

CJ-50001 (rG-CSF)에 대한 항원성시험

백남진 · 강재구 · 김달현* · 목헌 · 김제학 · 김현수
제일제당 종합연구소

Antigenicity of Recombinant Human G-CSF (CJ-50001)

Nam-Jin Baek, Jae Ku Kang, Dal Hyun Kim*, K. Hun Mok,
Je Hak Kim and Hyun Su Kim

R&D Center, Cheil Jedang Corp., 522-1 Dokpyong-Ri, Majang-Myon, Ichon-Si,
Kyonggi-Do 467-810, Korea
(Received June 30, 1997)
(Accepted August 7, 1997)

ABSTRACT: Antigenic potential of genetically engineered human granulocyte colony-stimulating factor (CJ-50001) was assessed in guinea pigs and mice. In active systemic anaphylaxis (ASA) test, although CJ-50001 at 50 µg/head induced anaphylactic responses, CJ-50001 5 µg/head alone or 50 µg/head with adjuvant did not induce anaphylactic responses. In passive systemic anaphylaxis test (PCA) or passive hemagglutination test (PHA), CJ-50001 did not induce positive responses. It is concluded that, in light of the fact that CJ-50001 was antigenic only in ASA but not in PCA or PHA and also that CJ-50001 is a foreign human recombinant protein to guinea pigs, CJ-50001 may not induce systemic allergic reaction in its clinical use in human.

Key Words: Granulocyte colony-stimulating factor, CJ-50001, Antigenicity test

I. 서 론

G-CSF(granulocyte colony-stimulating factor)는 단구/대식구, 섬유아세포, 성세포 및 내피세포에 의해 만들어져서 골수내에서 호중구 생산과 호중구 전구세포의 증식, 분화, 그리고 마지막 단계에서의 활성화(탐식능 향상, respiratory burst와 관련된 세포내 대사과정 야기, 항체의존성 세포독성 등)를 특이적으로 향상시키는 조혈 인자의 일종이다(Nagata, 1994). 인간의 G-CSF는 유전자 재조합기술을 이용하여 대장균 혹은 동물 세포로부터 대량 발현시킬 수 있게 되었고(Souza 등, 1986; Nagata 등, 1986), 이것에 의해 임상 적용이 실용화됨에 따라 골수이식 환자들에서 골수의 회복 촉진, 골수억제성 항암제 치료 환자의 감염 기회 감소, 재생불량성 빈혈 환자의 호중구 기능 향상, 그리고 약물에 의해 야기되는 호중구감소증 치료 등에 사용되고 있다.

제일제당(주) 종합연구소에서는 대장균을 발현계로 사용한 유전자재조합기술로 recombinant granulocyte-

colony stimulating factor (rG-CSF)를 생산하였다. 이에 대한 안전성시험의 일환으로서 guinea pig 및 마우스를 이용한 항원성 시험을 "의약품 등의 독성시험 기준" (1994)에 따라 실시하였으며, 그 결과를 본고에 발표하게 되었다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

제일제당 종합연구소에서 대장균을 이용하여 생산한 CJ-50001(Lot No. CS961025)를 10 mM acetic acid buffer(pH 4.0, 40 g/ml Tween 80, 5% mannitol)에 희석하여 사용하였다. 대조물질로는 ovalbumin(Sigma Chemical Co., Lot 19F-8105)을 멸균생리식염수에 용해하여 사용하였다.

2. 면역보조제

Freund's complete adjuvant(Sigma Chemical, St. Lou-

*To whom all correspondence should be addressed.

is, Missouri, USA) 혹은 alum(Pierce, Rockford, Illinois, USA)을 시험물질과 혼합(1:1, v/v)하여 사용하였다.

3. 실험동물 및 사육조건

4주령의 Hartley계 웅성 guinea pig 35마리를 삼육실험동물에서, 6주령의 C57BL/6 웅성 마우스 35마리와 5주령의 웅성 Sprague Dawley rat 20마리를 Charles River Japan(Atsugi, Japan)에서 각각 구입하였다. 일주일 이상의 순화기간을 거친후 시험에 사용하였으며, 시험시작시 guinea pig의 체중은 290.8~360.8 g, C57BL/6 마우스의 체중은 18.1~20.77 g이었다. 사육실은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기횟수 12~13회/hr, 조도 150~300 Lux 조건하에 유지하였다. 검역기간 및 시험기간중에는 실험동물용 고품사료를 섭취시켰으며, 음수는 수도물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다

4. Active systemic anaphylaxis test (ASA) in guinea pigs

감작 및 야기항원을 Table 1과 같이 투여하였다. 군당 5-6마리의 guinea pig에 1) vehicle, 2) CJ-50001 5 $\mu\text{g}/\text{head}$, 3) CJ-50001 50 $\mu\text{g}/\text{head}$, 4) CJ-50001 50 $\mu\text{g}/\text{head}$ 와 FCA의 동량 혼합액, 5) ovalbumin 1 mg/head와 FCA의 동량 혼합액을 각각 투여하되, 단독투여군에서는 1주일에 3회씩, 총 7회 피하주사하였고, 혼합투여군의 경우에는 1주일에 1회씩 총 3회 피하 주사하였다.

