

## DA-3585(recombinant human erythropoietin)의 국소자극성에 관한 연구

조 현 · 김동환\* · 강경구 · 박장현 · 이성희 · 김원배  
동아제약(주) 연구소

### Studies on Local Irritation of DA-3585, A Recombinant Human Erythropoietin, in Rabbits

Hyeon Cho, Dong Hwan Kim\*, Kyung Koo Kang, Jang Hyeon Park,  
Sung Hee Lee and Won Bae Kim

Research Laboratories, Dong-A Pharm. Co., Ltd.,  
47-5, Sanggal-ri, Kiheung-up, Yongin-si, Kyunggi-do 449-900, Korea  
(Received April 29, 1998)  
(Accepted June 30, 1998)

**ABSTRACT** : As a series of safety studies on DA-3585, a recombinant human erythropoietin, its local irritancy was examined in rabbits after the following treatments; application into the conjunctival sac of the eye (single), subcutaneous injection (single and 7-day repeated) and intravenous injection (7-day repeated). In addition, perivascular irritation of DA-3585 was investigated in mice. In the result of ocular irritation test, 10,000 IU/ml solution of DA-3585 could be considered as a non-irritating material. The local irritation of DA-3585 by a single and 7-day repeated subcutaneous injection was negligible and not so much different from that of saline. In the vascular irritancy test, macro- and microscopic observations revealed that local irritation of DA-3585 was comparable to that of saline when injected into retroauricular vein of rabbits for 7 consecutive days. Furthermore the perivascular administration of DA-3585 upto the concentration of 10,000 IU/ml did not induce any morphological abnormalities at injection sites. The results obtained from the present study suggest that the local irritancy of DA-3585 is not different from that of saline when injected through intravenous or subcutaneous route for clinical practice.

**Key Words** : DA-3585, Recombinant human erythropoietin (rhu-EPO), Toxicity, Local irritation

## I. 서 론

DA-3585는 동아제약(주) 연구소에서 baby hamster kidney(BHK) 세포를 이용하여 생산한 유전자재조합 인적혈구 조혈인자 recombinant human recombinant human erythropoietin, rhu-EPO)로서 분자량 30,400달톤의 당단백(glycoprotein)이다. 내인성 erythropoietin (EPO)은 주로 신장에서 생산되어 혈류를 따라 이동하여 골수내 erythroid progenitor cell(CFU-E)의 특이수용체와 작용하여 이들의 분화, 증식을 촉진함으로써 적혈구산생을 항진시킨다(Eschbach와 Adamson, 1989). 근래에 들어서 유전자재조합기술의 발달로 rhu-EPO의 대량생산이 가능하게 되어 만성빈혈, end stage renal

disease, 화학요법에 의한 빈혈, 자가수혈 등에 널리 사용되고 있다(Jacobs 등, 1985; Lin 등, 1985; Fisher, 1993; Vaziri 등, 1994; Gebbia 등, 1991).

EPO는 정맥 혹은 피하투여로 장기간 반복투여될 수 있으므로 적용부위에서의 자극성이 있을 경우 임상사용상의 심각한 문제가 발생할 수 있다. 본 연구는 BHK 세포를 이용하여 생산된 rhu-EPO인 DA-3585의 국소독성을 검토하고자 토끼를 이용한 안점막자극시험, 단회 및 7일 반복 피하투여에 의한 국소자극성 시험, 혈관장해성 시험 및 마우스를 이용한 혈관주위 국소자극성시험을 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물

\*To whom correspondence should be addressed

모든시험의 관리는 동아제약(주) 연구소의 "실험동물사육 및 시험에 관한 표준작업 지침서(SOP/ANC)" (1994)에 준하여 실시하였다. 안점막자극시험, 피하투여 국소자극성시험 및 혈관장해성시험에는 2.5~3.0 kg의 웅성 New Zealand White계 토끼를 연암축산에서 구입하여 사용하였으며, 혈관주위 국소자극성시험에는 5주령의 웅성 ICR계 마우스를 대한실험동물센터(주)에서 공급받아 사용하였다. 시험개시전 1주간 순화사육을 실시하였으며, 시험기간중 사육환경은 통상적인 조건(온도 23±2°C, 습도 60±10%)을 유지하였고 사료와 물은 자유급식시켰다.

