

YHB216의 비글개에서 정맥내 단회 및 4주 반복투여독성시험

노용우 · 장호송 · 지형진 · 정은용 · 신지순 · 강민정¹ · 안경규¹ · 최연식¹ · 이종욱¹ · 강종구*

충북대학교 수의과대학, ¹(주)유한양행 중앙연구소
청주시 흥덕구 개신동 산 48 충북대학교 수의과대학

Intravenous Single Dose and Four-week Repeated Dose Toxicity Study of YHB216, a Recombinant Human Erythropoietin, in Beagle Dogs

Yong Woo ROH, Hu Song ZHANG, Hyeong Jin JI, Eun Yong JUNG, Ji Soon SIN, Min Joung KANG¹, Kyoung Kyu AHN¹, Yeon Shik CHOI¹, Jong Wook LEE¹, and Jong Koo KANG*

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, 48 Gaeshin-dong, Heungduck-gu, Cheongju 361-763, Korea
¹Yuhan Research institute, Yuhan Corporation, 27-3 Dangjeong-dong, Gunpo 435-715, Korea

(Received March 6, 2002; accepted March 21, 2002)

Abstract : Recently, recombinant human erythropoietin (rHu-EPO) has been used to treat various types of anemia. YHB216 is a new rHu-EPO developed by Yuhan Research Institute. In this study, we investigated the single dose and 4-week repeated dose toxicity of YHB216 in Beagle dogs. In the single dose toxicity study, YHB216 was administered intravenously at single dose levels of 0 and 25,000 IU/kg to dogs (2 dogs/sex/group). There were no treatment-related changes in survivals, clinical signs, body weight gain, hematological values, blood chemical values, and necropsy finding during experimental period. In the repeated dose toxicity study, YHB216 was administered intravenously to dogs for 4 weeks at the dose levels of 0, 100, 500, and 2,500 IU/kg (3 dogs/sex/group). There were no toxicologically significant changes in clinical signs, body weights, food and water consumptions, ophthalmoscopy, urinalysis and blood chemistry. There were increased values of red blood cell, hemoglobin, and hematocrit at all treated groups. Spleen revealed increased weight and extramedullary hematopoiesis at 500 IU/kg or more. These changes are all considered to be pharmacology-related effects and were recovered after 4-week recovery period. From these results, it is concluded that LD₅₀ value was above 25,000 IU/kg in the single dose toxicity study of YHB216 in dogs and the no observed adverse effect level (NOAEL) was 100 IU/kg/day in the repeated dose toxicity study of YHB216 in dogs.

Key words □ YHB216, rHu-EPO, single dose toxicity, repeated dose toxicity, Beagle dogs

Erythropoietin (EPO)은 분자량 30,400 dalton의 165개의 아미노산으로 구성된 당단백질(Miyake 등, 1977)로서 저산소증 상태가 되면 신장 피질부의 관주위 간질세포(Maxwell 등, 1990) 또는 뇨세관 상피세포(Koury 등, 1988)에서 생성되며, 골수에 작용하여 적혈구전구세포(CFU-E; colony forming unit-erythroid)의 분화와 증식을 자극(Krantz, 1991)하고 적혈구생성을 조절 및 촉진한다(Eschbach와 Adamson, 1989; Ridley 등, 1994). 이러한 EPO의 생산은 태아기때 주로 간에서 이루어지고 조절작용 외에 체세포의 성장 및 발육에도 관계하며(Sandra 등, 1998), 출생 후 6주가 지나면 대부분 신장에서 생성되기 시작하지만(Fisher, 1993) 성인의 5~10% 정도가 간세포

(hepatocyte) 또는 Kupper cell에서 생성되는 등(Erslev 등, 1980) 기타 기관에서도 생산된다고 보고되어 있다.

1906년 Carnot과 Deflandre에 의해 동맥의 저산소 상태가 적혈구 생성을 촉진하는 체액성 인자를 생성한다는 가설 이후 EPO는 1977년 재생불량성 빈혈환자의 오줌으로부터 최초 정제되었지만(Miyake, 1977) 원료수급의 어려움 때문에 널리 보급되지 못하다가 Jacobson 등과 Lin 등이 유전자 크로닝에 성공함에 따라 recombinant EPO의 대량생산이 가능하게 되었다(Jacobs 등, 1985; Jacobson 등, 1957; Lin 등, 1985). EPO는 현재 만성 신부전과 관련된 빈혈, 신성 빈혈, ESRD (end stage renal disease), 만성 빈혈, 조산에 의한 빈혈, 자가 수혈, 화학요법과 방사선 치료후의 혈액회복 등에 널리 사용되고 있으며(Mino 등, 1990; Okumura 등, 1990), 최근에는 azidothymidin이나 HIV와

*To whom correspondence should be addressed.

관련된 임상치료, 인공혈액과 겸용시 발생하는 뇌경색 등의 각종 허혈성 병변(Fisher, 1993; Vreundenhil 등, 1993) 및 중추신경계에서 antiapoptotic, antioxidant, neurotrophic, angiogenic agent로 주목받고 있다(Siren과 Ehrenreich, 2001).

YHB216은 (주)유한양행 중앙연구소에서 유전자 재조합 기술을 이용하여 Chinese hamster ovary (CHO) 세포에 형질전환시켜 생산한 recombinant human erythropoietin으로 정상 및 실험 랫드에서의 약효시험결과 대조약물인 eprex와 동등한 약효를 가지는 것으로 나타났다. 이에 본 연구에서는 YHB216의 안전성평가의 일환으로 비글개에 대한 단회 및 4주 반복투여 독성시험을 실시하였다.

시험방법

시험물질

YHB216(단회투여독성시험: Lot No. 9903, 4주 반복투여 독성시험: Lot NO. 9906)은 냉장 보관된 무색 투명한 액상의 물질이며, 시험물질조제액은 (주)유한양행 중앙연구소에서 YHB216에 부형물질(formulated buffer)을 가하여 희석법으로 조제하였다. 부형물질로는 0.9 L의 멸균증류수에 1.164 g의 인산이수소나트륨(sodium phosphate, dibasic)과 2.225 g의 인산일수소나트륨(sodium phosphate, monobasic)을 넣어 제조한 sodium phosphate 완충용액에 등장화제로 5.84 g의 염화나트륨과 안정화제로 20% 농도의 인혈청알부민(human serum albumin)을 12.5 ml 첨가한 다음 pH를 7.0으로 조정하고 최종부피가 1 L가 되도록 만든 수용액을 사용하였다.

시험계 및 사육환경

단회투여독성시험은 (주)바이오제노믹스로부터 약 5개월령의 비글개 암·수 각각 5마리를 구입하여 1주일간 적응사육을 시킨 후, 육안관찰을 통해 건강한 시험계만을 선발하여 시험에 사용하였고, 4주 반복투여독성시험은 Marshall Farm Inc (NW, USA)로부터 4~5개월령의 비글개 암·수 각각 16마리를 입수하여 1개월간 검역, 순화 및 적응사육을 거쳐 육안적으로 건강한 시험계임을 확인한 후 시험에 이용하였다.

시험계의 식별을 위해 개체마다 귀의 안쪽에 문신(skin tattoo)을 하고, 각 우리(pen)마다 개체번호, 성별 및 군 등을 표기한 라벨(label)을 사용하였으며, 시험계는 우리 당 1마리씩 수용하였다.

사육환경조건은 시험종료시까지 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$ (단회투여 독성시험의 경우 $23 \pm 5^\circ\text{C}$), 상대습도 40~60%, 환기회수 10~12 회/hr, 조도 150~300 lux 및 12시간 주기의 명암 간격을 유지하였으며, 사료는 (주)퓨리나 사료에서 제조한 고형사료를 공급하였고, 음수는 필터를 통하여 여과된 수도 물을 자유섭취 시켰다.

투여량의 설정 및 시험물질 투여

시험군의 구성은 선발된 각각의 시험계에 대해 단회투여 독성시험은 군 당 암·수 각각 2마리씩 체중을 고려하여 배정하였고, 4주 반복투여독성시험은 연속 무작위화법을 이용하여 군 당 암·수 각각 3마리씩 배정하였으며 회복군으로 대조군 및 고용량투여군에 암·수 각각 2마리씩을 추가로 배정하였다.

