

## 유전자 재조합 사람형 erythropoietin, GC-rhEPO의 약물동태 및 조직분포

김선돈 · 한성규 · 이호성 · 김성남 · 정원휘 · 백대현 · 조은성 · 허재욱<sup>1</sup> · 류판동\*

서울대학교 수의과대학 약리학교실, 경기도 수원시 권선구 서둔동 103, 441-744

<sup>1</sup>(주)녹십자 종합연구소 경기도 용인시 기흥읍 구갈리 227-3, 449-900

## Pharmacokinetics and Tissue Distribution of a Recombinant Human Erythropoietin, GC-rhEPO

Sun Don KIM, Seong Kyu HAN, Ho Sung LEE, Seong Nam KIM, Wonee CHONG, Dae Hyun BAEK,  
Eun sung CHO, Jae Wook HUH<sup>1</sup> and Pan Dong RYU\*

Department of Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, 103, Seodundong Kwonseungu,  
Suwon, 441-744

<sup>1</sup>Central Research institute, Korea Green Cross Corporation, 227-3 Kugal-ri, Kiheung-eup, Yongin City, Kyunggi-do 449-900

(Received May 12, 2000; accepted June 3, 2000)

**Abstract**—To evaluate the pharmacokinetic properties and tissue distribution of a newly developed recombinant human erythropoietin (GC-rhEPO), we analyzed the plasma and tissue levels of erythropoietin by an ELISA after intravenous (IV) and subcutaneous (SC) administration to the male rats at the doses of 20, 100, 500 or 2,500 unit/kg. After single IV bolus injection of GC-rhEPO, the plasma concentration was rapidly increased and decreased with two phases with half-lives of 13.4 min and 2.94 hours. AUC was increased dose-dependently but plasma half-lives remained constant regardless of GC-rhEPO doses. Following SC administration, the plasma concentration increased slowly with half-life of 9.2 hours and reached peak at 8 hours. Mean residence time and bioavailability were 18.2 hours and 44 %, respectively. After single IV dose of 100 unit/kg, tissue GC-rhEPO level was higher in bone marrow and spleen, while the depletion rate was slower in liver and bone marrow, indicating the higher affinity of GC-rhEPO to bone marrow. Taken together, the experimental results indicate that GC-rhEPO contained the typical pharmacokinetic properties and the tissue distribution patterns inherent to human erythropoietin.

**Key words** □ GC-rhEPO, ELISA, Pharmacokinetics, Tissue distribution, Bioavailability.

Erythropoietin (EPO)은 적혈구의 생성을 촉진하는 호르몬으로 165 개의 아미노산(18 kDa)과 당류를 포함하는 분자량 30kDa의 당단백질이다 (Lai 등, 1986; Davis 등, 1987). EPO는 태아기에는 간장에서 생성분비되나, 성장후에는 신장에서 주로 생성 분비된다(Zanjani 등, 1977; Zanjani 등, 1981). EPO는 1906년에 그 존재가능성이 처음 확인된 후, 1977년에 순수 분리되었으며 (Miyake 등, 1977), 80년대에는 유전자가 규명되고 이어서 유전자조작법에 의하여 대량생산이 가능하게되었다 (Jacobs 등, 1985; Lin 등, 1985). 현재, EPO는 빈혈증상의 치료에 중요한 치료제의 하나로 특히 혈액투석에 의존하는 말기신부전증 환자의 빈혈증 치료, AZT를 투여받는 AIDS 환자의 빈혈

증 치료, 자기수혈이나 항암제 투여로 인한 골수발육억제 증상의 치료에 특효약으로 권장되고 있다 (Fisher, 1997).

EPO의 임상적 중요성이 부각됨에 따라 이에 대한 연구도 활발히 진행되었으며, 이에 대한 종설 (review)만 해도 수십 편에 이른다. EPO에 대하여 90년대 초를 전후하여 알려진 몇 가지 새로운 사실로는 간장과 신장에서의 EPO 생성의 cellular site 의 발견, ELISA를 이용한 EPO의 정량법 개발, EPO의 약물동태 및 아침에 높고 저녁에는 낮아지는 혈중농도의 일주기 현상의 발견 (Wide 등, 1988), EPO 생성과 관련된 신호전달인자의 발견, 그리고 EPO 수용체의 정제 및 유전자에 대한 규명 등이 있다 (Fisher, 1997).

EPO의 정량은 polycythemic mouse를 이용한 bioassay 법, radioimmunoassay (RIA)법, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 법이 있다. 이 세가지 방법간에는 광범

\*To whom correspondence should be addressed.

위한 농도에서 서로 상관성이 있음이 증명되었다 (Goto 등, 1989; Ma 등, 1992; Sakada 등, 1995). 이중 bioassay법은 여전히 국제적인 표준정량법으로 인정되고 있으나, 비용과 시간이 많이 소요되며, 고난도의 기법이 요구되기 때문에 특별한 실험실에서만 가능하다. 반면에 RIA와 ELISA법은 간편하면서도 정확도 (precision)가 bioassay법보다 높기 때문에 널리 이용되고 있다. 이러한 EPO의 정량은 EPO의 약물동태에 대한 연구뿐만 아니라, 혈중 EPO의 농도는 hematocrit 값 및 hemoglobin 농도와 함께 빈혈증상의 진단과 치료에 중요한 지표로도 이용되고 있다 (McGonigle 등, 1985; Wide 등, 1988).

