

마우스에서 항암제 유발 호중구 감소에 대한 HM 10411의 회복촉진효과

강경선¹ · 제정환¹ · 김경배¹ · 이지해¹ · 조성대¹ · 조종호¹ · 박준석¹ · 안남식¹ · 양세란¹
정지원¹ · 이영순^{1,*} · 권세창² · 김영민² · 정성엽² · 배성민² · 이관순²
¹서울대학교 수의과대학 공중보건학교실, ²한미약품(주) 중앙연구소

Therapeutic Effect of HM 10411 on Neutropenia Caused by Anticancer Agents in Mice

Kyung-Sun Kang¹, Jeong-Hwan Che¹, Kyung-Bae Kim¹, Ji-Hae Lee¹, Sung-Dae Cho¹,
Jong-Ho Cho¹, Joon-Suk Park¹, Nam-Shik Ahn¹, Se-Ran Yang¹, Ji-Won Jung¹,
Yong-Soon Lee^{1,*}, Se-Chang Kwon², Young-Min Kim², Sung-Youb Jung²,
Sung-Min Bae² and Gwan-Sun Lee²

¹Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine,
School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University,
Seodun-Dong, Kwonsun-Ku, Suwon 441-744, Korea

²Central Research Institute, Hanmi Pharm. Co. Ltd., #371 Sampyeong-Dong,
Boondang-Ku, Sungnam-City, Kyounggi-Do, 463-400, Korea

(Received April 12, 2001)

Accepted June 4, 2001)

ABSTRACT : Neutropenia is a major dose-limiting side effect of cancer chemotherapy. The therapeutic effect of HM 10411 was examined on neutropenia caused by anticancer agents. Neutropenia in normal ICR mice was induced by a single combined intraperitoneal injection of 130 mg/kg of cyclophosphamide (CPA), 4.5 mg/kg of doxorubicin (DXR), and 1mg/kg of vincristine (VCR) on day 0. Neutropenia in tumor-bearing mice was made by a single intraperitoneal injection of 200 mg/kg of cyclophosphamide (CPA) into BALB/c mice bearing Colon 26 adenocarcinoma at 7 day after tumor implantation. HM 10411 or filgrastim (100 µg/kg/day) was subcutaneously administered for 5 consecutive days starting 1 day after injection of anticancer agents in order to stimulate neutrophil production. Injection of HM 10411 accelerated the recovery from these anticancer drug-induced neutropenia. In normal and tumor-bearing mice, neutrophil production efficacy of HM 10411 was similar than that of filgrastim. These results suggest that HM 10411 could be useful in the clinical treatment for neutropenia induced by anticancer agents.

Key Words : HM 10411, G-CSF, Neutropenia, Chemotherapy

I. 서 론

항암화학요법 중 빈번히 관찰되는 골수억제는 항암제의 비특이적인 세포 독성에 기인한 것으로 분화 증식이 활발한 골수전구 세포에 세포 독성을 나타내어 호중구 감소증을 유발하고, 이로 인한 생체 면역기능의 저하로 심각한 감염증을 야기시키기 때문에 가장 심각한 용량 제한요소로 인식되고 있다(Bodey, 1986; Pizzo, 1984).

최근에는 이러한 호중구 감소증과 관련하여 여러 조혈 촉진 인자들이 발견되어 임상에서 실제 호중구 감소의 경

감 및 예방의 목적으로 사용되고 있는데, 이러한 조혈인자 중의 하나인 과립구 콜로니 자극인자(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF)는 단구쇄식구, 섬유 아세포, 성 세포 및 내피세포에 의해 만들어져서 골수내의 호중구계 세포들에 작용하여 호중구 전구세포의 증식과 분화를 자극하여 혈중 호중구 수준을 일정하게 유지하도록 해주며, 성숙 호중구에도 작용하여 활성화를 특이적으로 향상시키는 조혈인자의 일종이다(Nagata, 1994; Ottmann *et al.*, 1987).

G-CSF는 실제 임상에서 골수 억제성 항암제 치료 환자의 감염 기회 감소, 골수이식 환자들에게서 골수의 회복 촉진, 재생 불량성 빈혈 환자의 호중구 기능 향상, 그리고 항암제 치료에 의해 야기되는 호중구 감소증의 치료 등에

