatment. DA-3585 had no influence on clinical signs, food and water intake or on body weight changes. Hematological examination showed increases in the number of RBC, hemoglobin contents and hematocrit values with a dose dependent manner in the animals treated with DA-3585. Histopathological examination revealed erythroid hyperplasia in the bone marrow and extramedullary hematopoiesis in the liver. The changes detected in the hematological and histopathological examination presumably represent exaggerated pharmacological effects of erythropoietin. The NOAEL (no-observed-adverse-effect-level) of DA-3585 was estimated to be 100 IU/kg/day under this study condition.

Keywords □ DA-3585, recombinant human erythropoietin, toxicity, rabbit

빈혈은 조직에 산소를 운반하는 순환혈액량과 헤모글로빈 부족에서 기인하는 혈액성 기능장애 증상이다(Jones 등, 1990). 조직으로 운반되는 산소의 부족으로 저산소증이 유발되는데, 이때 신장에서는 glycoprotein 호르몬인 erythropoietin(EPO)을 생성시켜 erythroid progenitor 세포의 생성과 이들 세포의 분화를 촉진함으로써 신체의 항상성을 유지한다(Robert 등, 1994; Faulds와 Sorkin, 1989). 그러나 만성신장질환 환자에서는 신장 기능 부전으로 인해 EPO의 생성 감소와 함께 빈혈이 지속된다. 이러한 빈혈을 개선하기 위해 자기수혈, 신장투석 등의 방법과 헤모글로빈 증가를 위해 androgen 치료법이 이용되었으나, EPO의 생성결핍이 빈혈의 직접적인 원인임이 확인됨으로써(Eschbach,

1989) 근본적인 치료제로서 EPO가 요구되었다. 최근에 DNA 유전자 재조합 기술의 발달로 chinese hamster ovary (CHO) 세포를 이용하여 recombinant human erythropoietin (rHu-EPO)을 생산할 수 있게 되었으며(Jacob 등, 1985), 만성신부전증 등의 신장성 질환 뿐만 아니라 류마티스성 관절염, AIDS, 암 그리고 AIDS 치료제인 zidovudine의 조혈 기능억제 등 다양한 원인에 의해 유발된 빈혈 치료에 rHu-EPO를 이용할 수 있게 되었다(Vreugdenhil 등, 1993; Faulds와 Sorkin, 1989). 현재까지 알려진 바에 따르면, rHu-EPO는 혈액의 점도나 헤모글로빈농도를 증가시켜 고혈압 등의 심혈관계 부작용을 유발할 수 있어(Urabe 등, 1988; Casati 등, 1987) 말기신부전증 치료시 환자에 대한 신중한 관찰이 요구되지만, 혈압상승 이외에는 EPO에 대한 약리학적 반응성 감소나 항체형성은 없는 것으로 알려져 있다(Eschbach

* To whom correspondence should be addressed.

등, 1989).

동아제약(주) 연구소에서는 baby hamster kidney(BHK) 세포를 이용하여 rHu-EPO(DA-3585)를 생산하였으며, 본 연구에서는 DA-3585의 안전성평가의 일환으로 토끼에 대한 단회 및 반복 투여 독성시험을 의약품 등의 독성시험기준(식품의약품안전본부, 1997)에 준하여 실시하였다.

실험방법

시험물질

시험물질인 DA-3585(Lot No.; B004)는 본 연구소 생물공학연구실에서 동결 상태로 공급받아 사용하였다. DA-3585는 165개의 아미노산기를 함유한 당단백질로 당화된 부분을 제외한 펩타이드만의 분자량은 약 18000 달톤인 무색 투명한 액체였으며, 순도는 99% 이상(SDS-PAGE법)이며 역가는 27419 IU/ml(ELISA법)였다. 시험물질은 -20℃에서 보관하였고, 사용시 실온에서 용해한 다음 formulation buffer인 희석용 완충용액으로 희석하여 시험에 이용하였다.

시험동물 및 사육환경

체중 2.5~3.0 kg의 New Zealand White계 토끼 암수 각각 20마리를 연암축산에서 구입하여 1주일간 순화 사육한 다음 본 시험에 사용하였다. 검역순화기간 및 시험기간 중 동물은 온도 23±2℃, 습도 55±15%, 환기회수 15-20회/시간, 조명시간 12시간(07:00-19:00)의 조건에서 사육하였다. 동물은 토끼용 스테인레스제 사육상자에 케이지당 1마리씩 분리 수용하였으며, 사료(토끼용 고형사료, 퓨리나)와 음수(수도수)는 자유 급식하였다.

단회투여 독성시험

1주일간의 순화사육 후 각군 동물의 체중 평균치를 균일하게 하여 군당 2마리씩 분리하였고, 용매 투여 대조군 1개군과 시험물질 투여군 3개군을 포함하여 총 4개군으로 구성하였다. 시험물질의 투여용량은 동계열 의약품의 급성독성자료와 임상사용량 등을 참고로 하여 25000 IU/kg을 최고 용량군으로 하고 이하 공비 2로 감소시켜 12500, 6250 IU/kg으로 설정하였다. 시험물질의 투여경로는 예상 임상 적용경로인 정맥으로 하였으며, 투여액량은 1 ml/kg으로 하였다. 시험물질 투여 후 7일간 일반상태, 체중변화를 관찰하고 부검을 실시하였으며, 육안적 병변이 관찰된 경우는 병리조직학적 검사를 실시하였다. 일반증상 관찰은 투여당 일에는 투여전 1회 및 투여 후 8시간까지는 수차례, 투여 익일부터 6일까지는 매일 2회씩(오전 및 오후) 실시하였으며, 체중은 군 분리일과 시험물질 투여 후 3일과 7일에 측정하였다.

