

Recombinant Human Erythropoietin (DWP413)의 적혈구 생성 효과

최현주 · 김점용 · 임승욱 · 연제덕 · 고여욱
(주)대웅제약 생명과학연구소

Hematopoietic Efficacy of Recombinant Human Erythropoietin (DWP413)

Hyun Ju CHOI, Jeum Yong KIM, Seung Wook LIM, Je Deuk YEON and Yeo Wook KOH

Daewoong Pharmaceutical Co., Bioscience & Biotechnology Institute

(Received April 8, 2003; Accepted May 13, 2003)

Abstract—Efficacy and in vivo bioassay of recombinant human erythropoietin (rh-EPO, DWP413) was investigated. Efficacy studies on erythropoiesis were conducted in normal, cisplatin-induced anemic rats and acute hemorrhage - induced anemic rats. Animals were treated intravenously with DWP413 for 5 days, the changes in the number of red blood cells (RBC), hematocrit value (Hct), hemoglobin concentration (Hb) and reticulocyte were examined. In normal rats, at the doses of 50, 250, and 1250 IU/kg/day, in cisplatin-induced anemic rats, at the doses of 50, 100 and 200 IU/kg/day, RBC, Hb, Hct and reticulocyte were increased dose-dependently. And in acute hemorrhage-induced anemic rats, DWP413 (150, 450 and 1350 IU/kg/day) significantly increased RBC, Hb, Hct and reticulocytes. In histopathological findings of kidney, cisplatin alone treated rats expressed severe glomerulus and tubular damage. But in the DWP413 treated rats after cisplatin treatment, these were not remarkable compared to cisplatin alone treated rats. In vivo bioassay, DWP413 had 102.43% of bioactivity compared to erythropoietin BRP(Biological Reference Product, European Directorate for the Quality of Medicines). These results suggest that DWP413 might be useful for the therapy of anemia induce by renal failure and acute blood loss.

Keywords □ DWP413, efficacy, bioassay, erythropoiesis, acute hemorrhage induced rat, cisplatin, normocythemic mice

Erythropoietin(EPO)는 적혈구 조혈인자로 골수에서 적혈구 전구세포의 분화, 증식과 성장을 촉진하며(Joseph과 John, 1989; Ridley 등, 1994), 주로 신장의 세뇨관 주변세포나 내피세포 및 세뇨관 상피세포에서 생성되고 일부는 간에서 생성된다(Anagnostou, 1985; Michael과 Charles, 1989). Erythropoietin은 과거에는 뇨에서 정제하였으나, 1985년 사람 EPO 유전자의 염기배열이 알려진 후(Jacobs 등, 1985), 여러가지 host cell에서 발현, 생산되어 만성 신부전성 빈혈, AIDS 환자의 빈혈증 치료, 자가혈액량 확보, 화학요법후 빈혈 등의 치료에 사용되고 있다. EPO는 신동맥내의 산소포화도 저하, 신장으로의 산소 운반량 저하 등의 신장 hypoxia에 의해 생성된다. Hypoxia는 세포내의 칼슘농도를 저하시키는 신장 cAMP의 생성을 증가시킴으로써 prostaglandin을 유리시켜 EPO의 생성을 촉진하며(McGonigle RJS 등, 1987), feed-back작용을 통해 EPO의 생성을 조절한다(Nathan와 Sytkowski A, 1983).

Erythropoietin은 분자량 30,400달톤이고, 165개 아미노산으로 구성된 당단백질로써 펩타이드사슬만의 이론적 분자량은 18, 200달톤이기 때문에 당 함량이 약 40~55% 정도로 간주되고 있다. 그리고 당쇄의 종류와 길이는 개체에 따라서 다르며, 또한 재조합 유전자를 이용하여 생산시 host cell, 배양조건 등에 따라서 차이가 있는 것이 보고된 바 있다(Tsuda 등, 1988).

본 연구에서 사용한 EPO(DWP413)은 (주)대웅제약이 자체 개발한 pCDE(Plasmid DHFR CHO EPO)vector 및 CMV promoter를 이용하여 Chinese hamster ovary (CHO)에서 발현한 것이며, 유전자 재조합 CHO cell을 무혈청 배양하고 고순도로 정제하여 대량 생산한 것이다. 또한 DWP413은 국내개발 기존제품과는 달리 그 제형에 인혈청알부민을 포함하고 있지 않아 바이러스 등의 외부 감염원으로부터 안전하다. 본 연구는 재조합 사람 erythropoietin인 DWP413의 생물학적인 활성을 normocythemic model에서 평가하여 역가를 구한후, 정상, 급성출혈성 빈혈 및 cisplatin 유발 신장해 빈혈모델을 이용하여

*To whom correspondence should be addressed.

EPO의 약효를 확인하고자 실시되었다.