본 연구에서는 주식회사 녹십자에서 자체 개발한 유전자 재조합 사람 EPO (Green Cross recombinant human EPO, GC-rhEPO)의 약동력학적 성질을 밝히기 위하여 ELISA법을 이용하여 랫드에서 약물의 투여용량, 투여경로, 반복투여와 약물속도정수의 관련성을 조사하였으며, 아울러 정맥투여 후의 약물의 조직별 분포 및 소실정도를 조사하였다.

## 실험방법 및 재료

### 실험동물

웅성 Sprague-Dawley rats (사용시 250~300 g, 8주령)는 삼육동물실험센터 (서울, 한국)에서 구입하여 실험전 1주일간 실험동물실에서 순화 사육하였다. 사육환경은 온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $55 \pm 10\%$ , 조명시간 12시간을 유지하였으며, 사료와 물은 자유로이 섭취케 하였다.

### 재료 및 약제

녹십자에서 생산한 GC-rhEPO (50,000 unit/ml)를  $4^\circ\text{C}$ 에서 냉장보관하였으며, 사용직전에 '희석용 용매'로 희석하여 사용하였다. ELISA kit는 R&D systems사 (MN, USA)로 부터 구입하였다. 희석용매의 조성은 다음과 같다:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM, NaCl 100 mM, human serum albumin 0.25% (pH 7.0).

### 약물의 투여 및 시료 채취

#### 용량의존성 시험

채혈은 랫드를 쥐보정틀에 고정시킨 후 꼬리정맥에 정맥용 카테타 (24 GA, 신동방의료 주식회사)를 주입하여 수행하였다. GC-rhEPO를 각각 20, 100, 500 및 2500 unit/kg을 1 ml/kg 용량으로 주입하고 소량의 heparin 용액 (25 unit/ml 생리식염수)을 주사하여 관에 남아 있는 약물이 완전히 랫드의 정맥속으로 주입되게 하였다. 혈액은 투여후 5, 15, 30분 및 1, 2, 4, 6, 8 시간에 각각 200  $\mu\text{l}$  씩을 취하였다. 채취한 혈액은 10,000 rpm에서 1분간 원심분리 후 혈장을 취하여 정량시까지  $-70^\circ\text{C}$ 에서 냉동보관하였다.

#### 조직분포 시험

랫드에 GC-rhEPO 100 unit/kg을 1 ml/kg 용량으로 주입하고 25 unit/ml heparin 용액(생리식염수로 희석) 0.2 ml을 추가 주입하여 관에 남아있는 약물이 모두 투여되도록 하였다. 투여후 30분, 2 시간, 8시간에 각각 7~8 마리씩 복대동맥을 통하여 혈액을 취하고 실험 치사시켰다. 간장, 신장, 비장과 골수등을 적출하고, 조직무게의 4배 용량의 희석용액을 가한 후 homogenizer (Homogenizer, Brinkmann 사, 독일)로 조직을 균질화하였다. 이 용액을 10,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 얻은 상층액을 정량 전까지  $-70^\circ\text{C}$ 에서 냉동보관하였다.

#### 반복투여시의 약물동태 시험

5주령의 웅성 랫드에 GC-rhEPO (100 unit/kg)을 1주일에 3번, 연속 3주간(1, 3, 5, 8, 10, 15, 17, 19, 21일) 꼬리정맥으로 주입한 후, 마지막 주사 후 꼬리정맥에 정맥용카테타 (24 GA, 신동방의료주식회사)를 주입하여 5, 15, 30분 및 1, 2, 4, 6, 8 시간에 혈액 200  $\mu\text{l}$ 씩을 채혈하였다.

#### 피하투여시의 약물동태 시험

랫드의 꼬리정맥에 카테타 (24 GA, 신동방의료주식회사)를 장치하고, GC-rhEPO (100 unit/kg)을 피하에 주사하고, 주사 후 30분 및 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36, 48 시간에 혈액 200  $\mu\text{l}$ 씩을 채혈하였다.

### EPO 정량법

R&D systems사의 Quantikne IVD EPO ELISA kit에 포함된 microtiter plate wells에 diluent액 100  $\mu\text{l}$ 를 넣은 다음 sample (혈장과 tissue homogenate 상층액) 50  $\mu\text{l}$ 을 넣고 실온에서 1시간 동안 orbital shaker로 반응시켰다. 웰 (well)의 내용물을 완전히 제거한 후 200  $\mu\text{l}$  conjugate 액을 가한 후 실온에서 1시간 반응시켰다. 다시 웰을 세척

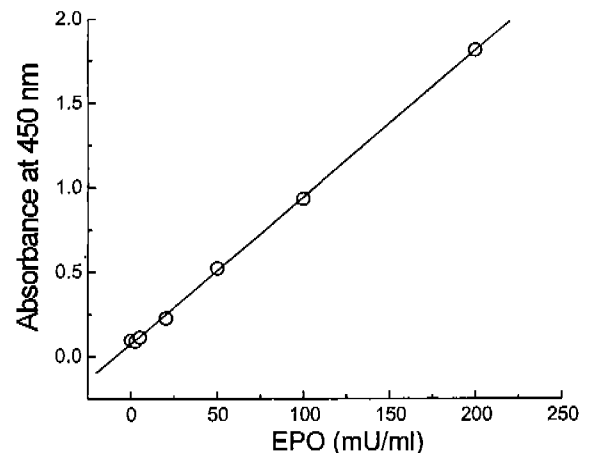


Fig. 1. Typical calibration curve of plasma erythropoietin ( $R=0.99975$ ). Absorbance of each open circle was read on a microplate reader using 450 nm wavelength.