4주 반복투여 독성시험

반복투여시험에서의 투여기간은 4주로 하였으며 예정임상경로인 정맥내 투여로 시험을 실시하였다. 순화사육 후

각 군간의 체중 평균치를 균일하게 하여 군당 3마리씩 군 분리한 후, DA-3585를 투여한 3개군과 희석용 완충액을 투여한 대조군 1개군을 포함하여 총 4개군으로 구성하였다. DA-3585의 투여용량은 동계열 의약품의 임상용량(50-100 IU/kg)과 급성독성 등의 기초자료를 참고로 하여 2500 IU/kg을 고용량으로 하고 이하 공비 1/5로 하여 500 IU/kg을 중용량군으로, 100 IU/kg을 저용량군으로 설정하였다. 시험물질은 1일 1회 4주 동안, 1 ml/kg의 투여액량으로 투여하였다. 시험기간 중 각 동물의 폐사 및 일반상태는 매일 오전 중에 관찰하여 소정의 양식지에 기록하였으며, 체중과 사료섭취량 및 음수섭취량은 주 2회 측정하였다. 시험개시전과 시험종료 직전에 모든 동물의 좌우안에 대해 안검 사용 검안경으로 전안부, 중간투광체 및 안저에 대한 안과학적검사를 실시하였다. 시험개시전 각 동물의 이개정맥에서 혈액을 채취하였고, 시험종료 후에는 모든 동물의 복대동맥에서 혈액을 채취하여 혈액학적검사와 혈액생화학적검사를 실시하였다. 혈액학적검사는 혈구자동측정기(Minos-vet, ABX사)를 이용하여 백혈구(WBC), 적혈구(RBC), 헤마토크리트치(HT), 헤모글로빈농도(HB), 평균혈구용적(MCV), 평균혈색소량(MCH), 평균혈구혈색소량(MCHC), 혈소판수(PLT)를 측정하였고, 슬라이드글라스에 혈액도말표본을 제작하여 0.5% modified Giemsa 용액으로 20분 동안 염색한 후 광학현미경(×400)을 이용하여 백혈구 백분율을 구하였다. PT(prothrombin time)와 APTT(activated partial thromboplastin time)의 측정은 혈장을 분리한 후, 자동응고시간측정기(Automated Coagulation Laboratory, Instrumentation Laboratory)를 이용하여 측정하였다. 혈액생화학적검사는 혈청을 분리한 다음 혈청자동분석기(Spectrum, Abbott사)를 이용하여 albumin, total protein, aspartate transaminase (AST), alanine transaminase(ALT), total bilirubin, inorganic phosphorus, urea nitrogen, creatinine, triglyceride, calcium, potassium, chloride, sodium, glucose, alkaline phosphatase (ALP) 등을 측정하였다. 뇨검사를 위해 시험개시전과 시험종료 후 각 군 동물의 뇨를 채취하여 뇨량을 측정하였고, 뇨 자동분석기(Clinitex 100, Ames사)를 이용하여 glucose, protein, ketone body, bilirubin, occult blood, pH, sediment 등을 검사하였다. 시험종료 후, 모든 동물을 pentobarbital로 마취하고 복대동맥을 절단하여 방혈, 치사시킨 후 부검을 실시하여 체강과 각 실질장기에 대한 육안적검사를 실시하였다. 각각의 병변을 관찰, 기록한 후 흉선, 폐장, 심장, 갑상선, 간장, 췌장, 비장, 신장, 부신, 정낭, 전립선, 정소, 난소, 자궁, 뇌 및 뇌하수체 등의 장기를 주위조직과 분리하여 각 장기의 절대중량을 측정하였으며, 체중에 대한 상대중량을 산출하였다. 골수 검사를 위해 부검한 각 동물의 흉골을 절제하여 10% 중성 포르말린에 고정한 후, 다시 탈회 용액(10% formic acid in 10% formalin)에 넣어 탈회시켰다.

병리조직학적 검사를 위해 증량을 측정된 장기와 흉골, 위, 소장, 대장, 임파절 등의 장기를 10% 중성 포르말린에 1주 이상 고정시킨 다음 통상적인 방법을 거쳐 조직절편을 제작하였으며, hematoxylin-eosin 염색을 한 후 광학현미경으로 병리조직학적 검사를 실시하였다.

통계학적 분석

본 시험에서 얻어진 체중, 사료섭취량, 음수섭취량, 혈액학적검사 결과, 혈액생화학학적검사 결과 및 장기중량측정 결과 등은 ANOVA를 실시하여 군간 유의성을 검정한 후 Duncans multiple range test를 실시하였고, 안과학적검사 결과와 병리조직학적검사 결과의 유의성 검정은 R×C Chi square test를 실시하였다. 뇨검사 결과는 Rank transformation을 실시한 후, Krustal-Wallis non-parametric ANOVA를 실시하여 α 값 0.05에서 유의하면 Distribution free multiple comparison을 실시하였다. 통계처리는 SAS(statistical analysis system) 통계 프로그램을 이용하였다.

실험결과

단회투여 독성시험

폐사율 및 임상증상

시험기간 중 DA-3585를 투여한 암수 모든 시험군에서 폐사된 동물이 관찰되지 않아 LD₅₀치는 암수 모두 25000 IU/kg 이상으로 나타났으며(Table I), 시험물질에 의한 것으로 판단되는 임상증상도 관찰되지 않았다

체중변화

모든 시험물질 투여군에서 대조군과 비교해 통계학적으로 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다(Fig. 1).

부검

시험 종료후 실시한 부검결과 각 군의 암수 모든 동물에서 시험물질의 영향으로 판단되는 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

4주 반복투여 독성시험

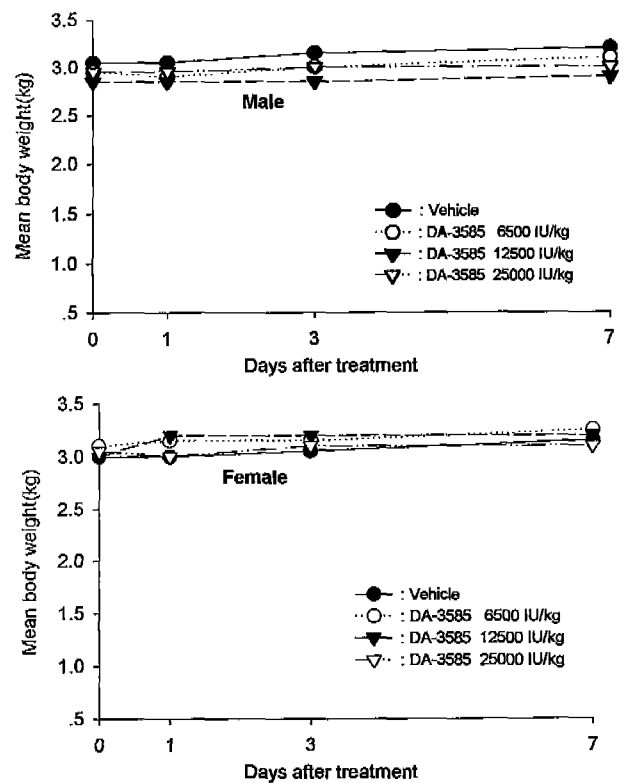


Fig. 1. Body weight changes in acute toxicity study of DA-3585.