실험 방법

시험물질

DWP413 : (주)대웅제약 생명과학연구소에서 생산한 recombinant human erythropoietin(rh-EPO, code name DWP413; Lot No. PU002)을 사용하였다. 투여전 시험물질은 -20°C 에서 보관하였고 사용시에는 투여전일에 희석용 용매로 처치군의 시험물질을 조제하여 1일 필요량씩 분주하여 냉장보관하였다. Vehicle은 희석용 용매를 사용하였다. 희석용 용매의 조성은 증류수 100 ml 당 sodium chloride 730 mg, sodium citrate 580 mg, citric acid (anhydrous) 5.7 mg을 첨가한 후 pH 7.0으로 조정하였다. 희석용 용매의 조제를 위한 시약은 모두 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

생물학적 활성 : DWP413의 생물학적 활성은 normocytic mouse에서 bioassay를 통해서 구하였고, erythropoietin BRP에 비하여 102.43%의 활성을 나타내었다 (Fig. 1).

Cisplatin : Cisplatin(cis-diamminodichloroplatinum (II))는 Sigma(USA)시약을 구입하여 생리식염수에 7 mg/ml로 용해시켜 kg당 1 ml씩 정맥내 투여하였다.

시험동물 및 사육환경

체중 250 g 전후의 웅성 Sprague Dawley 랫드와 7주령의 웅성 B6D2F1 mouse는 일본 Charles River사 (Atsugi, Japan)에서 구입하여 (주)대웅제약 실험동물 사육실에서 1주간 순화시킨 후 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다. 순화기간과 실험기간중의 동물 사육환경은 온도 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 15\%$, 조명시간 12시간 (08:00 점등~20:00 소등), 조도 150~300 Lux 및 환기

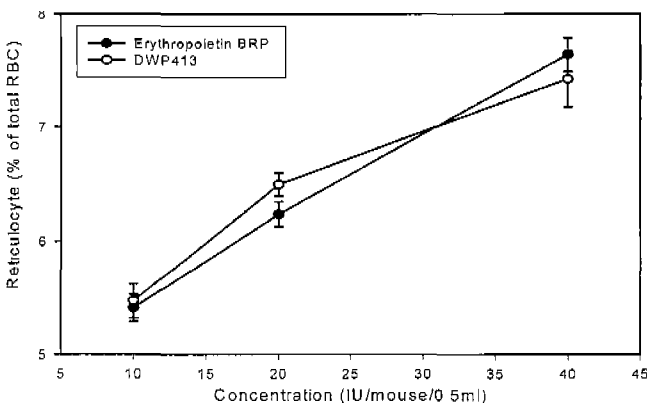


Fig. 1. Bioassay of DWP413 in normocytic mouse. Animals were injected subcutaneously with DWP413 once, and blood samples were collected after 4 days. Each point represents the mean \pm S.E. (n = 8).

횟수 15회/시간의 조건을 유지하였으며, 사료와 물은 자유섭취시켰다.

혈액학적 검사방법

흡입마취(Isoflurane/oxygen/nitrogen)후 안와정맥총으로부터 heparinized capillary tube(Fisher Scientific Ltd. CANADA)를 사용하여 채혈한 후 자동혈구추정기(Cell-Dyn 3500, ABBOT, USA)를 이용하여 적혈구수, 헤마토크리트치, 헤모글로빈 농도를 측정하였다. 또한 세망적혈구는 채취한 혈액 2 μl 를 reticOne reagent kit(Beckmann coulter, PN7547059)시약으로 500배 희석하여 상온에서 20분간 반응시킨 후 유세포 분석기(EPICS XL-MCL (Beckmann Coulter Co. Ltd)를 사용하여 측정하였다.

Normocytic mouse에서 DWP413의 생물학적 활성 측정

DWP413의 생물학적 활성측정을 위해 유럽약전 (European Pharmacopeia, 2002)에 기재된 normocytic mice 시험법을 이용하였다. 인혈청알부민이 첨가된 인산완충용액(pH 7.2)을 희석용액으로 사용하였으며, EPO 국제 표준품인 erythropoietin BRP(British Reference Product)와 역가추정치를 구한 DWP413 원액을 20, 40, 80 IU/ml로 희석시켰다. B6D2F1 mouse에 마리당 0.5 ml의 용량으로 1회 피하주사한 뒤, 4일 후에 혈액을 채취하여 세망적혈구를 측정한 후 BRP standard EPO와 DWP413의 농도별 세망적혈구수를 parallel line test를 실시하여 생물학적 활성을 구하였다.

효력실험방법

정상랫드에서의 실험 : DWP413의 투여는 정상랫드에 0, 50, 250, 1250 IU/kg의 용량으로 5일간, 1일 1회 미정맥으로 투여하였다. 투여전과, 투여개시후 3, 7, 10 및 14일째에 혈액을 채취하여 혈액학적인 변화를 측정하였다.

Cisplatin 유발 신장해 빈혈 랫드에서의 실험

Cisplatin에 의한 신장해 빈혈 랫드에 미치는 rh-EPO의 영향을 평가하기 위해 Matsunaga 등(1991)의 실험방법대로 실시하였다. 7주령 랫드에 cisplatin(7 mg/kg)를 1회 미정맥내투여하여 신장독성을 유발시킨 후 18일째부터 DWP413을 0, 50, 100, 200 IU/kg의 용량으로 5일간, 1일 1회 미정맥으로 투여하였다. 투여전, 투여개시후 18, 21, 25, 28, 32, 35일째에 혈액을 채취하여 혈액학적인 변화를 측정하였고, 최종 혈액을 채취한 후, 실험동물을 희생시킨 후 신장을 10% 중성포르말린 용액에 고정하여 통상적인 조직 처리과정을 거쳐 Hematoxylin & Eosin 염색후 병리조직학적인 소견을 관찰하였다.