**2. 시험물질**

시험물질인 DA-3585(Lot No. B-009)는 동아제약(주) 연구소 생물의약품 연구실에서 BHK(baby hamster kidney) cell을 이용하여 생산한 rhu-EPO로서 순도는 RP-HPLC분석시 98% 이상이였으며 역가는 최대임상 사용농도인 10,000 IU/ml 용액을 사용하였다. 시료의 pH는 6.9이였으며 투여 전까지 냉장보관하며 사용하였다. Vehicle용액의 조성은 1 ml 내에 human albumin 1.0 mg, D-mannitol 30 mg, sodium chloride 2.0 mg, sodium monobasic phosphate 1.5 mg으로 하였다. 대조 물질로 사용된 acetic acid는 純正化學株式會社(Japan)에서, 생리식염수는 중의제약(주)에서, sulfobromophthalein sodium(BSP)은 Sigma(U.S.A.)사에서 각각 구입하여 사용하였다.

**3. 안점막자극시험**

1주일간의 순화사육기간을 거쳐 선발된 건강한 토끼를 시험개시 24시간 전 각각의 안구에 브롬화수소호마트로핀액을 2방울씩 떨어뜨린 후 육안 및 검안경(Mini miroflex2, Heine)을 이용하여 안구, 각막 등의 이상유무를 확인하여 양안이 정상인 토끼 9마리를 시험에 사용하였다. 시험에 사용한 DA-3585는 예정 임상

사용 농도(10,000 IU/ml)로서, 각각의 왼쪽 안구에 0.1 ml씩 점안 후 1군의 3마리는 30초 후 미온 무균생리식염수 20 ml를 사용하여 1분간 세안하였고 오른쪽 눈은 비처치 대조군으로 사용하였다. 2군의 6마리는 DA-3585를 왼쪽 안구에 적용 후 세척하지 않고 관찰하였으며 오른쪽 눈은 비처치 대조군으로 사용하였다. 시험물질 적용 후 3시간, 1, 2, 3, 4 및 7일에 관찰을 실시하였고 평가는 식품의약품안전본부 "의약품 등의 독성시험기준"(1996년)의 안구병변의 등급표에 준해 실시하여 이에 따른 평점을 산출한 후 그 결과에 대한 자극성의 정도 판정은 국립보건안전연구원 "독성시험 표준작업지침서"(1993)의 안점막자극표에 의해 물질의 자극도를 평가하였다(Table 1).

**4. 피하투여에 의한 국소자극성시험**

1) 단회 피하투여에 의한 국소자극성시험

피하투여에 의한 국소자극성시험, 혈관장해성 시험 및 혈관주위 국소자극성 시험 등은 일본 후생성 "주사제의 국소자극성에 관한 시험법안" (厚生省資料, 1979)에 준하여 실시하였다.

순화사육을 거쳐 선발된 건강한 토끼 12마리의 후지외측대퇴부를 투여 1일 전에 electric clipper(A5, Oster)를 이용하여 제모하고 군당 6마리씩 군분리하였다. 투여부위는 유성펜을 이용하여 표시하였으며 투여는 1회용 인슐린주사기(28G 1/2 inch)를 사용하였다. 1군에는 우측후지에 DA-3585(10,000 IU/ml)액을, 좌측후지에는 생리식염수를 각각 1 ml씩 피하로 단회투여하였고, 2군에는 양성대조를 위하여 6.0%의 acetic acid를 우측후지에, 0.75% acetic acid를 좌측후지에 각각 1 ml씩 피하로 단회투여 하였다. 임상증상의 관찰은 투여일부터 시험종료시까지 연일 실시하였으며, 약물투여 2일 및 7일 후에 군당 3마리씩을 부검하여 주사부위의 피하에 형성된 병변을 관찰하고 digital caliper를 사용하여 병변의 장경과 단경을 측정하여 이들의 곱으로 병변의 면적을 산출하였다. 부검후 주사

**Table 1.** Classification of irritancy in ocular irritation test

Classification of irritancy	irritation index		
	A.O.I. <sup>a</sup>	M.O.I. <sup>b</sup>	day-7 I.O.I. <sup>c</sup>
Non-irritancy	0~5	0 (after 48 hrs)	
Mild irritancy	5~15	≤5 (after 48 hrs)	
Mild to moderate irritancy	15~30	≤5 (after 4 days)	
Moderate irritancy	30~60	≤20 (after 7 days)	≤30(6 heads all) or ≤10(above 4 in 6 heads)
Moderate to severe irritancy	60~80	≤40 (after 7 days)	≤60(6 heads all) or ≤30(above 4 in 6 heads)
Severe irritancy	80~100		

<sup>a</sup>Acute Ocular irritation Index; <sup>b</sup>Mean Ocular irritation Index; <sup>c</sup>Individual Ocular irritation Index.

