

## 인과립구 콜로니 자극인자 제제인 HM10411 (rhG-CSF)의 국소자극성

차신우\* · 한정희 · 김충용 · 서정은 · 김종춘<sup>1</sup> · 권세창<sup>2</sup>

한국화학연구원 부설 안전성평가연구소, <sup>1</sup>전남대학교 수의과대학, <sup>2</sup>한미약품공업주식회사

### Local Irritation Test of HM10411 (rhG-CSF) in Rabbits

Shin Woo CHA\*, Junghee HAN, Choong Yong KIM, Jeong Eun SUH, Jong Choon KIM and Se Chang KOWN<sup>1</sup>

Korea Institute of Toxicology, Korea Research Institute of Chemical Technology

P.O. Box 107, Yu-Seong, Daejeon, 305-606, Korea

<sup>1</sup>Department of Pharmacology and Toxicology College of Veterinary Medicine,

Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>2</sup>Central Research Institute, Hanmi Pharm. Co. Ltd., Sunnam, Kyonggi-do 453-400, Korea

(Received September 3, 2002 ; accepted September 26, 2002)

**Abstract** – The local irritation study (skin and ocular irritation tests) of HM10411, a rhG-CSF (recombinant human granulocyte-colony stimulating factor) was carried out in New Zealand White rabbits. HM10411 was applied to the bare skin at a dose of 2.5 mg/rabbit (5.0 mg/ml, 0.5 ml) and to the conjunctival sac of eye at a dose of 0.5 mg/rabbit (5.0 mg/ml, 0.1 ml), respectively. In this study, there were no clinical signs which were related to HM10411 compared with those of control group. From above results, HM10411 has not any irritating activity to skin and eye in rabbits.

**Key words:** HM10411, rhG-CSF, Local irritation, Rabbit

과립구 콜로니 자극인자 (hG-CSF)는 조혈인자 중의 하나로서 섬유아세포, 성세포, 단구/대식구 및 내피세포에 의해 생성되어 골수내의 호중구 전구세포에 작용하여 호중구 전구세포의 증식과 분화를 자극하여 혈중 호중구의 수준을 일정하게 유지해 주며, 성숙호중구에도 작용하여 활성화를 특이적으로 향상시켜 주는 것으로 알려져 있다 (Nagata, 1994; Ottmann 등, 1987). 또한 여러 병원체에 대항하여 호중구의 화학주성과 탐식작용을 향상시키며, 호중구의 apoptosis를 지연시켜 주는 것으로도 알려져 있다 (Roberts와 Maibach, 1994).

최근에는 유전자 재조합기술이 발전하여 대장균이나 동물세포를 이용하여 G-CSF를 대량 발현시킬 수 있게 되어 실제 임상에서 골수 억제성 항암제 치료환자의 감염기회 감소, 골수이식 환자들에게서 골수의 회복촉진, 재생불량성 빈혈환자의 호중구 기능 향상 및 항암제 치료에 의해 야기되는 호중구 감소증의 치료 등에 유용하게 사용되고 있다 (Nagata, 1995). 이런 경우들에서 G-CSF는 호중구계 과립구의 회복을 촉진하여 호중구 감소증의 기간을 상당히 감소시키며 (Sheridan 등, 1989),

이로 인해 화학요법 이후에 발현될 수 있는 중증의 세균감염증의 기회를 감소시킨다. 또한 G-CSF에 의해 암 치료시 사용되는 항암제들의 투여량을 증가시킬 수 있게 되었다.

HM10411은 최근 한미약품 (주) 연구소에서 대장균 (*E. coli*)을 발현계로 사용한 유전자재조합 기술로 생산한 recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF)이며, 본 시험에서는 HM10411을 임상예정에 적용하기 위하여 안전성평가시험의 일환으로 토끼에서의 국소자극성에 대한 연구를 수행하였다.

### 재료 및 방법

#### 시험물질

한미약품 (주) 중앙연구소에서 생산된 HM10411을 본 시험에 사용하였다.

부형제인 20 mM sodium phosphate로 용해하여 동결건조시킨 HM10411을 투여직전에 멸균생리식염수로 용해하여 투여하였다. rhG-CSF의 임상예정 농도인 250 µg/ml의 20배에 해당하는 5.0 mg/ml을 피부자극시험의 경우 0.5 ml/마리, 안점막자극시험의 경우 0.1 ml/마리씩 적용하였다.