투여용량은 동일제형약물들의 비설치류에서 정맥내 단회(Cho 등, 1996; Cho 등, 1998; Noguchi 등, 1990; Spicer와 Wisler, 1990; Tokiwa 등, 1988) 및 4주 반복투여독성시험(Cho 등, 1996; Cho 등, 1998; Kikumori 등, 1988; Noguchi 등, 1990; Spicer와 Wisler, 1990)의 결과와 YHB216의 임상예상용량($50 \sim 100 \text{ IU/kg}$)을 고려하여 단회투여독성시험의 경우 $25,000 \text{ IU/kg}$ 의 단일투여용량으로 설정하였고, 4주 반복투여독성시험의 경우 100, 500 및 $2,500 \text{ IU/kg}$ 의 3단계 용량으로 설정하였다. 또한, 개체별 투여액량은 0.2 ml/kg 으로 설정하였고 투여직전 또는 주 1회 측정된 체중을 기초로 산출하였다. 투여경로는 YHB216이 임상에서 정맥내 투여가 예상되는 약물이므로 정맥내 투여경로를 선택하여 정맥투여용 주사기[$23\text{G} \times 1 \text{ ml}$, (주)녹십자의료공업]를 이용하여 각각의 시험물질조제액을 시험계의 요측피내정맥으로 개체 당 1분 정도의 투여속도로 천천히 투여하였다.

관찰 및 검사항목

단회투여독성시험

일반증상 관찰 및 체중측정

임상증상 관찰은 시험물질 투여 당일의 경우 투여 후 15, 30분, 1, 2, 3 및 7시간에, 투여 후 1일부터 14일의 경우 1일 1회 세밀히 관찰하였다. 체중측정은 시험물질 투여 직전, 투여 후 1, 3 및 7일과 부검전일에 실시하였다.

혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 부검

투여직전 및 부검전에 18시간 절식시킨 모든 시험계의 우측 요측피내정맥으로부터 개체 당 약 5 ml의 혈액을 채취하여 혈액학적 및 혈액생화학적 검사를 실시하였다. 혈액학적 검사는 채취한 혈액 중 약 1 ml를 EDTA가 함유된 CBC bottle[(주)녹십자의료공업]에 담아 3시간 이내에 혈구 자동측정기(Minos Vet, Roche)를 이용하여 적혈구수(RBC), 백혈구수(WBC), 혈색소량(Hgb), 헤마토크리치(Hct), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소량(MCH), 평균적혈구혈색소농도(MCHC)치 및 혈소판수(PLT)를 측정하였다. 혈액생화학적 검사는 나머지 혈액을 실온에 30분간 방치하여 응고시킨 다음, 원심분리($3,000 \text{ rpm} \times 15 \text{ min}$)하여 혈청을 얻은 후, alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP), creatine

kinase (CK), glucose, blood urea nitrogen (BUN), creatinine, total bilirubin (T. bilirubin), cholesterol, triglyceride (TG), total protein 및 albumin을 자동분석기(550 EXPRESS, CIBA CORNING)로 측정하였다. 또한, 관찰기간 종료 후에는 살아있는 모든 시험계를 안락사 시키고 부검하여 체내·외 장기조직을 육안 관찰하였다.

4주 반복투여독성시험

일반증상 관찰

시험종료시까지 1일 1회 일반상태의 변화, 중독증상, 운동성, 외관, 자율신경등의 일반증상 및 사망동물의 유무 등을 주의 깊게 관찰하였다.

체중변화, 사료섭취량 및 음수섭취량 측정

체중은 시험물질 투여 전 1회, 시험물질 투여 후부터 시험종료시까지 주 1회씩 4주간 측정하였다. 사료섭취량은 사육 케이지별로 약 400 g 정도의 일정량을 공급한 후 사료잔량을 측정하는 방법으로 투여개시전 및 투여종료일까지 매주 1회씩 4주간 측정하여 군 당 평균사료섭취량(g/group/day)을 산출하였으며, 음수섭취량은 사육 케이지별로 급수총량과 급수잔량을 투여개시전 및 투여종료일까지 매주 1회씩 4주간 측정하여 군 당 평균음수섭취량(ml/group/day)을 산출하였다.

안과학적 검사

모든 시험동물에 대하여 시험물질 투여 최종일에 안과학적 검사를 실시하였다. 관찰 10분 전에 산동제(Midorin P; 삼천제약, Japan)를 1~2방울 점안한 후, 육안 및 검안경을 이용하여 전안부, 중간투광체 및 안저를 검사하였다.

혈액학적 및 혈액생화학학적 검사

투여직전, 부검전 및 회복기 4주차에 18시간 절식시킨 모든 시험계의 경정맥으로부터 개체 당 약 10 ml의 혈액을 채취하여 그 중 2 ml의 혈액은 EDTA가 함유된 CBC bottle[(주)농림축산검역본부]에 담아 혈액학적 검사를 실시하고, 나머지 8 ml는 혈액생화학학적 검사에 사용하였다. 혈액학적 검사는 혈액채취 후, 3시간 이내에 자동혈구측정기(Celltac a NIHON KODEN, Japan)를 이용하여 RBC, WBC, Hgb, Hct, MCV, MCH, MCHC 및 PLT를 측정하였다. 혈액생화학학적 검사는 나머지 혈액을 실온에 30분간 방치하여 응고시킨 다음, 원심분리(3,000 rpm×15 min) 하여 얻은 혈청에 대해 ALT, AST, ALP, CK, glucose, BUN, creatinine, T. bilirubin, cholesterol, TG, total protein, albumin, calcium, γ -glutamyl transpeptidase (GGT), inorganic phosphate, lactate dehydrogenase 및 A/G ratio를 자동분석기(Express plus, Chiron, US)를 이용하여 측정하였으며, sodium ion (Na^+), potassium ion (K^+) 및 chloride ion (Cl^-)은 전해질분석기(Chiron 644 US)로 측정하였다.

노검사

모든 시험동물에 대하여 시험물질 투여 최종일 및 회복기 4주차에 노검사를 실시하였다. Combur¹⁰ test[®] (Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 specific gravity, pH, leukocyte, nitrite, protein, glucose, ketone, urobilinogen, bilirubin, blood 및 hemoglobin을 검사하였다.

부검 및 장기중량 측정

시험물질 투여 최종일 및 회복기 4주차에 모든 시험동물을 안락사 시키고 부검하여 체내·외 장기조직을 육안관찰하고, 심장, 간장, 비장, 신장(좌, 우), 부신(좌, 우), 고환(수컷; 좌, 우), 난소(암컷; 좌, 우), 뇌 및 뇌하수체, 폐장, 흉선, 갑상선, 전립선, 부고환(수컷; 좌, 우) 및 자궁(암컷)의 중량을 측정하였다.

병리조직학적 검사

시험물질 투여 최종일 및 회복기 4주차에 모든 시험동물을 안락사 시키고 부검하여 병리조직학적 검사를 실시하였다. 피부, 유선, 림프절, 타액선, 골 및 골수(홍골, 대퇴골), 흉선, 기관, 폐 및 기관지, 심장, 갑상선 및 부갑상선, 혀, 식도, 위 및 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 간장, 췌장, 비장, 신장, 부신, 방광, 정낭, 전립선, 고환, 부고환, 난소, 자궁, 질, 뇌, 뇌하수체, 척수 및 그 부속기, 기타 육안적 병변이 관찰된 장기조직 등을 채취하여 10% 중성포르말린용액에 충분히 고정시킨 다음, 파라핀 포매기(Leica EG 116)에서 포매하고 로타리 마이크로톰(Leica 820)으로 약 4 μm 정도의 조직 절편을 만든 후, Hematoxylin & Eosin 염색을 하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

통계학적 분석

체중, 사료 및 음수섭취량, 혈액학적검사, 혈액생화학학적 검사 및 장기중량 등의 검사결과에서 얻어진 모든 자료들에 대해 분산의 동질성을 비교하기 위한 Levene's test를 실시하고, 분산이 동질성을 갖는 경우 one way ANOVA test를 실시하여 유의성이 관찰되면 대조군과의 유의차가 있는 시험군을 알아내기 위하여 Dunnett's test를 실시하였다[절차①]. Levene's test 결과 분산이 이질적이면 적절한 data transformation을 실시하고 다시 transformed data에 대한 Levene's test를 재실시하여 분산이 동질하면 절차①의 순서를 진행하였다. 한편 분산이 동질적이지 않는 경우에는 non-parametric ANOVA test를 실시하고 그 결과가 유의적이면 그에 합당한 t-test 방법을 선정하여 통계학적 해석을 실시하였다. 한편, 회복군에 대해서는 개체수가 적어서 통계학적 분석을 실시하지 않았다.