*To whom correspondence should be addressed

유용하게 사용되고 있다. 그리고 포유동물 세포배양을 이용해 얻은 당쇄화된 괴립구 콜로니 자극인자는 O-글라이코시드 당쇄구조를 가지고 있으며 당은 비록 G-CSF 활성화에 필수적이지 않지만 이미 보고된 것처럼 고농도에서 응집(aggregation)을 방지시켜 주는 것으로 알려져 있다. 또한 대장균에서 발현된 비당쇄화된 G-CSF는 낮은 용해도 때문에 고농도시 쉽게 응집되는 것으로 알려져 있다. 또한 대장균을 이용하여 얻은 비당쇄화된 G-CSF는 아미노 말단 위치에 메티오닌 잔기가 하나 더 첨가된 175개 또는 178개 아미노산으로 구성된 G-CSF가 만들어지게 되고, 부가된 메티오닌 잔기로 인해 인체에 유해한 면역반응이 유발될 수 있다고 알려져 있다. 그리고 천연형 G-CSF는 5개의 시스테인 잔기를 가지고 있으며 이중 4개는 다이설파이드 결합에 관여하고 1개의 시스테인 잔기는 자유로운 상태를 가지면서 폴딩의 역할 뿐만 아니라 단백질의 용액 내 안정성을 낮춘다는 문제점을 피할 수 없게 된다.

본 연구팀은 G-CSF의 역할에는 영향을 주지 않으면서 물리화학적 성질이 뛰어난 G-CSF 유도체를 얻었다. 특히 17번째 시스테인 잔기를 다른 아미노산 잔기로 치환하여 제조된 hG-CSF 변이체의 유전자를 분비서열과 연결하여 발현시킬 경우 아미노 말단에 메티오닌 잔기가 부가되지 않은 HM 10411 형태로 획득할 수 있었다.

본 시험은 HM 10411의 효력시험의 일환으로, 현재 임상적으로 널리 사용되고 있는 filgrastim(Grasim)을 비교물질로 사용하여 정상 혹은 담암 마우스에서 항암제 투여 후 나타나는 호중구 감소증에 대한 HM 10411의 회복 촉진 효과를 검토하기 위하여 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험 물질

한미약품 중앙연구소에서 개발한 HM 10411을 시험시용매(20 mM Sodium Phosphate, 1% Gly, 0.25% Mannitol, pH 7.0)에 용해하여 사용하였다. 비교 물질로는 filgrastim(Grasim, 제일약품)을 위와 동일한 용매에 희석하여 사용하였다. Cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine은 Sigma(St. Louis, U.S.A)에서 구입하여 사용하였다.

2. 실험 동물 및 사육 조건

정상 마우스 시험에서는 웅성 ICR 마우스 7주령을, 담암 마우스 시험에서는 웅성 BALB/c 마우스 7주령을 설타코 Bio(주)에서 구입하여 일주일 동안의 순화 기간을 거친 후 시험에 사용하였다. 시험 개시시 체중 범위는 ICR의 경우 30~35 g, BALB/c의 경우 20~25 g이었다. 사육실

은 온도 22±3°C, 상대습도 55±5%, 환기횟수 10~12회/hr, 명암주기 12시간, 조도 150~200 lux로 유지하였으며 순화 기간 및 시험기간 중에는 실험동물용 고형사료(삼양사 배합사료)를 섭취시켰으며, 음수는 수돗물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

3. 정상마우스에서 복합항암제와 HM 10411의 병용 투여

Cyclophosphamide(CPA) 130 mg/kg, doxorubicin(DXR) 4.5 mg/kg 및 vincristine(VCR) 1 mg/kg을 ICR 마우스의 복강내로 단회 투여하였다. 항암제 투여 후 1일째부터 5일째까지 매일 오전 10시경에 HM 10411 혹은 filgrastim을 100 µg/kg/day 용량으로 임상에서 보편적으로 사용되는 피하주사를 실시하였다. 항암제 투여 후 1, 2, 3, 4, 5, 6 및 8일째에 안와 채혈을 실시하였다. 채혈시간은 약물투여 6시간 후인 오후 4시경에 하였으며, 각 군당 5마리씩의 마우스로부터 0.3~0.5 ml의 혈액을 안와정맥 총에서 채혈하였다.

4. 담암마우스에서 cyclophosphamide와 HM 10411의 병용투여

마우스 이식에 사용한 CT-26(mouse colon adenocarcinoma) 세포는 한국 세포주 은행(서울, KOREA)에서 분양 받은 후, BALB/c 마우스의 피하에 3회 이상 계대된 암 조직을 사용하였다. 계대 14일 후에 마우스의 피하에서 암 조직을 무균으로 적출한 후 2x2x2 mm³ 크기로 잘라 이식 침으로 마우스의 우측 등쪽 피하에 이식하였다. 암세포 이식 일주일 후에 cyclophosphamide(CPA) 200 mg/kg을 복강내 주사하고, 다음 날부터 5일간 오전 10시경에 HM 10411 혹은 filgrastim을 100 µg/kg/day 용량으로 임상에서 보편적으로 사용되는 피하 주사를 실시하였다. 항암제 투여 전, CPA 투여 후 0, 2, 3, 4, 5, 6, 8 및 10일째에 채혈을 실시하였다. 채혈 시간은 약물 투여 6시간 후인 오후 4시경에 각 군당 5마리씩의 마우스로부터 0.3~0.5 ml의 혈액을 안와정맥총에서 채혈하였다. 체중은 채혈 직전에 각각 측정하였다.