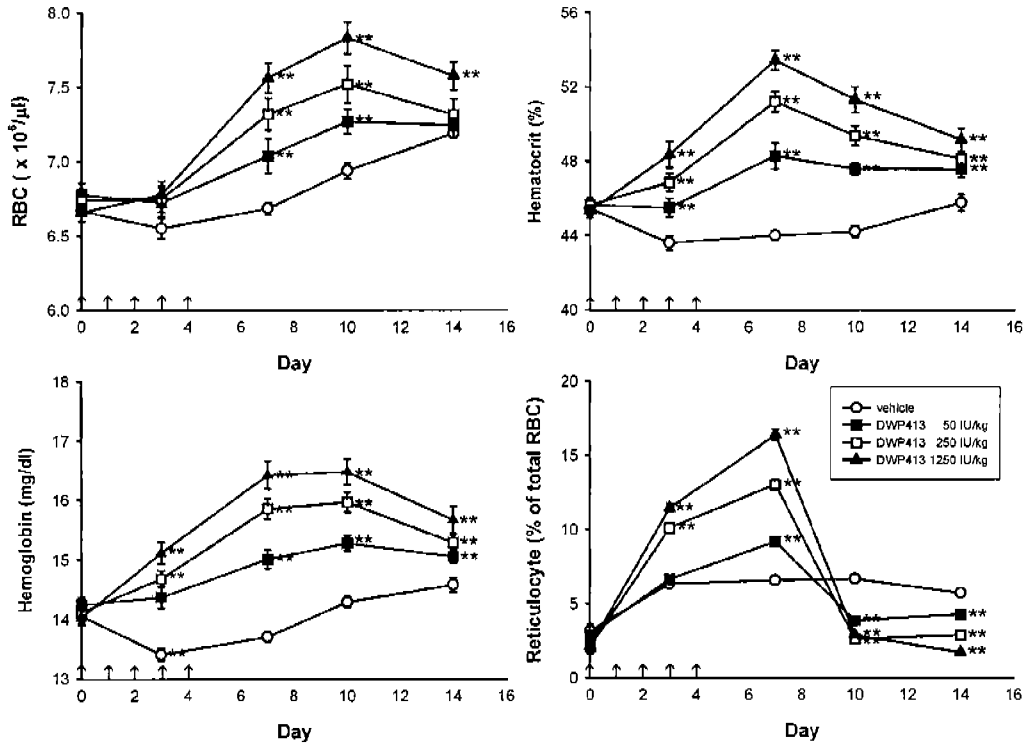


Fig. 2. Effects of DWP413 on erythropoiesis in normal rats. Animals were injected intravenously with DWP413 once a day for 5 days. Arrow represents the day of DWP413 treatment. Each point represents the mean ± S.E. (n = 7). Significantly different from vehicle (*p < 0.05, **p < 0.01).

