

게잡이 원숭이에 있어 rHuEPO(HM10760)의 단회 투여 후 혈액학 및 혈액생화학적 변화

김충용 · 이현숙 · 이필수 · 하창수 · 권세창¹ · 이관순¹ · 송창우 · 한상섭

한국화학연구원 부설 안전성평가연구소, ¹한미약품 연구센터

Changes in Hematological and Serum Biochemical Parameters After Single Dose of Recombinant Human Erythropoietin (HM10760) in Male Cynomolgus Monkeys

Choong-Yong Kim, Hyun-Sook Lee, Pil-Soo Lee, Chang-Su Ha, Se-Chang Kwon¹,
Gwan Sun Lee¹, Chang-Woo Song and Sang-Seop Han

Non-human Primate Team, Toxicology Division, Korea Institute of Toxicology, KRICT, P.O. Box123, Yuseong, Daejeon

¹Research Center, Hanmi Pharm. Co., Ltd.

Received January 7, 2006; Accepted March 15, 2006

ABSTRACT. Changes in hematology and serum biochemistry after treatment of recombinant human erythropoietin (rHuEPO, HM10760) were screened in 4 male cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). Four monkeys, composed of a treatment group of HM10760 and a positive control group of Aranesp[®], were subcutaneously administered at same dose of 100 µg/kg. Both groups did not show any change in body weights and food consumption for 4 weeks compared with those of pretreatment. Both groups did not show any change in total leukocyte count (WBC) and platelet count, while both groups showed increased platelet distribution width (PDW) percentage in HM10760 group during a period from day 5 to day 59 and in Aranesp[®] group during a period from day 9 to day 26. Both groups showed increases in red blood cells (RBC), hemoglobin (HGB), and hematocrit (HCT) approximately 10 days after treatment compared with those of pretreatment (day 0). The increased levels of RBC, HGB, and HCT were much higher in HM10760 than in Aranesp[®] by the increases of 3.2%~12.5% for RBC, 3.8%~17.1% for HCT, and 1.85%~11% for HGB. Both groups showed increases in red cells distribution width (RDW) and reticulocyte (RET) compared with those of pretreatment, showing the highest peak from day 9. The increased level of RET lasted up to day 14 in Aranesp[®] group, while it lasted up to day 23 in HM10760 group. The increased level of RDW lasted up to day 59, it was much higher in HM10760 by the increase of 10.1%~17.6% than in Aranesp[®] group. In serum biochemistry, both groups showed a decrease in chloride level compared with those of pretreatment. These findings indicated that HM10760 increased RBC, HGB, HCT, RDW, and RET compared with those of pretreatment, and the increased levels were much higher in HM10760 than in Aranesp[®].

Keywords: rHuEPO, Cynomolgus Monkeys, Hematology, Aranesp[®], HM10760.

서 론

Erythropoietin(EPO)은 적혈구 전구세포의 분열과 분화를 촉진하는 당단백 호르몬으로서 태아 때에는 주로 간에

서 생성되지만, 성숙동물에서는 80~90% 정도가 신장의 피질과 수질외측의 모세혈관을 둘러싸고 있는 내피세포에서 생성되고 나머지는 간이나 기타 다른 조직에서 생성된다(Koury *et al.*, 1988; Fisher, 1993). 형성된 EPO는 혈류를 따라 이동하여 골수 내 erythroid progenitor cell (CFU-E)의 특이수용체와 작용하여 이들의 분화 및 증식을 촉진함으로써 적혈구 생산을 항진시킨다(Eschbach and Adamson, 1989). EPO는 유전자재조합기술의 발달로 인

Correspondence to: Sang-Seop Han (Choong-Yong Kim), Non-human Primate Team, Toxicology Division, Korea Institute of Toxicology, KRICT, P.O. Box123, Yuseong, Daejeon, Korea
E-mail: kimcy@kitox.re.kr

하여 EPO 유전자의 재조합과 대량생산이 가능하게 되어 임상적으로 만성빈혈, 신성빈혈, 말기 신장질환, 화학요법에 의한 빈혈, 자가수혈 등에 널리 사용되고 있다(Jacobs et al., 1985; Lin et al., 1985; Gebbia et al., 1991; Fisher, 1993; Vaziri et al., 1994).

포스트 지놈 시대를 맞이하여 다국적 제약기업들의 제약시장의 주력은 기존의 화학합성 의약품에서 바이오 의약품으로 빠르게 전환되고 있다. 특히 glycomics 등 첨단 생명공학 기술을 도입하여 바이오 제네릭 제품의 당쇄를 변형시킴으로써 효능 및 안정성이 증가될 수 있는 차세대 의약품개발에 박차를 가하고 있다. Amgen사는 바이오 의약품 시장에서 최고의 블록버스터인 Epogen®(EPO)의 차세대 제품으로서 Aranesp®를 개발 상용화하고 있다(Shriver et al., 2004). 한편 국내에서는 다양한 정부차원의 육성정책에 힘입어 1990년대에 들어 제약사들은 인터페론, 성장호르몬, EPO, 콜로니자극인자 등 유전자 재조합 의약품을 국내 자체기술로 개발하여 시판(정, 2004)하고 있으며, 특히 구조의 리모델링을 통한 긴 반감기의 차세대 EPO 제품개발에 주력하고 있다.