5. 혈구수 측정

자동혈구측정기로 백혈구(WBC), 적혈구(RBC), 혈소판(Platelet) 수를 측정했다. 또한 혈액 일부를 취해 혈액 도말 표본을 제작하여 Giemsa염색을 행한 후 각 혈구들을 분별계수하고, 얻어진 호중구(neutrophil)의 비율에 의해 호중구수를 다음식에 의해 산출했다.

호중구수(개/mm³)
 = 전 백혈구수(개/mm³)×호중구비율(%)×1/100

6. 통계처리

혈구수 및 체중에 대하여 Student's *t*-test를 사용하여 무처치군 혹은 용매 대조군과 *p*<0.05, *p*<0.01 에서 통계적 유의성을 검증하였다.

III. 결 과

1. 정상마우스에서 복합항암제와 HM 10411의 병용투여 효과

1) 호중구수에 대한 영향

항암제를 투여하지 않은 무처치군의 호중구수는 약 0.5~2.1×10³개의 범위로 시험 기간 중 대체로 일정하게 유지되었다. 용매대조군의 호중구수는 항암제 투여 후부터 무처치군에 비해 유의적으로(*p*<0.05) 감소하기 시작하여 항암제 투여 4일 후에 최저치에 이르렀다. 그 이후 5~6일에는 용매대조군의 호중구수는 점차 증가되어 항암제 투여 8일 후에는 무처치군에 비하여 약 2배 이상에 달하는 일시적 rebound 현상을 보였다. HM 10411 투여군의 경우 호중구수가 항암제 투여 3일째까지 무처치군에 비해 감소되었지만 항암제 투여 4일 후부터는 증가하기 시작하여 항암제 투여 5일 후에는 무처치군에 비해 약 40배에 달하는 수준까지 증가하였으며 이러한 호중구수의 증가는 항암제 투여 6일 후에도 관찰되었다. 대조물질로 사용한 filgrastim 투여군에서도 이와 유사한 호중구수의 변화가 관찰되었으나, HM 10411 투여군만큼 호중구수의 변화를

Table 1. Effects of HM 10411 and Filgrastim on Quantitive Changes of Neutrophils in Blood of the ICR Mice (n = 5) after Receiving a Single Intraperitoneal Injection of Cyclophosphamide (130 mg/kg), Doxorubicin (4.5 mg/kg), and Vincristine (1 mg/kg) on Day 0

Day/ Group	No. of Neutrophils (×10 ³ /mm ³)			
	Non-treated	Vehicle	HM 10411	Filgrastim
1	2.12±0.33	1.05±0.10*	1.55±0.15	1.59±0.18 ⁺
2	1.48±0.28	0.67±0.15*	1.19±0.14	0.98±0.16
3	0.92±0.19	0.17±0.07**	0.67±0.10 ⁺⁺	0.50±0.02* ⁺⁺
4	0.66±0.03	0.15±0.02**	5.41±0.45*** ⁺⁺	2.37±0.24*** ⁺⁺
5	0.56±0.06	0.22±0.06**	23.11±0.87*** ⁺⁺	15.89±0.65*** ⁺⁺
6	0.74±0.07	0.34±0.03*	10.09±1.21*** ⁺⁺	9.97±0.54*** ⁺⁺
8	1.06±0.12	2.66±0.41	3.49±0.40**	4.72±0.71**

HM 10411 or filgrastim (100 µg/kg/day) was injected subcutaneously into the mice from day 1 to day 5.
 Values indicate Mean±S.E.M.
 Significantly different from Non-treated group (; *p*<0.05, **; *p*<0.01)
⁺Significantly different from Vehicle group (+; *p*<0.05, ⁺⁺; *p*<0.01).

Table 2. Effects of HM 10411 and Filgrastim on Quantitive Changes of WBC in Blood of the ICR Mice (n = 5) after Receiving a Single Intraperitoneal Injection of Cyclophosphamide (130 mg/kg), Doxorubicin (4.5 mg/kg), and Vincristine (1 mg/kg) on Day 0

Day/ Group	No. of WBC (×10 ³ /mm ³)			
	Non-treated	Vehicle	HM 10411	Filgrastim
1	5.01±1.02	3.13±0.57	3.86±0.59	4.55±0.26
2	4.78±0.67	1.92±0.30**	2.90±0.42*	2.41±0.55*
3	4.58±0.76	1.22±0.15**	2.10±0.27*** ⁺	1.44±0.07**
4	4.78±0.98	1.18±0.07**	15.44±2.69*** ⁺⁺	6.32±0.98 ⁺⁺
5	4.32±0.76	2.72±0.97	43.18±1.09*** ⁺⁺	40.90±3.75*** ⁺⁺
6	3.94±0.52	2.92±0.35	24.86±2.87*** ⁺⁺	26.82±1.39*** ⁺⁺
8	6.78±0.54	9.00±1.21	10.25±1.12	12.22±1.46*

HM 10411 or filgrastim (100 µg/kg/day) was injected subcutaneously into the mice from day 1 to day 5.
 Values indicate Mean±S.E.M.
 Significantly different from Non-treated group (; *p*<0.05, **; *p*<0.01).
⁺Significantly different from Vehicle group (+; *p*<0.05, ⁺⁺; *p*<0.01).