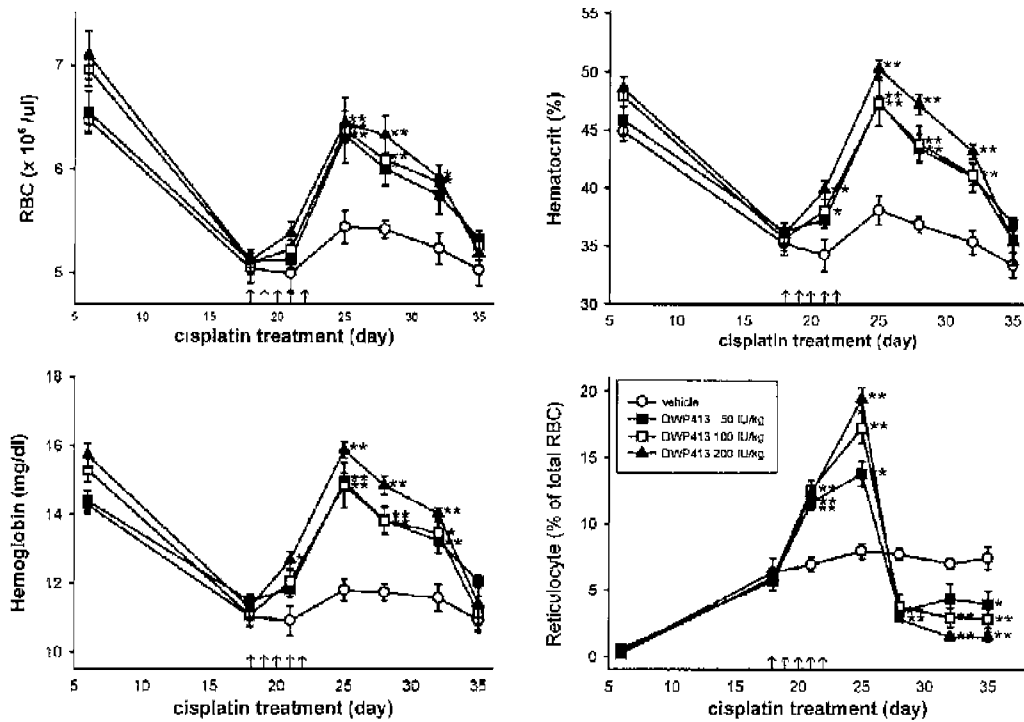


Fig. 3. Effects of DWP413 on erythropoiesis in cisplatin-induced acute renal failure rats. Animals were injected intravenously with DWP413 once a day for 5 days. Arrow represents the day of DWP413 treatment. Each point represents the mean ± S.E. (n = 7). Significantly different from vehicle (*p < 0.05, **p < 0.01).

급성실혈 랫드에서의 실험

흡입마취(Isoflurane/oxygen/nitrogen)하에서 심장침자하여 총 혈액의 20%(체중의 1.5%)를 실험시킨 후 1일 후에 DWP413을 0, 150, 450, 1350 IU/kg의 용량으로 5일간, 1일 1회 꼬리정맥으로 투여하였다. 투여전, 투여개시후 1, 3, 5, 10, 15일째에 혈액을 채취하여 혈액학적인 변화를 측정하였다.

통계학적 방법

모든 실험결과는 mean \pm S.E로 표현하였으며 대조군과 처치군의 평균값의 차이는 student's t-test를 실시하여, 대조군과 비교하여 p값이 0.05 미만일때 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였고, normocythemic mouse에서의 생물학적 활성평가는 유럽약전(2002)에 따라 parallel line assay를 실시하여 판정하였다.

결 과

정상 랫드에 대한 DWP413의 효과

정상 랫드에 있어서 DWP413의 효과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 즉, DWP413의 50, 250, 1250 IU/kg 투여군에서 적혈구수, 헤모글로빈 농도가 10일째에, 헤마토크리트치는 7일째에 최고치에 도달되어 vehicle에 비해 유의성 있는 증가가 관찰되었으며($p < 0.01$), 그후 점차 감소하였다. 한편 세망적혈구에 있어서는 250, 1250 IU/kg 투여군에서 3일째부터 유의성있는 증가가 관찰되었고 7일째에 모든 투여군에서 최고의 증가치가 나타났다. 그러나 10일째는 50, 250, 1250 IU/kg을 투여한 동물군 모두에서 vehicle에 비해 유의적으로($p < 0.01$) 감소하였다.

Cisplatin으로 유발한 신장해 빈혈랫드에 대한 DWP413의 효과

Cisplatin 유발 신장해 빈혈랫드에 대한 DWP413 투여 효과는 Fig. 3에 나타난 바와 같다. 랫드에 cisplatin(7 mg/kg)을 1회 정맥투여한 결과 적혈구수, 헤마토크리트치, 헤모글로빈 농도의 현저한 감소가 관찰되었다. Cisplatin 투여후 18일째부터 DWP413을 1일 1회 5일동안 정맥투여하였으며, 투여개시 3일째(cisplatin 투여 21일째)에 모든 투여군에서 RBC수의 증가가 나타나기 시작하여 DWP413 투여개시 7일째에 최고치를 나타낸 후 감소하는 경향을 보였다. 헤마토크리트치에서는 DWP413 투여개시 3일째에 100, 200 IU/kg 투여군에서 vehicle에 비해 유의성있는($p < 0.05$, $p < 0.01$) 증가를 나타내었고, 헤모글로빈에서는 200 IU/kg 투여군에서 유의적인 증가를 보인 후 투여개시 7일째에 최고치를 나타낸 후 감소하는 경향을 보였다. 또한 세망적혈구에서는 모

든 투여군에서 투여개시 후 3일째부터 유의성있는($p < 0.01$) 증가를 보였고 7일째에 최고치를 나타낸 후, 10일째(cisplatin 투여 28일째)에 모든 군에서 vehicle에 비해 유의적인 감소경향이 나타났다. 시험 최종일에 부검하여 관찰한 신장의 병리조직학적 소견에서 cisplatin에 의한 독성변화는 주로 피질부위에서 나타났으며, 신사구체와 보우만씨 낭의 유착(adhesion), 원위곡세뇨관(distal convoluted tubule) 또는 집합관(collecting tubule)의 낭성 확장과 세뇨관 증식성 변화(tubular hyperplasia)를 보였다. 또한 증식한 세뇨관 주위에 국소성 임파구 침윤이 관찰되었고, 세뇨관 변성(degeneration) 및 간질의 섬유화의 소견과 확장한 세뇨관의 상피세포와 근위세뇨관의 일부에서 거핵세포가 관찰되었다. 수질부위에서는 집합관의 확장과 함께 균질성의 초자적(hyaline droplet)으로 생각되는 호산성 또는 염기성 물질이 관찰