부위의 피하 및 근육을 10% 중성포르말린용액에 24시간 이상 고정하고 통상적인 조직처리를 한 후 H&E 염색을 실시하여 조직학적검사를 실시하였다. DA-3585의 자극성평가는 생리식염수와 0.75% acetic acid 및 6.0% acetic acid에 의하여 형성된 병변의 크기 및 색조, 조직학적 검사결과 등을 비교하여 평가하였다.

## 2) 7일 연속 피하투여에 의한 국소자극성시험

순화사육 후 선발된 건강한 토끼 12마리의 후지외측 대퇴부를 투여 1일전 electric clipper(A5, Oster)를 이용하여 제모하고 유성펜을 이용하여 주사할 부위를 표시하였으며 군당 6마리씩 군분리하였다. 1군에는 우측후지에 DA-3585를, 좌측후지에 생리식염수를 각각 0.5 ml씩 피하로 7일간 반복 투여하였고 2군에는 양성대조군으로 0.2% acetic acid를, 우측후지에는 1.6% acetic acid를 동일한 방법으로 7일간 반복 투여하였다. 임상증상의 관찰은 투여일부터 시험종료시까지 매일 실시하였으며, 약물 투여종료 후 2일 및 7일에 군당 3마리씩을 부검하여 단회 피하투여에 의한 국소자극성 시험과 동일하게 처리하였다. DA-3585의 자극성 평가는 생리식염수와 0.2% acetic acid 및 1.6% acetic acid에 의하여 형성된 병변의 크기 및 색조, 조직학적 검사결과 등을 비교하여 평가하였다.

## 5. 혈관장해성시험

투여 1일전 순화사육을 거쳐 선발된 건강한 토끼 6마리의 좌우 외측이개를 electric clipper(A5, Oster)로 제모하고 군당 3마리씩 군분리하였다. 1군은 좌측이개 정맥에 생리식염수를, 우측이개정맥에는 DA-3585 10,000 IU/ml액을 1일 1회 7일간 연속 투여하였고 2군에는 좌측이개정맥에 5% sulfobromophthalein sodium (BSP)을, 우측이개정맥에는 0.75% acetic acid를 1일 1회 7일간 연속 투여하였다. 투여는 0.4 ml/min 유속으로 1 ml을 투여하는 방법으로 1회용 인슐린주사기 (28G 1/2 inch)를 사용하였다. 투여개시일부터 혈전형성과 염증유발정도를 매일 관찰하였으며, 시험개시 8일째 부검을 실시하고 접종부위의 조직학적검사를 실시하였다. DA-3585의 혈관장해성 평가는 생리식염수와 5% BSP 및 0.75% acetic acid에 의한 혈전형성, 염증유발정도 및 조직학적 검사결과 등을 비교하여 평가하였다.

## 6. 혈관주위 국소자극성시험

**Table 2.** Experimental design for perivascular irritation test treated with DA-3585

Groups	Substance	Route of injection	No. of animals
1	saline	p.v. <sup>a</sup>	10
2	vehicle	p.v.	10
3	DA-3585	p.v.	10
4	0.75% acetic acid	p.v.	10
5	6.0% acetic acid	p.v.	10

<sup>a</sup>: perivascular injection of caudal vein.

순화사육후 선발된 건강한 ICR mouse를 Table 2와 같이 10마리씩 5개군으로 군분리하고 시험물질 및 양성대조물질을 미정맥주위(perivascular)에 단회투여 하였다. 투여시 액량은 0.05 ml로 insulin 주사기를 사용하여 Balsari 등(1989)의 방법에 따라 실시하였다. 투여 후 3시간, 1, 3, 5 및 7일에 모든 동물의 주사부위 병변을 육안으로 관찰하여 아래기준에 따라 점수화한 후 각각의 평균과 표준편차를 구하였다(Kim 등, 1996).

0: no gross lesion

1: erythematous, swelling, induration, but no necrotic change

2: erythematous, swelling, and/or severe induration, mild necrosis

3: obvious necrosis, but no deformity of tail

4: severe necrosis and scar formation and/or deformity of tail

투여 후 7일에 대조군을 포함한 모든 군을 도살하여 주사부위의 조직학적검사를 실시하였다. DA-3585 및 vehicle의 혈관주위 자극성의 평가는 생리식염수와 0.75% acetic acid 및 6.0% acetic acid에 의하여 형성된 병변의 육안적 및 조직학적 검사결과를 비교하여 평가하였다.