시험결과

단회투여독성시험

시험종료시까지 암·수 모든 시험군에서 폐사동물은 없

였으며, 시험물질에 의한 것으로 판단되는 임상증상은 전혀 관찰되지 않았다. 또한, 체중측정(Fig. 1), 혈액학적(Table I, II) 및 혈액생화학적 검사결과(Table III, IV)에서도 암·수 모든 시험군과 대조군을 비교하여 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았으며, 관찰기간 종료 후에 실시한 부검결과, 암·수 모든 시험군에서 시험물질의 영향으로 판단되는 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

4주 반복투여독성시험

폐사율 및 일반증상

시험기간동안 암·수 모든 시험군에서 사망동물은 없었으며, 시험물질과 관련된 특이적인 임상증상 역시 관찰되지 않았다.

체중변화, 사료섭취량 및 음수섭취량 측정

체중측정결과, 암·수 500 및 2,500 IU/kg 투여군에서 체중이 다소 감소하였으나 그 차이가 적었으며 대조군과

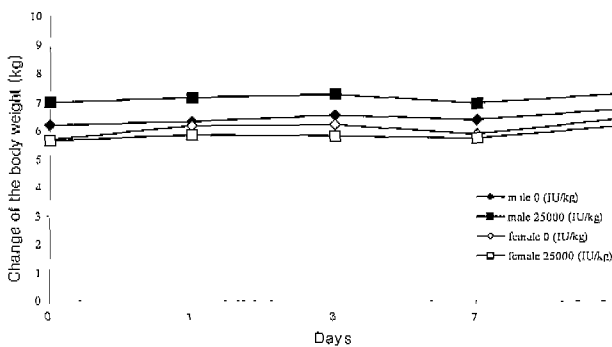


Fig. 1. Body weights of Beagle dogs treated intravenously with YHB216 at single dose (n=2).

비교하여 유의성은 없었다(Fig. 2, 3). 사료 및 음수섭취량 측정결과 암·수 500 및 2,500 IU/kg 투여군 일부 개체에서 단발성의 간헐적인 사료 및 음수섭취량의 저하가 있었으나 그 밖의 시험물질 투여군에서 특이한 변화는 관찰되지 않았다.

안과학적 및 뇨검사

안과학적 및 뇨검사 결과 모든 시험군에서 시험물질 투여와 관련된 이상변화는 관찰되지 않았다.

혈액학적 검사

시험물질 투여 종료 후에 실시한 혈액학적 검사결과(Table I, II), Hgb 및 Hct가 수컷 500 및 2,500 IU/kg 투여군과 암컷 모든 용량 투여군에서, RBC는 암컷 500 및 2,500 IU/kg 투여군에서 증가하였다. 이러한 소견들은 4주

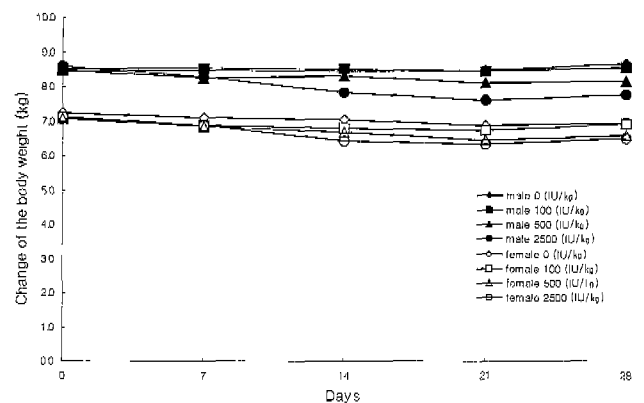


Fig. 2. Body weights of Beagle dogs injected intravenously with YHB216 for 4 weeks (n=3).

Table I. Hematology of single and 4 week repeated intravenous injection of YHB216 in male Beagle dogs and kept untreated for 4 weeks

Stage	Dose (IU/kg)	No. of animals	RBC (10 ⁶ /μl)	WBC (10 ³ /μl)	Hct (%)	Hgb (g/dl)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	PLT (×10 ³ /μl)
Single	0	2	5.9±0.31	13.2±1.20	38.3±1.48	13.8±0.92	64.5±0.70	23.1±0.28	35.9±0.99	345.5±4.90
	25,000	2	5.6±0.02	8.7±2.26	35.3±0.71	12.8±0.28	63.0±1.40	22.8±0.64	36.3±0.07	305.5±65.80
	0	2	5.7±0.29	8.8±0.42	35.2±1.48	13.0±1.06	61.5±0.70	22.6±0.71	36.8±1.98	304.5±7.80
	25,000	2	6.8±0.11	7.6±0.85	42.6±1.20	15.4±0.85	63.5±0.70	22.8±0.92	36.1±0.99	244.0±21.20
4 Weeks	0	5	6.7±0.59	7.4±0.84	44.9±3.68	14.5±1.12	67.2±4.27	21.7±1.39	32.4±0.55	210.4±30.53
	100	3	6.3±0.31	8.50±1.80	43.8±1.30	14.5±0.40	69.0±4.00	22.9±0.95	33.0±0.51	216.7±28.15
	500	3	6.9±0.46	8.1±2.53	47.2±2.27	15.7±0.68	69.00±1.73	22.9±0.61	33.3±0.20	139.0±112.30
	2,500	5	5.6±2.39	6.4±2.99	37.7±15.89	12.5±5.15	67.8±1.92	22.7±1.30	33.5±1.31	180.8±91.84
	0	3	5.8±0.72	7.4±1.12	39.5±0.17	13.5±0.49	69.3±5.69	23.3±1.89	33.5±0.12	266.7±65.4
	100	3	8.2±0.43	7.7±1.21	57.9±2.05	19.4±0.85	70.3±3.06	23.7±1.30	33.6±0.46	314.0±82.2
	500	3	9.6±0.11	8.3±0.52	62.8±0.50**	20.5±0.21**	65.3±1.15	21.3±0.45	32.6±0.35*	163.0±60.3
	2,500	3	8.3±2.90	9.5±1.79	59.3±10.23*	19.2±3.27*	76.0±19.29	24.5±6.07	32.3±0.36**	170.0±63.7
	0	2	7.2±0.30	9.4±2.69	51.5±2.47	16.7±1.06	71.5±0.71	23.2±0.49	32.4±0.49	348.5±13.44
	2,500	2	9.1±0.00	8.7±1.48	55.2±0.92	18.3±0.00	60.5±0.71	20.0±0.00	33.2±0.57	311.5±40.31

Results are mean±S.D.

RBC: red blood cell; WBC: white blood cell; Hct: hematocrit; Hgb: hemoglobin; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; PLT: platelet

*: Significantly different from the control, p<0.05.