폐사율 및 일반증상

시험물질을 투여한 모든 시험군에서 폐사된 동물은 없었으며, 시험물질과 연관된 것으로 판단되는 특기할만한 임상증상도 관찰되지 않았다(Table II).

체중, 사료 및 음수섭취량

DA-3585를 투여한 모든 시험군에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의성있는 체중변화나 사료섭취량의 변화는 관찰되지 않았다(Table III, Table IV). 음수섭취량은 수컷 고용량군과 암컷 중용량군에서 각각 시험물질 투여 후

Table I. Mortalities in acute toxicity study of DA-3585 in rabbits

Sex	Dose (IU/kg)	Days after administration							Final mortality
		1	2	3	4	5	6	7	
M	Vehicle	0 ^a	0	0	0	0	0	0	0/2(0%)
	6250	0	0	0	0	0	0	0	0/2(0%)
	12500	0	0	0	0	0	0	0	0/2(0%)
	25000	0	0	0	0	0	0	0	0/2(0%)
F	Vehicle	0	0	0	0	0	0	0	0/2(0%)
	6250	0	0	0	0	0	0	0	0/2(0%)
	12500	0	0	0	0	0	0	0	0/2(0%)
	25000	0	0	0	0	0	0	0	0/2(0%)

M; male, F; female. a; Number of examined animals.

Table II. Mortalities in rabbits intravenously treated with DA-3585 for 4 weeks

Sex	Dose (IU/kg)	Days after administration																			Final mortality															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		20	21	22	23	24	25	26	27	28						
M	Vehicle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
F	Vehicle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

M; male, F; female. Value are expressed as animal numbers.

Table III. Body weight changes in rabbits intravenously treated with DA-3585 for 4 weeks

Sex	Dose (IU/kg)	Days after administration																			(unit=kg)
		0	7	10	13	17	20	24	27	31											
M	Vehicle	2.43±0.67	2.53±0.50	2.53±0.64	2.64±0.66	2.70±0.64	2.72±0.66	2.78±0.88	2.81±0.61	2.83±0.60	2.85±0.72										
	100	2.43±0.23	2.47±0.21	2.53±0.06	2.59±0.05	2.61±0.05	2.70±0.12	2.70±0.11	2.71±0.16	2.78±0.14	2.89±0.16										
	500	2.40±0.10	2.43±0.06	2.43±0.15	2.55±0.11	2.60±0.12	2.66±0.10	2.67±0.13	2.73±0.17	2.73±0.11	2.85±0.17										
F	Vehicle	2.47±0.06	2.53±0.06	2.57±0.06	2.53±0.17	2.58±0.07	2.65±0.03	2.65±0.08	2.72±0.08	2.78±0.05	2.84±0.03										
	100	2.43±0.25	2.43±0.25	2.57±0.29	2.56±0.35	2.72±0.42	2.69±0.47	2.83±0.45	2.85±0.47	2.90±0.51	2.97±0.56										
	500	2.50±0.70	2.53±0.67	2.63±0.68	2.66±0.75	2.72±0.73	2.73±0.76	2.78±0.78	2.83±0.86	2.87±0.79	3.05±0.95										
2500	2.43±0.36	2.43±0.46	2.57±0.66	2.63±0.15	2.71±0.23	2.70±0.10	2.74±0.12	2.85±0.11	2.89±0.18	2.79±0.21											
2500	2.50±0.70	2.50±0.70	2.58±0.72	2.62±0.72	2.74±0.64	2.75±0.75	2.78±0.67	2.79±0.75	2.85±0.69	2.92±0.66											

Each value represents mean±S.D.

Table IV. Food consumptions in rabbits intravenously treated with DA-3585 for 4 weeks

Sex	Dose (IU/kg)	Days after administration																			(unit=g/day/animal)
		3	7	10	14	17	21	24	28												
M	Vehicle	98±79.4*	154±20.1	168±16.8	145±23.7	163±29.3	95±74.5	136±66.8	185±18.5												
	100	82±70.5	111±22.5	136±34.8	141±8.7	147±40.6	74±46.1	153±45.2	128±35.5												
	500	102±44.0	144±18.9	164±25.7	155±30.9	143±28.4	119±17.2	146±25.7	132±9.5												
F	Vehicle	116±7.5	140±24.5	121±27.5	121±46.1	157±31.9	107±39.3	108±31.4	125±27.8												
	100	145±72.3	158±44.1	144±82.1	166±67.5	137±72.2	147±64.1	145±72.2	137±38.1												
	500	126±22.7	167±35.5	187±85.7	179±40.5	193±36.7	132±30.1	143±53.7	149±63.2												
2500	98±20.2	150±5.6	160±20.9	132±8.6	172±26.0	123±12.6	163±30.4	143±122.8													
2500	133±50.2	138±49.1	192±51.3	137±56.5	165±39.5	224±191.7	181±29.1	128±62.7													

Each value represents mean±S.D. M; male, F; female.

Table V. Water consumptions in rabbits intravenously treated with DA-3585 for 4 weeks (unit=g/day/animal)

Sex	Dose (IU/kg)	Days after administration							
		3	7	10	14	17	21	24	28
M	Vehicle	3±2.0	165±127.9	190±199.3	44±48.8	147±174.2	230±197.6	14±2.5	145±173.9
	100	36±30.4	123±132.6	172±220.9	98±80.9	85±83.9	48±33.3	159±119.4	119±4.7
	500	11±11.4	142±144.4	82±73.2	128±131.3	81±130.5	124±131.4	122±173.8	34±26.0
	2500	128±11.1*	233±121.0	127±48.5	127±208.7	295±183.7	142±192.3	71±83.9	181±149.3
F	Vehicle	131±36.3	143±153.7	88±96.9	239±204.0	84±103.3	197±152.2	165±108.2	139±103.1
	100	143±68.3	102±80.0	122±122.1	159±126.8	218±40.5	173±75.4	167±185.9	84±63.4
	500	88±79.7	145±69.3	139±54.7	139±89.2	303±57.4*	226±97.3	337±61.5	258±84.5
	2500	127±109.6	22±21.4	193±51.6	133±111.7	139±100.0	121±94.6	271±156.8	273±110.2

Each value represents mean±S.D. *Significantly different from control group(p<0.05). M; male, F; female.