액으로 4회 세척한 후 200 ml substrate solution를 가한 후 실온에서 25분 동안 benchtop shaker로 반응시켰다. 이 웰에 50 µl의 stop solution을 가한 후 15분 이내에 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Erythropoietin 표준품의 농도를 측정된 결과 0 mU 에서 200 mU 까지 직선형으로 나타났으며 (Fig. 1), 시료를 측정할 때 고농도의 시료는 희석배수를 조정하여 흡광도가 표준직선 범위에 오도록 하여 측정하였다.

**약동학적 지표분석**

정맥투여 후 5분부터 측정된 혈장농도-시간의 자료는 two compartment model에 의하여 가장 적합하게 설명이 되었으며, 약물의 배설속도상수는 아래 식 (1)에 fitting하여 구하였다.

$$C_p = A \cdot \exp(-\alpha \cdot t) + B \cdot \exp(-\beta \cdot t) \text{ ----- 식(1)}$$

A, B: coefficients in the sum of exponentials  
 α: initial slope factor  
 β: terminal slope factor

여기서 C<sub>p</sub>는 GC-rhEPO의 혈장농도, α는 분포속도상수, β는 배설속도상수, t는 약물투여후의 경과 시간을 뜻한다.

한편, 피하주사 후의 혈액농도-시간의 자료는 흡수속도 상수를 함께 고려한 아래 식(2)에 의하여 흡수속도 상수 (K<sub>a</sub>) 및 배설속도 상수 (β)를 구하였다 (Johan Gabrielsson and Daniel Weiner, 1994).

$$C_p = \frac{K_a \cdot F \cdot D}{V_d} \cdot \left[ \frac{(K_d - \alpha) \cdot \exp(-\alpha \cdot t)}{(K\alpha - \alpha) \cdot (\beta - \alpha)} + \frac{(K_d - \beta) \cdot \exp(-\beta \cdot t)}{(K\alpha - \beta) \cdot (\beta - \alpha)} + \frac{(K_d - K\alpha) \cdot \exp(-K\alpha \cdot t)}{(\alpha - K\alpha) \cdot (\beta - \alpha)} \right] \text{ ----- 식(2)}$$

- K<sub>a</sub>: absorption rate constant (t<sup>-1</sup>)
- K<sub>d</sub>: fractional rate constant peripheral→central component
- V<sub>d</sub>: volume of distribution
- α: initial slope factor for elimination
- β: terminal slope factor for elimination

실제의 계산에서는 GC-rhEPO의 피하 투여시의 약물배설속도상수는 정맥투여시와 같다는 전제 아래, β는 정맥주사 자료에서 얻어진 배설속도 상수 값으로 고정하였다. 피하주사자료를 보면, GC-rhEPO가 투여 후 8시간째에 혈중 최고농도에 도달하며 이기간은 정맥투여후의 약물배설반감기보다 2배 이상 길다. 따라서, 이 경우는 흡수속도가 약물의 혈중농도-시간관계 그래프의 모양을 좌우하는 absorption

rate limited kinetics에 해당된다 (Roland와 Tozer, 1995).

AUC (area under the concentration-time curve)는 아래와 같은 식에 의하여 구하였다.

$$AUC = A/\alpha + B/\beta \text{ ----- 식(3)}$$

AUMC (area under the first moment of the concentration-time curve)는 농도함수(C<sub>p</sub>(t))에 시간을 곱하여 AUC를 구하는 방법과 유사하게 구하였다. MRT (mean residence time)은 AUMC를 AUC로 나누어 얻었고, 흡수 반감기 (t<sub>1/2ab</sub>)는 0.693을 흡수속도상수로, 배설반감기 (t<sub>1/2b</sub>)는 0.693을 배설속도상수로 나누어 구하였다. Cl<sub>B</sub> (total body clearance)는 투여용량을 AUC로 나누어 구하였고, V<sub>dss</sub> (steady-state에서의 분포용적)는 Cl<sub>B</sub>를 배설속도상수로 나누어 구하였다. 초기 약동학적 매개변수는 비선형 회귀법, 적분법에 의하여 구하였으며 실제의 계산은 Origin 프로그램 (Ver 4.1)을 이용하였다.

한편, GC-rhEPO의 조직으로 부터의 감소의 정도는 기준시간농도 (a)에서 일정 시간 (t) 경과후의 농도 (b) 자료를 이용하여 아래와 같은 식에 의하여 구하였다.

$$\{(a-b)/a\}/t \text{ ----- 식(4)}$$

**통계 분석**

측정값은 평균값±표준오차 (mean±SEM)로 표기하였으며, 평균값간의 유의차는 분산분석 및 unpaired student t-test에 의하여 검정하였다. 유의수준은 p<0.05로 하였다.

**결과 및 토의**

**용량의존성**

Fig. 2는 GC-rhEPO를 rats에 20, 100, 500 및 2,500 unit/kg을 정맥투여 한 후 평균 혈장농도-시간 추이를 보여 주고 있다. 정맥 투여 후 혈장농도-시간의 관계는 알려진 대로 (Kinoshita 등, 1992; 심 등, 1996; Kato 등, 1997) 두개의 배설속도상수를 갖는 two compartmental model에 의하여 설명이 되었으며, 관련된 약동학적 지표는 Table I에 나타내었다. 전체적으로 초기농도감소 속도상수 (α, 3.11 ±0.600, mean±SEM, n=4)는 말기농도감소 속도상수 (β)보다 약 10배 이상 컸으며, 이들 속도상수와 투여용량간의 유의성 있는 상관관계는 관찰되지 않았다. 초기혈장농도감소 (분포기) 반감기는 약 13.4분, 말기혈장농도감소 속도상수 (β)로부터 구한 혈장반감기는 2.68-3.25 시간의 범위이었으며, 전체 평균값은 2.94±0.12 (mean±SEM, n=4) 시간이었다. 이들 반감기의 투여용량에 따른 유의성은 관찰되지 않았다. 따라서, 초기의 혈장농도감소 속도상수가 혈