** : Significantly different from the control, p<0.01.

Table II. Hematology of single and 4 week repeated intravenous injection of YHB216 in female Beagle dogs and kept untreated for 4 weeks

Stage	Dose (IU/kg)	No. of animals	RBC (10 ⁶ /μl)	WBC (10 ³ /μl)	Hct (%)	Hgb (g/dl)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	PLT (×10 ³ /μl)		
Single	Pre	0	2	5.9±0.45	12.4±2.55	35.7±1.70	12.9±0.78	61.0±1.40	22.0±0.35	36.0±0.49	406.5±70.0	
		25,000	2	5.1±0.40	12.3±0.42	33.1±2.90	11.8±0.92	64.5±0.70	22.9±0.07	35.6±0.35	243.0±178.2	
	After	0	2	6.2±0.36	11.4±0.92	37.9±4.38	13.7±1.34	61.5±3.50	22.0±0.92	36.0±0.57	327.0±106.1	
		25,000	2	6.5±0.02	8.1±0.35	39.7±1.48	14.5±0.57	61.5±2.10	22.4±0.78	36.6±0.07	334.5±2.10	
4 Weeks	Pre	0	5	7.1±0.10	10.2±1.81	48.3±1.70	15.4±0.49	67.8±2.17	21.6±0.63	31.9±0.22	163.4±88.47	
		100	3	6.4±0.48	9.9±3.36	45.2±1.79	14.6±0.61	70.7±2.52	22.8±0.92	32.4±0.12	188.7±89.58	
		500	3	6.9±0.32	6.8±1.04	47.7±3.08	15.2±1.07	69.3±1.53	22.0±0.61	31.9±0.21	208.0±29.51	
		2,500	5	6.9±0.33	7.8±0.47	48.3±2.63	15.4±0.93	70.2±1.79	22.5±0.65	31.9±0.34	260.4±73.77	
	Main	0	3	6.0±0.61	9.1±1.80	42.8±3.11	14.4±1.19	71.3±2.31	23.9±0.51	33.6±0.67	275.3±124.0	
		100	3	7.2±0.45	8.2±1.87	53.0±2.08**	17.8±0.86*	73.7±3.06	24.7±0.70	33.5±0.38	212.7±144.9	
		500	3	8.7±0.37***	7.3±2.31	58.2±1.63***	19.8±0.51**	67.3±3.06	22.8±1.30	34.0±0.38	224.7±50.00	
		2,500	3	8.3±0.61**	9.0±1.19	55.9±4.47**	18.6±1.80**	67.3±3.22	22.3±1.00	33.2±0.76	167.7±11.06	
		Recovery	0	2	8.5±0.51	10.8±0.79	60.9±3.81	12.5±9.19	72.0±0.00	23.2±0.35	32.3±0.50	324.5±105.36
			2,500	2	9.9±0.26	9.4±1.41	61.9±1.63	19.9±0.21	62.0±0.00	20.0±0.28	32.10±0.57	326.0±86.27

Results are means±S.D.

RBC: red blood cell; WBC: white blood cell; Hct: hematocrit; Hgb: hemoglobin; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; PLT: platelet.

*: Significantly different from the control, p<0.05.

**: Significantly different from the control, p<0.01.

***: Significantly different from the control, p<0.001.

Table III. Blood chemistry of single and 4 week repeated intravenous injection of YHB216 in male Beagle dogs and kept untreated for 4 weeks

Stage	Dose (IU/kg)	No. of animals	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	CK (U/L)	Glucose (mg/dl)		
4 Weeks	Pre	0	5	28.4±3.90	47.0±8.83	202.2±22.90	279.8±126.88	86.6±7.64	
		100	3	26.2±1.51	42.7±6.29	248.0±61.65	264.0±103.12	82.0±14.80	
		500	3	34.3±7.66	43.1±2.25	238.3±27.97	225.0±51.51	92.7±13.87	
		2,500	5	27.6±4.11	52.2±16.79	199.6±73.88	310.4±109.00	89.2±5.36	
	Main	0	3	26.8±2.88	28.3±8.46	159.3±29.50	180.7±42.78	88.3±10.97	
		100	3	34.0±11.20	35.7±7.02	218.3±70.69	240.0±91.89	55.7±11.37**	
		500	3	42.0±7.55	37.2±3.07	195.3±42.15	283.0±76.54	40.3±2.31***	
		2,500	3	26.3±5.75	57.0±24.77	140.3±39.55	288.3±86.23	29.3±10.26***	
		Recovery	0	2	33.0±2.76	44.4±16.12	95.0±8.49	159.5±6.36	58.5±7.78
			2,500	2	31.5±2.83	48.9±5.80	172.0±42.43	153.5±20.51	51.5±10.61
Single	Pre	0	2	41.8±0.99	37.0±7.57	179.5±4.90	313.5±105.40	93.0±4.20	
		25,000	2	37.9±16.48	32.8±8.20	267.5±9.20	189.0±24.00	107.5±4.90	
	After	0	2	27.0±0.42	22.3±0.42	141.0±17.00	200.5±12.0	101.0±0.00	
		25,000	2	17.6±7.35	21.6±0.57	208.5±37.50	228.5±12.0	102.5±4.90	
4 Weeks	Pre	0	5	14.1±2.18	0.8±0.08	0.6±0.08	162.8±27.56	49.8±9.88	
		100	3	15.4±6.06	0.9±0.06	0.5±0.15	155.3±11.50	45.7±9.29	
		500	3	11.8±0.25	0.8±0.06	0.7±0.06	166.7±5.13	45.3±5.03	
		2,500	5	12.8±2.27	0.8±0.11	0.6±0.10	176.0±25.64	75.8±11.95**	
	Main	0	3	12.3±0.55	1.1±0.46	0.2±0.06	162.0±12.00	35.3±13.65	
		100	3	16.2±2.74*	1.1±0.75	0.1±0.06	195.7±27.68	49.7±9.71	
		500	3	12.1±0.61	1.1±0.47	0.1±0.15	175.3±22.14	55.3±14.50	
		2,500	3	10.3±0.47*	1.1±0.46	0.1±0.10	193.3±26.58	69.7±6.51*	
		Recovery	0	2	14.2±0.85	0.6±0.07	0.1±0.00	110.0±3.54	34.5±7.78
			2,500	2	12.4±2.40	0.6±0.00	0.1±0.00	152.0±20.51	38.5±3.54
Single	Pre	0	2	9.0±1.77	0.4±0.14	0.1±0.00	181.0±49.50	36.5±0.70	
		25,000	2	8.3±0.35	0.4±0.00	0.1±0.00	169.5±0.70	37.5±10.60	
	After	0	2	11.3±1.41	0.5±0.07	0.1±0.00	167.5±6.40	47.5±6.40	
		25,000	2	14.9±1.91	0.6±0.07	0.1±0.00	185.0±16.97	47.0±9.90	

Table III. Continued

Stage	Dose (IU/kg)	No. of animals	TP (g/dl)	Albumin (g/dl)	Calcium (mg/dl)	GGT (U/L)	Phosphorus (mg/dl)	
4 Weeks	Pre	0	5.6±0.29	3.3±0.21	11.2±0.79	2.9±0.76	5.4±0.43	
		100	3	5.3±0.38	3.1±0.27	10.4±0.40	3.4±2.33	5.5±0.47
		500	3	5.7±0.23	3.4±0.21	11.3±0.51	3.4±0.06	5.7±0.44
		2,500	5	5.5±0.17	3.1±0.28	10.9±1.36	3.1±1.01	4.5±2.16
	Main	0	3	4.4±0.70	3.2±0.21	9.6±2.61	2.9±0.83	5.4±0.35
		100	3	4.4±0.44	3.1±0.25	9.6±0.66	5.0±1.42	5.2±0.71
		500	3	4.8±0.10	3.3±0.15	8.9±0.42	4.3±1.69	6.2±1.06
		2,500	3	4.7±0.56	3.0±0.20	7.9±0.51	1.4±1.49	3.7±1.25
Recovery	0	2	4.8±0.21	2.9±0.28	9.1±0.64	4.4±0.14	5.4±0.21	
	2,500	2	5.3±0.07	3.1±0.00	9.6±0.49	5.2±1.34	5.7±0.92	
Single	Pre	0	2	5.4±0.28	3.3±0.14			
		25,000	2	5.4±0.42	3.2±0.14			
	After	0	2	5.4±0.07	3.1±0.14			
		25,000	2	5.5±0.10	3.2±0.07			
Stage	Dose (IU/kg)	No. of animals	LDH (U/L)	A/G ratio	Sodium (mmol/L)	Potassium (mmol/L)	Chloride (mmol/L)	
4 Weeks	Pre	0	5	21.8±1.79	1.41±0.10	144.6±3.36	4.6±0.28	105.0±2.35
		100	3	25.0±1.00*	1.39±0.10	125.7±28.57	4.03±0.90	92.3±21.13
		500	3	20.0±3.61	1.4±0.08	128.7±15.70	4.0±0.36	91.7±11.37
		2,500	5	49.4±32.21***	1.3±0.21	126.2±22.15	4.2±0.75	90.4±14.66
	Main	0	3	135.0±21.91	3.2±1.15	120.0±24.00	3.9±0.61	86.7±14.01
		100	3	177.7±44.50	2.5±0.42	142.3±15.37	5.4±0.37*	99.3±6.81
		500	3	402.7±216.02*	2.1±0.26	146.0±13.23	6.7±0.87**	98.0±6.08
		2,500	3	667.3±288.81**	1.8±0.30	172.3±11.93*	7.9±0.37***	112.7±7.37*
Recovery	0	2	389.0±213.55	1.6±0.21	01.0±8.49	3.6±0.04	76.0±6.4	
	2,500	2	491.0±180.31	1.4±0.05	118.0±5.66	3.9±0.19	86.0±2.83	

