

유전자 재조합 인형 과립구 콜로니 자극인자 DA-3030의 일반약리작용

배은주* · 신명수 · 김순희 · 강수형 · 김원배 · 양중익
동아제약(주) 연구소

General Pharmacology of Recombinant Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor DA-3030 Expressed in *E. coli*

Eun Ju BAE, Myeong Soo SHIN, Soon Hoe KIM,
Soo Hyung KANG, Won Bae KIM and Junnick YANG

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

(Received October 4, 1994; accepted October 21, 1994)

Abstract—Neutropenia is a major dose-limiting factor in cancer chemotherapy diminishing its usefulness and increase patient's susceptibility to infectious disease. Some recombinant human granulocyte colony stimulating factors(rhG-CSFs) are in use to reduce the risk of this serious side effect. In this study, we examined the pharmacological properties of DA-3030, a rhG-CSF expressed in *E. coli*. DA-3030 100 and 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i. v., had no significant effect on the central nervous, gastrointestinal system in mice and cardiovascular system in rabbits, but it slightly inhibited the spontaneous motility of isolated nonpregnant uterus in rats. It also had no influence on excretion of urinary electrolytes. DA-3030 administered for successive 3 days increased the blood WBC count in zymosan air pouch inflamed rats and in normal rats. These results indicate that DA-3030 has little side effects in animals.

Keywords □ DA-3030, rhG-CSF, general pharmacology(mouse, rat, guinea pig, rabbit)

Colony stimulating factor(이하 CSF)란 혈구의 재생, 증식, 분화, 기능적 조화, 활성화 등을 조절하는 일련의 당단백질군을 총칭하며, hemopoietic growth factor(조혈 성장인자)라고도 불리어진다(Gabrilove, 1991; Gasson 등, 1984; Metcalf 등, 1986; Souza 등, 1986; Wong 등, 1985). CSF는 크게 Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-6 (IL-6), Granulocyte-macrophage CSF (GM-CSF), Granulocyte-CSF (G-CSF), Macrophage-CSF (M-CSF), Erythropoietin으로 나눌 수 있으며 이들은 fibroblast, endothelial cell, epithelial cell, T-lymphocyte 등에서 생성된다.

이 중 과립구 콜로니 자극인자(G-CSF)는 과립구 전구세포(CFU-G : Colony forming units-granulocytes)를 자극하고 pre-CFU의 생존과 증식을 보조하는 역할을 하는데 방광암 세포주 5637에서 최초로 분리된 이래

최근에는 유전자 재조합기술의 발전으로 대장균이나 동물세포를 이용하여 대량 발현할 수 있게 되어 임상적용이 실용화됨에 따라 최근 여러 종류의 암에서 항암 화학요법시 G-CSF 사용으로 백혈구 감소증에 의한 감염을 감소시킬 수 있음이 보고되고 있다(Morstyn 등, 1988).

G-CSF와 항암제의 병용요법은 항암제 투여로 인한 현저한 호중구 감소증을 예방하거나 경감시킴으로써 항암제의 고용량 투여를 가능하게 하며 임상적용시 동일 항암제에 대하여 보다 높은 항암효과를 얻을 수 있다(Gabrilove, 1989). 이외에도 G-CSF는 임상적으로 골수 적출 및 자가골수 이식 수술시, 방사선 요법, 골수 이형성증, 선천성 및 특발성 호중구 감소증 등에 시험적으로 적용하고 있다.

본 연구는 동아제약(주) 연구소에서 대장균(*E. coli*)을 발현제로 이용하여 유전자 재조합법으로 생산한 새로운 인형 과립구 콜로니 자극인자(rhG-CSF)인 DA-3030의 일반약리작용에 관한 것이다.

*To whom correspondence should be addressed.

실험방법

시약 및 기기

실험에 사용한 DA-3030은 본 연구소 생물공학 연구실에서 유전자 재조합 기술로 만든 무색 투명한 액체로 순도는 98% 이상이고 Lot No.는 CTS-001로서 냉장보관하였고, 시험시 용매대조물질(10 mM sodium acetate, 50% mannitol, 0.004% tween 80, pH 4.0)으로 희석하여 사용하였다. 이 외에 사용한 시약으로서 sodium hexobarbital과 sodium pentobarbital은 각각 hexobarbital과 pentobarbital로부터 합성하여 사용하였고 기타 약물은 Sigma Chemical Co.의 일급시약을 사용하였다.