\*To whom correspondence should be addressed.

시험동물 및 사육환경

시험에 사용한 New Zealand White rabbit는 (주) 계통 과학에서 구입하여 8일간의 순화 및 검역기간을 거쳐 발육이 정상이고 건강한 동물만을 사용하여 시험을 수행하였다. 피부자극시험의 경우, 전 동물에 대해 제모를 실시한 후 피부에 이상이 없는 동물을 선택하였으며, 안점막 자극시험의 경우에는 시험개시 24시간전 육안 및 검안경 (IO-H, Nietz instrument, Japan)을 이용하여 양안이 정상인 토끼를 선택하여 시험에 사용하였다.

사육실은 온도 23±3°C, 상대습도 55±15%, 환기횟수 10~20회/hr, 조도 150~300 Lux의 조건하에 유지하였다. 토끼의 검역, 순화 및 시험기간동안, 사료는 토끼용 고형 사료 (퓨리나코리아 주식회사)를, 그리고 음수는 대전광역시 상수도수를 자유섭취시켰다.

시험군 및 적용방법

1) 피부자극시험

본 시험에는 총 6마리를 사용하였으며, 시험개시 시점에서 체중범위는 2.2~2.4 kg이었다. 시험물질 도포 24시간 전 및 시험물질도포 직전에 제모기를 사용하여 시험체의 등 부위를 제모하였다. 시험물질 도포 직전에 등 부위 좌우측에 정상피부 (비찰과피부) 2개소와 슬라이드 글라스 (slide glass)로 각질층만 벗겨낸 손상피부 (찰과피부) 2개소를 각각 2.5×2.5 cm 정도의 크기로 할당하였으며, 그 배치는 Fig. 1과 같다.

예상 임상 사용농도의 20배에 해당하는 5.0 mg/ml를 본 시험에서의 투여농도로 설정하였으며, 시험물질 및 부형물질이 액상이므로 도포액은 의약품 등의 독성시험 기준에 의거하여 0.5 ml로 설정하였다. 좌측 정상피부와 찰과피부에는 부형제를, 우측 정상피부 및 찰과피부에는 시험물질을 각각 1회 도포한 후, 가아제로 덮고 시험물질의 증발을 막기위해 고형재질의 비닐을 덮고 반창고로 고정한다. 부착물의 이탈을 방지하기 위하여 보호대를 착용시켰다. 시험물질 도포 후 24시간째에 반창고, 비닐 및 가아제를 제거하고 도포부위를 증류수로 세척한 후, 홍반과 가피의 형성여부 및 부종형성여부를 관찰하였으며, 또한 72시간째에도 관찰하였다. 피부반응의 결과는 의약품등의 독성시험 기준에서 정한 피부반응의

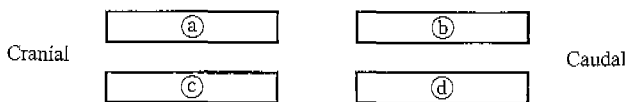


Fig. 1. Experimental region to rabbit back skin.

- Ⓐ: test site (non-abraded)
- Ⓑ: test site (abraded)
- ⓒ: control site (non-abraded)
- Ⓓ: control site (abraded)

Table 1. Evaluation of skin reactions

A. Erythema and Eschar Formation	
Very slight erythema (barely perceptible)	1
Well defined erythema	2
Moderate to severe erythema	3
Severe erythema (beet redness) to slight eschar formation (injuries in depth)	4
Total possible erythema score	4
B. Edema Formation	
Very slight edema (barely perceptible)	1
Slight edema (edges of area well defined by definite raising)	2
Moderate edema (area raised approximately 1 mm)	3
Severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond area of exposure)	4
Total possible edema score	4
Total possible score for primary irritation	8
Primary irritation index (PII): P.I.I.<2	mild irritant
2≤P.I.I.<5	moderate irritant
5≤P.I.I.	severely irritant
Draize et al. (1944)	

평가표에 따라 판정하였다. 24시간과 72시간째의 홍반과 가피의 형성 점수와 부종의 형성 점수들에 대한 평균을 구하고, 이들 8개 평균의 합을 4로 나눈 값을 피부자극지수 (Primary Irritation Index, P.I.I.)로 하여 Table 1에 따라 그 정도를 구분하였다 (Draize 등, 1944; Patrick과 Maibach, 1994).