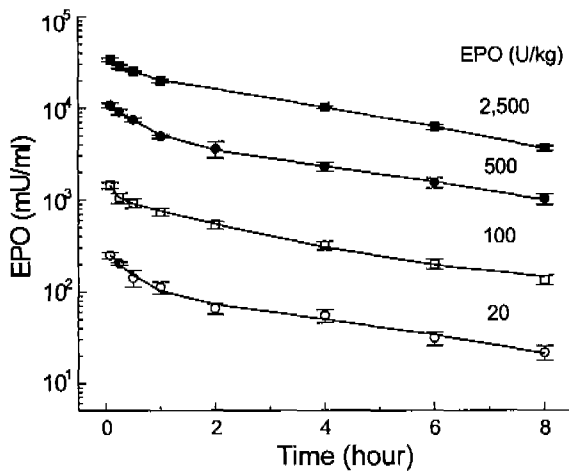


Fig. 2. Mean plasma concentration-time profiles of GC-rhEPO after intravenous administration of 20, 100, 500 and 2,500 unit/kg to the rats. Solid lines were drawn by the best-fit parameters obtained by fitting the data to Equation (1). Each symbol and bar represent the mean±SEM.

션 크다는 것은 정맥주사 후 배설속도보다 매우 빠른 속도로 분포과정이 진행됨을 알 수 있다.

GC-rhEPO를 rats에 20, 100, 500 및 2500 unit/kg을 정맥투여 한 경우, AUC, AUMC는 용량의존적인 증가를 보였으나, MRT는 3.4-4.5 시간, 청소율 (CL)은 22.8-25.1 ml/h\*kg, 분포용적 (Vd<sub>ss</sub>)은 85.4-102.1 ml/kg이었다. MRT, 청소율, 분포용적의 경우, 투여용량과의 이질 값에서 유의성 있는 상관관계는 관찰되지 않았다 (Table I). GC-rhEPO의 분포용적 (85.4-102.1 ml/kg)이 체중의 8-10%에 해당하여 혈장의 용량과 비슷하다는 (Ganong, 1997) 사실은 GC-rhEPO의 거의 모두가 혈액 내에 존재하며, 혈관 밖으로 분포하는 양은 미미함을 알 수 있다. 또한 이 결과는 사람에서 EPO의 분포용적 (Goodnough 등, 1993)과도

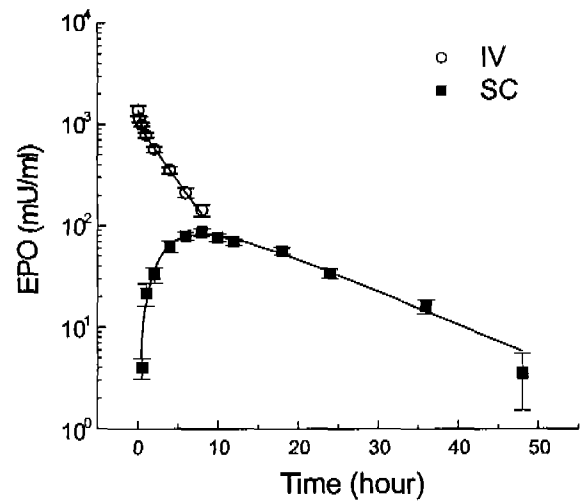


Fig. 3. Concentration of GC-rhEPO in plasma of the rats after intravenous and subcutaneous administration of 100 unit/kg. Solid line is drawn by the best-fit parameters obtained by fitting data to Equation (1) for the plasma concentration-time profiles after intravenous administration and Equation (3) for subcutaneous administration. Symbols and bars are means of 8 measurements and SEM, respectively.

유사하다. 대부분의 약물은 간장이나 신장에서 대사 및 배설이 된다. EPO의 경우 Widness 등 (1996)은 외과적으로 간장과 신장을 제거한 먼양에서 EPO의 약동학적 매개변수가 정상동물과 유의한 차이가 없음을 보고하였다. 이러한 결과를 미루어볼 때 EPO는 간장이나 신장이 아닌 다른 부위에서 대사가 이루어짐을 짐작할 수 있다.

EPO의 혈장반감기는 종에 따라서 차이가 나며 (심 등, 1996), 구조중의 당류의 유무에 따라서도 다름이 알려져 있다 (Spivak 와 Hogans, 1989). GC-rhEPO의 약동학적 성질은 심 등(1996)이 랫드에서 조사하여 보고한 동아제약의

Table I. Pharmacokinetic parameters of erythropoietin after intravenous administration of 20, 100, 500 and 2,500 unit/kg to rats

Parameters	Dose (unit/kg)			
	20 (n=4)	100 (n=5)	500 (n=6)	2500 (n=6)
t <sub>1/2</sub> (hr)	2.68±0.25	2.84±0.21	2.97±0.14	3.2±0.15
AUC (mU*h/ml)	817±76.2	4,210±291	20,719±1,938	109,978±2,219
AUMC (mU*h <sup>2</sup> /ml)	2,83±8371	16,872±2,138	81,993±11,932	491,736±18,420
MRT (hr)	3.43±0.25	3.9±0.27	3.88±0.2	4.47±0.17
CL (ml/h*kg)	25.1±2.5	24.3±1.9	25.0±2.0	22.77±0.47
Vd <sub>ss</sub> (ml/kg)	85.4±6.6	93.8±3.1	96.0±6.4	102.1±5.0
α (h <sup>-1</sup> )	0.26±0.02	0.25±0.02	0.22±0.02	0.22±0.01
β(h <sup>-1</sup> )	2.30±0.48	4.87±1.8	2.46±0.45	2.79±0.42