최종 감작 2주후 야기항원을 이정맥내에 투여하였다. 30분동안 전신의 증상을 관찰하여 다음의 기준에 따라 anaphylaxis 증상을 판정하였다.

- (Asymptomatic)

\pm (Mild): 불안, 기모, 진전, 코를 문지르거나 핏몸

+ (Moderate): 재채기, 기침, 호흡촉진, 배뇨, 배변, 유루

++ (Severe): 호흡곤란, 짹짹거리는 소리, 청색증, 보행불안, 도약, 혈떡거리고 몸부림침, 경련, 황와, Cheyne-Stokes 호흡

+++ (Death)

5. Heterologous passive cutaneous anaphylaxis test (PCA)

군당 6마리의 웅성 C57BL/6 마우스에 1) vehicle, 2) CJ-50001 0.4 $\mu\text{g}/\text{head}$, 3) CJ-50001 4 $\mu\text{g}/\text{head}$, 4) CJ-50001 4 $\mu\text{g}/\text{head}$ 와 Alum의 동량 혼합액, 5) ovalbumin 20 $\mu\text{g}/\text{head}$ 와 Alum의 동량 혼합액을 각각 투여하였다(Table 2). 단독투여군에는 1주일에 3회씩 총 7회 피하주사하였고 alum혼합투여군에는 1주일에 1회씩 총 3회 복강내 투여하였다. 최종 감작 13일후 마우스 안와정맥총에서 혈액을 채취하여 혈청을 얻었다.

항혈청을 PBS(phosphate buffered saline)로 5배 희석한후 이를 3배씩 5단계 희석하여, 100 μl 씩을 rat의 등에 피내주사하였다. 24시간 후, 야기항원을 2% Evans blue와 동량으로 혼합하여 rat의 미정맥에 주사하였다.

Table 1. Active systemic anaphylaxis test in guinea pigs

Group	Sensitizing antigen	No. of shots	No. of animal	Route	Challenging antigen
1	Vehicle ^a	7 ^b	6	s.c.	CJ-50001 50 $\mu\text{g}/\text{head}$
2	CJ-50001 5 $\mu\text{g}/\text{head}$	7	6	s.c.	CJ-50001 50 $\mu\text{g}/\text{head}$
3	CJ-50001 50 $\mu\text{g}/\text{head}$	7	6	s.c.	CJ-50001 50 $\mu\text{g}/\text{head}$
4	CJ-50001 50 $\mu\text{g}/\text{head}$ +FCA	3 ^c	5	s.c.	CJ-50001 50 $\mu\text{g}/\text{head}$
5	Ovalbumin 1 mg/head+FCA	3	5	s.c.	Ovalbumin 1 mg/head

^a 10 mM Acetic acid, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tween 80, 5% mannitol (pH 4.0).

^b three times per week for 3 weeks.

^c once per week for 3 weeks.

Table 2. Mouse-rat passive cutaneous anaphylaxis test (PCA)

Group	Sensitizing antigen	No. of shots	No. of animal	Route	Challenging antigen
1	Vehicle ^a	7 ^b	6	s.c.	CJ-50001 50 $\mu\text{g}/\text{head}$
2	CJ-50001 0.4 $\mu\text{g}/\text{head}$	7	6	s.c.	CJ-50001 50 $\mu\text{g}/\text{head}$
3	CJ-50001 4 $\mu\text{g}/\text{head}$	7	6	s.c.	CJ-50001 50 $\mu\text{g}/\text{head}$
4	CJ-50001 4 $\mu\text{g}/\text{head}$ +Alum	3 ^c	6	i.p.	CJ-50001 50 $\mu\text{g}/\text{head}$
5	Ovalbumin 20 $\mu\text{g}/\text{head}$ +Alum	3	6	i.p.	Ovalbumin 1 mg/head

^a 10 mM Acetic acid, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tween 80, 5% mannitol (pH 4.0).

^b three times per week for 3 weeks.

^c once per week for 3 weeks.

30분 후 ether마취에 의해 rat를 도살하고, 항혈청 주사 부위에 나타나는 청색 반점을 관찰하였다. 청색반점의 직경이 5 mm 이상인 최대 희석배율을 그 항혈청의 항체가로 결정하였다.