보이지 않았다(Table 1).

2) 백혈구수에 대한 영향

복합 항암제 투여 후 각 군의 말초백혈구수의 변화는 호중구수 변화와 유사한 양상으로 진행되었다. 무처치군의 백혈구수는 실험기간 중 정상범위에서 유지되었지만, 용매 대조군의 백혈구수는 항암제 투여 후 감소하기 시작하여 투여 4일째에 최저치에 이르렀다. 이후 용매 대조군의 백혈구수는 점차 증가하였고 항암제 투여 8일 후 백혈구수의 일시적인 증가가 관찰되었다. HM 10411 투여군의 백혈구수는 항암제 투여 3일 후까지 계속 감소되다가 항암제 투여 4일째부터 증가하기 시작하여 항암제 투여 5일째에 무처치군에 비해 10배 높은 수준으로 유의적으로(*p*<0.01) 증가하였다. Filgrastim 투여군에서도 이와 유사한

Table 3. Effects of HM 10411 and Filgrastim on Quantitive Changes of RBC in Blood of the ICR Mice (n = 5) after Receiving a Single Intraperitoneal Injection of Cyclophosphamide (130 mg/kg), Doxorubicin (4.5 mg/kg), and Vincristine (1 mg/kg) on Day 0

Day/ Group	No. of RBC (×10 ⁶ /mm ³)			
	Non-treated	Vehicle	HM 10411	Filgrastim
1	10.14±0.35	9.93±0.46	9.99±0.35	9.52±0.38
2	8.75±0.10	8.35±0.41	9.66±0.55	8.81±0.52
3	8.07±0.23	8.47±0.30	8.42±0.30	9.68±0.30**
4	8.95±1.10	9.25±0.24	8.86±0.53	9.47±0.63
5	7.82±0.29	8.75±0.46	7.97±0.10	8.19±0.24
6	8.66±0.17	6.67±0.60	7.30±0.79	7.63±0.18
8	8.72±0.15	7.43±0.36	7.80±1.23	7.82±0.24

HM 10411 or filgrastim (100 µg/kg/day) was injected subcutaneously into the mice from day 1 to day 5.
 Values indicate Mean±S.E.M.
 Significantly different from Non-treated group (; *p*<0.05, **; *p*<0.01).
⁺Significantly different from Vehicle group (+; *p*<0.05, ⁺⁺; *p*<0.01).

Table 4. Effects of HM 10411 and Filgrastim on Quantitative Changes of Platelets in Blood of the ICR Mice (n = 5) after Receiving a Single Intraperitoneal Injection of Cyclophosphamide (130 mg/kg), Doxorubicin (4.5 mg/kg), and Vincristine (1 mg/kg) on Day 0

Day/ Group	No. of Platelets ($\times 10^3/\text{mm}^3$)			
	Non-treated	Vehicle	HM 10411	Filgrastim
1	1313.60 ± 150.27	538.40 $\pm 142.12^{**}$	800.40 $\pm 195.30^{**}$	630.20 $\pm 55.94^{**}$
2	895.20 ± 132.41	509.20 ± 156.67	495.80 ± 70.94	410.80 $\pm 68.79^*$
3	815.40 ± 87.75	415.40 $\pm 64.93^*$	687.80 ± 167.36	453.80 ± 25.80
4	896.40 ± 40.51	367.80 $\pm 52.33^{**}$	554.80 $\pm 97.47^{**}$	403.00 $\pm 37.74^{**}$
5	821.80 ± 49.27	675.00 ± 183.70	363.40 $\pm 30.75^*$	281.40 $\pm 37.17^{**+}$
6	705.20 ± 134.91	369.80 ± 117.47	215.80 $\pm 54.60^*$	323.20 ± 19.17
8	693.80 ± 89.69	1047.00 ± 55.17	858.60 ± 178.77	894.20 ± 59.16

HM 10411 or filgrastim (100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) was injected subcutaneously into the mice from day 1 to day 5.

Values indicate Mean \pm S.E.M

Significantly different from Non-treated group (; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$).

+Significantly different from Vehicle group (+; $p < 0.05$, ++; $p < 0.01$).

백혈구수의 변화가 관찰되었다(Table 2).

3) 적혈구수에 대한 영향

항암제 투여 후 용매대조군, HM 10411, filgrastim 투여 군에서 무처치군에 비해 일시적인 적혈구수의 변화가 관찰되었으나, 세 군 사이에는 유의적인 차이가 없었고, 정상 범위를 벗어나지 않았다(Table 3).