따라서 본실험에서는 지속형 조혈장애의 치료제로 주목되는 EPO의 안전성 및 유효성 스크리닝의 일환으로 (주)한미약품에서 분리제한 유전자 재조합 사람 적혈구조혈인자에 대하여 게잡이 원숭이에서 단회투여후 혈액학 및 혈액생화학적 지표들을 Aranesp®와 비교 검토하였다.

재료 및 방법

시험동물

한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 영장류 동물실에서 사육된 중국산 cynomolgus monkey(Macaca fascicularis)로서 수컷 4마리를 이용하였다. 연령은 4~5년생으로 체중은 3562~4764 g이었다.

사육환경

공시동물은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 10\%$, 환기 횟수 10~20회/hr, 조명시간 12hr (07:00 점등~19:00 소등) 및 조도 150~300 Lux로 실내는 음압(3 mmAq 이상)으로 유지되는 조건에서 사육하였다. 동물실의 온·습도는 자동 온습도측정기에 의하여 매시간 마다 측정되었으며, 조도 등의 환경조건은 정기적으로 측정되었고, 동물실의 환경측정 결과 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

사료 및 물

사료는 영장류 전용 고형사료(PS, 오리엔탈효모 주식회

사: 日本 東京都 板橋區 小豆泥 3-6-10)를 사육기간동안 1일 동물체중의 약 4%를 제한급여 하였다. 또한 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 검역실에서 미생물검사와 사료공급처에서 오염물질을 확인한 바, 본 시험에 영향을 미칠만한 요인은 발견되지 않았다.

물은 상수도수를 미세여과기와 자외선유수살균기를 이용하여 소독시킨 후 자유섭취시켰다. 급여 전에 일반수질 검사를 실시하였으며, 물 중의 오염물질 분석에 있어서 시험에 영향을 미칠만한 요인은 발견되지 않았다.

시험군 구성

시험군은 군당 2마리씩으로 시험물질 및 양성대조물질 투여군을 두었고, 시험물질은 HM10760을 양성대조물질은 Aranesp®를 사용하였다.

시험물질 HM10760 및 양성 대조물질 Aranesp®의 투여

시험물질 HM10760은 면역글로불린 단편을 포함한 지속형 유전자재조합 사람 erythropoietin 제제(rHuEPO, MW 83.4 kDa)로 하는 조혈호르몬 제제(한미약품)를 사용하였으며, 시험물질의 양성대조물질은 Aranesp®를 사용하였다. 투여용량은 각각 100 µg/kg B.W.으로 등배부 피하로 투여하였다.

채혈 및 보정

채혈 및 보정 등 동물시험에 적용되는 모든 수순은 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소(AAALAC International 인증획득, 1998)의 동물관리 사용위원회(IACUC)에 의해 검토되어 실시되었다.

일반증상 및 체중측정

일반증상관찰은 투여전과 후에 1일 2회 실시하였고, 체중은 투여개시 전, 투여개시 후, 7, 14, 21 및 28일째에 측정하였다.

사료섭취량

투여개시 전 및 투여개시후 1회 측정하였다.

혈액학적 및 혈액생화학적 검사

분석을 위하여 게잡이 원숭이의 대퇴정맥 또는 요측피정맥에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액의 일부는 EDTA-2K 함유 채혈병(CBC bottle, 세원메디칼)을 사용하여 응고를 방지하였고, 나머지는 혈액생화학적 검사를 위해 혈청분리관에 옮겨 담았다. 혈액학적 검사는 투여개시 전, 투여개시 후 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 12일, 14일, 17일, 20일, 23일, 26일, 29일