## III. 결 과

### 1. 안점막자극시험

DA-3585의 최대임상 사용농도인 10,000 IU/ml액을 안구에 투약한 후 3시간, 1, 2, 3, 4 및 7일에 각막손상, 홍채의 충혈이나 빛에 대한 반응과 안검점막, 안구결막 등의 혈관상태, 결막의 부종 및 배출물의 유무 등을 관찰한 결과 세척군과 비세척군 모두에서는 대조군에 비해 유의한 변화가 관찰되지 않았으며, M.O.I., I.A.I. 및 A.O.I. 평점이 모두 0점으로 무자극(non-irritancy) 물질인 것으로 나타났다(Table 3).

### 2. 단회 피하투여에 의한 국소자극성시험

**Table 3.** Results of ocular irritation test treated with DA-3585

Group	Animal No.	Tissue	Time after application						
			3hrs	day 1	day 2	day 3	day 4	day 7	A.O.I. <sup>c</sup>
Irrigation	1	Cornea	0	0	0	0	0	0	0
		Iris	0	0	0	0	0	0	0
		conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0
	2	Cornea	0	0	0	0	0	0	0
		Iris	0	0	0	0	0	0	0
		conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0
3	Cornea	0	0	0	0	0	0	0	
	Iris	0	0	0	0	0	0	0	
	conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0	
M.O.I. <sup>a</sup>		0	0	0	0	0	0	0	
Day-7 I.O.I. <sup>b</sup>		0							
Non-irrigation	4	Cornea	0	0	0	0	0	0	0
		Iris	0	0	0	0	0	0	0
		conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0
	5	Cornea	0	0	0	0	0	0	0
		Iris	0	0	0	0	0	0	0
		conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0
	6	Cornea	0	0	0	0	0	0	0
		Iris	0	0	0	0	0	0	0
		conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0
	7	Cornea	0	0	0	0	0	0	0
Iris		0	0	0	0	0	0	0	
conjunctiva		0	0	0	0	0	0	0	
8	Cornea	0	0	0	0	0	0	0	
	Iris	0	0	0	0	0	0	0	
	conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0	
9	Cornea	0	0	0	0	0	0	0	
	Iris	0	0	0	0	0	0	0	
	conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0	
M.O.I.		0	0	0	0	0	0	0	
Day-7 I.O.I.		0							

<sup>a</sup>Mean Ocular irritation Index; <sup>b</sup>Individual Ocular irritation Index; <sup>c</sup>Acute Ocular irritation Index.

피하투여에 의한 국소자극성의 육안소견은 Table 4와 같다. 생리식염수와 DA-3585를 피하주사한 군에서는 어떤 개체에서도 약물의 영향으로 보이는 변화는 인정되지 않았으며 투여후 2일 및 7일째 부검을 실시하여 관찰한 육안소견에서도 특이한 병변을 관찰할 수 없었다. 0.75% acetic acid 투여군에서는 2일째 부검시 주사부위의 피하직에 유백색 반점이 관찰되었고 주위 조직은 암적색으로 종창되었으며 크기는 평균 648 mm<sup>2</sup>이었다. 투여 후 7일째는 2일째와 유사한 병변이 관찰되었으나 그 크기는 평균 131 mm<sup>2</sup>로 2일째에 비해 감소되었다. 6.0% acetic acid투여시 2일째는 황백색 반점을 관찰할 수 있었으며, 그 크기는 평균 5233 mm<sup>2</sup> 이었고 담갈색의 액상삼출물이 관찰되었다. 투여 후 7일째는 피부의 비후와 피하직에 투명한 액상 삼출물이 관찰되었고 2일째와 유사한 반점이 존재하였으나 그 크기는 평균 1057 mm<sup>2</sup>로 감소되었다. 조직학적 검사결과(Table 5) 생리식염수와 DA-3585투여군은 투여 2일째와 7일째 모두 유사한 정도의 조직학적 소견을

**Table 4.** Macroscopic changes of the injection sites at 2 and 7 days after single subcutaneous administration of DA-3585 and various substances