4) 혈소판수에 대한 영향

Table 5. Effects of HM 10411 and Filgrastim on Body Weight Changes in ICR Mice (n = 5) after Receiving a Single Intraperitoneal Injection of Cyclophosphamide (130 mg/kg), Doxorubicin (4.5 mg/kg), and Vincristine (1 mg/kg) on Day 0

Day/ Group	Body weight (g)			
	Non-treated	Vehicle	HM 10411	Filgrastim
0	33.90 \pm 0.20	33.22 \pm 0.29	33.62 \pm 0.40	33.82 \pm 0.31
1	33.68 \pm 0.45	30.82 \pm 0.62**	30.78 \pm 0.60**	32.90 \pm 0.57**
2	35.06 \pm 0.58	29.44 \pm 0.60**	28.70 \pm 0.61**	31.84 \pm 0.41**
3	35.62 \pm 0.39	29.88 \pm 0.75**	30.70 \pm 0.75**	29.24 \pm 0.54**
4	35.84 \pm 0.61	29.86 \pm 0.49**	30.76 \pm 1.47**	28.54 \pm 0.74**
5	35.40 \pm 0.75	30.14 \pm 1.33**	29.00 \pm 0.85**	28.80 \pm 1.27**
6	34.20 \pm 0.45	32.42 \pm 0.53	29.66 \pm 1.59*	29.96 \pm 1.04*
8	37.48 \pm 0.67	32.18 \pm 2.16*	33.28 \pm 1.04	31.16 \pm 0.95*

HM 10411 or filgrastim (100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) was injected subcutaneously into the mice from day 1 to day 5.

Values indicate Mean \pm S.E.M

Significantly different from Non-treated group (; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$).

항암제 투여 후 1, 4, 5일째에 HM 10411, filgrastim 투여군에서 혈소판수가 무처치군에 비해 유의적으로 감소되었지만, 이후 회복되어 8일째에는 정상 수준으로 회복되었다(Table 4).

5) 체중변화에 대한 영향

무처치군에서는 동물의 체중이 증가하는 경향이 관찰되었으나, 용매대조군, HM 10411, filgrastim 투여군에서는 무처치군에 비해 항암제 투여 5일때까지 유의적으로 ($p < 0.01$) 체중이 감소되다가 6일 이후 점차 증가되었으나, 무처치군에 비해 완전히 회복되지는 않았다(Table 5).

2. 답암마우스에서 cyclophosphamide와 HM 10411의 병용투여

1) 호중구수에 대한 영향

CPA 투여 후 용매대조군의 호중구수는 지속적으로 감소되어 항암제 투여 5일 후 최저치에 이르렀고, 이후 점차 증가되었다. HM 10411 투여군에서 호중구수는 항암제 투여 후 4일째에 최저치에 이르렀으며, 이후 점차 증가하여 CPA 투여 5, 6일 후 무처치군에 비해 각각 14배, 18배에 달하는 수준까지 증가하였다. Filgrastim 투여군에서도 이와 유사한 호중구수의 변화가 관찰되었으나, HM 10411 투여군만큼 호중구수의 변화를 보이지 않았다(Table 6).

2) 백혈구수에 대한 영향

항암제를 투여하지 않은 무처치군에서는 시험기간 중 일정한 백혈구수를 유지하였다. CPA 투여 후 용매대조군의 백혈구수는 점차 감소하여 5일째에 최저치에 이르렀다.

Table 6. Effects of HM 10411 and Filgrastim on Quantitative Changes of Neutrophils in Blood of Colon 26 adenocarcinoma-bearing BALB/c Mice (n = 5) after Receiving a Single Intraperitoneal Injection of Cyclophosphamide (200 mg/kg) on Day 0

Day/ Group	No. of Neutrophils ($\times 10^3/\text{mm}^3$)			
	Non-treated	Vehicle	HM 10411	Filgrastim
0	2.62 \pm 0.32	2.34 \pm 0.22	2.01 \pm 0.44	2.55 \pm 0.37
2	2.43 \pm 0.09	1.02 \pm 0.08**	1.74 \pm 0.22**	1.82 \pm 0.17**+
3	3.52 \pm 0.30	0.40 \pm 0.13**	0.78 \pm 0.21**	0.71 \pm 0.17**
4	0.77 \pm 0.12	0.18 \pm 0.03**	1.97 \pm 0.48**++	0.42 \pm 0.07+
5	0.86 \pm 0.03	0.05 \pm 0.01**	12.41 \pm 0.53**+++	3.83 \pm 0.41**+++
6	0.96 \pm 0.08	0.39 \pm 0.06**	17.46 \pm 1.49**+++	8.94 \pm 0.43**+++
8	1.30 \pm 0.20	1.01 \pm 0.32	8.43 \pm 0.80**+++	4.07 \pm 0.37**+++
10	1.14 \pm 0.21	0.74 \pm 0.11	2.41 \pm 0.45*+++	3.11 \pm 0.16**+++

HM 10411 or filgrastim (100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) was injected subcutaneously into the mice from day 1 to day 5.