Table 1. Abbreviations, unit and analysis methods of the items

| Items | Units | Methods |
|-----------------------------------|---------------------------|--|
| RBC (Red blood cell) | $\times 10^6/\text{mm}^3$ | Laser optical (Flow cytometry) |
| HGB (Hemoglobin concentration) | g/dl | Cyanmethemoglobin spectrophotometry |
| HCT (Hematocrit) | % | Calculation from MCV |
| MCV (Mean corpuscular volume) | fl | Laser optical (Flow cytometry) |
| RET (Reticulocyte count) | % | Laser optical with cytochemical reaction |
| RDW (Red cell distribution width) | % | Laser optical flow cytometry |
| WBC (White blood cell) | $\times 10^3/\text{mm}^3$ | Laser optical with cytochemical reaction |
| Differential leukocyte count | % | Perox optical with chemical reaction |
| NEU (Neutrophils) | % | Laser optical with cytochemical reaction |
| LYM (Lymphocytes) | % | Laser optical with cytochemical reaction |
| MON (Monocytes) | % | Laser optical with cytochemical reaction |
| EOS (Eosinophils) | % | Laser optical with cytochemical reaction |
| BAS (Basophils) | % | Laser optical with cytochemical reaction |
| LUC (Large unstained cells) | % | Laser optical with cytochemical reaction |
| Platelet | $\times 10^3/\text{mm}^3$ | Laser optical Flow cytometry |
| PDW (Platelet distribution width) | % | Laser optical Flow cytometry |
| AST (Aspartate aminotransferase) | IU/l | UV-rate |
| ALT (Alanine aminotransferase) | IU/l | UV-rate |
| ALP (Alkaline phosphatase) | IU/l | P-NPP |
| BUN (Blood urea nitrogen) | mg/dl | UV rate |
| CREA (Creatinine) | mg/dl | Jaffe |
| GLU (Glucose) | mg/dl | Hexokinase |
| T-CHO (Total cholesterol) | mg/dl | Enzyme |
| A/G (Albumin globulin ratio) | ratio | ALB/(TP-ALB) |
| TP (Total protein) | g/dl | Biuret |
| ALB (Albumin) | g/dl | BCG |
| CPK (Creatine phosphokinase) | IU/l | UV-Rate |
| TG (Triglyceride) | mg/dl | Enzyme |
| Ca (Calcium) | mg/dl | OCPC |
| IP (Inorganic phosphorous) | mg/dl | UV |
| PL (Phospholipid) | mg/dl | Enzyme |
| LDH (Lactic dehydrogenase) | IU/l | UV |
| T-BIL (Total bilirubin) | mg/dl | Enzyme |
| Na (Sodium) | mmol/l | Electrode |
| K (Potassium) | mmol/l | Electrode |
| Cl (Chloride) | mmol/l | Electrode |

36일, 43일 및 59일째 채혈하여 20분 이내에 혈구자동계측장치(ADVIA 120, Bayer, USA)를 이용하여 측정하였다. 혈액생화학적 검사는 투여개시 후 14일 및 29일째 채혈하여 채혈 후 30분 이내에 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 분리된 혈청을 -80°C 에 보관하여 3개월 이내에 자동분석장치(Shimadzu CL-7200, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 측정하였으며, chloride(Cl), sodium(Na) 및 potassium(K)은 전해질자동분석장치(644, Na/K/Cl analyzer Ciba-corning USA)를 이용하여 측정하였다. 혈액 및 혈액생화학적 검사의 방법과 단위는 Table 1과 같다.

결 과

본 연구는 cynomolgus monkey에 있어 새로운 저속형 EPO인 HM10760의 안전성 및 유효성을 파악하기 위하여 양성대조물질인 Aranesp[®]를 단회 피하투여

하여 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량, 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 실시하였으며 그 결과는 다음과 같다.

Table 2. Body weight and food consumption after single dose of HM10760 or Aranesp[®]

| | HM10760 | | Aranesp [®] | |
|---|---------|-------|----------------------|-------|
| | No. 1 | No. 2 | No. 3 | No. 4 |
| Body weight | | | | |
| Day 0 | 3942 | 4395 | 4764 | 3562 |
| Day 7 | 3941 | 4820 | 4799 | 3489 |
| Day 14 | 4037 | 4852 | 4816 | 3537 |
| Day 21 | 4156 | 4896 | 5039 | 3636 |
| Day 28 | 4237 | 4984 | 5077 | 3517 |
| Change (%) = (Day 28 - Day 0)/Day 0 \times 100 | +7.48 | +13.4 | +6.6 | -1.26 |
| Food consumption | | | | |
| Pretreat | 150 | 141.4 | 150 | 128.8 |
| Day 22 | 150 | 150 | 150 | 150 |

일반증상, 체중 및 사료섭취량 측정

투여 후 시험물질 투여와 관련된 일반증상은 관찰되지 않았다. Table 2와 같이 투여전 체중기준 28일째 체중변화가 Aranesp® 투여군에서 HM10760투여군 보다 한 마리가 증가억제 경향이 관찰되었으나, 사료섭취량에 있어 투여 후 22일째 두 군간 섭취량의 차이가 없어 체중의 증가억제는 일시적 우발적 변화로 생각된다.