Table VI. Hematological parameters in male rabbits intravenously treated with DA-3585 for 4 weeks

Parameters	DA-3585 (IU/kg/day)			
	Vehicle	100	500	2500
WBC (10 ³ /mm ³)	9.2±2.35	11.5±2.76	9.9±3.99	10.3±1.66
Neutrophil	30.0±2.00	30.3±2.08	28.3±5.29	29.3±1.66
Eosinophil	0.7±1.15	0.7±0.58	0.3±0.58	0.3±0.48
Basophil	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00
Lymphocyte	66.3±0.58	68.0±2.65	68.0±4.93	66.3±2.52
Monocyte	3.0±1.00	3.3±1.53	3.3±3.06	3.3±1.00
RBC (10 ⁶ /mm ³)	6.2±0.29	6.5±0.38	7.6±0.24*	9.1±0.66 ^h
HB (g/dl)	13.9±0.17	14.8±0.55	17.9±10.40*	20.3±1.08*
HT (%)	34.7±1.11	36.8±1.10	45.8±1.25 ^h	53.1±2.23 ^h
MCV (μ ³)	56.3±1.53	57.0±2.65	60.7±1.53	58.3±1.53
MCH (pg)	22.5±0.93	22.8±0.93	23.7±0.23	22.2±0.87
MCHC (g/dl)	40.0±0.95	40.0±0.44	39.2±0.76	38.2±1.04
PLT (10 ³ /mm ³)	123.7±54.35	100.3±5.86	59.0±19.08	70.3±15.57

Each value represents mean±S.D. *Significantly different from control group(p<0.05).

Table VII. Hematological parameters in female rabbits intravenously treated with DA-3585 for 4 weeks

Parameters	DA-3585 (IU/kg/day)			
	Vehicle	100	500	2500
WBC (10 ³ /mm ³)	14.7±10.28	11.4±2.86	9.9±1.10	9.8±3.21
Neutrophil	21.3±3.21	22.7±5.03	21.3±3.18	22.9±0.58
Eosinophil	0.7±0.58	0.3±0.58	1.0±0.00	0.7±1.15
Basophil	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00
Lymphocyte	73.0±3.61	71.0±2.00	74.7±4.16	73.0±1.01
Monocyte	5.0±1.00	5.3±2.52	3.0±1.03	3.7±0.58
RBC (10 ⁶ /mm ³)	5.2±0.25	5.9±0.26	7.1±1.02	8.6±0.93 ^h
HB (g/dl)	11.9±0.67	13.2±0.51	17.4±3.11 ^h	19.8±1.15 ^h
HT (%)	30.2±1.10	33.1±1.50	43.3±7.41 ^h	52.8±3.36 ^h
MCV (μ ³)	57.7±3.51	56.0±0.00	61.0±2.65	61.7±3.06
MCH (pg)	22.7±2.01	22.4±0.32	24.4±1.07	22.9±1.20
MCHC (g/dl)	39.3±1.22	39.7±0.55	39.9±0.38	37.4±0.26 ^h
PLT (10 ³ /mm ³)	124.0±42.33	132.0±40.51	114.7±49.12	67.7±47.69

Each value represents mean±S.D. *Significantly different from control group(p<0.05).

3일째 및 17일째 통계학적으로 유의성 있는 증가를 나타내었다(Table V).

안과학적검사

각 군의 암수 모든 동물에서 안과학적 이상소견은 관찰

되지 않았다.

혈액학적검사

DA-3585를 투여한 암수 모든 용량군에서 적혈구 수, 헤모글로빈 농도 및 헤마토크리치가 용량의존적으로 증가

Table VIII. Biochemical parameters in male rabbits intravenously treated with DA-3585 for 4 weeks

Parameters	DA-3585 (IU/kg/day)			
	Vehicle	100	500	2500
Albumin (g/dl)	4.93±0.20	4.39±0.18	4.81±0.18	4.54±0.47
ALP (IU/L)	97.2±32.93	144.5±19.68	95.5±23.42	128.9±61.16
ALT (IU/L)	75.2±40.87	79.0±23.00	68.8±41.69	45.9±10.98
AST (IU/L)	47.5±24.17	50.1±13.65	35.3±8.78	37.5±8.59
Bilirubin (mg/dl)	0.23±0.26	0.19±0.09	0.19±0.01	0.40±0.20
Calcium (mg/dl)	14.8±0.75	14.7±0.41	15.2±1.03	15.5±0.65
Cholesterol (mg/dl)	48.6±9.41	71.3±60.32	35.2±7.73	56.3±26.00
Creatinine (mg/dl)	1.26±0.04	1.10±0.13	1.34±0.09	1.33±0.08
Glucose (mg/dl)	77.9±18.84	106.6±22.31	79.7±8.75	59.4±5.20
Phosphorus (mg/dl)	6.19±0.66	5.21±0.50	4.65±0.07*	4.19±0.39*
Protein (g/dl)	7.58±1.11	6.48±0.24	6.77±0.11	6.91±0.87
Triglyceride (mg/dl)	70.2±31.35	81.3±52.35	90.7±47.08	128.9±19.22
BUN (mg/dl)	15.6±3.42	16.4±0.09	18.7±18.74	16.6±3.72
Na (mmol/L)	157±2.7	155±5.8	152±2.1	156±8.4
K (mmol/L)	4.09±0.42	4.58±0.08	4.79±0.52	5.57±1.22 ⁺
Cl (mmol/L)	87.40±3.37	86.07±2.83	89.87±2.41	90.97±6.79
PT (sec)	8.1±0.15	8.1±0.09	8.1±0.05	8.1±0.20
APTT (sec)	39.6±6.43	42.2±6.85	40.6±6.01	48.7±1.64

Each value represents mean±S.D. *Significantly different from control group(p<0.05).