Values indicate Mean \pm S.E.M.

Significantly different from Non-treated group (; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$)

+Significantly different from Vehicle group (+; $p < 0.05$, ++; $p < 0.01$).

Table 7. Effects of HM 10411 and Filgrastim on Quantitative Changes of WBC in Blood of Colon 26 adenocarcinoma-bearing BALB/c Mice (n = 5) after Receiving a Single Intraperitoneal Injection of Cyclophosphamide (200 mg/kg) on Day 0

Day/ Group	No. of WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)			
	Non-treated	Vehicle	HM 10411	Filgrastim
0	7.17 ± 0.48	7.68 ± 0.54	7.37 ± 0.35	7.73 ± 0.58
2	3.75 ± 0.42	2.12 ± 0.30	3.36 ± 0.63	2.67 ± 0.42
3	7.59 ± 0.53	1.37 $\pm 0.42^{**}$	2.56 $\pm 0.67^{**}$	1.98 $\pm 0.34^{**}$
4	5.06 ± 0.57	0.88 $\pm 0.08^{**}$	2.11 $\pm 0.50^{***+}$	0.75 $\pm 0.13^{**}$
5	6.04 ± 0.49	0.78 $\pm 0.13^{**}$	19.04 $\pm 1.11^{***+}$	15.42 $\pm 0.65^{***+}$
6	5.28 ± 0.73	3.88 ± 0.43	29.98 $\pm 3.12^{***+}$	26.02 $\pm 1.25^{***+}$
8	5.66 ± 0.65	13.36 $\pm 1.57^{**}$	21.78 $\pm 2.81^{**}$	11.00 $\pm 0.72^{**}$
10	5.12 ± 0.29	9.24 $\pm 1.22^*$	9.44 $\pm 1.55^*$	10.98 $\pm 0.39^{**}$

HM 10411 or filgrastim (100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) was injected subcutaneously into the mice from day 1 to day 5. Values indicate Mean \pm S.E.M.
Significantly different from Non-treated group (; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$).
+Significantly different from Vehicle group (+; $p < 0.05$, ++; $p < 0.01$).

CPA 투여 8일 후 용매대조군의 백혈구수는 무처치군의 약 2배에 달하는 수치로 증가하였다. HM 10411 투여군, filgrastim 투여군의 백혈구수 변화는 거의 비슷한 양상으로 진행되었다. HM 10411 투여군에서 4일째까지 백혈구수가 감소되다가 5, 6일째에는 무처치군에 비해 각각 3배, 5.5배 정도 증가하였다. Filgrastim 투여군에서도 이와 유

Table 8. Effects of HM 10411 and Filgrastim on Quantitative Changes of RBC in Blood of Colon 26 adenocarcinoma-bearing BALB/c Mice (n = 5) after Receiving a Single Intraperitoneal Injection of Cyclophosphamide (200 mg/kg) on Day 0

Day/ Group	No. of RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)			
	Non-treated	Vehicle	HM 10411	Filgrastim
0	11.02 \pm 0.46	11.06 \pm 0.54	10.05 \pm 0.52	10.21 \pm 0.71
2	10.65 \pm 0.36	9.95 \pm 0.41	9.79 \pm 0.42	10.24 \pm 0.37
3	10.54 \pm 0.23	9.49 \pm 0.72	9.06 \pm 0.09	10.22 \pm 0.45
4	9.77 \pm 0.16	9.49 \pm 0.18	9.36 \pm 0.25	8.53 \pm 0.71
5	9.24 \pm 0.56	10.09 \pm 0.31	10.45 \pm 0.54	9.55 \pm 0.36
6	9.19 \pm 0.29	7.83 \pm 0.34*	9.41 \pm 0.12++	8.71 \pm 0.42
8	8.74 \pm 0.40	7.72 \pm 0.23	8.34 \pm 0.22	8.80 \pm 0.13+
10	8.85 \pm 0.32	10.16 \pm 0.71	9.21 \pm 0.92	9.41 \pm 0.29

HM 10411 or filgrastim (100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) was injected subcutaneously into the mice from day 1 to day 5. Values indicate Mean \pm S.E.M.
Significantly different from Non-treated group (; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$).
+Significantly different from Vehicle group (+; $p < 0.05$, ++; $p < 0.01$).

사한 백혈구수의 변화가 관찰되었다(Table 7).

3) 적혈구수에 대한 영향

CPA 투여후 용매대조군에서 적혈구수의 지속적이며 유의적인 감소는 관찰되지 않았고, HM 10411 투여군에서도 용매대조군에 비해 항암제 투여 6일째에 유의하게 일시적인 수치의 변화가 있었으나 전반적으로 유의한 적혈구수의 변화는 관찰되지 않았다(Table 8).