혈액학적 검사

적혈구 관련지표의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 적혈구 수(red blood cell, RBC), 혈색소량(hemoglobin, HGB) 및 헤마토크리트치(hematocrit, HCT)는 HM10760 및 Aranesp® 투여군에서 투여개시 후 약10일 전후부터 문헌치(RBC, $4.96\sim 6.17 \times 10^6$; HGB, 12.7~14.40 g/dl; HCT, 44.50~53.57%, Kim *et al.*, 2004) 이상으로 증가하여

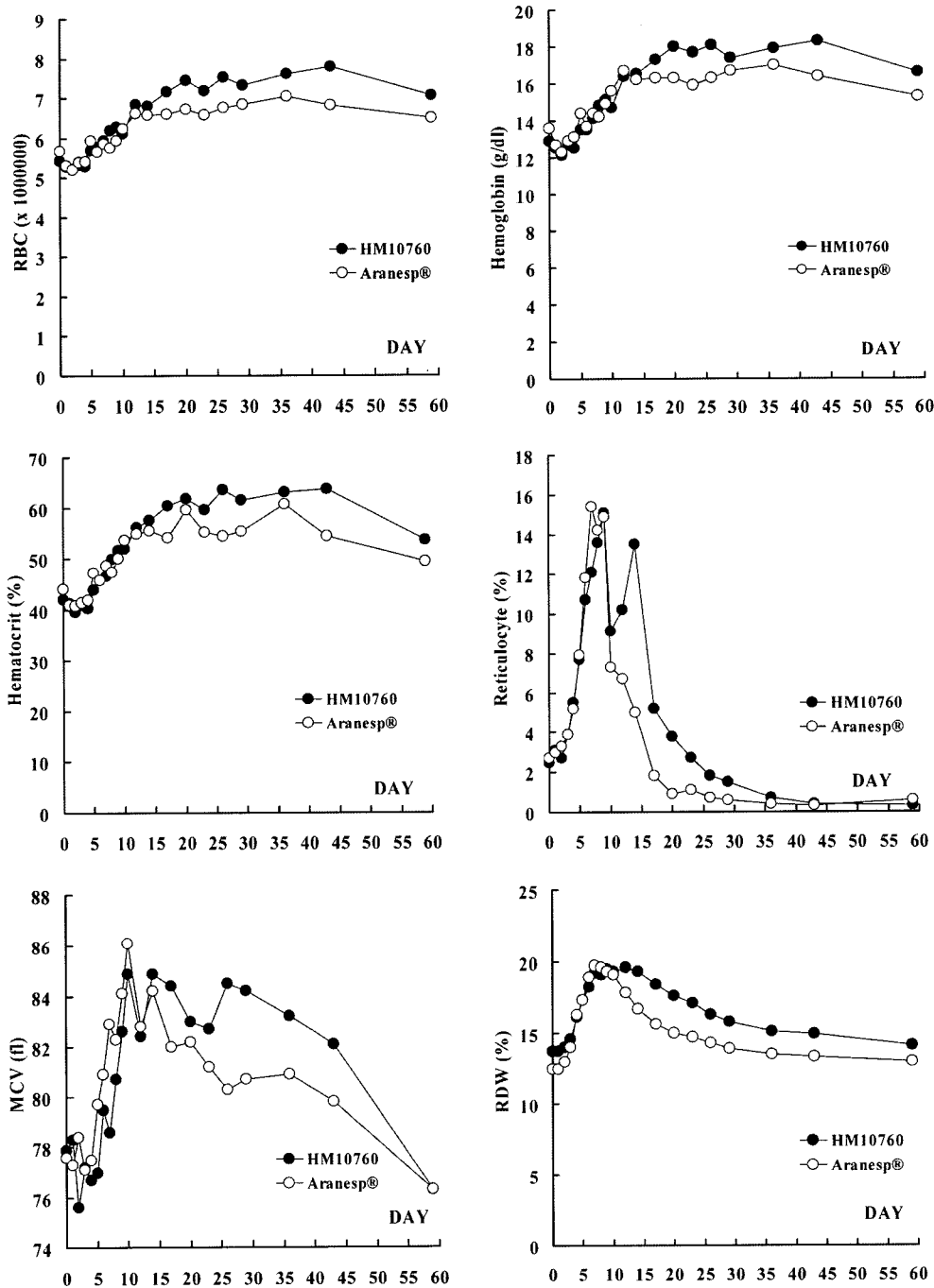


Fig. 1. Changes in RBC-related parameters in cynomolgus monkeys after single dose of HM10760 or Aranesp®. Each value represents as mean value. Closed circle represented for HM10760 (n = 2) and open circle for Aranesp® (n = 2).