ALT: alanine transaminase; AST: aspartate transaminase; ALP: alkaline phosphatase; CK: creatine kinase; BUN: blood urea nitrogen; T. bilirubin: total bilirubin; TG: triglyceride; TP: total protein; GGT: γ -glutamyl transpeptidase; LDH: lactate dehydrogenase; A/G ratio: albumin/globulin ratio.

*: Significantly different from the control, $p < 0.05$.
 **: Significantly different from the control, $p < 0.01$.
 ***: Significantly different from the control, $p < 0.001$.

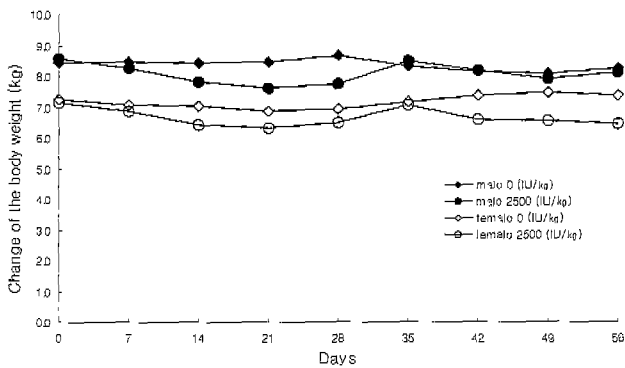


Fig. 3. Body weights of Beagle dogs injected intravenously with YHB216 for 4 weeks and kept untreated for 4 weeks (n=2)

회복기간동안 대부분 회복되는 것으로 관찰되었다.

혈액생화학적 검사

시험물질 투여 종료 후에 실시한 혈액생화학적 검사결과 (Table III, IV), Glucose는 수컷 모든 용량 투여군과 암컷 500, 2,500 IU/kg 투여군에서 감소하였으며, BUN은 수컷 100 IU/kg 투여군에서는 증가하였으나 수컷 2,500 IU/kg 및 암컷 500, 2,500 IU/kg 투여군에서는 감소하였다. TG는 수컷 2,500 IU/kg 투여군과 암컷 500 IU/kg 투여군에서 증가하였으며, albumin은 암컷 500 및 2,500 IU/kg 투여군에서 감소하였다. 이러한 소견들은 4주 회복기간 종료 후에 실시한 검사결과 모두 회복되는 것으로 나타났다.

부검소견 및 장기중량 측정

시험물질 투여 종료 후 및 4주 회복기간 종료 후에 실시

Table IV. Blood chemistry of single and 4 week repeated intravenous injection of YHB216 in female Beagle dogs and kept untreated for 4 weeks

Stage	Dose (IU/kg)	No. of animals	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	CK (U/L)	Glucose (mg/dl)		
4 Weeks	Pre	0	5	33.6±10.00	60.4±20.17	218.8±51.62	157.2±47.83	111.8±6.46	
		100	3	37.1±4.82	63.8±1.20	277.7±95.63	226.3±10.69	123.0±6.25	
		500	3	45.0±5.35	63.3±17.49	330.7±65.73	234.0±38.97	101.7±5.13	
		2500	5	32.1±3.70	60.1±12.09	261.4±74.61	245.8±51.44*	96.8±5.59**	
	Main	0	3	38.3±5.40	32.5±7.79	193.7±23.44	146.3±9.29	91.0±23.00	
		100	3	39.3±11.78	45.0±5.46	190.3±55.54	307.0±196.61	64.7±7.77	
		500	3	53.1±31.10	44.4±6.90	292.3±17.90	215.3±20.21	31.0±6.08*	
		2500	3	20.5±4.71	40.6±2.37	200.7±87.85	210.3±17.39	36.0±28.79*	
		Recovery	0	2	32.8±1.48	42.3±11.31	133.0±42.43	154±26.87	71.5±12.0
			2500	2	42.3±1.34	65.5±37.69	119.0±14.85	164±42.25	36.0±38.18
Single	Pre	0	2	48.0±4.10	38.9±1.06	168.0±24.00	270.5±75.70	99.5±0.70	
		25000	2	41.8±0.99	36.1±3.25	178.0±7.10	215.5±47.40	90.0±5.70	
	After	0	2	26.2±0.49	24.5±3.61	122.0±25.50	253.0±63.60	95.0±8.50	
		25000	2	27.0±0.42	30.3±1.91	137.5±6.40	277.0±49.50	89.5±13.40	
Stage	Dose (IU/kg)	No. of animals	TP (g/dl)	Albumin (g/dl)	Calcium (mg/dl)	GGT (U/L)	Phosphorus (mg/dl)		
4 Weeks	Pre	0	5	6.2±0.95	3.8±0.24	10.7±1.59	3.6±1.64	5.4±0.58	
		100	3	6.4±0.25	3.6±0.44	11.0±1.04	3.8±1.80	6.2±0.78	
		500	3	6.1±0.70	3.7±0.10	10.5±0.47	2.1±2.07	5.0±0.68	
		2500	5	6.0±0.51	3.5±0.21	11.3±1.21	3.3±1.48	5.6±0.46	
	Main	0	3	4.5±0.64	3.5±0.21	11.4±1.39	9.6±1.78	5.1±0.76	
		100	3	4.2±0.40	3.2±0.32	7.5±0.92**	8.9±1.30	5.3±0.12	
		500	3	4.7±0.31	3.0±0.15*	7.3±0.17**	11.8±0.50	5.2±0.35	
		2500	3	4.6±0.47	2.9±0.10*	8.1±0.93**	5.7±1.26*	5.4±0.46	
		Recovery	0	2	6.0±1.56	3.3±0.64	11.6±3.61	6.1±1.06	6.7±1.41
			2500	2	5.2±0.21	3.3±0.21	9.5±0.64	4.9±2.69	6.0±0.14
Single	Pre	0	2	5.5±0.07	3.4±0.35				
		25000	2	5.2±0.71	3.3±0.00				
	After	0	2	5.8±0.28	3.4±0.35				
		25000	2	5.7±0.00	3.4±0.21				

한 부검에서 시험물질 투여와 관련된 육안적 이상소견은 암·수 500 및 2,500 IU/kg 투여군에서 비장종대 (enlargement) 외에는 관찰되지 않았다.

시험물질 투여 종료 후에 실시한 장기중량 측정결과 (Table V, VI), 간장의 경우 수컷 2,500 IU/kg 투여군에서 상대중량이 증가하였으며, 비장의 경우 암·수 500 및 2,500 IU/kg 투여군에서 절대 및 상대중량이 증가하였다. 신장의 경우 수컷 500 및 2,500 IU/kg 투여군에서는 좌측 상대중량이 그리고 수컷 500 IU/kg 투여군에서 우측 상대중량이 증가하였으며 암컷 500 IU/kg 투여군에서는 좌측 절대중량이 증가하였다. 고환의 경우 500 IU/kg 투여군에서 우측 절대 및 상대중량이 증가하였으나 양측 고환을 합산하였을 경우에는 모든 시험물질 투여군에서 유의성이 관찰되지 않았다. 이러한 소견들은 4주 회복기간 동안 대부분 회복되는 것으로 관찰되었다.