Substance	No. and site <sup>a</sup>	Day 2	No. and site <sup>a</sup>	day 7
Saline	1 left	0	4 left	0
	2 left	0	5 left	0
	3 left	0	6 left	0
	mean ± SD	0 ± 0	mean ± SD	0 ± 0
DA-3585	1 right	0	4 right	0
	2 right	0	5 right	0
	3 right	0	6 right	0
	mean ± SD	0 ± 0	mean ± SD	0 ± 0
0.75% acetic acid	7 left	672	10 left	108
	8 left	522	11 left	128
	9 left	750	12 left	156
	mean ± SD	648 ± 156	mean ± SD	131 ± 24
6.0% acetic acid	7 right	5246	10 right	960
	8 right	5704	11 right	957
	9 right	4750	12 right	1254
	mean ± SD	5233 ± 477	mean ± SD	1057 ± 171

Each number represents the size of subcutaneous spot (mm<sup>2</sup>). <sup>a</sup>: Animal No. and observed site.

**Table 5.** Histopathological changes of the injection sites at 2 and 7 days after single subcutaneous administration of DA-3585 and various substances (n=3)

substance	saline		DA-3585		0.75% acetic acid		6.0% acetic acid	
	2	7	2	7	2	7	2	7
cutaneous layer								
Edema	-	-	-	-	+	±	++	+
Cellular infiltration	-	-	-	-	+	+	++	+
Activated phagocytosis	-	-	-	-	+	±	++	+
Focal hemorrhage	-	-	-	-	+	±	++	+
Focal necrosis	-	-	-	-	±	±	++	+
Granulation	-	-	-	-	±	++	++	++
Fibrosis	-	-	-	-	±	+	++	++
Subcutaneous layer								
Edema	-	-	-	-	+	+	++	+
Cellular infiltration	-	-	-	-	++	±	++	+
Activated phagocytosis	-	-	-	-	+	±	++	+
Focal hemorrhage	-	-	-	-	+	+	++	+
Focal necrosis	-	-	-	-	+	+	++	+
Granulation	-	-	-	-	+	+	++	+
Fibrosis	-	-	-	-	±	++	+	+++

Each grade represents the mean score of the group (n=3). -, no changes; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe

보였다. 한편 0.75% 및 6.0% acetic acid투여군에서는 피하수종(subcutaneous edema), 염증세포 및 대식구의 출현, 국소적 출혈을 동반한 괴사소견, 주변조직의 육아조직 형성, 섬유화에 의한 막형성, 석회침착 등이 관찰되었다. 또한 피하직에 인접한 근육층의 일부 근육 조직에서는 변성 및 괴사와 염증세포의 침윤이 관찰되었다.

**3. 7일 연속 피하투여에 의한 국소자극성시험**

**Table 6.** Macroscopic changes of the injection sites at 2 and 7 days after 7-day repeated subcutaneous administration of DA-3585 and various substances

Substance	No. and site <sup>a</sup>	Day 2	No. and site <sup>a</sup>	day 7
Saline	1 left	0	4 left	0
	2 left	0	5 left	0
	3 left	0	6 left	0
	mean ± SD	0 ± 0	mean ± SD	0 ± 0
DA-3585	1 right	0	4 right	0
	2 right	0	5 right	0
	3 right	0	6 right	0
	mean ± SD	0 ± 0	mean ± SD	0 ± 0
0.2% acetic acid	7 left	532	10 left	306
	8 left	744	11 left	450
	9 left	572	12 left	336
	mean ± SD	616 ± 113	mean ± SD	364 ± 76
1.6% acetic acid	7 right	800	10 right	384
	8 right	630	11 right	740
	9 right	833	12 right	396
	mean ± SD	754 ± 109	mean ± SD	507 ± 202

Each number represents the size of subcutaneous spot (mm<sup>2</sup>).  
<sup>a</sup>: Animal No. and observed site

**Table 7.** Histopathological changes of the injection sites at 2 and 7 days after 7-days repeated subcutaneous administration of DA-3585 and various substances (n=3)

substance	saline		DA-3585		0.2% acetic acid		1.6% acetic acid	
	2	7	2	7	2	7	2	7
cutaneous layer								
Edema	-	-	-	-	+	+	++	+
Cellular infiltration	-	-	-	-	+	+	++	+
Focal hemorrhage	-	-	-	-	+	+	+	+
Focal necrosis	-	-	-	-	+	+	+	+
Granulation	-	-	-	-	++	+	++	++
Fibrosis	-	-	-	-	+	+	++	++
Subcutaneous layer								
Edema	-	-	-	-	+	+	++	+
Cellular infiltration	-	-	-	-	+	+	++	++
Focal hemorrhage	-	-	-	-	+	+	++	++
Focal necrosis	-	-	-	-	+	+	+	+
Granulation	-	-	-	-	+	+	++	+
Fibrosis	-	-	-	-	±	+	++	+++