Table 3. Changes in WBC- and Platelet-related parameters in cynomolgus monkeys after single dose of HM10760 or Aranesp®

| Days | WBC-related parameters | | | | | | Platelet | | | |
|------|---|----------|----------|----------|----------|----------|--|----------|----------|----------|
| | WBC count ($\times 1000/\mu\text{l}$) | | NEU (%) | | LYM (%) | | Platelet count ($\times 1000/\mu\text{l}$) | | PDW (%) | |
| | HM 10460 | Aranesp® | HM 10460 | Aranesp® | HM 10460 | Aranesp® | HM 10460 | Aranesp® | HM 10460 | Aranesp® |
| D 0 | 14.54 | 15.67 | 43.1 | 49.1 | 51.8 | 44.2 | 405 | 531 | 58.6 | 53.9 |
| D 1 | 9.86 | 12.67 | 43.0 | 49.0 | 51.3 | 45.7 | 398 | 590 | 57.3 | 54.7 |
| D 2 | 12.22 | 13.15 | 39.8 | 49.1 | 54.1 | 45.3 | 420 | 600 | 62.8 | 53.4 |
| D 3 | 14.81 | 12.20 | 41.4 | 47.0 | 51.3 | 47.2 | 423 | 691 | 61.7 | 60.1 |
| D 4 | 17.75 | 14.72 | 45.6 | 51.0 | 47.8 | 43.8 | 461 | 694 | 69.7 | 61.1 |
| D 5 | 14.55 | 12.44 | 46.6 | 47.1 | 45.7 | 49.3 | 478 | 741 | 73.3 | 65.5 |
| D 6 | 14.26 | 13.01 | 41.0 | 52.8 | 50.6 | 41.6 | 445 | 699 | 80.9 | 64.7 |
| D 7 | 12.61 | 11.86 | 40.2 | 49.3 | 51.5 | 41.5 | 436 | 724 | 86.3 | 69.1 |
| D 8 | 10.88 | 9.38 | 32.5 | 45.6 | 57.3 | 48.7 | 381 | 653 | 90.1 | 67.9 |
| D 9 | 10.59 | 9.45 | 34.4 | 46.0 | 55.2 | 47.5 | 355 | 688 | 94.2 | 74.7 |
| D 10 | 11.68 | 9.59 | 31.2 | 46.4 | 58.5 | 48.3 | 413 | 703 | 85.9 | 71.8 |
| D 12 | 10.73 | 8.87 | 29.2 | 49.8 | 59.3 | 43.9 | 333 | 568 | 89.1 | 77.0 |
| D 14 | 8.16 | 8.42 | 31.4 | 53.7 | 60.0 | 40.3 | 367 | 483 | 92.6 | 74.9 |
| D 17 | 5.83 | 8.68 | 25.2 | 48.0 | 66.4 | 43.7 | 378 | 368 | 90.6 | 80.3 |
| D 20 | 6.68 | 10.81 | 35.6 | 39.4 | 57.5 | 51.8 | 450 | 489 | 89.9 | 76.4 |
| D 23 | 7.02 | 9.84 | 46.6 | 44.6 | 46.2 | 47.4 | 385 | 565 | 87.1 | 71.4 |
| D 26 | 7.70 | 9.41 | 37.5 | 46.8 | 55.5 | 46.6 | 399 | 517 | 89.4 | 72.7 |
| D 29 | 7.17 | 9.76 | 32.2 | 44.3 | 59.6 | 48.6 | 367 | 481 | 86.8 | 69.0 |
| D 36 | 9.10 | 12.92 | 39.0 | 53.5 | 53.5 | 39.4 | 349 | 380 | 78.2 | 68.4 |
| D 43 | 7.62 | 13.45 | 34.9 | 55.3 | 58.7 | 37.6 | 261 | 394 | 82.1 | 66.0 |
| D 59 | 10.84 | 12.59 | 34.1 | 34.4 | 59.3 | 58.1 | 228 | 370 | 80.5 | 63.6 |

Each value represents as mean value ($n = 2$).

WBC, white blood cell; LYM, lymphocyte; NEU, neutrophil; PDW, platelet distribution width.

Table 4. Changes in Serum biochemical values in cynomolgus monkeys after single dose of HM10760 or Aranesp®