사용기기로서 Hugo Sachs Elektronik사의 digital 전자체온계, Narco Co.의 Physiograph(Narcotrace® 40 및 80), Roche사의 혈구자동측정기(MINOS vet)와 Baxter사의 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ Instant ISE analyzer 등을 사용하였다.

실험동물

ICR mouse(♂)와 Sprague-Dawley rat(♂, ♀)는 SIPPR/B&K Laboratory Animal Ltd.로부터 공급받았고 Guinea pig(♂)과 Newzealand white rabbit(♂)은 국내 업체로부터 공급받아 순화기간을 거친 후 사용하였다.

용량설정

DA-3030의 실험동물에서의 효력범위는 피하주사의 경우 50~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이므로, 본 실험에서는 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 저용량으로 하고 효력용량의 10배 이상인 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 고용량으로 설정하여 정맥주사하였다.

중추신경계에 대한 영향

일반증상

체중 20~32 g의 마우스를 한 군에 10마리씩 사용하였다. 약물 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 꼬리에 정맥주사하고 Irwin법(Irwin, 1968)에 준하여 총 26항목에 걸쳐 행동을 관찰하였다. 양성 대조약물로 haloperidol 10 mg/kg을 정맥주사하였다.

Barbital 수면강화작용

체중 23~24 g의 마우스를 한 군에 8마리씩 사용하였다. 약물 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 정맥주사하고 30분 후에 Na-hexobarbital 100 mg/kg을 복강주사하고 정향반사가 소실된 후 회복되기까지의 시간을 측정하였다.

정상체온에 대한 작용

체중 18~24 g의 마우스를 한 군에 8마리씩 사용하였다. 약물 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 정맥주사하고 digital 전자체온계로 일정시간간격으로 직장체온을 측정하였다.

초산 writhing 진통작용

Koster 등(1959)의 방법에 준하여 실시하였다. 체중 25~32 g의 마우스를 한 군에 8마리씩 사용하였다. 약물 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 정맥주사하고 15분 후에 0.7% 초산-생리식염액 0.1 ml/10 g을 복강내에 주사한 다음,

10분후부터 10분간 writhing 발생수를 측정하였다.

Pentetrazole 유발경련에 대한 작용

체중 24~32 g의 마우스를 한 군에 10마리씩 사용하였다. Schreiber 등(1971)과 Schechter 등(1977)의 방법에 따라 약물 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 정맥주사하고 30분 후에 pentetrazole 110 mg/kg을 복강주사하고 간대성 경련, 강직성 신전의 발현률과 치사율을 측정하였다.

호흡순환기계에 대한 영향

마취 Rabbit의 혈압 및 심박수에 대한 작용

체중 2 kg내외의 rabbit을 urethane(1 g/kg)을 복강주사하여 마취시킨 후 경동맥과 대퇴정맥을 cannulation 하고 대퇴정맥으로 약물 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 및 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 주입한 후 경동맥을 통하여 혈압 및 심박수를 측정하였다.

자율신경계 및 적출평활근계에 대한 영향

장관수송능에 대한 작용

체중 12~27 g의 마우스를 한 군에 8마리씩 사용하였다. 마우스를 24시간 절식시킨 후 10% arabia gum에 현탁한 5% charcoal을 개체당 0.2 ml씩 경구투여하고 15분 후 약물 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 및 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 정맥주사하였다. 30분 후 십이지장에서 회장까지 적출하여 charcoal의 이행률을 구하였다.

기니픽 적출회장에 대한 작용

체중 700 g내외의 기니픽을 실험치사하고 회장을 적출하여 표본을 만들어 32°C, 95% O_2 -5% CO_2 로 포화된 Ca^{2+} deficient Tyrode가 담긴 organ bath에 현수하고 등장성 수축을 기록하였다. 약물 10^{-8} ~ 3×10^{-5} g/ml의 직접작용 및 histamine 수축에 대한 간접작용을 검토하였다. 시험물질은 Van Rossum(1963)의 방법에 의하여 organ bath에 누적적으로 가하였다.

비임신 랫드 적출자궁에 대한 작용

체중 200 g 내외의 자성 랫드를 실험치사하고 자궁표본을 만들어 37°C, air로 포화되어 있는 de Jalon 용액이 담긴 organ bath에 현수하고 등장성 수축을 기록하였다. 약물 10^{-8} ~ 3×10^{-5} g/ml을 누적적으로 가하면서 자궁의 자동운동을 관찰하였다.