6. Passive hemagglutination test

면양 적혈구(한국 Media) 8 ml을 원심분리 (740 g, 10 min)하여 상청액을 버리고 생리식염수에 부유하였다. 원심분리에 의한 세척과정을 3회 반복한 후 마지막 원심분리시 침전된 적혈구 1 ml과 CJ-50001 혹은 ovalbumin 0.5 mg/ml, 0.0067% 염화크롬 (in saline) 10 ml을 섞어서 1시간동안 상온에서 반응시켰다. 원심분리 (740 g, 10 min)하여 상청액을 제거하고 생리식염수에 부유시키는 세척과정을 3회 반복한 뒤, 최종적으로 0.5% cell (v/v)이 되도록 PBS에 부유시켰다.

마우스에 감작하여 얻어진 항혈청을 20% FBS가 들어있는 PBS로 5배부터 10240배까지 12단계 연속배수 희석하였다. 항원처리한 0.5% 적혈구 부유액 50 μ l에 항혈청 희석액 50 μ l를 혼합하여 상온에 12시간 이상 방치한 후, 적혈구의 응집유무를 육안으로 관찰하였다. 응집이 관찰된 항혈청의 최고희석배율을 그 항혈청의 응집가로 결정하였다.

III. 결 과

1. Active systemic anaphylaxis (ASA) test in guinea pigs

시험 결과는 Table 3과 같다. CJ-50001 5 μ g을 단독으로 혹은 CJ-50001 50 μ g을 면역보조제와 혼합하여 감작한 군에서는 anaphylaxis 증상이 관찰되지 않았으나, CJ-50001 50 μ g으로 감작한 군에서는 5/6의 개체에서 anaphylaxis 증상이 관찰되었다. 양성대조물질인 ovalbumin을 면역보조제와 혼합하여 감작한 경우에는 모든 동물에서 심한 아나필락시스 반응이 관찰되었고, 1/5은 사망하였다.

2. 24 hr-Heterologous passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test in mouse-rat

마우스 항혈청에 대한 수동피부 anaphylaxis 시험결과는 Table 4와 같다. CJ-50001을 단독으로 감작한 모든군의 혈청에서는 PCA 항체가가 5 미만으로서 PCA 반응을 전혀 관찰할수 없었으나, 양성대조물질인 ovalbumin으로 감작한 군의 혈청에서는 15배 이상의 PCA 항체가를 보였다.

3. Passive hemagglutination (PHA) test

마우스 항혈청에 대한 간접적혈구응집반응시험 (PHA)의 결과는 Table 5에 나타내었다. CJ-50001을 감작한 모든 군의 혈청은 응집가가 4 미만으로 CJ-50001-coated RBC의 응집반응을 일으키지 않았으나, 양성대조군인 ovalbumin 투여군의 혈청은 5120배 이상의 희석액에서 ovalbumin-coated RBC의 응집반응을 일으켰다.

Table 3. Results of active systemic anaphylaxis test in guinea pigs sensitized with CJ-50001

Dose (per head)		Severity of anaphylaxis					Positive ratio
Sensitization (s.c.)	Challenge (i.v.)	-	\pm	+	++	+++	
Vehicle	CJ-50001 50 μ g	1	5				0/6
CJ-50001 5 μ g	CJ-50001 50 μ g	4	2				0/6
CJ-50001 50 μ g	CJ-50001 50 μ g		1	1	4		5/6
CJ-50001 50 μ g+FCA	CJ-50001 50 μ g	2	3				0/5
Ovalbumin 1 mg+FCA	Ovalbumin 1 mg				4	1	5/5

Table 4. Results of 24 hr-passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test in mouse-rat

Dose (per head)			PCA titer	Positive ratio
Sensitization	Route	Challenge (i.v.)		
Vehicle	s.c.	CJ-50001 50 μ g	$< \times 5$ (6) ^a	0/6
CJ-50001 0.4 μ g	s.c.	CJ-50001 50 μ g	$< \times 5$ (6)	0/6
CJ-50001 4 μ g	s.c.	CJ-50001 50 μ g	$< \times 5$ (6)	0/6
CJ-50001 4 μ g+Alum	i.p.	CJ-50001 50 μ g	$< \times 5$ (6)	0/6
Ovalbumin 20 μ g+Alum	i.p.	Ovalbumin 1 mg	$\times 15$ (4), $\times 45$ (2)	6/6

^a The number in parenthesis indicates the number of animal.