Each grade represents the mean score of the group (n=3). -, no changes; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

7일간 연속투여에 의한 육안소견은 Table 6과 같다. 생리식염수와 DA-3585 0.5 ml을 피하투여한 군에서는 어떤 개체에서도 약물의 영향으로 보이는 변화는 인정되지 않았으며 투여후 2일 및 7일째 부검을 실시하여 관찰한 육안소견에서도 특이한 병변을 관찰할 수 없었다. 그러나 양성대조군으로 사용한 0.2% 및 1.6% acetic acid를 7일간 투여한 군에서는 투여종료후 2일째 부검시 피하직에서 유백색 및 황백색 반점을 관찰할 수 있었으며, 그 크기는 평균 616 mm<sup>2</sup> 및 754 mm<sup>2</sup>이었다. 투여 후 7일째에도 2일째와 유사한 병변이 관찰되었으나 그 크기는 평균 364 mm<sup>2</sup> 및 507 mm<sup>2</sup>로 2일째에 비해 감소되었다. 조직학적 검사결과(Table 7) 생리식염수와 DA-3585투여군은 투여종료후 2일째와 7일째 조직학적 관찰에서 약물에 의한 변화는 인정되지 않았다. 반면 acetic acid투여군에서는 단회투여시험서와 유사한 소견을 관찰할 수 있었으나 단회투여시험에 비해 피하직의 섬유화가 더욱 심하였고 1.6% acetic acid투여군은 0.2% acetic acid 투여군의 병변보다 그 정도가 심하였다.

**4. 혈관장해성시험**

시험물질을 7일간 혈관내 반복 투여하였을 때의 육안소견은 Table 8과 같다. 투여 7일째까지 생리식염수와 DA-3585 투여군에서는 혈전형성과 염증소견이 관찰되지 않았다. 그러나 양성대조군으로 사용한 5.0% BSP와 0.75% acetic acid 투여군에서는 심한 혈전형성과 염증소견이 나타났다. 조직학적 검사결과 생리식염수와 DA-3585 투여군은 모두 정상적인 조직학적 소견

**Table 8.** Macroscopic changes of the auricles of rabbits infused with DA-3585 and various controls for 7 days

Substance	Animal No.\day	Thrombogenesis							Inflammation						
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
Saline	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DA-3585	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.75% acetic acid	7	-	-	+	++	++	+++	+++	-	-	-	+	++	++	+++
	8	-	-	-	+	+++	+++	+++	-	-	-	+	++	+++	+++
	9	-	+	+	++	+++	+++	+++	-	-	+	++	+++	+++	+++
5.0% BSP	10	-	+	++	+++	+++	+++	+++	-	+	+	++	+++	+++	+++
	11	-	+	+	++	+++	+++	+++	-	-	-	+	+++	+++	+++
	12	-	+	+	++	+++	+++	+++	-	-	+	++	+++	+++	+++

Thrombogenesis: -, 0 mm; +, 1-4 mm; ++, 5-14 mm; +++, >15 mm.  
 Inflammation: -, no gross lesion; +, mild; ++, moderate; +++, severe.

**Table 9.** Histopathological changes around the retroauricular vein of rabbits infused with DA-3585 and various controls for 7 days

Substance	Saline			DA-3585			0.75% acetic acid			5.0% BSP		
	-	±	+	-	±	+	+	++	+++	+	++	+++
Venous wall												
desquamation of endothelium	3	0	0	3	0	0	2	1	0	1	2	0
necrosis	3	0	0	3	0	0	2	1	0	2	1	0
Lumen												
thrombus	3	0	0	3	0	0	1	2	0	0	2	1
Perivascular area												
edema	3	0	0	3	0	0	2	1	0	0	3	0
cellular infiltration	3	0	0	3	0	0	1	1	1	0	1	2
hemorrhage	3	0	0	3	0	0	2	1	0	0	3	0
necrosis	3	0	0	3	0	0	1	2	0	1	2	0
granulation	3	0	0	3	0	0	0	3	0	0	2	1

-, no changes; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

을 보였다. 5.0% BSP 용액 투여군과 0.75% acetic acid 용액 투여군에서는 3예 모두 혈관내피세포의 탈락, 혈관벽괴사, 혈전형성, 혈관주위조직의 부종, 출혈 및 염증세포침윤 등 중등도 이상의 병변이 관찰되었고 일부 예에서는 중등도 이상의 혈관주위조직의 국소적 괴사, 육아조직형성 등의 소견도 관찰되었다(Table 9).