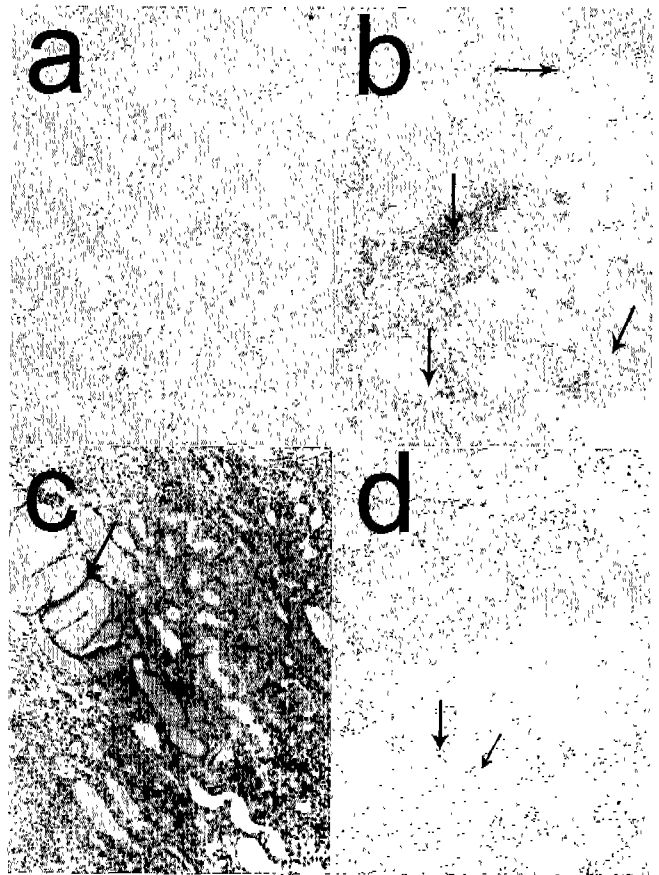


Photo. 1. Microscopic findings of the kidney on 35 days after cisplatin treatment. normal (a), vehicle (b,c), DWP413 (200 IU/kg)(d) Glomerular and bowman's capsule adhesion, tubular degeneration, interstitial fibrosis, and tubules distension (b), hyaline droplet deposition (c) compared with normal kidney (a) was observed. DWP413 treated animals (d) exhibited tubular degeneration, dilation, glomerular adhesion and tubular distention were not remarkable compared with cisplatin alone treated rat. (H&E, X 100)

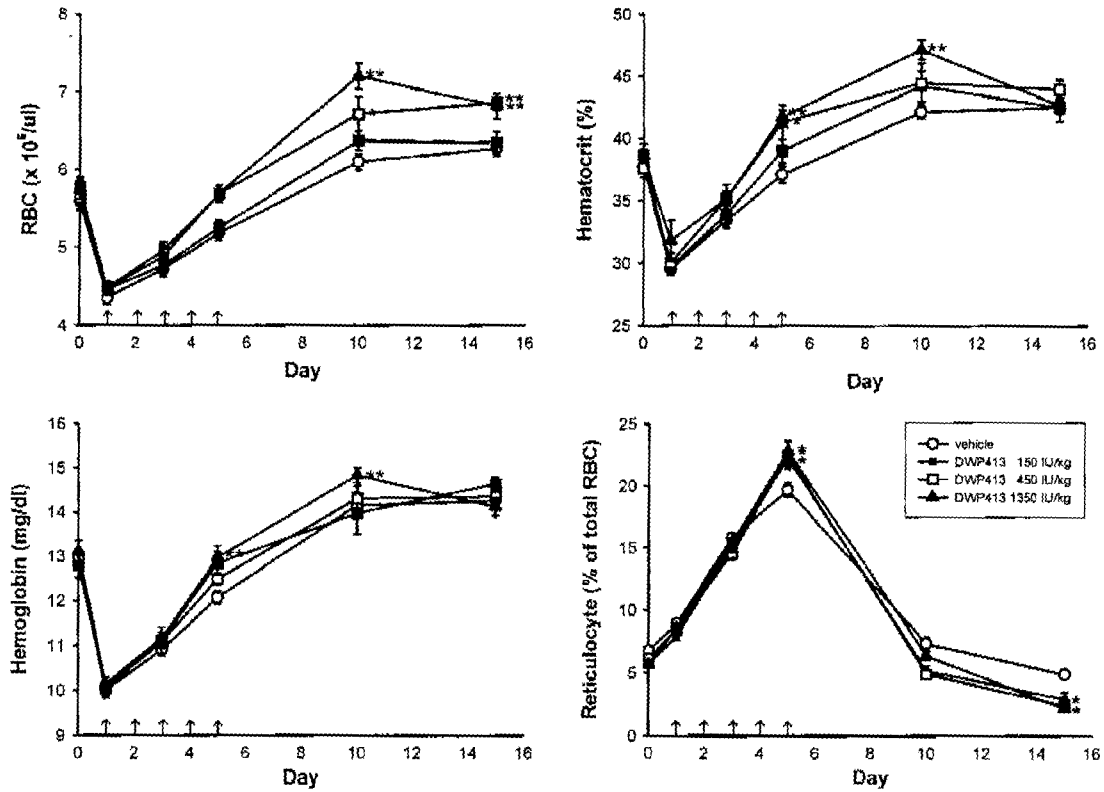


Fig. 4. Effects of DWP413 on erythropoiesis in acute hemorrhage-induced rats. Animals were injected intravenously with DWP413 once a day for 5 days. Arrow represents the day of DWP413 treatment. Each point represents the mean \pm S.E. (n=7). Significantly different from vehicle (*p<0.05, **p<0.01).