None was significantly different from the respective control at p value of 0.05.

t<sub>1/2</sub>, half-life; AUC, area under the concentration-time curve; AUMC, area under the first moment of the concentration-time curve; MRT, mean residual time; CL, total clearance of drug from blood; Vd<sub>ss</sub>, volume of distribution (apparent) under steady-state conditions; α, initial elimination rate constant; β, terminal elimination rate constant.

EPO ( $t_{1/2}$ , 2.1-2.35 시간;  $V_{dss}$  57.2-70.1 ml/kg), 그리고 Kinoshita 등 (1992)이 보고한 일본 Chugai 제약회사의 EPO에 대한 약동학적 매개변수( $t_{1/2}$ , 1.98-2.7 시간;  $V_{dss}$ , 65-79 ml/kg)와 비교할 때 반감기 및 분포용적에서 다소 높은 편이나 전체적으로는 유사하였다. 그러나, 이들 값은 사람에서 EPO의 혈장 반감기 4-11 시간 (Sobata, 1990; Goodnough 등, 1993) 보다는 짧다. 한편, Kato 등 (1997)은 랫드에서 EPO의 청소율 (CL)이 저농도 투여군 (0.2 µg/kg)에서는 48.3 ml/kg\*hr 이나, 고농도 투여군 (0.5~5 µg/kg)에서는 24-27 ml/kg\*hr임을 보고하고, EPO의 소실과정에는 포화가능한 소실과정과 포화되지 않는 소실과정이 있음을 제시하였다. 본 연구의 결과에서도 고농도 투여군 (2500 unit/kg)의 청소율 (CL)은 22.8 ml/h\*kg로 저농도투여군 (20 unit/kg)의 청소율, 25.1 ml/h\*kg 보다 작았으나, 그 차이가 Kato 등 (1997)의 실험결과와 같이 유의성있는 정도는 아니었다. 이와 같이 고용량에서 rhEPO의 청소율이 감소하는 용량 의존적인 청소율의 변화는 사람에서도 관찰되어 (Cheung 등, 1998), 이 현상은 rhEPO 약물동태의 한 특징으로 여겨지고 있다.

#### 투여경로별 약물동태

##### 반복투여에 의한 약물동태

약물은 반복투여 시에 그 약물동태가 변화되는 경우가 흔히 있다. Fig. 4은 반복투여시의 EPO의 약물동태의 변화를 조사하기 위하여 GC-rhEPO (100 unit/kg)를 주 3회씩 3주간 반복 투여했을 때 평균혈장농도시간 추이를 나타낸 것이며, 관련된 약물 속도정수는 Table II에 나타내었다. 단회 투여시 및 반복 투여군의 6가지의 약물속도 정수는 통계적으로 유의차가 없었다. 혈장 농도 반감기의 경우, 유의성은 없었지만 반복 투여군의 반감기가 단회 투여군의 반감기보다 짧은 경향을 보였다. 이 경향은 Kinoshita 등

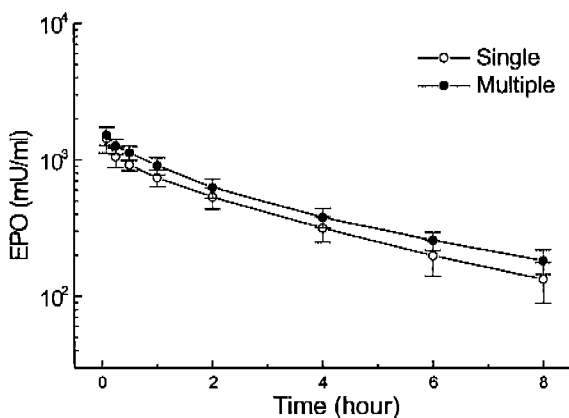


Fig. 4. Plasma concentration-time profiles of erythropoietin after single and multiple intravenous administrations (3 times a week for 3 weeks) of GC-rhEPO (100 unit/kg) to rats.

Table II. Pharmacokinetic parameters of erythropoietin after single and multiple intravenous administration of 100 unit/kg erythropoietin to rats

Parameters	Single administration (n=5)	Multiple administration (n=6)
$t_{1/2}$ (hr)	2.84±0.21	2.68±0.33
AUC (mU*h/ml)	4,210±291	4,589±328
AUMC (mU*h <sup>2</sup> /ml)	16,872±2,138	17,146±2,029
MRT (hr)	3.9±0.27	3.67±0.42
CL (ml/h*kg)	24.3±1.9	22.32±3.68
$V_{dss}$ (ml/kg)	93.8±3.1	80.85±6.2
$\alpha$ (h <sup>-1</sup> )	0.25±0.02	0.26±0.03
$\beta$ (h <sup>-1</sup> )	4.87±1.8	6.25±1.54

None was significantly different from the respective control at p value of 0.05. Abbreviations for pharmacokinetic parameters are the same as in Table I.

(1992) 및 심 등 (1996)의 결과와도 일치한다. 본 실험의 결과는 반복 투여시에 GC-rhEPO의 약물대사에 유의성 있는 변화를 유발할 가능성이 낮음을 보여주고 있다.