Table IX. Biochemical parameters in female rabbits intravenously treated with DA-3585 for 4 weeks

Parameters	DA-3585 (IU/kg/day)			
	Vehicle	100	500	2500
Albumin (g/dl)	3.31±2.36	3.94±1.38	4.37±0.04	4.32±0.21
ALP (IU/L)	71.8±67.64	68.8±53.58	102.6±20.12	66.4±3.08
ALT (IU/L)	8.4±21.54	3.3±2.16	5.7±16.40	4.4±21.08
AST (IU/L)	21.2±18.08	12.2±9.86	21.4±4.63	46.1±13.58
Bilirubin (mg/dl)	0.22±0.12	0.23±0.03	0.67±0.36	1.07±0.27*
Calcium (mg/dl)	12.0±4.82	15.5±1.23	18.5±4.32	16.2±0.59
Cholesterol (mg/dl)	62.3±28.85	48.5±26.04	54.4±15.64	76.2±17.26
Creatinine (mg/dl)	1.03±0.15	1.34±25.43	1.10±0.20	1.00±0.10
Glucose (mg/dl)	83.6±54.45	122.5±25.43	96.1±16.35	55.8±20.73
Phosphorus (mg/dl)	3.37±2.70	4.38±0.85	4.68±0.07	4.85±1.58
Protein (g/dl)	5.60±1.69	6.49±1.11	6.25±0.13	3.16±4.33
Triglyceride (mg/dl)	68.0±26.38	55.6±32.32	91.4±55.31	111.0±27.14
BUN (mg/dl)	14.7±11.15	18.0±2.16	19.7±2.63	20.1±1.90
Na (mmol/dl)	147±1.3	154±9.5	155±5.2	154±7.2
K (mmol/dl)	6.47±2.21	6.12±1.65	6.23±2.91	13.06±6.46
Cl (mmol/dl)	104.2±10.23	98.3±7.77	90.1±4.94 ⁺	83.3±3.44*
PT (sec)	8.1±0.05	8.0±0.06	8.0±0.05	8.1±0.14
APTT (sec)	54.6±16.73	42.4±4.84	69.3±24.73	54.6±17.33

Each value represents mean±S.D. *Significantly different from control group(p<0.05).

하였으며, 500 IU/kg 이상 투여군에서는 통계학적 유의성도 관찰되었다($p < 0.05$). 그외 시험물질과 용량상관성을 보이며 증가하거나 감소하는 항목은 없었으나, 암컷 고용량군에서는 MCHC치가 유의성있게 감소하였고 혈수판 수는 암수 모든 시험군에서 용량의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다(Table VI, VII).

혈액생화학적검사

수컷 동물의 경우 phosphorus치는 용량의존적인 감소를, potassium치는 용량의존적인 증가를 나타내었으며 각각 500 IU/kg 이상 투여군과 2500 IU/kg 투여군에서 통계학적 유의성도 관찰되었다($p < 0.05$). 암컷 동물의 경우에는 chloride치가 용량의존적으로 감소하며 500 IU/kg 이상 투여군에서 통계학적으로 유의성있는 차이를 나타내었다($p < 0.05$). 그외 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의성있는 변화를 나타낸 항목은 관찰되지 않았다(Table VIII, IX).

노검사

노량을 포함하여 glucose, nitrite, bilirubin, ketone, occult blood, pH, sediment 등의 모든 항목에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다(Table X).

부검 및 장기중량

시험종료 후 실시한 부검에서 육안적으로 이상을 나타낸 장기는 관찰되지 않았다. 절대장기중량에서는 수컷 동물의 경우, 심장의 무게는 모든 용량군에서 대조군과 비교해 유의성 있게 감소하였고, 뇌하수체는 중용량군에서 유의성있게 감소하였다($p < 0.05$). 암컷 동물의 경우에는 대조군과 비교하여 유의성있는 변화를 나타낸 장기는 관찰되지 않았다. 상대장기중량에서는 수컷동물의 경우 저용량군과 고용량군에서 뇌의 무게가, 저용량군에서 정낭의 무게가 통계학적으로 유의성있게 증가하였으며, 암컷 동물의 경우에는 고용량군에서 흉선의 무게가 유의성있게 증가하였다($p < 0.05$, Table XI, XII).

병리조직학적 검사

병리조직학적 검사결과, 간장에서는 extramedullary hematopoiesis가 DA-3585 500 IU/kg 이상 투여군의 암수 모든 동물에서 관찰되었고, 골수에서는 erythroid hyperplasia에 의한 조혈세포밀도의 증가와 적골수내의 지방공간(fat space) 감소가 시험물질을 투여한 암수 모든 용량군에서 관찰되었다(Table XIII). 그외, 시험물질의 영향으로 판단되는 조직학

Table X. Urinalysis in rabbits intravenously treated with DA-3585 for 4 weeks

Parameters		Male				Female			
		Vehicle	100	500	2500	Vehicle	100	500	2500
Volume	ml	55±49.8	26±10.4	53±51.7	21±11.4	36±10.2	24±7.2	27±16.9	47±38.5
Glucose	-	3	3	3	3	3	3	3	3
Bilirubin	-	1	0	3	2	1	2	3	2
	+	2	3	0	1	2	1	0	1
Ketone	-	2	1	2	3	1	1	2	2
	±	1	2	1	0	2	2	1	1
Occult blood	-	2	2	2	3	1	1	0	2
	±	0	0	0	0	0	0	1	0
	+	0	0	0	0	0	0	1	0
	++	0	0	0	0	1	1	0	0
	+++	1	1	1	0	1	1	1	1
pH	7.5	0	0	0	0	0	1	0	0
	8.0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8.5	2	3	3	3	3	2	3	3
	9.0	1	0	0	0	0	0	0	0
Protein	-	0	0	1	0	0	0	0	0
	+	0	0	1	1	1	1	0	1
	++	2	1	1	2	1	2	3	2
	+++	1	2	0	0	1	0	0	0
Urobilinogen	-	3	3	3	3	3	3	3	3
	+	0	0	0	0	0	0	0	0
WBC	-	3	3	3	3	3	3	3	3
Nitrite	-	3	2	3	3	3	3	3	3
	+	0	1	0	0	0	0	0	0
Sediment	-	3	3	3	3	3	3	3	3

Urine volume was expressed as mean±S.D. Other data expressed as the number of rabbits under grade.