**5. 혈관주위 국소자극성시험**

관찰기간중 육안적 소견은 Table 10과 같다. 생리식염수와 DA-3585를 투여한 mouse를 관찰한 결과 투여 후 3시간까지는 주사부위에 경도의 종창이 인정되었으나 이후에는 모두 정상소견을 나타내었다. 양성대조물 질인 0.75% 및 6.0% acetic acid 액을 투여한 개체들은 주사 후 3시간까지는 생리식염수와 유사한 정도의 병변을 보였으나 시간이 경과함에 따라 국소병변이 진행되어 주사부위의 홍반, 종창, 변성, 궤양 및 괴사소견이 나타났고 개체에 따라 꼬리의 변형(deformity) 및 괴사로 인한 꼬리의 탈락이 관찰되었다. 주사 후 7일에 실시한 조직학적 검사결과(Table 11), 생리식염수와 vehicle

**Table 10.** The results of macroscopic observation for 7 days after perivascular injection with DA-3585 and various compounds (n=10)

Substance\Time	3 hrs	day 1	day 3	day 5	day 7
saline	0.4±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
vehicle	0.5±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
DA-3585	0.4±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
0.75% acetic acid	0.6±0.5	0.2±0.4	0.6±0.7	1.5±0.5	2.3±1.0
6.0% acetic acid	0.4±0.5	1.4±0.8	2.9±0.7	3.6±0.5	4.0±0.0

Each value represents the mean ± SD under the grades.

및 DA-3585를 투여한 시험군에서는 특이한 변화가 인정되지 않았다. 그러나, Acetic acid를 투여한 개체들에서는 외피의 유극세포증식에 의한 비후, 괴사에 의한 궤양의 형성 및 호중구의 침윤에 의한 화농소형성 등이 관찰되었으며 피하 결체조직은 수종성변화, 신생육아조직의 형성 및 섬유화, 근섬유의 위축과 변성 및 괴사소견 등을 나타내었다.

**IV. 고 찰**

본 연구는 동아제약(주)에서 개발중인 recombinant

**Table 11.** Microscopic findings around the caudal vein of mice 10 days after perivascular injection with DA-3585 and acetic acids

Findings \ Substance	Saline	Vehicle	DA-3585	0.75% acetic acid	6.0% acetic acid
<b>Cutaneous</b>					
necrosis and ulceration	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	3.2±0.6	3.8±0.4
hyperkeratosis	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	2.3±0.5	3.9±0.3
epidermal hyperplasia	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	2.2±0.4	2.9±0.6
<b>Subcutaneous</b>					
Cellular infiltration	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	2.8±0.6	3.9±0.3
Edema	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	3.2±0.4	2.7±0.5
Degeneration of bone	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.1±0.3	2.6±0.5
Fibrosis	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	2.3±0.5	2.9±0.6
Muscular degeneration	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.5±0.5	1.7±0.5

Each value represents the mean ±SD under the grades.

Grades: 0, No change; 1, Very slight; 2, Mild; 3, Moderate; 4, Severe.

human erythropoietin(DA-3585)의 국소자극성 유발정도를 여러 동물시험계를 이용하여 평가하기 위하여 실시하였다. 토끼를 이용한 안점막자극시험결과에서 임상사용농도인 10,000 IU/ml의 DA-3585용액은 각막, 공막, 결막 및 안검에 무자극한 물질로 판단되었다. 단회 및 7일 연속 피하투여 자극성시험에서도 육안적 및 조직학적 검사에서 어떠한 변화도 관찰되지 않아 DA-3585는 피하투여시에도 특이한 자극성이 없는 안전한 물질로 나타났다.