| | Pretreat | | Day 14 | | Day 28 | |
|---------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | HM 10760 | Aranesp® | HM 10760 | Aranesp® | HM 10760 | Aranesp® |
| AST (IU/l) | 39.3 | 66.5 | 44.4 | 35.1 | 30.6 | 29.1 |
| ALT (IU/l) | 49.5 | 57.4 | 40.1 | 37.0 | 41.1 | 45.0 |
| ALP (IU/l) | 933 | 1913 | 1111 | 2146 | 1023 | 2255 |
| BUN (mg/dl) | 19.9 | 20.5 | 17.0 | 19.4 | 16.2 | 22.1 |
| CREA (mg/dl) | 1.07 | 0.98 | 1.17 | 1.06 | 1.02 | 0.97 |
| GLU (mg/dl) | 96.8 | 67.4 | 87.1 | 76.9 | 88.3 | 65.2 |
| T-CHO (mg/dl) | 97.5 | 97.6 | 95.8 | 100.1 | 106.3 | 120.5 |
| A/G (ratio) | 1.49 | 1.33 | 1.31 | 1.34 | 1.30 | 1.25 |
| TP (g/dl) | 6.82 | 7.02 | 7.72 | 7.39 | 7.55 | 7.78 |
| ALB (g/dl) | 4.07 | 4.00 | 4.36 | 4.22 | 4.26 | 4.29 |
| CPK (IU/l) | 396 | 706 | 273 | 226 | 165 | 129 |
| TG (mg/dl) | 31.2 | 29.3 | 24.9 | 28.2 | 16.4 | 30.2 |
| Ca (mg/dl) | 8.30 | 9.15 | 7.96 | 8.77 | 8.06 | 9.31 |
| IP (mg/dl) | 5.24 | 4.31 | 6.31 | 5.44 | 6.42 | 6.00 |
| PL (mg/dl) | 169.3 | 185.2 | 156.2 | 159.4 | 154.9 | 178.9 |
| LDH (IU/l) | 1183 | 1644 | 1285 | 1087 | 894 | 856 |
| T-BIL (mg/dl) | 0.173 | 0.131 | 0.295 | 0.205 | 0.206 | 0.158 |
| Na (mmol/l) | 148 | 149 | 148 | 148 | 147 | 147 |
| K (mmol/l) | 5.01 | 4.9 | 4.24 | 4.48 | 4.94 | 4.91 |
| Cl (mmol/l) | 106 | 109 | 98 | 101 | 105 | 108 |

Each value represents as mean value ($n = 2$).

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; GLU, glucose; T-CHO, total cholesterol; A/G, albumin/globulin; TP, total protein; ALB, albumin; CPK, creatine phosphokinase; TG, triglyceride; IP, inorganic phosphate; PL, Phospholipid; LDH, lactate dehydrogenase; T-BIL, total bilirubin.

59일째까지 유지하였다. HM10760 투여군의 증가폭은 Aranesp[®] 투여군 보다 RBC는 약 3.2%~12.5%, HCT는 약 3.8%~17.1%, HGB는 1.85%~11% 만큼씩 유지되며 증가를 보였다. 평균적혈구용적(mean corpuscular volume, MCV) 측정치는 HM10760 및 Aranesp[®] 투여군에서 투여개시 후 6일째부터 43일째까지 투여전 측정치 보다 현저히 증가하였으나 문헌치(MCV, 83.93~96.2 fl, Kim *et al.*, 2004)내 변화이었다. 망상적혈구수(reticulocyte count, RET) 및 적혈구입자분포폭(red cell distribution width, RDW) 측정치는 HM10760 및 Aranesp[®] 투여군에서 투여개시 후 4일째부터 투여개시 전 및 문헌치(RET, 1.27~2.1%, Kim *et al.*, 2004; RDW, 약 13%, 김 등 2005) 이상으로 증가하기 시작하여 9일째부터 최고치를 보였다. RET에 있어 HM10760 투여군은 23일째까지 Aranesp[®] 투여군은 14일째까지 RET의 지속적 증가를 보였고, RDW 증가는 투여 후 59일째까지 유지되었으며 HM10760 투여군의 증가는 Aranesp[®] 투여군 보다 약 10.1%~17.6% 만큼 더 증가폭으로 유지되었다.

Table 3은 백혈구 관련지표인 백혈구수(white blood cell, WBC), 림프구(lymphocyte) 및 호중구(neutrophils) 비율과 혈소판 관련지표인 혈소판 수(platelet count)와 혈소판입자분포폭(platelet distribution width, PDW) 비율을 나타내었다. HM10760 및 Aranesp[®] 투여 후 백혈구수, 림프구 비율, 호중구 비율 및 혈소판수 측정치에서 투여개시 전 및 문헌치($7.94\sim 17.39 \times 10^3/\text{mm}^3$, Kim *et al.*, 2004)에 비해 현저한 변화가 관찰되지 않았다. PDW 측정치 변화에 있어 HM10760 투여군은 투여개시 후 5일째 부터 59일까지 Aranesp[®] 투여군은 투여개시 후 9일째 부터 26일째까지 투여개시 전 및 문헌치(59.8~69.6%, 김 등, 2005)이상으로 증가하였다.

혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사결과를 Table 4에 나타내었다. 각 항목의 측정치는 투여전 및 문헌치(CREA, 0.71~1.0 mg/dl; Cl, 105.7~110.0 mmol/l; Kim *et al.*, 2004)에 비해 볼 때, 투여개시 후 14일째에 Cl의 감소가 관찰되었다.