기타작용

노량 및 뇨전해질에 대한 작용

체중 100~160 g의 랫드를 한군에 6마리씩 사용하였다. 생리식염액 2.5 ml/100 g을 경구투여하고 약물 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 정맥주사한 후 즉시 rat metabolic cage에 한 마리씩 넣고 6시간 동안 뇨를 채집하였다. 뇨량 및 뇨중 Na^+ , K^+ , Cl^- 의 농도를 측정하였다.

Zymosan air pouch inflammation에 대한 작용

체중 180~260 g의 랫드를 한군에 6마리씩 사용하였다. 랫드 등의 털을 제거하고 배부 피하에 20 ml의 공기를 주사하였다. 24시간 후 1% zymosan 1 ml을 공기낭에 주사하고 그날부터 1일 1회, 3일간 약물 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 피하주사하였다. 그 다음날 체중을 측정하고 ether 마취하에 공기낭에 10 ml의 saline을 넣어 씻어내

얻은 침출액 및 혈액중의 백혈구수를 측정하였다.

혈액학적 parameter에 대한 영향

체중 150~190 g의 랫드를 한 군에 5마리씩 사용하였다. 약물 100 µg/kg 및 1,000 µg/kg을 1일 1회, 3일간 피하주사하고, 약물투여후 12시간에 복대동맥에서 채혈하여 EDTA 처리된 시험관에 넣어 백혈구수를 측정하였다.

통계처리

통계처리는 ANOVA와 Duncan's multiple comparison test로 하였으며, 결과는 Mean±S.E.M로 표시하였다.

실험결과

중추신경계에 대한 영향

일반증상

DA-3030 1,000 µg/kg 투여 직후 grooming, spontaneous activity가 약간 증가하는 경향을 보였지만 이는 용매투여군에서도 비슷하게 나타났다. Haloperidol 투여군에서는 alertness와 spontaneous activity가 저하되고, analgesia, Straub's tail reaction, hypothermia, respiratory depression, ptosis 등의 다양한 증세가 나타났다.

Barbital 수면 강화 작용

DA-3030 100, 1,000 µg/kg 투여 후 Na-hexobarbital에 의해 유발된 수면시간은 대조군에 비해 유의성 있는 차이를 보이지 않았다.

정상체온 하강작용

DA-3030 1,000 µg/kg 투여에 의해 직장체온이 대조군에 비해 약간 높게 유지되었지만 통계적 유의성은 없었으며 100 µg/kg 투여군에서도 유의성있는 체온변화는 나타나지 않았다.

초산 writhing 진통작용

DA-3030 100, 1,000 µg/kg 투여 후 초산으로 유발된

Table I. Effect of DA-3030 on pentetrazole induced convulsions in mice.

Group	N	Dose (µg/kg, iv)	Incidence/10 animals		
			CL	TE	Death
Vehicle	10		9/10	9/10	9/10
DA-3030	10	100	7/10	8/10	8/10
DA-3030	10	1,000	9/10	9/10	9/10

CL: Clonic convulsions, TE: Tonic extensions

Table II. Effect of DA-3030 on the intestinal propulsion in mice

Group	N	Dose (µg/kg, iv)	Percentage traversed by charcoal	Percent change from control
Vehicle	8		66.2±1.44	—
DA-3030	8	100	62.5±2.00	5.6
DA-3030	8	1,000	59.5±3.10	10.1

writhing의 횟수는 대조군에 비해 유의성있는 차이를 나타내지 않았다.

Pentetrazole 유발경련에 대한 작용

DA-3030 100, 1,000 µg/kg 투여 후 pentetrazole에 의하여 유발된 경련은 대조군에 비해 유의성있는 차이가 나타나지 않았다(Table I).

호흡순환기계에 대한 경향

마취 Rabbit의 호흡 및 혈압에 대한 작용

DA-3030 100, 1,000 µg/kg 투여시 일과성의 미약한 혈압상승과 심박수 강하가 관찰되었지만 이는 용매만을 주사한 경우에도 마찬가지로 나타난 증상이었다.

자율신경계 및 적출평활근계에 대한 영향

장관수송능에 대한 작용

DA-3030 100, 1,000 µg/kg 투여에 의해 유의성 있는 장관수송능의 변화는 나타나지 않았다(Table II).