#### 정맥 및 피하주사시 약물동태

Fig. 3는 GC-rhEPO (100 unit/kg)를 피하주사한 경우의 혈장농도와 시간의 관계를 나타내는 그래프이며, 관련된 약물 속도정수는 Table III에 나타내었다. 피하투여시 혈장농도는 투여 후 곧 증가하기 시작하여 투여 후 8시간 ( $T_{max}$ )에 혈중 최고농도에 도달하였으며, 그 이후에는 겉보기 반감기 (apparent  $t_{1/2}$ )가 11.7시간의 속도로 느리게 감소하였다. 이렇게 피하주사후 GC-rhEPO의 겉보기배설반감기와 MRT는 각각 정맥투여 경우의 반감기(2.8시간) 및 MRT(3.9 시간) 보다 약 4배정도 증가된 약물동태를 보였다. 그러나, 일반적으로 반감기는 약물고유의 것으로 투여경로에 따라 달라진다고 볼 수는 없다. 따라서, 이렇게 반감기가 크게 나타나는 것은 피하주사후 혈류로의 유입이 느리게 일어나기 때문이라 보는 것이 더 타당하다. 이렇게 근육 혹은 피하주사시의 혈중 약물농도-시간의 관계가 흡수속도에 따라 좌우되는 경우 (absorption rate limited kinetics)에 해당된다 (Roland와 Tozer, 1995). 실제로 정맥주사 후 얻어진 반감기 값을 대입하여 재료 및 방법란의 식 (3)에 의하여 Fig. 3의 자료를 분석하면, 흡수속도상수( $K_a$ )를 구할 수 있는데 (Table III), 이로부터 얻은 피하주사 후 EPO의 흡수 반감기는 9.2 시간이었다. 즉, 흡수반감기(9.2시간)와 겉보기배설반감기(11.7시간)가 거의 일치한다. 즉, 이는 GC-rhEPO의 배설기전이 달라졌다기 보다 배설은 빠르게 일어나나 주사 부위에서 혈액으로 흡수속도가 느리기 때문이며, GC-rhEPO가 흡수되어 혈액에 오래 머무는 것이 아님을 알 수 있다. 피하주사한 GC-rhEPO의 AUC를 같은

**Table III.** Pharmacokinetic parameters of erythropoietin after intravenous and subcutaneous administration of 100 unit/kg to rats

Parameters	Intravenous administration (n=5)	Subcutaneous administration (n=8)
$t_{1/2}$ (hr)	2.84±0.21	11.7±2.93* <sup>1</sup>
AUC (mU*h/ml)	4,210±291	1,879±120**
AUMC (mU*h <sup>2</sup> /ml)	16,872±2,138	33,600±2,300**
MRT (hr)	3.9±0.27	18.2±0.6**
CL (ml/h*kg)	24.3±1.9	27.9±1.8
Bioavailability (F)	1	0.44
$C_{max}$ (mU/ml)	1,249±92.5	86.7±19.1**
$T_{max}$ (hr)	0.083	8
$K_a$ (h <sup>-1</sup> )	-	0.072±0.017 <sup>2</sup>

\* $p<0.05$  and \*\* $p<0.01$ : Significantly different compared to the values for intravenous administration, respectively. <sup>1</sup>apparent plasma half-life obtained from the decay phase of plasma concentration-time curve shown in Fig. 3. <sup>2</sup>obtained by curve fitting of the data shown in Fig. 3 to the equation (2) described in Materials and Methods, assuming that the terminal elimination phase did not change after the subcutaneous administration.  $C_{max}$ , peak plasma concentration;  $T_{max}$ , time to peak plasma concentration;  $K_a$ , fractional rate constant from peripheral to central compartment. Other abbreviations for pharmacokinetic parameters are the same as in Table I.

용량으로 정맥주사한 경우의 AUC로 나눈 생체이용율 (F)은 44%이었다. 일반적으로 GC-rhEPO와 같이 분자량이 큰 물질은 모세혈관벽을 직접 통과하여 흡수되는 것이 아니라 세포간질액에서 먼저 림프액과 섞인 후 림프관을 타고 혈류에 유입되는 것으로 알려져 있다 (Roland 와 Tozer, 1995). 따라서, 혈류보다 림프액의 흐름이 느리고, 이 과정에서 단백질분해효소 등에 의한 손실 때문에 GC-rhEPO의 흡수가 느리고 생체이용율은 낮은 것으로 보인다. 본 실험에서 얻은 GC-rhEPO의 랫드에서의 생체이용율은 랫드에서 조사된 심 등 (1996)의 결과보다 약 1.6배 정도 큰 값이며, 토끼에서 조사된 Yoon 등 (1997)의 결과와 유사하다. 한편 사람에서의 rhEPO의 생체이용율은 36% (Salmonson 등, 1990), 또, 개, 랫드, 마우스에서 각각 80, 76, 70%로 보고된 바 있다 (Bleuel 등, 1996). 이러한 차

이의 원인에 대하여는 잘 알려져 있지 않으나 제형, 투여 부위, 종 (species) 등에 따라 다를 것으로 여겨진다. 한편, 피하주사경로는 생체이용율은 낮으나, GC-rhEPO의 혈중농도를 보다 오래 지속시킬 수 있는 장점이 있어 사람에서 rhEPO의 주 투여 경로로 여겨지고 있다 (Salmonson 등, 1990; Jensen 등, 1996; Cheung 등, 1998).