Table XI. Absolute organ weights in rabbits intravenously treated with DA-3585 for 4 weeks

Items	Male				Female			
	Vehicle	100	500	2500	Vehicle	100	500	2500
Brain	8.6±1.58	9.3±0.20	8.9±0.38	9.6±0.37	8.8±0.62	9.5±0.37	9.0±0.91	9.2±1.48
Hypophysis	0.05±0.02	0.02±0.02	0.04±0.03 ^c	0.04±0.01	0.02±0.03	0.02±0.02	0.02±0.03	0.01±0.02
Heart	8.6±0.92	6.8±0.70 ^{bc}	7.1±0.46 ^{bc}	6.4±0.28 ^b	7.3±1.04	7.9±2.10	7.7±1.05	7.7±1.05
Liver	106±27.5	91±20.8	98±16.2	85±9.8	117±37.5	121±61.6	102±23.3	117±8.8
Kidney	19.4±3.00	18.6±3.54	17.2±1.64	17.3±0.76	21.9±3.07	19.3±4.42	21.3±2.56	20.9±3.89
Spleen	1.6±0.12	1.5±0.23	1.5±0.66	1.9±0.54	1.5±2.09	1.5±0.34	2.1±0.31	2.2±0.85
Prostate gl.	0.36±0.63	0.65±0.58	0.47±0.58	0.53±0.40	-	-	-	-
Uterus	-	-	-	-	2.3±1.20	5.1±4.28	4.1±2.40	3.1±2.10
Adrenal gl.	0.32±0.07	0.29±0.04	0.29±0.07	0.33±0.02	0.34±0.03	0.31±0.10	0.35±0.04	0.38±0.13
Testes	4.0±1.01	5.2±1.38	4.3±1.00	5.1±0.36	-	-	-	-
Ovaries	-	-	-	-	0.27±0.01	0.30±0.10	0.29±0.05	0.22±0.09
Lung	12.9±0.37	10.9±2.92	11.2±1.94	12.5±2.61	10.7±0.44	10.9±1.58	12.8±1.98	12.3±2.68
Salivary gl.	1.57±0.17	1.59±0.20	1.55±0.09	1.61±0.26	1.39±0.22	1.29±0.26	1.40±0.16	1.35±0.30
Thymus	6.9±3.16	5.2±2.12	5.9±2.36	4.7±0.87	3.7±1.98	6.0±2.76	5.5±0.83	6.0±1.87
SE ^a	1.35±0.27	1.91±0.40	1.92±0.34	0.93±0.29	-	-	-	-
Thyroid gl.	0.33±0.11	0.30±0.06	0.35±0.07	0.31±0.05	0.39±0.08	0.27±0.08	0.44±0.20	0.35±0.02

Each value represents mean±S.D. ^aSeminal vesicle. -; Not examined. ^bSignificantly different from control group(p<0.05).

Table XII. Relative organ weights in rabbits intravenously treated with DA-3585 for 4 weeks

Items	Male				Female			
	Vehicle	100	500	2500	Vehicle	100	500	2500
Brain	2.8±0.49	3.5±0.14 ^b	3.1±0.22	3.5±0.11 ^a	3.0±0.38	3.3±1.16	3.3±0.22	3.3±0.62
Hypophysis	0.02±0.00	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.00	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01
Heart	2.8±0.38	2.5±0.19	2.5±0.06	2.4±0.12	2.5±0.26	2.6±0.16	2.8±0.16	2.8±0.45
Liver	33.5±1.24	33.6±5.55	34.5±5.24	30.9±3.25	38.9±5.33	38.1±7.66	36.8±5.62	42.6±6.76
Kidney	6.2±0.54	6.9±0.89	6.1±0.81	6.3±0.35	7.5±1.05	6.5±0.89	7.7±0.35	7.5±0.69
Spleen	0.66±0.17	0.56±0.05	0.54±0.26	0.72±0.20	0.51±0.97	0.49±0.04	0.75±0.12	0.77±0.15
Prostate gl.	0.32±0.00	0.37±0.08	0.25±0.20	0.19±0.15	-	-	-	-
Uterus	-	-	-	-	0.77±0.39	1.47±0.89	1.55±1.00	1.03±0.02
Adrenal gl.	0.10±0.00	0.11±0.01	0.10±0.03	0.12±0.01	0.12±0.03	0.11±0.05	0.13±0.02	0.13±0.47
Testes	1.3±0.45	1.9±0.40	1.5±0.31	1.9±0.14	-	-	-	-
Ovaries	-	-	-	-	0.09±0.01	0.09±0.04	0.10±0.02	0.08±0.02
Lung	4.3±1.19	4.0±0.81	3.9±0.55	4.6±0.98	3.7±0.65	3.7±0.61	4.7±0.39	4.4±0.91
Salivary gl.	0.04±0.01	0.05±0.02	0.04±0.01	0.06±0.04	0.04±0.01	0.04±0.02	0.06±0.01	0.05±0.03
Thymus	2.1±0.55	1.9±0.81	2.1±0.93	1.7±0.30	1.2±0.65	1.9±0.28	2.0±0.29	2.1±0.35 ^b
SE ^a	0.43±0.06	0.72±0.19 [*]	0.68±0.12	0.34±0.11	-	-	-	-
Thyroid gl.	0.14±0.07	0.16±0.06	0.11±0.01	0.17±0.15	0.12±0.01	0.11±0.01	0.13±0.03	0.13±0.02

Each value represents mean±S.D. ^aSeminal vesicle. -; Not examined. ^bSignificantly different from control group(p<0.05).

적 이상소견은 관찰되지 않았다.

고 찰

DA-3585는 동아제약(주) 연구소에서 유전자 재조합 기술을 이용하여 BHK 세포에서 생산한 천연형 사람 적혈구 조혈인자로 과다출혈, 만성신부전증 등 다양한 원인에 의

해 야기되는 빈혈을 치료하기 위한 목적으로 생산하였으며, 본 시험에서는 이에 대한 안전성 평가의 하나로써 토끼에 대한 단회 및 4주간 반복투여 독성시험을 실시하였다.