기니픽 적출회장에 대한 작용

DA-3030 10⁻⁸~3×10⁻⁵ g/ml을 누적적으로 가했을 때 수축 또는 이완반응은 나타나지 않았으며, DA-3030 3×10⁻⁵ g/ml을 전처리한 경우 histamine 10⁻⁷ g/ml에 의한 수축에 길항하지 않았다.

비임신 랫드 적출자궁에 대한 작용

DA-3030 10⁻⁸~3×10⁻⁵ g/ml을 누적적으로 가했을 때 실험에 사용한 랫드 5마리중 3마리의 경우 3×10⁻⁶~3×10⁻⁵ g/ml에서 자궁의 자동운동에 일과적이고 불규칙적인 변화가 나타났다(Fig. 1).

기타작용

노랑 및 노전해질에 대한 작용

DA-3030 100, 1,000 µg/kg 투여 후 6시간동안 채집한 노랑 및 노중 Na⁺, K⁺, Cl⁻의 농도에는 유의성있는 변화가 나타나지 않았다.

Zymosan air pouch inflammation에 대한 작용

zymosan air pouch법으로 유발된 염증반응에 있어서 DA-3030은 육아증량, 흉선과 부신의 증량에 유의성있는 영향을 주지 않았다. 단, 혈액중의 백혈구는 DA-3030 1,000 µg/kg 투여군에서 유의성있게 증가하였고, 침출액 중의 백혈구수도 DA-3030 투여군에서 상당히 증가하였

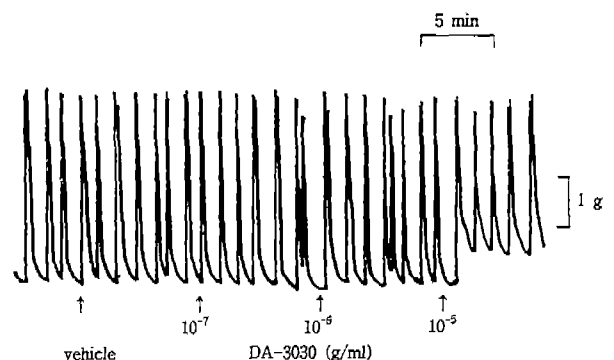


Fig. 1. Effect of DA-3030 on spontaneous motility of isolated nonpregnant uterus in rats (N=5).

Table III. Effect of DA-3030 on zymosan air pouch inflammation in rats

Group	N	Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$, sc)	중량			백혈구수($10^3/\text{mm}^3$)	
			육아(g)	흉선(mg)	부신(mg)	혈액	침출액
Vehicle	6		3.2 \pm 0.34	392.2 \pm 39.7	37.3 \pm 3.23	8.2 \pm 0.92	2.6 \pm 1.36
DA-3030	6	100	2.7 \pm 0.10	444.9 \pm 14.4	44.2 \pm 2.70	11.0 \pm 1.15	3.2 \pm 0.77
DA-3030	6	1,000	2.7 \pm 0.28	414.7 \pm 19.2	41.9 \pm 2.31	19.8* \pm 1.82	4.1 \pm 1.28

*Significantly different from vehicle control group at $p < 0.05$

Table IV. Effect of DA-3030 on hematological values in rats

Group	N	Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$, sc)	WBC	RBC	Hemoglobin	Hematocrit	Platlet
			($10^3/\text{mm}^3$)	($10^6/\text{mm}^3$)	(g/dl)	(%)	($10^3/\text{mm}^3$)
Vehicle	6		7.7 \pm 1.6	7.3 \pm 0.8	15.1 \pm 1.8	42.2 \pm 4.3	641 \pm 73.9
DA-3030	6	100	18.2* \pm 1.4	7.7 \pm 0.3	15.8 \pm 0.6	45.5 \pm 1.7	636 \pm 90.1
DA-3030	6	1,000	15.2* \pm 2.9	7.4 \pm 0.4	15.1 \pm 1.1	43.4 \pm 2.8	582 \pm 77.4

*Significantly different from vehicle control group at $p < 0.05$

지만 통계적 유의성은 없었다(Table III).

혈액학적 parameter에 대한 영향

DA-3030 100 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 모두 랫드의 혈중 백혈구수를 유의성있게 증가시켰지만 용량의존성은 나타나지 않았다. 이외의 다른 혈액학적 parameter는 대조군과 차이가 없었다(Table IV).

고찰

본 실험은 동아제약(주) 연구소에서 대장균(*E. coli*) 발현계를 이용하여 유전자 재조합법으로 생산한 분자량 18,800 dalton의 새로운 재조합 인형 파립구 촉진인자(rhG-CSF)인 DA-3030의 일반약리작용에 관한 것이다.