고 찰

적혈구생성(erythropoiesis)은 신장에서 분비되는 erythropoietin에 의해 조절되고 CFU-E가 proerythroblast로의 분화 및 proerythroblast가 망상적혈구로의 성숙에 관여하는 것으로 알려져 있다(Koury *et al.*, 1988; Fisher, 1993). 유전자재조합 사람 EPO는 분자유전공학을 통하여 생산되며 1989년 미국식품의약품안전청에 의해 처음 만

성신부전증(chronic renal failure) 환자에게 사용이 승인되었으며, 현재는 epoetin alfa, epoetin beta 및 darbepoetin alfa 등이 치료제로서 사용되고 있다(Cazzola, 2003; Ng *et al.*, 2003). 또한 혈액도핑(blood doping)은 혈중 최대 산소분압의 증가 및 지치지 않고 달릴 수 있는 시간이 각각 9% 및 23%가 증가(Ekblom *et al.*, 1972)될 수 있으며, 특히 운동선수에 대한 재조합 EPO 투여는 항 빈혈 및 기능증진의 효과는 있으나 과도한 적혈구 생산으로 인한 혈액점도의 증가 및 혈전형성(thrombogenicity)의 부작용이 보고되고 있다(Jelkmann, 2000).

혈액학 검사결과, 적혈구 관련지표인 RET 및 RDW 측정치에 있어 투여개시 후 4일째부터의 증가는 HM10760 및 Aranesp[®] 투여 후 미숙 적혈구 생성과 관련된 사항으로 판단되며 원숭이에서의 EPO 투여 시험결과(김 등, 2005)와 일치하는 사항이다. RET 및 RDW의 증가양상에 있어 Fig. 1에서 보는 바와 같이 RET의 지속적 증가는 Aranesp[®] 투여군은 14일째까지 HM10760 투여군은 23일째까지 관찰되었고, RDW의 지속적인 증가폭은 HM10760 투여군에서 약 10.1%~17.6%가 관찰되었다. 이는 동일한 용량으로 투여되었으나 HM10760이 Aranesp[®]보다 더 적혈구 생성에 더 영향을 주는 것으로 판단된다. 또한 RBC, HGB 및 HCT 측정치에 있어 HM10760 투여군에서의 증가폭이 Aranesp[®] 투여군 보다 더 큰 것은 HM10760이 Aranesp[®]보다 적혈구 생성에 더 큰 영향을 주는 증거자료라고 생각된다. rHuEPO 투여에 따른 적혈구계 지표의 증가는 랫드, 토끼, 개 및 원숭이(김 등, 1994; 남 등, 1997; 제 등, 1997; 조 등, 1998, Furuno *et al.*, 1990)를 이용한 동물시험에서 관찰된 바 있어 본 시험결과와 일치하는 결과이었다. 따라서 HM10760은 골수 내 특이수용체와 작용하여 이들의 분화 및 증식을 촉진함으로써 적혈구 및 관련인자의 생성을 향진시킨 것으로 생각된다. 또한 RET의 증가양상에 있어 4일째부터 투여개시 전 및 문헌치(RET, 1.27~2.1%, Kim *et al.*, 2004; RDW, 약 13%, 김 등, 2005) 이상으로 증가하여 9일째 최고치에 달하였으나 이후 조금씩 감소하여 지속적으로 유지하는 현상은 현저한 적혈구계의 생산에 있어 체내의 보상적인 네가티브 피드백 효과가 관련되어 더 이상 증가되지 않은 것으로 사료된다.

PDW의 변화에 있어 HM10760 투여군에서는 투여개시 후 5일째부터 Aranesp[®] 투여군은 9일째부터 증가하여 투여개시 전 및 문헌치(59.8~69.6%, 김 등, 2005)에 비해 증가하는 결과이었다. 이는 HM10760 투여군이 Aranesp[®] 투여군에서 보다 혈소판 생성에 있어 더 큰 영향을 준 것으로 생각되나 본 시험에서는 HM10760 투여군 및 Aranesp[®] 투여군에서 혈소판 수가 투여개시 전 후

은 문헌치 수준으로 변화가 관찰되지 않았다. 이는 원숭이에서의 EPO의 4주간 투여시험에서도 유사한 결과로 일치하는 현상이었다(김 등, 2005). PDW는 혈소판 크기에 대한 평가로서 특히 혈소판의 대소부동증(anisocytosis)일 때 증가하며 PDW와 RDW가 동반하는 것으로 알려져 있다(Wiwanitkit, 2004). 본 시험결과에서도 역시 RDW와 PDW의 동반하는 증가패턴으로 일치하는 결과를 보였다. 또한 혈액생화학적 결과에서 CREA 및 CI은 생리적 범위(Kim *et al.*, 2004)내의 변화로 독성학적 의미가 적은 것으로 생각된다.

본 연구에서 cynomolgus monkey를 이용하여 HM10760를 100 µg/kg 용량으로 단회 피하투여한 결과, 혈액학적으로 적혈구 관련지표를 증가시켰으며 Aranesp® 투여군보다 상대적으로 더 큰 증가를 유발하였다.

감사의 말씀

본 논문은 산업자원부(바이오채린저, 0405-DS01-0101-001) 및 식품의약품안전청(05132독성평642, 영장류를 이용한 일반독성평가기술 확립, 2005)지원에 의해 수행되었으며, 영장류 독성시험수행에 수고해 주신 한수철, 허정두, 이필수, 임선택, 박남수, 정우홍 선생님께 감사드립니다.