일반적으로 erythropoietin의 임상경로는 정맥내투여와 피하투여가 이용되고 있다. 주사제의 정맥내투여에 의한 혈전증, 정맥염 및 정맥주위염 등의 의료사고에 대해서는 많은 보고가 되어 있으며 이는 실제 임상에서 자주 접하게 되는 문제라고 할 수 있다(赤石英 등, 1974). 그러므로 정맥내투여가 예상되는 주사제에 대한 혈관장해성과 혈관외누출(extravasation)에 의한 혈관주위조직에의 자극도에 대한 평가는 전임상개발과정 중에 필히 검토되어야 할 항목이다. 본 연구에서는 府川 등(1975)에 의한 방법으로 DA-3585의 혈관장해성을 검토한 결과 양성대조물질인 acetic acid와 BSP는 투여후 3~5일부터 심한 염증과 혈전형성을 일으킨 것에 비해 DA-3585는 약물의 영향으로 보이는 국소병변을 야기시키지 않아 정맥내 투여시에도 특이한 자극성이 없는 안전한 물질로 사료된다. 한편 혈관주위주사에 의한 자극성시험결과에서는 투여후 3시간에 생리식염수투여군과 DA-3585투여군에서 주사부위의 경도증상이 인정되었으나 이는 주사액의 흡수시간에 따른 일시적 국소증상으로 판단되었으며 투여후 1일부터는 모두 정상으로 회복되었다. 투여후 7일에 실시한 조직학적검사결과 음성대조군과 DA-3585투여군 모든 동물에서 어떠한 변화도 관찰되지 않았다.

이러한 결과는 Kim 등(1996)이 Chinese hamster ovary cell을 이용하여 생산한 erythropoietin(rhu-EPO)인 DA-3285의 국소자극성 시험에서 특이한 국소자극

성이 나타나지 않았다는 보고와 epoetin alfa인 *Espo*<sup>®</sup>(Sankyo Pharm. Co. Japan)의 국소자극성 시험시 특이한 이상이 발견되지 않았다는 결과(Japan pharmaceutical information center, 1992)와 일치하는 것이다.

이상의 결과로 보아 동아제약에서 개발중인 recombinant human erythropoietin인 DA-3585는 예정임상사용농도(10,000 IU/ml)에서 특이한 국소자극성은 나타내지 않는 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- 府川和永, 伊藤義彦, 三崎則幸, 野村聰子 (1975): 靜脈注射による血全性靜脈炎に實驗的研究, 日藥理紙, **71**, 307.
- 赤石英, 押田茂美, 高橋由美子 (1974): 藥劑に關する醫療事故について, 月刊藥事, **16**(6), 901.
- 厚生省資料 (1979): 注射劑の局所障害性に關す試驗法(案), 醫藥ジャーナル, **15**, 447.
- 국립보건안전연구원 (1993): 독성시험 표준작업지침서, p. 496-499.
- 동아제약(주) 연구소 (1994): 표준작업지침서 (SOP/ANC).
- 식품의약품안전본부 고시 제 96-8호 (1996): 의약품 등의 독성시험기준.
- Balsari, A., Lombardo, N. and Ghione, M. (1989): Skin and perivascular toxicity induced experimentally by doxorubicin. *J. Chemother.*, **1**, 324.
- Eschbach, J.W. and Adamson, J.W. (1989): Guidelines for recombinant human erythropoietin therapy. *Am. J. Kidney Dis.*, **14**(2), suppl. 1, 2-8.
- Fisher, J.W. (1993): Recent advances in erythropoietin research. *Prog. Drug. Res.*, **41**, 293-311.
- Gebbia, V., Palmeri, S., Valenza, R., Rausam, L. and Citarrella, P. (1991): The in vivo effects of recombinant human erythropoietin on cis-diamminodichloroplatinum-induced anemia in Golden Syrian hamsters. *In Vivo*, **5**, 149-152.
- Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S.D., Kaufman, R.J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S.

- S., Hewick, R., Fretsch, 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.
- Japan pharmaceutical information center (1992): Drugs in Japan - Ethical drugs (Yakugyo Jiho Co. Ltd., Tokyo, Japan) p. 212-213.
- Kim, O.J., Kim, D.H., Ahn, B.O., Kim, W.B. and Yang, J. (1996): Local irritation of DA-3285, recombinant human erythropoietin. *Korean J. Toxicol.*, **12**(1), 101-111.
- Lin, F.K., Suggs, S., Lin, C.H., Browne, J.K., Smalting, 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.
- Vaziri, N.D., Zhou, X.J. and Liao, S.Y. (1994): Erythropoietin enhances recovery from cisplatin-induced acute renal failure. *Am. Physiol. Soc.*, **266**(35), F360-F366.