병리조직학적 검사

시험물질 투여 종료 후에 실시한 병리조직학적 검사결과,

암·수 500 및 2,500 IU/kg 투여군에서 비장의 골수외조혈 (extramedullary hematopoiesis)이 관찰되었으나, 4주 회복기간동안 모두 회복되었다. 기타 장기에서는 시험물질 투여와 관련된 변화가 없었다.

고찰 및 결론

시험물질 YHB216은 (주)유한양행 중앙연구소에서 빈혈 치료의 목적으로 유전자 재조합 기술을 이용하여 CHO 세포에서 생산한 유전자 재조합 인형 다당체 에리스로포이에틴(recombinant human erythropoietin, rHu-EPO)제제로, 본 시험에서는 이에 대한 안전성 평가의 하나로서 비글개에 대한 단회 및 4주 반복투여독성시험을 실시하였다.

단회투여독성시험의 경우 YHB216을 25,000 IU/kg의 단일용량으로 암·수 비글개에 1회 정맥내 투여하고, 2주간 일반증상 등을 세밀히 관찰한 후 모든 시험계를 부검하였다. 시험결과, 생존율, 일반증상, 체중변화, 혈액학적변화, 혈

Table IV. continued

Stage	Dose (IU/kg)	No. of animals	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	T. Bilirubin (mg/dl)	Cholesterol (mg/dl)	TG (mg/dl)	
4 Weeks	0	5	21.0±4.23	1.0±0.11	0.7±0.13	164.0±33.02	72.8±46.76	
	Pre	100	3	20.4±4.39	1.1±0.06	0.6±0.12	195.7±11.59	71.3±22.50
		500	3	13.3±1.95	0.9±0.00	0.5±0.15	181.3±41.89	41.3±7.37
		2500	5	17.2±8.37	0.9±0.11	0.6±0.08	149.8±31.30	46.4±15.44
		0	3	24.8±4.27	1.1±0.46	0.1±0.10	150.0±7.94	23.7±7.51
	Main	100	3	65.2±86.47	1.1±0.53	0.1±0.15	162.3±40.28	39.0±9.54
		500	3	11.8±1.62**	1.0±0.58	0.1±0.15	168.7±40.27	47.3±8.74*
		2500	3	13.7±1.39*	1.1±0.47	0.1±0.10	149.3±35.50	40.0±2.65
	Recovery	0	2	13.8±1.34	0.8±0.21	0.1±0.00	151.0±40.31	45.5±7.78
		2500	2	9.3±2.62	0.6±0.00	0.1±0.00	130.0±27.58	52.0±21.21
Single	0	2	7.0±0.28	0.4±0.00	0.1±0.00	133.0±38.20	26.5±3.50	
	25000	2	9.2±0.49	0.5±0.07	0.1±0.00	111.0±18.40	20.0±5.70	
	0	2	12.0±0.07	0.4±0.00	0.1±0.00	175.0±12.70	45.5±16.30	
	25000	2	15.2±0.64	0.5±0.14	0.1±0.00	185.5±37.50	43.0±2.80	

Stage	Dose (IU/kg)	No. of animals	LDH (U/L)	A/G ratio	Sodium (mmol/L)	Potassium (mmol/L)	Chloride (mmol/L)	
4 Weeks	0	5	21.8±7.76	1.6±0.35	146.8±16.80	4.5±0.40	104.4±8.88	
	Pre	100	3	24.3±14.64	1.3±0.41	134.7±5.51	4.0±0.24	97.7±1.16
		500	3	23.3±5.13	1.61±0.50	143.7±6.03	4.2±0.05	103.7±2.08
		2500	5	19.2±5.12	1.5±0.35	148.0±3.39	4.5±0.29	105.8±3.27
		0	3	198.0±45.51	4.4±1.79	124.0±40.60	3.7±0.93	89.3±27.10
	Main	100	3	460.7±567.59	3.4±0.50	154.0±23.52	5.6±1.55	106.0±13.11
		500	3	301.7±146.83	1.8±0.28*	136.0±5.57	5.6±0.41	95.7±2.08
		2500	3	407.7±207.56	1.8±0.40*	149.3±3.06	5.9±1.03	101.3±3.06
	Recovery	0	2	195.0±1.41	1.2±0.17	125.0±5.66	3.8±0.23	88.5±2.12
		2500	2	670.0±673.17	1.7±0.11	111.5±12.02	3.7±0.25	81.5±9.19

Results are means±S.D.

ALT: alanine transaminase; AST: aspartate transaminase; ALP: alkaline phosphatase; CK: creatine kinase; BUN: blood urea nitrogen; T. bilirubin: total bilirubin; TG: triglyceride; TP: total protein; GGT: γ -glutamyl transpeptidase; LDH: lactate dehydrogenase; A/G ratio: albumin/globulin ratio.

*: Significantly different from the control, $p < 0.05$.

**: Significantly different from the control, $p < 0.01$.

액생화학적 변화 및 부검소견에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 없었으며, 이 결과는 설치류에서 실시된 단회투여독성시험결과와도 일치한다.

4주 반복투여독성시험의 경우 시험물질 YHB216을 0, 100, 500 및 2,500 IU/kg 용량으로 암·수 비글개에 1일 1회 4주간 정맥내로 투여하였고, 0 및 2,500 IU/kg 투여군의 경우 4주 시험물질 투여 종료 후에 4주간의 회복기간을 두어 회복성을 확인하였다. 각각의 시험종료 후에는 모든 시험계를 부검하였다. 시험종료시까지 암·수 모든 시험군에서 폐사동물 및 특기할 만한 임상증상이 없었으며, 체중측정결과 암·수 500 및 2,500 IU/kg 투여군에서 체중이 다소 감소되는 경향을 나타내었으나 대조군과 비교하여 유의성은 없었다. 사료 및 음수섭취량, 안과학적검사 및 뇨검사 결과에서도 시험물질 투여와 관련된 유의성 있는 변화는 없었다. 혈액학적 검사결과, Hgb 및 Hct가 수컷 500 및 2,500 IU/kg 투여군과 암컷 모든 용량 투여군에서 증가하였

으며, RBC는 암컷 500 및 2,500 IU/kg 투여군에서 증가하였다. 이러한 소견들은 rHu-EPO 투여에 의해 나타나는 일반적인 약리학적 현상으로 4주 회복기간동안 대부분 회복되었다. 혈액생화학적 검사결과, glucose가 수컷 모든 용량투여군 및 암컷 500 및 2,500 IU/kg 투여군에서 유의성 있게 감소하였으며, 그 외에 시험물질투여군의 일부 항목에서 산발적인 변화가 있었으나 그 변동폭이 적고 용량상관성이 없었으며 모두 정상범주 이내였을 뿐만 아니라 4주 회복기간동안에 모두 회복되는 것으로 보아 독성학적 중요성은 낮은 것으로 사료되었다. 장기중량 측정결과, 비장의 경우 암·수 500, 2,500 IU/kg 투여군에서 절대 및 상대중량이 대조군과 비교하여 유의성있게 증가하였는데, 이러한 소견은 500 IU/kg이상에서 관찰된 비장 종대와 필수외조혈과도 관련성이 있는 것으로 사료되며, 4주 회복기간에 모두 회복되었다. 그 밖의 일부 장기에서 관찰된 변화는 4주 회복기간에서는 변화가 없었으며, 용량 의존성 등을 고

Table V. Absolute and relative organ weights of Beagle dogs injected intravenously with YHB216 for 4 weeks