Table 5. Results of passive hemagglutination test

Sensitization dose per head (route)	Antigen absorbed to sheep RBC	PHA titer	Positive ratio
Vehicle (s.c.)	CJ-50001	<×5 (6) ^a	0/6
CJ-50001 0.4 µg (s.c.)	CJ-50001	<×5 (6)	0/6
CJ-50001 4 µg (s.c.)	CJ-50001	<×5 (6)	0/6
CJ-50001 4 µg+Alum (i.p.)	CJ-50001	<×5 (6)	0/6
Ovalbumin 20 µg+Alum (i.p.)	Ovalbumin	×5120 (1), >10240 (5)	6/6

^a The number in parenthesis indicates the number of animal.

IV. 고 찰

제일제당에서 유전자재조합 기술을 이용하여 대장균에서 생산한 사람 rG-CSF인 CJ-50001에 대하여 guinea pig과 마우스에서 항원성시험을 실시하였다. CJ-50001은 ASA 시험에서는 추정임상용량의 3배(5 µg/head)로 단독감작 혹은 추정임상용량의 30배(50 µg/head)를 면역보조제인 FCA와 혼합감작시 anaphylaxis 반응을 일으키지 않았으나, 추정임상용량의 30배 단독감작시에는 guinea pig에서 anaphylaxis 반응을 나타냈다. 한편, 마우스에 감작하여 얻은 혈청에 대한 PCA 및 PHA 시험에서 CJ-50001에 특이적인 항체의 생성은 관찰되지 않았다.

CJ-50001은 사람유래의 단백질이므로, 실험동물에서 이종단백으로 간주되어 guinea pig ASA 반응에서 양성의 결과를 보이는 것은 당연하다고 사료된다. 하지만, CJ-50001이 마우스에서 항원성을 보이지 않은 것은 마우스 G-CSF와 사람 G-CSF가 매우 유사하기 때문인 것으로 사료된다. 실제로, 마우스 G-CSF와 사람 G-CSF의 아미노산 서열 유사성은 72.6%(Tsuchiya 등, 1986)로서, 두 단백질의 일차구조는 매우 유사하다. 또한, 대장균에서 생산한 rG-CSF가 마우스에서 호중구수를 증가시키는 것이 확인되었다(Tamura 등, 1990). 이처럼 rG-CSF가 마우스에서도 murine G-CSF와 마찬가지로 호중구수를 증가시키는 것으로 보아 3차구조에 있어서도 상당히 유사할 것임을 추측할 수 있다. 물론 두 단백질이 완전히 동일한 3차구조를 갖는 것은 아니므로 마우스에서 CJ-50001에 대한 항체가 생성될 것이 예상되긴 하나, 위와 같은 구조적인 유사성 때문에 항체생성률이 일반 이종단백에 비해 현저히 낮아진 것으로 사료된다.

결론적으로, CJ-50001이 ASA에서 양성반응을 보인 것은 인간 유래의 단백질을 guinea pig에 투여한 결과

나타날 수 있는 것으로 사료되며, 양성반응을 나타낸 투여량도 임상용량의 약 30배에 달한다. 그러므로, CJ-50001은 정상임상용량을 인체에 투여하더라도 특이한 아나필락시스 반응을 유발하지 않을 것으로 예상된다.

참고문헌

- 국립보건안전연구원 (1994) : 의약품 등의 독성시험 기준 (국립보건안전연구원 고시 제 94-3호)
- Nagata, S. (1994) : Granulocyte colony stimulating factor and its receptor in *The Cytokine Handbook* (Thompson, A. Ed.), (Academic Press, London), p. 371-385.
- Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oheda, M., Nomura, H. and Yamazaki, T. (1986) : The chromosomal gene structure and two mRNAs for human granulocyte-colony stimulating factor. *EMBO J.*, **5**(3), 575-581.
- Souza, L.M., Boone, T.C., Gabrilove, J., Lai, P.H., Zsebo, K.M., Murdock, D.C., Chazin, V.R., Bruszewski, J., Lu, H., Chen, K.K., Barendt, J., Platzer, E., Moore, M.A.S., Mertelsmann, R. and Welte, K. (1986) : Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science*, **232**, 61-65.
- Tamura, M., Hattori, K., Sato, K., Oh-izumi, I., Yamamoto, O., Kaihou, S., Ochi, N., Kubota, N., Nagai, H., Imai, N., Ohkawa, H., Oh-ishi, T. and Nakano, T. (1990) : The effect of a single administration of rG-CSF on the peripheral neutrophil levels and its dose responsiveness in normal animals. *Jpn. Pharmacol. Ther.*, **18** (Suppl 9), 2419-2430.
- Tsuchiya, M., Asano, S., Kaziro, Y. and Nagata, S. (1986) : Isolation and characterization of the cDNA for murine granulocyte-colony stimulation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7633-7637.