단회투여 독성시험결과, DA-3585는 25000 IU/kg을 투여한 최고용량군까지 시험물질에 의한 것으로 판단되는 임상 증상이나 체중변화 및 부검시 이상소견을 나타내지 않았으며, 폐사된 동물도 없어 LD₅₀치는 암수 모두 25000 IU/kg

Table XIII. Histopathological findings in rabbits intravenously treated with DA-3585 for 4 weeks

Organs and Findings	Group	DA-3585 (IU/kg/day)							
		Vehicle		100		500		2500	
	Sex	M	F	M	F	M	F	M	F
Brain		(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)
Within normal limits		3	3	3	3	3	3	3	3
Eye		(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)
Within normal limits		3	3	3	3	3	3	3	3
Lung		(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)
Congestion		1	0	0	0	1	1	0	0
Interstitial pneumonia		1	1	0	1	1	0	1	0
Trachea		(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)
Within normal limits		3	3	3	3	3	3	3	3
Thyroid gland		(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)
Within normal limits		3	3	3	3	3	3	3	3
Salivary gland		(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)
Within normal limits		3	3	3	3	3	3	3	3
Heart		(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)
Within normal limits		3	3	3	3	3	3	3	3
Thymus		(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)
Within normal limits		3	3	3	3	3	3	3	3
Liver		(3)	(3)	(0)	(0)	(0)	(3)	(3)	(3)
Vacuolar degeneration		0	0	1	0	0	1	1	1
Slight congestion		1	1	0	2	1	1	0	1
Extramedullary hematopoiesis		0	0	0	1	2	3	3	3
Gastrointestinal tract		(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)
Within normal limits		3	3	3	3	3	3	3	3
Spleen		(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)
Erythroid hyperplasia		0	0	0	0	2	3	3	3
Kidney		(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)
Within normal limits		3	3	3	3	3	3	3	3
Adrenal gland		(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)
Within normal limits		3	3	3	3	3	3	3	3
Bone marrow(Sternum)		(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)
Erythroid hyperplasia		0	0	3	3	3	3	3	3
Urinary bladder		(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)
Within normal limits		3	3	3	3	3	3	3	3
Testis		(3)	-	(3)	-	(3)	-	(3)	-
Within normal limits		3	-	3	-	3	-	3	-
Seminal gland		(3)	-	(3)	-	(3)	-	(3)	-
Within normal limits		3	-	3	-	3	-	3	-
Prostate		(3)	-	(3)	-	(3)	-	(3)	-
Within normal limits		3	-	3	-	3	-	3	-
Ovary		-	(3)	-	(3)	-	(3)	-	(3)
Within normal limits		-	3	-	3	-	3	-	3
Uterus		-	(3)	-	(3)	-	(3)	-	(3)
Within normal limits		-	3	-	3	-	3	-	3

M; male, F; female, Code; ()=Number of animals examined.

이상으로 나타났다. 동계열 의약품인 rHu-EPO의 임상사용량이 50~100 IU/kg인 점으로 미루어 볼 때, 이와 같은 시

험결과는 토끼에 DA-3585를 임상사용량의 약 250 배까지 투여해도 독성이 발현되지 않음을 의미한다. 한편, Spicer

와 Wisler(1990a) 및 임 등(1994)도 각각 마우스 유래 C127 세포와 CHO(chinese hamster ovary) 세포에서 발현시킨 rHu-EPO를 사용하여 랫드와 개 및 원숭이에서 급성독성시험을 실시한 결과, 시험물질과 연관된 독성증상은 관찰되지 않았으며 LD₅₀치는 모두 20000 IU/kg 이상이라고 하여 본 시험 결과와 유사하였다(Spicer와 Wisler, 1990a; 임 등, 1994).

4주 반복투여시험에서 DA-3585를 투여한 고용량군(2500 IU/kg) 이하 모든 시험군에서 시험물질의 영향으로 판단되는 폐사나 임상증상은 관찰되지 않았고, 체중이나 사료 섭취량에 있어서도 대조군과 비교하여 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다. 한편, 음수 섭취량은 수컷 고용량군의 경우 시험물질 투여 후 3일째, 암컷 중용량군의 경우 투여 17일째 대조군과 비교해 통계학적으로 유의성있게 증가되었으나, 용량상관성이 부족하였고 시험기간동안 지속적으로 유의성있는 변화가 없었던 점에 미루어 독성학적 의의는 없는 일시적인 증가로서 사료되었다.

일반적으로 rHu-EPO는 랫드 및 기타 실험동물에서 적혈구수, 헤모글로빈농도, 헤마토크리트치 등을 용량 의존적으로 증가시키는 것으로 알려져 있는데(Faulds와 Sorkin, 1989; Kim 등, 1994), 본 시험에서도 DA-3585를 투여한 암·수 모든 시험군에서 적혈구수, 헤모글로빈 농도, 헤마토크리트치가 용량 의존적으로 증가하였다. 이와 같은 시험결과는 동계열 의약품인 CHO 세포 유래 rHu-EPO의 랫드에 대한 아급성 독성시험 결과와도 유사한 것으로서, 이는 EPO의 약리학 작용에 의한 정상적인 신체반응에 의해 나타난 것으로 판단되었다(Spicer와 Wisler, 1990b). 그의 혈액학적 검사에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의성 있는 변화로는 암컷 고용량군에서 MCHC치의 감소가 관찰되었다. Eschbach 등(1989)과 Robert 등(1994)은 rHu-EPO 투여시 성숙적혈구 뿐만 아니라 미성숙적혈구인 reticulocyte도 동시에 분화 증식될 수 있으나, 미성숙적혈구가 증가하게 되는 경우에는 전체 혈액 중의 적혈구용적(헤마토크리트치)은 증가하지만 미성숙적혈구내에 충분한 량의 헤모글로빈이 함유되어 있지 않기 때문에 헤모글로빈농도는 감소하여, 결국 MCHC의 감소가 나타난다고 하였다(Eschbach 등, 1989; Robert 등, 1994). 이와 같은 점에 미루어 볼 때, 본 시험결과 암컷 동물에서 관찰된 MCHC의 감소도 이와 유사한 기전에 의해 유발된 것으로 추정되며, 이것 또한 rHu-EPO의 약리학 작용에 의한 것으로 독성학적인 변화는 아닌 것으로 판단되었다. 한편, rHu-EPO는 단회 투여한 경우 랫드와 마우스에서 용량상관성 있게 혈소판 생성을 자극하지만(Berridge 등, 1988; Mcdonald 등, 1987), 대량을 지속적으로 투여하는 경우에는 오히려 활성화된 적혈구 전구세포가 혈소판 전구세포를 경쟁적으로 억제함으로써 혈소판 감소를 유발한다고 알려져 있는데(Mcdonald와 Sullivan, 1993), 본 시험에서도 통계학적 유의성은 없었으나 용량의존적인 혈

소판 감소가 관찰되어 기존의 결과와 유사하였다.