Absolute weight(g) Relative weight(%)	Male (IU/kg)				Female (IU/kg)			
	0	100	500	2500	0	100	500	2500
Testis or ovary L. (%)	5.203±0.704 0.059±0.009	5.373±1.246 0.063±0.014	6.583±0.581 0.081±0.010	4.787±0.081 0.064±0.007	0.376±0.090 0.006±0.002	0.323±0.025 0.005±0.000	0.313±0.084 0.005±0.001	0.327±0.107 0.005±0.002
R. (%)	5.083±0.687 0.057±0.009	5.273±1.160 0.062±0.013	6.700±0.239* 0.082±0.006*	4.547±0.260 0.061±0.007	0.380±0.053 0.006±0.001	0.340±0.017 0.005±0.001	0.333±0.084 0.005±0.001	0.353±0.157 0.006±0.003
Pituitary gland (mg) (mg %)	36.7±12 0.41±0.11	43±12 0.51±0.14	40±17 0.49±0.21	77±32 0.99±0.36	40±10 0.63±0.25	47±6 0.72±0.19	50±10 0.75±0.12	37±21 0.55±0.27
Brain (%)	71.437±4.234 0.803±0.070	71.023±2.942 0.830±0.025	72.153±6.482 0.881±0.042	69.850±4.963 0.927±0.031*	63.867±1.592 0.971±0.139	63.030±0.892 0.960±0.148	69.833±4.364 1.058±0.025	67.203±5.130 1.036±0.131
Thymus (%)	6.100±1.759 0.068±0.016	4.357±0.163 0.051±0.003	5.310±1.569 0.065±0.021	3.840±2.572 0.050±0.031	7.057±2.869 0.104±0.038	4.677±1.299 0.069±0.008	5.170±3.270 0.078±0.046	5.157±4.001 0.077±0.054
Heart (%)	68.070±3.783 0.764±0.040	63.963±0.832 0.748±0.004	62.213±2.855 0.762±0.048	59.800±8.178 0.795±0.114	52.370±2.922 0.803±0.170	66.650±11.931 0.998±0.059	61.903±6.745 0.938±0.091	62.187±4.144 0.955±0.071
Lung (%)	73.51±12.894 0.820±0.094	75.263±6.441 0.880±0.069	69.900±6.684 0.855±0.054	61.453±4.855 0.815±0.043	61.753±4.301 0.935±0.097	66.603±16.751 0.989±0.082	66.223±3.384 1.007±0.097	58.530±7.080 0.900±0.124
Liver (%)	259.04±47.416 2.889±0.365	273.843±19.475 3.025±0.282	255.740±15.474 3.129±0.159	298.103±18.798 3.966±0.350**	185.710±32.588 2.810±0.551	201.250±9.355 3.056±0.390	212.583±37.500 3.224±0.564	215.480±4.969 3.313±0.224
Spleen (%)	23.837±5.126 0.265±0.041	21.900±15.476 0.257±0.183	47.713±4.466* 0.586±0.075**	98.120±6.350*** 1.304±0.099***	17.747±3.049 0.271±0.063	28.007±3.835 0.428±0.102	42.340±8.259** 0.643±0.131*	58.570±25.747** 0.922±0.453**
Kidney L. (%)	20.373±0.634 0.229±0.008	21.497±1.947 0.252±0.027	23.547±2.684 0.287±0.020*	21.370±0.493 0.287±0.031*	16.207±1.621 0.248±0.056	17.667±1.125 0.268±0.035	22.313±2.348* 0.338±0.020	18.470±2.418 0.284±0.038
R. (%)	20.050±1.046 0.225±0.002	21.440±2.244 0.251±0.029	32.643±14.039 0.399±0.172*	20.573±1.897 0.275±0.050	18.000±4.474 0.268±0.030	17.570±1.793 0.265±0.021	21.660±2.21 0.328±0.023	19.273±2.912 0.297±0.053
Adrenal gland L. (%)	0.690±0.139 0.008±0.002	0.627±0.136 0.007±0.001	0.660±0.225 0.008±0.003	0.683±0.015 0.009±0.001	0.550±0.044 0.008±0.002	0.597±0.075 0.009±0.001	0.667±0.085 0.010±0.001	0.643±0.060 0.010±0.001
R. (%)	0.610±0.104 0.007±0.002	0.610±0.161 0.007±0.002	0.633±0.185 0.008±0.002	0.860±0.487 0.011±0.006	0.553±0.075 0.009±0.002	0.580±0.035 0.009±0.001	0.693±0.076 0.011±0.001	0.697±0.074 0.011±0.002
Thyroid gland L. (%)	0.500±0.023 0.006±0.000	0.387±0.151 0.005±0.002	0.390±0.121 0.005±0.002	0.310±0.036 0.004±0.001	0.337±0.058 0.005±0.001	0.300±0.040 0.005±0.001	0.290±0.036 0.004±0.000	0.297±0.047 0.005±0.000
R. (%)	0.507±0.126 0.006±0.001	0.420±0.139 0.005±0.002	0.430±0.168 0.005±0.002	0.293±0.038 0.004±0.001	0.373±0.081 0.006±0.002	0.313±0.021 0.005±0.001	0.290±0.020 0.004±0.000	0.283±0.021 0.004±0.000
Submaxillary gland (%)	9.020±2.128 0.100±0.017	8.547±1.370 0.100±0.014	7.227±0.649 0.088±0.006	7.147±1.070 0.095±0.010	6.433±0.822 0.097±0.006	7.350±0.545 0.113±0.023	6.877±0.684 0.104±0.008	7.147±0.132 0.110±0.009
Prostate gland (%)	3.030±1.605 0.033±0.017	2.647±0.899 0.031±0.011	2.143±1.383 0.026±0.017	1.310±0.340 0.018±0.006				
Epididymis L. (%)	1.167±0.134 0.013±0.001	1.140±0.248 0.013±0.003	1.157±0.295 0.014±0.004	0.735±0.155 0.010±0.003				
R. (%)	1.133±0.129 0.013±0.001	1.210±0.288 0.014±0.003	1.137±0.232 0.014±0.003	0.887±0.144 0.012±0.003				
Uterus (%)					3.467±0.446 0.052±0.002	2.763±0.641 0.042±0.013	2.563±0.642 0.039±0.010	5.967±0.163*** 0.092±0.010**

Results are means±S.D.

*: Significantly different from the control, p<0.05.

**: Significantly different from the control, p<0.01.

***: Significantly different from the control, p<0.001.

려할 때 독성학적 중요성은 낮은 것으로 판단된다. 이러한 결과는 이미 진행된 랫드에서의 4주 반복투여독성시험 및 Cho 등(1996)이 발표한 비글개에서 rHu-EPO의 4주 반복투여독성시험결과와 일치 하였다.

이상의 시험결과를 종합해 볼 때, 비글개에 YHB216을 정맥내 단회투여 하였을 때의 LD₅₀값은 암·수 모두 25,000 IU/kg 이상으로 판단되며, YHB216을 0, 100, 500 및 2,500

IU/kg 용량으로 4주 반복투여하였을 때의 무독성량(NOAEL)은 100 IU/kg인 것으로 판단된다.