참고문헌

- Cazzola, M. (2003): Erythropoietin therapy: need for rationality and active surveillance. *Haematologica*, **88**, 601-605.
- Eklom, B., Goldbarg, A.N. and Gullbring, B. (1972): Response to exercise after blood loss and reinfusion. *J. Appl. Physiol.*, **33**, 175-180.
- Eschbach, J.W. and Adamson, J.W. (1989): Guidelines for recombinant human erythropoietin therapy. *Am. J. Kidney Dis.*, **14**(Suppl. 1), 2-8.
- Fisher, J.W (1993): Recent advances in erythropoietin research. *Prog. Drug Res.*, **41**, 293-311.
- Furuno, T., Komastu, H., Noguchi, N., Noguchi, G., Suzuki, S., Kataoka, S., Usami, M., Saito, K. and Tatsumi, T. (1990): Thirteen-week intravenous toxicity study of EPOCH in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Rinshouigaku*, **6**(Suppl. 2), 271-289.
- Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neil, S.D., Kaufman, R.J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S.S., Hewick, R., Fretch, E.F., Kawakita, M., Shimizu, T. and Miyake, T. (1985): Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*, **313**, 806-810.
- Jelkmann, W. (2000): Use of recombinant human erythropoietin as an anti-anemic and performance enhancing drug. *Curr. Pharmaceut. Biotechnol.*, **1**, 11-31.
- Gebbia, V., Palmeri, S., Valenza, R., Rausam, L. and Citarrella, P. (1991): The *in vivo* effects of recombinant human erythropoietin on cisdiamminodichloroplatinum-induced anemia in Golden Syrian hamsters. *In Vivo*, **5**, 149-152.
- Kim, C.-Y., Han, S.-C., Heo, J.-D., Lee, H.-S., Ha, C.-S., Kang, B.-H., Kwon, M.-S. and Han, S.-S. (2004): Effect of transportation on hematological and serum biochemical values in cynomolgus monkeys. *Korean J. Lab. Ani. Sci.*, **20**, 328-332.
- 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.
- Lin, F.K., Suggs, S., Kin, C.H., Browne, J.K., Smalling, R., Egrie, J.C., Cjen, K.K., Fox, G.M., Martin, F., Stabinsky, Z., Badrawi, S.M., Lai, P.H. and Goldwasser, E. (1985): Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7580-7584.
- Ng, T., Marx, G., Littlewood, T. and Macdougall, I. (2003): Recombinant erythropoietin in clinical practice. *Postgrad Med. J.*, **79**, 367-376.
- Shriver, Z., Raguram, S. and Sasisekharan, R. (2004): Glycomics: a pathway to a class of new and improved therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**, 863-873.
- Vaziri, N.D., Zhou, X.J. and Liao, S.Y. (1994): Erythropoietin enhances recovery from cisplatin-induced acute renal failure. *Am. J. Physiol.*, **266**, F360-F366.
- Wiwanitkit, V. (2004): Plateletcrit, mean platelet volume, platelet distribution width: its expected values and correlation with parallel red blood cell parameters. *Clin. Appl. Thrombo. Hemost.*, **10**, 175-178.
- 김충용, 윤석주, 김용범, 하창수, 김달현, 권명상, 한상섭 (2005): 계잡이 원숭이에 있어 rHuEPO의 4주간 투여 후 혈액학 및 조직병리학적 변화. *한국독성학회지*, **21**, 227-234.
- 김달현, 임동문, 조효진, 박관하, 하병집, 김현수 (1994): 새로운 유전 공학적 방법에 의해 생산한 Erythropoietin의 rat에서의 4주 아급성 독성. *한국독성학회지*, **10**, 243-254.
- 남정석, 제정환, 이석만, 양재만, 강병철, 이학모, 박재학, 송동호, 유선희, 이영순 (1997): 랫드에서 EPO(erythropoietin)의 4주간 정맥 반복투여 독성시험. *한국독성학회지*, **13**, 131-138.
- 정광희 (2004): 유전자재조합 의약품 연구동향. *보건산업기술동향*, 가을호, 30-38.
- 제정환, 남정석, 이석만, 강병철, 이학모, 박재학, 송동호, 유선희, 이영순(1997): 토끼에서 EPO(erythropoietin)의 4주간 정맥 반복투여 독성시험에 관한 연구. *한국독성학회지*, **13**, 139-147.
- 조명행, 성하정, 광승준, 천선아, 임소영, 김원배, 김병문, 안병욱, 이병무(1998): 비글견에서 인체 재조합 적혈구 조혈인자, rHu-EPO의 급성독성에 관한 연구. *한국응용약물학회지, J. Appl. Pharmacol.*, **6**, 317-327.