이 실험에서 DA-3030 100, 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 은 중추신경계에 있어서 일반증상, barbital 수면, 정상체온, 초산 유발 writhing, pentetrazole 유발 경련에 대하여 유의성있는 영향을 나타내지 않았다.

호흡 순환기계에 있어서 마취토끼의 혈압과 심박수에 영향을 주지 않았다.

자율신경계 및 적출평활근에 있어서 마우스 장관수축능과 기니픽 적출회장시험에서 유의성있는 영향을 나타내지 않았으나, 자성랫트 비임신 적출자궁에 대해서는 비교적 고용량에서 일시적인 자동운동의 변화가 나타났다가 관찰되었는데, Filgrastim의 일반약리시험에서도 이와 같은 사실이 보고되어 있다(藥業時報社, 1992; 藥事日報社, 1992).

6시간 동안 채집한 랫드의 뇨량 및 뇨중 Na^+ , K^+ , Cl^- 의 농도에서도 유의성있는 차이가 나타나지 않았다. 또한 호중구의 기능이 관련되는 것으로 생각되는 염증 반응으로서 실시한 zymosan air pouch inflammation 시험의 경우 염증반응에 관여하는 부신이나 흉선의 중량은 증가하지 않았지만 혈중 백혈구수가 유의성있게

증가하였고 육아침출액의 백혈구수도 미약하게나마 증가하였으므로 이것은 DA-3030의 작용이라고 사료된다. 정상 랫드에 같은 용량의 DA-3030을 투여하였을 때에도 역시 혈중 백혈구수가 현저하게 증가하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 본 연구소에서 제조한 rhG-CSF인 DA-3030은 중추신경계, 호흡 순환기계, 자율신경계 및 적출평활근에 대하여 심각한 부작용을 나타내지 않으며 호중구가 관련된 반응은 강화시키는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Gabrilove, J. L. (1991). Colony-stimulating factors: Clinical status. *Important Advances in Oncology* **1991**, 215.
- Gabrilove J. L. and Jakubowski, A. (1989). Granulocyte colony stimulating factor: Preclinical clinical studies. *Haematology Clinics of North America* **3**, 4270.
- Gasson, J. C., Weisbart, R. H., Kaufman, S. E., et al (1984). Purified human granulocyte macrophage colony stimulating factor: Direct action on neutrophils. *Science* **226**, 1339.
- Irwin, S. (1968). Comprehensive observational assessment: A systemic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologica* **13**, 222.
- Koster, R., Anderson, M. and de Beer, E. J. (1959). Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.* **18**, 412.
- Metcalf, D. (1986). The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* **67**, 257.
- Morstyn, G., Souza, L. M., Keech, J., Sheridan, W., Campbell, L., Alton, N. K., Green, M. and Metcalf, D. (1988). Effect of granulocyte colony stimulating factor on neutropenia induced by cytotoxic chemotherapy. *Lancet* **1**, 667.
- Schechter, P. J., Tranier, Y., Jung, M. J. and Sjoerdsma, A. (1977). Antiseizure activity of γ -acetylenic γ -chemotherapy. *Lancet* **1**, 667.

- Schechter, P. J., Tranier, Y., Jung, M. J. and Sjoerdsma, A. (1977). Antiseizure activity of γ -acetylenic γ -aminobutyric acid: A catalytic irreversible inhibitor of γ -aminobutyric acid transaminase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **201**(3), 606.
- Schreiber, R. A. and Schlesinger, K. (1971). Circadian rhythms and seizure susceptibility: Relation to 5-hydroxytryptamine and norepinephrine in brain. *Physiol. & Behav.* **6**(6), 635.
- Souza, L. M., Boone, T. C. and Gabilove, J. *et al* (1986). Recombinant human granulocyte colony stimulating factor: Effects on normal leukemic myeloid cells. *Science* **232**, 61.
- Van Rossum, J. M. (1963). Cumulative dose-response curves. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **143**(3), 299.
- Wong, G. G., Witek, J. S. and Temple, P. A. *et al* (1985). Human GM-CSF: Molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. *Science*. **228**, 810.
- 藥事日報社 (1992). 最近の新薬. **43**, pp. 160-164.
- 藥業時報社 (1992). 日本醫藥品集 (醫療藥), pp. 956-957.