4) 혈소판수에 대한 영향

용매대조군, HM 10411 투여군, filgrastim 투여군에서의 혈소판수는 CPA 투여 5일 후 무처치군에 비해 유의성 있게 ($p < 0.01$) 일시적으로 감소되었다. 또한, CPA 투여 6일 후에 HM 10411 투여군, filgrastim 투여군에서도 혈소판수가 용매대조군에 비해 유의하게 ($p < 0.01$) 일시적으로 감소되었지만 이후 점차 회복되는 경향이 관찰되었다(Table 9).

5) 체중변화에 대한 영향

무처치군에서는 시험 3일째까지 체중이 증가하다가 그 이후에는 암세포의 성장으로 인하여 체중의 감소가 관찰되었다. HM 10411 투여군, filgrastim 투여군에서는 전반적으로 무처치군에 비해 체중이 감소하다가 시험 후반부에

Table 9. Effects of HM 10411 and Filgrastim on Quantitative Changes of Platelets in Blood of Colon 26 adenocarcinoma-bearing BALB/c Mice (n = 5) after Receiving a Single Intraperitoneal Injection of Cyclophosphamide (200 mg/kg) on Day 0

Day/ Group	No. of Platelets ($\times 10^3/\text{mm}^3$)			
	Non-treated	Vehicle	HM 10411	Filgrastim
0	1149.80 ± 99.67	1170.80 ± 71.48	1175.20 ± 60.05	1181.00 ± 101.27
2	906.60 ± 98.89	672.20 ± 90.54	810.80 ± 44.29	632.80 ± 98.05
3	878.60 ± 30.29	550.00 $\pm 87.08^*$	996.80 $\pm 122.36^+$	516.20 $\pm 89.97^*$
4	756.00 ± 66.78	520.40 ± 68.26	584.60 ± 81.02	812.00 ± 119.96
5	857.60 ± 91.90	378.40 $\pm 48.09^{**}$	310.40 $\pm 41.37^{**}$	327.80 $\pm 26.23^{**}$
6	868.80 ± 148.94	526.80 ± 44.62	225.20 $\pm 32.17^{***+}$	191.80 $\pm 35.12^{***+}$
8	797.00 ± 84.07	878.20 ± 99.72	696.60 ± 63.39	1015.00 ± 80.09
10	1005.40 ± 81.66	227.20 $\pm 54.81^{**}$	921.20 $\pm 60.12^{++}$	1320.20 $\pm 41.92^{***+}$

HM 10411 or filgrastim (100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) was injected subcutaneously into the mice from day 1 to day 5. Values indicate Mean \pm S.E.M.
Significantly different from Non-treated group (; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$).
+Significantly different from Vehicle group (+; $p < 0.05$, ++; $p < 0.01$).

Table 10. Effects of HM 10411 and Filgrastim on Body Weight Changes in Colon 26 adenocarcinoma-bearing BALB/c Mice (n = 5) after Receiving a Single Intraperitoneal Injection of Cyclophosphamide (200 mg/kg) on Day 0

Day/ Group	Body weight (g)			
	Non-treated	Vehicle	HM 10411	Filgrastim
0	21.54±0.48	21.04±0.51	22.46±0.47	21.88±0.51
1	22.10±0.41	19.28±0.66	21.06±0.71	19.18±0.30
2	23.12±0.57	20.32±0.54	20.74±0.81	20.24±0.81
3	23.38±0.25	20.58±0.70*	21.32±0.88	21.66±0.33*
4	22.92±0.32	20.78±0.30	21.44±1.43	19.32±1.89
5	22.92±0.50	19.94±0.97	20.74±1.12	18.88±1.49
6	22.68±0.35	19.80±0.44	20.96±0.48	19.18±1.36*
8	21.88±0.82	19.54±0.74	20.92±1.06	22.02±1.13
10	21.88±0.38	17.64±1.49	22.92±1.13	20.48±1.81

HM 10411 or filgrastim (100 µg/kg/day) was injected subcutaneously into the mice from day 1 to day 5.

Values indicate Mean±S.E.M.

Significantly different from Non-treated group (; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$).

이르러 무처치군과 비슷한 수준으로 회복되었다(Table 10).

IV. 고 찰

본 시험은 HM 10411의 유효성을 검토하기 위하여 임상에서 암화학 요법으로 일반적으로 사용되는 복합 항암제를 처리한 정상 ICR 마우스와 실제 암에서의 효과를 알아보기 위해 담암 BALB/c 마우스를 실험에 이용하여 항암제 유발 호중구 감소증에 대한 회복 촉진 효과를 살펴 보았다. 약물의 투여경로는 감염의 우려가 적고, 실제 임상에서 가장 보편적으로 사용되고 있는 피하 투여를 선택하였다.