Serum phosphorus의 감소는 드물게 나타나며 식이 변화, 신장에서의 배설감소 그리고 칼슘과 연관된 호르몬의 불균형에 의해 달라진다(Robert 등, 1994). 본 시험 결과, 수컷 중용량군과 고용량군에서 phosphorus치의 유의성있는 감소가 관찰되었으나($p < 0.05$), 이는 생리적 정상범위에 해당하였으며, 병리조직학적검사 결과 신장에서 이상소견이 관찰되지 않았고, 암수 시험군의 혈청 칼슘치도 대조군과 비교하여 유의성있는 변화가 없었던 점으로 미루어 독성학적으로 의의 있는 변화는 아닌 것으로 판단되었다. 그리고 potassium과 chloride치도 각각 수컷 고용량군과 암컷 중용량군 이상 투여군에서 유의성있는 증가와 감소를 나타내었으나($p < 0.05$), 모두 생리학적인 정상범위를 벗어나지 않는 변화인 점으로 미루어 시험물질에 의한 독성변화는 아닌 것으로 추정되었다.

장기중량에서는 수컷 동물의 심장, 뇌하수체, 뇌, 정낭과 암컷 동물의 흉선 등이 통계학적 유의성을 나타내며 증가하거나 감소하였으나, 시험군간에 용량상관성을 나타내지 않았으며, 해당 장기들의 육안적 관찰과 함께 병리조직학적검사에서도 특기할 만한 이상소견은 관찰되지 않았던 것으로 보아 DA-3585에 의한 영향은 아닌 것으로 사료되었다. 병리조직학적검사 결과, 간에서 extramedullary hematopoiesis와 bone marrow에서 erythroid hyperplasia 소견이 관찰되었는데 이는 EPO의 약리학 작용으로 나타난 변화로 이미 언급되었던 적혈구 수 증가 등의 혈액학적검사 결과를 뒷받침 해 주는 조직학적 변화로 판단되었다.

이상의 결과를 종합하면 동아제약(주) 연구소에서 유전자 재조합 기술을 이용하여 생산한 DA-3585는 토끼에 단회 정맥투여시 25000 IU/kg 용량까지 특기할 만한 독성증상을 유발하지 않았으며 LD₅₀치는 암·수 각각 25000 IU/kg 이상인 것으로 나타났다. 또한 4주간 반복 정맥투여시 과도한 약리학 작용에 의한 결과로서 인정되는 적혈구수(RBC), 헤마토크리트치(HT), 헤모글로빈 농도(HB) 증가 등 혈액학적변화가 암·수 500 IU/kg 이상 투여군부터 통계학적으로 유의성있게 증가되었고, 이에 동반하여 관찰되었던 조직학적변화에서 골수조직의 조혈세포밀도 증가 등의 소견을 고려해 볼 때, DA-3585의 4주 반복 정맥투여에서 토끼에 대한 무해용량(no-observed adverse-effect-level, NOAEL)은 100 IU/kg/day로 판단되었다.

참고문헌

- Berridge, M. V., Fraser, J. K., Carter, J. M. and Lin, F. K. (1988). Effects of recombinant human erythropoietin on megakaryocytes and on the platelet production in the rats. *Blood*, 72: 970-977.
- Casati, S., Passerini, P., Campise, M. R., Graziani, G. and Ce-

- sana, B. (1987). Benefits and risks of protracted treatment with human recombinant erythropoietin in patients having hemodialysis. *British Medical Journal*, **295**: 1017-1020.
- Eschbach, J. W. (1989). The anemia of chronic renal failure: pathophysiology and the effects of recombinant erythropoietin. *Kidney International*, **35**: 134-148.
- Eschbach, J. W., Egrie, J. C., Downino, M. R., Brownie, J. K. and Adamson, J. W. (1989). Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin(rHu-EPO): results of combined phase I and II clinical trial, *New England Journal of Medicine*, **316**: 73-78.
- Faulds, D. and Sorkin, E. M. (1989). Epoetin(recombinant human erythropoietin): a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in an anemia and the stimulation of erythropoiesis. *Drugs*, **38**: 863-899.
- Jacob, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neil, S. D., Kaufman, R. J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S. S., Hewick, R., Fritsch, F. F., Kawakita, M., Shimizu, T. and Miyake, T. (1985). Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*, **313**: 806-810.
- Jones, J. G., Holland, B. M., Hudson, I. R. B. and Wardrop, C. (1990). Total circulating red cells versus hematocrit as the primary descriptor of oxygen transport by the blood. *British Journal of Hematology*, **76**: 288-294.
- 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. *The Korean Journal of Applied Pharmacology*, **2**: 343-346.
- McDonald, T. P., Cottrell, M. B., Clift, R. E., Cullen, W. C. and Lin, F. K. (1987). High doses of recombinant erythropoietin stimulates platelet production in mice. *Experimental Hematology*, **15**: 719-721.
- McDonald, T. P. and Sullivan, P. S. (1993). Megakaryocytic and erythrocytic cell lines share a common precursor cell. *Experimental Hematology*, **21**: 1316-1320.
- Robert, D. J., Prasse, K. W. and Mahaffey, E. A. (1994). Erythrocyte. In *Veterinary Laboratory Medicine* (3rd ed), pp. 3-36. Iowa State University Press., Ames, Iowa.
- Spicer, E. J. F. and Wisler, J. A. (1990a). Acute, subcutaneous and intravenous toxicity studies in rats and monkeys with TYB-5220. *Jpn. Pharmacol. Ther.*, **18**(Suppl 5), s973-s1034.
- Spicer, E. J. F. and Wisler, J. A. (1990b). 28 day intravenous toxicity studies of TYB-5220 in rats and monkeys with a 28 recovery period: a recombinant human erythropoietin. *Jpn. Pharmacol. Ther.*, **18**(suppl 5): 107-206.
- Urabe, A., Takaku, F., Miziguchi, H., Kubo, K. and Ota, K. (1988). Effect of recombinant human erythropoietin on the anemia of chronic renal failure. *International Journal of Cell Cloning*, **6**: 179-191.
- Vreugdenhil, G., Frenken, L. A. M. and Koene, R. A. P. (1993). Erythropoietin: mechanisms of action and indications for treatment. *Netherlands Journal of Medicine*, **42**: 187-202.
- 임동문, 정성목, 조효진, 김달현, 박관하, 오명석, 김현수. (1994). 유전공학 재조합방법에 의 해 CHO 세포에서 생산된 Erythropoietin(EPO)의 Rat 및 Dog에서의 급성독성. *Korean Journal of Toxicology*, **10**: 237-241.