되었다(Photo. 1-a, b, c). DWP413의 200 IU/kg 투여군에서는 세뇨관 및 집합관의 정도의 확장과 세뇨관의 재생상이 관찰되었고, 신사구체와 보우만씨낭의 유착, 세뇨관 주위의 국소성 임파구 침윤은 cisplatin 단독투여군에 비해 다소 완화됨이 관찰되었다(Photo. 1-d).

실혈렛드에 대한 DWP413의 효과

실혈렛드에 대한 DWP413의 효과는 Fig. 4에 나타난 바와 같다. 즉, 실혈 1일 후에 모든 투여군에서 적혈구수, 헤마토크리트치의 뚜렷한 감소가 관찰되었다. 실혈 후 5일째에 헤마토크리트치와 세망적혈구는 450, 1350 IU/kg 투여군에서, 헤모글로빈은 1350 IU/kg 투여군에서 vehicle에 비하여 유의성있는(p<0.01) 증가가 관찰되었고, 실혈 후 10일째에 1350 IU/kg 투여군에서 적혈구수, 헤마토크리트치, 헤모글로빈의 유의적인(p<0.01) 증가가 나타난 반면, 세망적혈구는 vehicle에 비해 유의적으로(p<0.01) 감소하였다.

고 찰

본 연구는 ㈜ 대웅제약에서 개발한 DWP413의 적혈구

생성 촉진 효능을 평가하기 위하여 normocythemic model, 정상모델, 급성실혈모델, cisplatin 신장해 빈혈모델을 이용하여 실시하였다.

효능시험에 사용하는 DWP413 원액의 역가를 구하기 위해서, 국제표준품인 erythropoietin BRP과의 bioassay를 실시한 결과 102.43%의 활성을 나타냈으며, 이를 기준으로 역가를 구하여 효능시험에 사용하였다.

정상렛드에 DWP413을 투여하였을 때 용량의존적으로 적혈구수, 헤마토크리트치, 헤모글로빈치가 10일째 가장 높은 값을 나타내다가 점차 감소하였고, 세망적혈구는 7일째에 가장 높은 수치에 도달한 후 감소하였다. 이것은 생성된 세망적혈구가 성숙적혈구로 변화되는 기간이 1~2일 정도 소요되므로, 생성된 세망적혈구가 성숙하여 정상적혈구가 되면서 측정된 결과라고 생각된다(Landschulz 등, 1992). 10일과 14일째에 세망적혈구수가 vehicle에 비하여 유의성있게 감소한 것은 생리적 항상성을 유지하기 위한 피드백 작용이라고 생각된다. 따라서 본 실험의 결과로 DWP413은 정상동물에서 뚜렷한 적혈구 생성 촉진 효과가 있음을 확인하였다.

Cisplatin(CP ; cis-diamminodichloroplatinum)은 정소, 방광, 난소 및 자궁경부암에 효과가 있으나, 이(耳)독성, 말

초성 신경변, 특히 신장독성이 강한 항암 화학요법제이며(Rossof 등, 1972), 투여받은 환자의 10~40%에서 심한 빈혈이 발생한다(Kuzur Me와 Greco FA, 1980, Gebbia 등, 1989). Cisplatin에 의한 빈혈은 cisplatin의 직접적인 신장해에 의한 EPO의 생성 감소, 조혈조직에 대한 EPO의 작용억제, 골수내의 CFU-E에 직접적인 독성작용 등에 의해 일어난다(Rossof 등, 1972; Rothmann과 Weick, 1981; Doll과 Weiss, 1983; Rothmann 등, 1985). Cisplatin 유발 빈혈랫드에서 DWP413을 5일간 연속투여한 결과, 적혈구수, 헤마토크리트치, 헤모글로빈농도, 세망적혈구수가 DWP413 투여개시 후 3일째부터 증가하기 시작하여 7일째 최고치를 나타내다가 이후 감소하였다. 이 결과는 Wood 등(1995)이 cisplatin을 투여한 랫드에 EPO를 주2회 2주간 투여한 경우 cisplatin만을 투여한 랫드에 비해 빈혈증상이 개선되었다고 보고하였고, Nam 등(1998)이 cisplatin유발 빈혈랫드에서 EPO를 5일간 연속투여한 결과 200 IU/kg 농도에서 적혈구수, 헤마토크리트치, 헤모글로빈 농도, 세망적혈구수가 투여개시후 4일째부터 증가하기 시작하여 6일, 8일, 10일째에 유의성 있는 증가를 나타내었고 8일째에 세망적혈구수가 최고치를 나타낸후 급격한 감소를 나타내었다고 보고한 것과 일치하다. 신장의 병리조직학적 소견에서 cisplatin 단독투여군에서는 신사구체와 보우만씨 낭의 유착, 원위곡세뇨관 또는 집합관의 낭성 확장과 세뇨관 증식성 변화를 보였고, 증식한 세뇨관 주위에 국소성 임파구 침윤, 세뇨관 변성, 간질의 섬유화 등이 관찰되었으나, DWP413 200 IU/kg 투여군에서는 이러한 병리조직 소견이 완화된 것이 관찰되었다. Vaziri ND 등(1994)은 cisplatin에 의한 신부전 빈혈랫드에서 EPO투여후 세뇨관 재생과 신장 피질부의 DNA 합성 증가를 확인하였고, Nam 등(1998)은 cisplatin 단독 투여에서 나타나는 신사구체의 위축과 mesangium의 증식, 요세관 확장에 의한 상피의 편평화, 요세관의 위축, 변성 및 간질의섬유화 등의 소견이 관찰되었으나 EPO 투여군에서는 요세관의 정도의 확장만이 관찰되었다고 보고 하였으며, 이는 EPO 투여가 신장피질부의 세포성장을 촉진하는 것이라 하였고, 이는 본 실험의 결과와 유사하다. 이러한 결과들로 보아 cisplatin으로 인한 신장해 빈혈을 DWP413의 투여로 회복시킬 수 있을 것으로 사료된다.