감사의 말씀

본 연구는 (주)유한양행의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

Table VI. Absolute and relative organ weights of Beagle dogs injected intravenously with YHB216 and kept untreated for 4 weeks

Absolute weight(g) Relative weight(%)	Male (IU/kg)		Female (IU/kg)	
	0	2,500	0	2,500
Testis or ovary L. (%)	6.335±0.856 0.078±0.004	6.950±1.372 0.079±0.002	0.405±0.007 0.006±0.001	0.320±0.028 0.005±0.001
R. (%)	6.680±0.057 0.083±0.015	7.145±0.742 0.082±0.009	0.425±0.021 0.006±0.001	0.390±0.071 0.006±0.001
Pituitary gland (mg) (mg %)	65±7.07 0.80±0.06	55±7.07 0.65±0.22	50±14.14 0.67±0.10	45±7.07 0.64±0.05
Brain (%)	66.695±2.609 0.824±0.121	74.445±8.337 0.856±0.090	65.865±5.084 0.899±0.057	70.835±5.862 1.018±0.004
Thymus (%)	13.335±0.686 0.165±0.022	12.895±0.629 0.151±0.040	7.785±2.623 0.104±0.021	10.415±2.468 0.152±0.047
Heart (%)	72.575±2.652 0.897±0.134	69.140±12.431 0.789±0.029	56.405±0.658 0.773±0.100	57.655±5.961 0.828±0.020
Lung (%)	80.565±5.211 1.005±0.250	83.080±38.933 0.918±0.244	68.065±20.174 0.915±0.146	68.345±5.494 0.982±0.001
Liver (%)	221.505±25.562 2.776±0.826	250.760±61.745 2.842±0.087	199.205±22.436 2.712±0.076	202.970±22.302 2.913±0.090
Spleen (%)	30.125±3.330 0.377±0.111	32.800±3.224 0.378±0.045	28.700±1.838 0.392±0.030	25.745±2.100 0.370±0.001
Kidney L. (%)	22.965±4.066 0.289±0.103	26.195±10.783 0.291±0.060	16.290±2.956 0.221±0.009	18.700±0.255 0.269±0.018
R. (%)	23.965±4.787 0.303±0.114	22.955±5.537 0.260±0.007	16.015±2.425 0.217±0.002	18.455±1.011 0.267±0.036
Adrenal gland L. (%)	0.670±0.198 0.008±0.001	0.555±0.120 0.006±0.000	0.675±0.078 0.009±0.002	0.620±0.071 0.009±0.002
R. (%)	0.625±0.134 0.008±0.001	0.550±0.113 0.006±0.001	0.685±0.078 0.009±0.002	0.595±0.007 0.009±0.001
Thyroid gland L. (%)	0.305±0.305 0.004±0.001	0.450±0.212 0.005±0.001	0.465±0.120 0.006±0.001	0.440±0.057 0.006±0.001
R. (%)	0.290±0.042 0.004±0.001	0.420±0.170 0.005±0.001	0.440±0.071 0.006±0.000	0.460±0.042 0.007±0.001
Submaxillary gland (%)	7.365±1.294 0.090±0.001	8.260±3.069 0.092±0.015	6.470±0.622 0.088±0.004	7.130±1.358 0.102±0.011
Prostate gland (%)	3.055±0.827 0.037±0.003	1.670±0.028 0.019±0.004*		
Epididymis L. (%)	1.405±0.262 0.017±0.000	1.045±0.219 0.012±0.000**		
R. (%)	1.400±0.071 0.017±0.002	1.030±0.085* 0.012±0.002		
Uterus (%)	3.380±0.212 0.046±0.004	4.010±1.527 0.057±0.017		

Results are means±S.D.

*: Significantly different from the control, $p<0.05$.

** : Significantly different from the control, $p<0.01$.

참고문헌

- Cho, M. H., Kim, D. H., Kang, K. K., Baik, N. G. and Kim, W. B. (1998). Single and 4-week repeated dose toxicity studies of DA-3585, a recombinant human erythropoietin, in rabbits. *J. Appl. Pharmacol.* **6**, 171-181.
- Cho, M. H., Seong, H. J., Kim, H. S., Kwack, S. J., Chun, S. A., Lim, S. Y., Kim, W. B., Kim, B. M., Ahn, B. O. and Lee, B. M. (1996). Acute toxicity of recombinant human

erythropoietin (rHu-EPO) in Beagle dogs. *Korean J. Toxicol.* **12**, 305-308.

- Cho., M. H., Seong, H. J., Kim, H. S., Kwack, S. J., Lim, S. Y., Chun, S. A., Kim, W. B., Kim, B. M., Ahn, B. O. and Lee, B. M. (1996). Subacute toxicity of recombinant human erythropoietin (rHu-EPO) in Beagle dogs. *J. Appl. Pharmacol.* **4**, 323-329.

Eric, J. F., Spicer and John A., Wksler. (1990). Acute subcutaneous and intravenous toxicity studies in rats and

- monkeys with TYB-5220: A recombinant human erythropoietin. *藥理と治療* **18**, 45-106.
- Eric, J. F. Spicer and John A. Wisler. (1990). Twenty eight days intravenous toxicity studies of TYB-5220 in rats and monkeys with a 28 day recovery period: A recombinant human erythropoietin. *藥理と治療* **18**, 107-206.
- Erslev, A. J., Caro, J., Kansu, E. and Silver, R. (1980). Renal and extrarenal erythropoietin production in anemic rats, *Brit. J. Hematol.* **45**, 65-72.
- Eschbach, J. W. and Adamson, J. W. (1989). Guidelines for recombinant human erythropoietin therapy. *Am. J. Kidney Dis.* **14**, 2-8.
- Fisher, J. W. (1993). Recent advances in erythropoietin research. pp. 293-311. in: *Progeress in Drug Research*. Vol. 41. eds. Ernst Jucker, Birkhauser Verlag Basel, Switzerland. pp. 293-331.
- Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R. Neill S. D. et al. (1985). Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin, *Nature* **313**, 806 - 810.
- Jacobson, L. O., Goldwasser, E., Fied, W. and Plzak, L. (1957). Role of the kidney in erythropoiesis, *Nature* **179**, 633-634.
- Koury, S. T., Bondurant, M. C. and Koury, M. J. (1988). Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by *in situ hybridization*. *Blood* **71**, 524-527.
- Krantz, S. B. (1991). Erythropoietin. *Blood* **77**, 2497-2503.
- Lin, F. K., Suggs, S., Lin, C. H., Browne, J. K., Smalling, R., Egrie, J. C., Cjen, K. K., Fox, G. M., Martin, F., Stabinsky, Z., Bdrawi, S., Lin, P. H. and Goldwasser, E. (1985). Cloning and expression of human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **49**, 807-815.
- Maxwell, A. P., Lappin, T. R. J., Johnston, C. F., Bridges, J. M. and McGeown, M. G. (1990). Erythropoietin production in kidney tubular cells. *Brit J Hematol.* **74**, 535-539.
- Mikito Kikumori *et al.* (1988). A four-week intravenous subacute toxicity study of KRN5702 in Beagle dogs. *The Clinical Report* **15**, 123-153.
- Mino, T., Ohmura, T., Hiraoka, Y., Sugino, T. and Hayashi, H. (1990). General pharmacological studies of erythropoietin (TYB-5220). *藥理と治療* **18**, 953-971.
- Miyake, T., Kung, C. K. H. and Goldwasser, E. (1977). Purification of human erythropoietin, *J. Biol. Chem.* **252**, 5558.
- Noguchi, G., Matsuoka, A., Shinkura, H., Hiromichi, K., Suzuki, S., Kataoka, S., Noguchi, G. and Usami, M. (1990). Four-week intravenous toxicity study of EPOCH in dogs. *臨床醫藥* **6**, 117-142.
- Noguchi, G., Takahashi, T., Komatsu, H., Suzuki, S. and Usami, M. (1990). Single-dose intravenous toxicity study of EPOCH in dogs. *臨床醫藥* **6**, 82-88.
- Okumura, K., Aoki, S., Sugino, T., Ono, T., Nagano, N. and Iba, Y. (1990). Metabolic fate of erythropoietin (TYB-5220). *藥理と治療* **18**, 2009-2019.
- Ridley, D. M., Dawkins, F. and Perlin, E. (1994). Erythropoietin: A review. *J. Natl. Med. Assoc.* **86**, 129-135.
- Sandra, E., Juul, Anthony, T., Yachnis, Robert, D. and Christensen (1998). Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus, *Early Human Development* **52**, 235-249.
- Siren, A. L. and Ehrenreich, H. (2001). Erythropoietin - a novel concept for neuroprotection, *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* **251**, 179-184.
- Vreundenhil, G., Frenken, L. A. M. and Koene, R. A. P. (1993). Erythropoietin; mechanisms of action and indications for treatment. *Netherlands J. Med.* **42**, 187-202.
- 식품의약품안전청(1999). “의약품 등의 독성시험기준”, 식품의약품안전청고시 제 1999-61호.
- 식품의약품안전청(2000). 비임상시험관리기준, 식품의약품안전청 고시 제 2000-63호.