### 조직분포

Table IV는 GC-rhEPO 100 unit/kg를 랫드에 정맥투여 하였을 때의 조직분포를 나타낸 것이다. 조직별로는 혈액이 가장 높았으며, 다음에 골수, 비장, 신장 그리고 간장의 순으로 나타났다. 시간별로는 첫 번째 측정시간인 투여 후 30분에 조직에서의 농도가 제일 높게 나타났으며, 그 이후는 모든 장기에서 조직농도가 감소되었다. 특히, 골수는 EPO의 표적장기로서 신장과 간장 등과 같이 혈류량이 두드러지게 높은 장기들 (Ganong, 1997)보다 높게 분포하는 점은 주목할 만 하다. 이는 EPO가 이들 표적장기의 수용체에 결합하기 때문일 것으로 여겨진다 (Lin 등, 1994), Kinoshita 등 (1992)과 심 등 (1996)도 랫드에서 위와 유사한 rhEPO의 조직분포양상을 보고한 바 있다. 토끼에서는 랫드와는 다른 조직분포를 보였는데, Yoon 등(1997)은 rhEPO를 정맥 투여한 후 30분에 조사한 결과 신장, 간장, 폐장, 심장의 순으로 높게 분포함을 보고하였다. 이는 EPO의 조직분포가 종에 따라 다를 수 있음을 제시하고 있다. 한편, 0.5, 2, 8 시간 후의 농도를 기준으로 단위 시간당 조직별 GC-rhEPO의 농도의 시간당 감소 비율은 식 (4)에 의하여 계산하였으며, 0.5 시간 이후 1.5-시간 동안 혈장, 비장, 간장, 신장, 골수에서의 시간당 감소비율은 각 35, 40, 38, 37, 28%이었으며, 2시간 이후 6시간 동안에는 각각 11.5, 12.9, 1.8, 8.3, 3.7 % 이었다. 혈중농도의 경우, 정맥주사 후 혈중농도 측정시점을 보다 세분하여 조사한 후 약동학적 분석을 통하여 얻은 배설속도상수( $\beta$ , 0.24±0.129 h<sup>-1</sup>, Table I과 II)와 유사함을 알 수 있다. 특히 흥미로운 것은 두 시간 이후의 조직별 GC-rhEPO의 농도감소율이 간장과 골수에서 낮게 나타난 것이다. 이는 골수에 높게 분포한다는 사실과 함께, GC-rhEPO의 표적장기가 골

**Table IV.** Amount (mU/ml plasma or g tissue) of erythropoietin remaining in each tissue after intravenous administration of the drug, 100 unit/kg to rats (n=5~8)

	Amount (mU/ml plasma or g tissue)			
	Control	30 min	2 hr	8 hr
Plasma	13.47±6.39	994.75±37.35	472.83±84.29	142.75±19.33
Spleen	1.16±8.67	231.17±15.62	92.22±19.91	20.6±4.73
Liver	32.7±13.11	145.7±12.37	63.33±7.56	56.32±3.84
Kidney	5.77±7.36	193.66±18.46	86.57±14.69	42.9±2.23
Bone marrow	55.03±17.21	510.53±71.27	299.24±23.57	233.04±11.29

수라는 일반적인 사실과도 일치하는 결과로 여겨진다.

## 결 론

본 실험의 결과는 랫드에 정맥 주사후 GC-rhEPO의 혈중농도-시간의 관계는 two compartment model에 의하여 적합하게 설명이 되었고, 분포기의 반감기는 13.4분, 배설 반감기는 2.94시간, 분포용적은  $94.3 \pm 3.45$  ml/kg, 청소율은  $24.3 \pm 0.55$  ml/hr\*kg 이었다. AUC는 농도의존적으로 증가하였으나, 배설반감기는 일정하게 유지되었다. 피하주사후 혈중농도는 서서히 증가하여 투여후 8시간에 혈중최고농도에 도달하였으며, 이때 흡수반감기는 9.2 시간, MRT는 18.2시간, 생체이용율은 44%이었다. 조직별로는 골수에 높게 존재할 뿐만 아니라 느리게 유리됨으로서 GC-rhEPO의 골수 조직 친화성을 확인할 수 있었다. 이상의 실험 결과는 GC-rhEPO의 약동학적 성질과 조직분포에서 이미 알려진 rhEPO의 고유 특성을 모두 가지고 있음을 증명하고 있다.