수술, 창상 등의 급성의 다량 출혈이 일어나면 적혈구수치의 변화가 나타나는데 적혈구수 헤마토크리트치, 헤모글로빈농도가 감소하고, 세망적혈구수, MCV는 증가하며 이러한 변화는 15일 이내에 회복된다(Roberta L. 등, 1997). 전체 혈액의 20% 손실까지는 혈관계 이상없이 보상이 가능하나 20~30% 손실시 심계항진, 저혈압 등의 증상이 나타나며 그 이상일 때 쇼크가 일어난다(Ernest

B. 등, 1995). Nam 등(1998)은 SD 랫드에 20% 실혈 후 5일 연속 EPO를 투여하였을 때 실혈후 5일째에 적혈구수, 헤마토크리트치, 헤모글로빈농도, 세망적혈구수의 증가를 보여 급성실혈성 빈혈시에 EPO의 투여가 효과적인 조혈작용을 갖는다고 하였다.

본 실험에서 전체 혈액의 20%를 실혈시킨 랫드에 DWP413을 투여하였을 때, 실혈 후 3일째부터 세망적혈구는 증가하여 5일째에 유의성있는 증가를 나타내었으며 그후 급격히 감소하였다. 이러한 결과는 Kim 등(1994)의 실험에서 20% 급성실혈동물에 EPO를 7일간 투여한 후 세망적혈구를 측정된 결과, 투여후 3~5일에는 증가를 보이다가 그후 급격히 감소하였다는 보고와 유사하다. 헤마토크리트치는 450, 1350 IU/kg투여군에서, 헤모글로빈은 1350 IU/kg투여군에서 유의한($p < 0.01$) 증가가 관찰되었다. RBC의 경우 실혈후 10일째에 450, 1350 IU/kg 투여군에서 대조군에 비해 유의한 증가가 관찰되었다. 급성실혈후 30%까지 헤마토크리트치가 내려간 후 1350 IU/kg EPO 5일 연속 투여군에서 초기 헤마토크리트치 회복은 5.7일에서 3.8일로 단축되었다. 이러한 결과는 Levin E.A. 등(1989)의 보고와 유사하며, 그 보고에 따르면, 15% 헤마토크리트치까지 급성실혈시킨 baboon에 재조합 사람 EPO를 1000 IU/kg 용량으로 14일 연속 투여하였을 때, 30% 헤마토크리트치까지의 회복속도는 17.4일에서 9.9일로 단축되었고 초기 헤마토크리트치 회복은 32.1일에서 11.9일로 단축되었다. 이는 EPO의 투여가 급성실혈성 빈혈의 회복에 효과적으로 작용함을 의미한다. 이러한 결과로 보아 DWP413은 급성 출혈성 빈혈에도 효과적인 조혈작용을 가지는 것으로 생각된다.

이상의 결과로 보아 (주)대웅제약의 DWP413은 정상상태, cisplatin 등의 항암제에 의해 유발된 빈혈상태, 급성실혈에 의한 빈혈상태에서 효과적인 조혈작용이 있는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Anagnostou, A. (1985). Erythropoietin : a hematopoietic hormone produced by the kidney. *Semin. Nephrol.* **5**, 104-114.
- Edward A., Levine, M.D., Arthur L., Rosen, Ph. D., Laksman R., Sehgal, Ph. D., Steven A., Gould, M.D., Joan C., Egrie, Ph. D., Hansa L., Sehgal, B.S.M.T., and Gerald S.Moss, M.D. (1989). Treatment of acute postoperative anemia with recombinant human erythropoietin. *J.Trauma*, **29**, 1134-1139.
- Ernest B., Marshall A.L., Barry S.C., Thoman J.K. (ed.)(1995). *Williams Hematology* pp.704-708. McGraw-Hill, New York.
- Fuchs, A. and Eder, H. (1992). Dose dependent effects of recombinant human erythropoietin on the reticulocyte population of rabbits. *Arzeim.-Forsch./Drug. Res.* **42**, **10**, 1266-1268.

- Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S. D., Kaufman, R. J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S. S., Hewick, R., Fritsch, 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.
- Joseph, W. E. and John, W. A. (1989). Guideline for recombinant human erythropoietin therapy. *Am. J. Kidney Dis.* **2**, 2-8.
- Kim D., H., Ahn B. O., Park J. H., Lee S. H., and Kim W. B. (1998). Efficacy of recombinant human erythropoietin (rhu-EPO). *J. Appl. Pharmacol.* **6**, 312-316.
- Kim S. J., Ha B. J., Lee D. E., Oh M. S., Kim D. H., Park K. H. and Kim H. S. (1994). Efficacy of recombinant erythropoietin from CHO cells. *J. Appl. Pharmacol.* **2**, 343-346.
- Kuzur M. E. and Greco F. A. (1980). Cisplatin induced anemia. *New Engl. J. Med.* **303**, 110-112.
- Landschulz K. T., Boyer S. H., Noyes A. N., Rogers O. C., and Frelin L. P. (1992). Onset of erythropoietin response in murine erythroid colony forming units : assignment to early S-phase in a specific cell generation. *Blood*, **79**, 2749-2758.
- Levine E. A., Rosen A. L., Sehgal L. R., Gould S. A., Egrie j. C., Sehgal H. L. and Moss G. S. (1989). Treatment of acute postoperative anemia with recombinant human erythropoietin. *J. Trauma* **29**, 1134-1139.
- Masunaga, H., Goto, M. and Ueda, M. (1986). Effects of purified erythropoietin in partially nephrectomized rats. *Acta Hematol. Jpn.* **49**, 807-815.
- Masunaga, H., Takahira, R. and Sawai, T. (1991). Effects of recombinant human erythropoietin on renal anemic rats induced by drugs. *Folia. Pharmacol. Jpn.* **98**, 151-160.
- McGonigle R. J., Brookins J, Pegram B. L. Fisher J. W. (1987) : Enhanced erythropoietin production by calcium entry blockers in rats exposed to hypoxia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **241**, 428-432.
- Nam C. J., Kim H., Huh J. W., Kang J. K. (1989). Efficacy of recombinant human erythropoietin. *Korean J. of the Lab. Anim. Sci.* **14**, 241-249.
- Nathan D. G., Sytkowski A. (1983). Erythropoietin and the regulation of erythropoiesis. *N. Engl. J. Med.* **306**, 520-522.
- Palmeri S., Russo A., Gebbia V., Borsellino N., Gebbia N., Rustum Y., Rausa L. (1990). A phase I-II study on the toxicity and therapeutic efficacy of 5-fluorouracil in combination with leucovorin and cisplatin in patients with advanced colorectal carcinoma. *J. Chemotherapy suppl.* **1**, 28-32.
- Ridley, D. M., Dawkins, F. and Perlman, E. (1994). Erythropoietin : A review. *J. Natl. Med. Assoc.* **86**, 129-135.
- Roberta L. Scipioni, Richard W. Deters, William R. Myers, and Susan M. Hart. Clinical and clinicopathological assessment of serial phlebotomy in the Sprague Dawley rat. *Laboratory Ani. Sci.* 1997. **47**, 293-299.
- Rossof, A. H., Slayton, R. E. and Perlia, C. P. (1972). Preliminary clinical experience with cisdiamminedichloroplatinum (II). *Cancer* **30**, 1451-1456.
- Rothmann S. A. and Weick J. K. (1981). Cisplatin-induced anemia. *New. Eng. J. Med.* **303**, 110-112.
- Rothmann, S. A., Paul, P., Weick, J. K., McIntyre, W. R. and Fantelli, F. (1985). Effects of cis-diamminedichloroplatinum on erythropoietin production and hematopoietic progenitor cells. *Int. J. Cell Cloning* **3**, 415-423.
- Tsuda, E., Goto, M., Murakami, A., Akai, K., Ueda, M., Kawanishi, G., Takakashi, N., Sasaki, R., Chiba, H., Ishihara, H., Mori, M., Tejima, S., Endo, S. and Arata, Y. (1988). Comparative structural study of N-linked oligosaccharides of urinary and recombinant erythropoietins. *Biochemistry* **27**, 5646-5654.
- Vaziri N. D., Zhou X. J., and Liao S. Y. (1994). Erythropoietin enhances recovery from cisplatin-induced acute renal failure. *Am. J. Physiol.* **266**(Renal Fluid Electrolyte Physiol 35): F360-F366.
- Wood, P. A. and Hrushesky, W. J. M. (1995). Cisplatin-associated anemia; an erythropoietin deficiency syndrome. *J. Clin. Invest. Inc.* **95**, 1650-1659.