ULICH 등(1988)에 의하면, G-CSF를 생체 내에 투여했을 때 골수 분화의 진행 단계에서 여러 가지 작용이 나타난다고 한다. 투여 후 4~12시간째에 골수모세포와 전골수세포의 수와 크기 및 세포질의 과립화 등은 증가하나, 성숙 호중구에서는 감소가 관찰되어, G-CSF가 골수 진행 과정의 초기 세포에서는 분열유발인자(mitogen)로 작용할 뿐 아니라 성숙 골수 호중구에 대해서도 releasing factor로 작용한다고 한다. 또한 G-CSF는 초기 말초 호중구 감소에 대해 매개체(mediator)로 작용하거나 현저한 핵의 과분절을 유발한다고 보고하였다.

이러한 G-CSF는 대식세포나 내피세포가 endotoxin이나 다른 세균성 부산물에 노출되었거나 T 림프구가 alloantigen이나 lectins에 노출되었을 때 자극을 받아 생산된다고 한다(Donald, 1985). 또한 임신기간 동안에 G-CSF와 G-CSF의 수용체가 태반이나 탈락막 및 자궁내막 선 세포에서도 생산되는 것으로 밝혀져 G-CSF는 탈락막과 태반의 기능에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Saito et

al., 1994).

한편, G-CSF 수용체는 약 800개의 아미노산 잔여물들의 단일 transmembrane 당단백이다. G-CSF는 이러한 특별한 세포 표면의 수용체와 결합하여 생물학적 활성을 나타내며, 친화성이 높은 결합부위는 조혈 전구세포와 호중구 구성 과립세포에 존재하는 것으로 알려져 있다(Fukunaga et al., 1990).

정상 ICR 마우스에 cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine의 복합 항암제를 투여하였을 때 HM 10411 투여군에서는 호중구수가 항암제 투여 3일째까지 무처치군에 비해 감소되었지만 항암제 투여 4일부터는 증가하기 시작하여 항암제 투여 5일 후에는 무처치군에 비해 약 40 배에 달하는 수준까지 증가하였으며 호중구수의 증가는 항암제 투여 6일 후에도 관찰되었다. 대조물질로 사용한 filgrastim 투여군에서도 이와 유사한 호중구수의 변화가 관찰되었으나, HM 10411 투여군만큼 호중구수의 변화를 보이지 않았다. 적혈구수의 변화에 있어서는 일시적인 수적 변화가 보였으나, 유의적인 차이는 관찰할 수 없었다. 또한 HM 10411을 항암제와 병용 투여시 혈소판수가 감소되다가 다시 증가하여 회복되는 경향이 관찰되었다.

담암 BALB/c 마우스에서도 정상 ICR 마우스에서와 마찬가지로 HM 10411 투여시 백혈구수와 호중구수는 용매 대조군에 비해 빨리 회복되었으며 적혈구와 혈소판수는 일시적으로 유의한 변화를 보였을 뿐 그 외의 다른 영향은 관찰할 수 없었다. 이러한 결과는 filgrastim을 비교물질로 사용한 다른 그룹(백 등, 1997)의 항암제 유발 호중구 감소증에 대한 G-CSF의 회복촉진효과 결과와도 유사하게 나타났다.

이상의 결과들을 종합해 보았을 때 HM 10411는 정상 및 담암 마우스에서 항암제 투여 후 나타나는 호중구 감소증에 대해 filgrastim과 유사한 호중구수 회복 촉진 효과를 가지고 있는 것으로 생각되며, 본 실험 결과는 임상에서 항암제 투여에 의한 호중구 감소증 치료에 사용될 유용한 전임상 자료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Bodey, G. (1986): Infection in cancer patients: A continuing association. *Am. J. Med.*, (Suppl 1A) **81**, 11-26.
- Donald Metcalf. (1985): The Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factors. *Science*, **229**, 16-22
- Fukunaga, R. (1990): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8702.
- Nagata, S. (1994): Granulocyte colony stimulating factor and its receptor. In *The Cytokine Handbook* (Thompson, A. Ed.), pp. 371-385. Academic Press, London.

- 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.
- Pizzo, P.A. (1984): Granulocytopenia and cancer chemotherapy: past problems, current solutions, future challenges. *Cancer*, **54**, 2649-2661
- Saito, S. *et al.* (1994) *Growth Factors* **10**, 135.
- ULICH *et al.* (1988): Kinetics and Mechanisms of Recombinant Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor-Induced Neutrophilia. *American Journal of Pathology*, **133**, 630-638.
- 백남진, 강재구, 최재묵, 김기완, 김달현, 김제학, 김현수 (1997): 마우스에서 항암제 유발 호중구 감소에 대한 CJ-50001의 회복촉진효과. *한국응용약물학회지* **5**(4), 384-389.