## 참고문헌

- Bleuel, H., Hoffman, R., kaufmann, B., Neubert, P., Ochlich, P.P., and Schaumann, W. (1996). kinetics of subcutaneous versus intravenous epoetin-beta in dogs, rats and mice. *Pharmacology*. **52**, 329-338.
- Cheung, W.K., Goon, B.L., Guilfoyle, M.C., Wacholtz, M.C. (1998). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin after single and multiple subcutaneous doses to healthy subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* **64**, 412-423.
- Davis, J.M., Arakawa, T., Strckland, T.W. and Yphantis, D.A. (1987). Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry*. **26**, 2633-2638.
- Eschbach, J.W., Egrie, J.C., Downing, M.R., Browne, J.K. and Adamson, J.W.(1987). Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. *N. Engl. Med.* **316**, 73-78
- Fisher, J.W. (1997). Erythropoietin: Physiologic and pharmacologic aspects. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **216**, 358-369.
- Ganong, W.F. (1997) Neuromuscular transmission. In review of medical physiology. 18th ed. pp107~110, Appleton and Lange, Stanford.
- Goodnough, L.T., Anderson, K.C., Kurtz, S., Lane, T.A., Pisciotto, P.T. and Silverstein, L.E. (1993). Indications and guidelines for the use of hematopoietic growth factors. Committee Report. *Transfusion*. **33**, 944-959.
- Goto, M., Murakami, A., Araki, K., Kawanishi, G., Ueda, M., Chiba, H. and Sasaki. R. (1989). Characterization and use of monoclonal antibodies directed against human erythropoietin that recognize different antigenic determinants, *Blood*. **74**, 1415-1423.
- Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neil, S.D., Kaufman, R.J., Muffson, A., Seehra, J., Jones, S.S., Hewick, R., Fritsch, E.F., Kawaita, M., Shimizu, T. and Miyake, T. (1985). Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*. **313**, 806-810.
- Jensen, J.D., Jensen, L.W., and Madsen, J.K (1994). The pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin after subcutaneous injection at different sites. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **46**, 333-337.
- Johan Gabriellsson and Daniel Weiner (1994) Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis concepts and application, Swedish pharmaceutical press, 55-56.
- Kato, M., Kamiyama, H., Okazaki, A., Kumaki, K., Kato, Y. and Sugiyama, Y. (1997). Mechanism for nonlinear pharmacokinetics of erythropoietin in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **283**, 520-527.
- Kinoshita, H., Ohishi, N., Kato, M., Tokura, S. and Okazaki, A. (1991). Comparative pharmacokinetics and distribution of human urinary erythropoietin and recombinant human erythropoietin in rats. *Arzneimittelforschung*. **41**, 1004-1007.
- Kinoshita, H., Ohishi, N., Kato, M., Tokura, S. and Okazaki, A. (1992a). Pharmacokinetics and distribution of recombinant erythropoietin in rats. *Arzneimittelforschung*. **42**, 174-178.
- Kinoshita, H., Ohishi, N., Kato, M., Tokura, S. and Okazaki, A. (1992b). Distribution of recombinant human erythropoietin following multiple intravenous administration and effects of age on the distribution in rats. *Arzneimittelforschung*. **42**, 579-584.
- Lai, P-H., Everett, R., Wang, F.F., Arakawa, T. and Goldwasser, E. (1986). Structural characterization of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* **261**, 3116-3121.
- Lin, F-K., Suggs, S., Lin, C-H., Browne, J.K., Smalling, R., Egrie, J.C., Chen, K.K., Fox, G.M., Martin, F. and Wasser, Z. (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 7850-7854.
- Lin, Z.Y., Chin, K. and Noguchi, C.T. (1994). Tissue specific expression of human erythropoietin receptor in transgenic mice. *Dev. Biol.* **166**, 159-169.
- Ma, D.D.F., Wei, A-Q., Downton, L.A., Lau, K.S., Wu, Z-H. and Ueda, M. (1992). Assessment of an EIA for measuring human serum erythropoietin as compared with RIA and an in-vitro bioassay. *Br. J. Haematol.* **80**, 4431-436.
- McGonigle, R.J.S., Boineau, F., Beckman, B., Frempong, K.O., Levy, J., Shaddock, K.K. and Fisher, J.W. (1985). Erythropoietin and inhibitors of in vivo erythropoiesis in the development of anemia in children with renal disease. *J. Lab. Clin. Med.* **105**, 449-458.
- Miyake, T., Kung, C.K.H. and Goldwasser, E. (1977). Purification of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* **252**, 5558-5564.
- Roland, M. and Tozer, T.N. (1995). Absorption and disposition kinetics: Extravascular dose. In, Clinical pharmacokinetics: *Concepts and application*. 3rd ed. pp 34-52. Williams & Wilkins, London.
- Sakada, S., Enoki, Y., Shimizu, S., Hattori, M. and Ueda, M. (1995) Correlation between a sandwich ELISA and an in-vitro bioassay for erythropoietin in human plasma. *Br. J.*

- Haematol.* **91**, 562-565.
- Salmonson, T., Danielson, B.G., and Wikstrom, B. (1990). The pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin after intravenous and subcutaneous administration to healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **29**, 709-713.
- Sobota, J.T. (1990). *An international perspective*. Garmick MC, ed. New York: Marcel Dekker.
- Spivak, J. and Hogans, B. (1989). The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin in the rats. *Blood*. **73**, 90-99.
- Wide, L., Bengtsson, C. and Birgegard, D. (1988). Circadian rhythm of erythropoietin in human serum. *Br. J. Hematol.* **72**, 85-90.
- Widness, J.A., Veng-Pedersen, P., Schmidt, R.L., Lowe, L.S., Kisthard, J.A. and Peteres, C. (1996). In vivo <sup>125</sup>I-erythropoietin pharmacokinetics are unchanged after anesthesia, nephrectomy and hepatectomy in sheep. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **279**, 1205-1210.
- Yoon, W.H., Park, S.J., Kim, I-C., Lee, M.G. (1997). Pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin in rabbits and 3/4 nephrectomized rats. *Res. Comm. Mol. Pathol. Pharmacol.* **96**, 227-240.
- Zanjani, E.D., Ascenasao, J.L. and McGlave, P.B. (1981). Studies on the liver to kidney switch of erythropoietin production. *J. Clin. Invest.* **67**, 1183-1188.
- Zanjani, E.D., Postor, J., Burlington, H., Mann, L.I. and Wasserman, L.R. (1977). Liver as the primary site of erythropoietin production in the fetus. *J. Lab. Clin. Med.* **89**, 640-644.
- 심현주, 이응두, 이종진, 김홍재, 이상득, 이성희, 김원배, 양중익. (1996). Recombinant human erythropoietin(DA-3285)의 실험 동물에서의 약동력학 및 조직분포. *응용약물학회지* **1**, 78-93.