2) 안점막자극시험

본 시험에서는 9마리를 사용하였으며, 시험개시 시점에서 체중범위는 2.2~2.7 kg이었다. 피부자극시험에서와 마찬가지로 예상 임상 사용농도의 20배에 해당하는 5.0 mg/ml를 본 시험에서의 투여농도로 설정하였으며, 점안액은 시험물질 및 부형물질이 액상이므로 의약품등의 독성시험 기준에 따라 0.1 ml로 설정하였다. 좌측 안구에는 대조부위로서 부형제를, 우측 안구에는 투여부위로서 시험물질을 각각 1회 직접 점안하였다. 점안 20~30초 후, 군 당 3마리는 미온 무균생리식염수 20 ml로 양쪽 눈을 1분간 세안하였으며, 나머지 6마리는 세안하지 않았다.

시험물질을 점안한 후 1, 2, 3, 4 및 7일에 좌측 안점막을 대조로 하여 각막의 혼탁 및 혼탁된 각막의 범위, 홍채의 반응, 결막의 발적, 부종 및 배출물 유무를 육안적 또는 검안경으로 관찰하였다. 안점막 자극 점수는 의약품 등의 독성시험 기준에서 정한 안구병변의 등급표에 따라 산출하였다. 각 항목의 점수를 합하여 총점을 구하였으며, 그 총점을 마리수로 나눈 값을 평균안구자극지수 (mean ocular irritation index, M.O.I.)로 하였다. 평균

**Table 2.** Scale of weighted scores for grading the severity of ocular lesions

<b>I. Cornea</b>	
<b>A. Opacity-Degree of Density (area which is most dense is taken for reading)</b>	
Scattered or diffuse area-details of iris clearly visible	1
Easily discernible translucent areas. details of iris slightly obscured	2
Opalescent areas. no details of iris visible. size of pupil barely discernible	3
Opaque. iris invisible	4
<b>B. Area of Cornea Involved</b>	
One quarter (or less) but not zero	1
Greater than one quarter-less than one-half	3
Greater than one one-half less than three quarters	3
Greater than three quarters up to whole area	4
Score equals A×B×5	Total maximum=80
<b>II. Iris</b>	
<b>A. Values</b>	
Folds above normal, congestion, swelling, circumcorneal injection (any one or all of these or combination of any thereof), iris still reacting to light (sluggish reaction is positive)	1
No reaction to light, hemorrhage, gross destruction (any one or all of these)	2
Score equals A×5	Total possible maximum=10
<b>III. Conjunctivae</b>	
<b>A. Redness (refers to palpebral conjunctivae only) Vessels definitely injected above normal</b>	
More diffuse deeper crimson red individual vessels not easily discernible	1
Diffuse beefy red	2
Diffuse beefy red	3
<b>B. Chemosis</b>	
Any swelling above normal (includes nictitating membrane)	1
Obvious swelling with partial eversion of lids	2
Swelling with lids about half closed	3
Swelling with lids about half closed to completely closed	4
<b>C. Discharge</b>	
Any amount different from normal (does not include small amounts observed in inner canthus of normal animals)	1
Discharge with moistening of the lids and hairs just adjacent to the lids	2
Discharge with moistening of the lids and considerable area around the eye	3
Score (A+B+C)×2	Total maximum=20
The maximum total score is the sum of all scores obtained for the cornea, iris and conjunctivae.	
Draize <i>et al.</i> (1944).	

**Table 3.** Results of skin reaction

Sites	Control site				Test site			
	Erythema & Eschar		Edema		Erythema & Eschar		Edema	
Change	Intact	Abraded	Intact	Abraded	Intact	Abraded	Intact	Abraded
Phases (hours) <sup>a)</sup>	Intact	Abraded	Intact	Abraded	Intact	Abraded	Intact	Abraded
Animal No.								
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean Score	0	0	0	0	0	0	0	0
ΣMean Score	0		0		0		0	
Total	0				0			
P.I.I. <sup>b)</sup>	0				0			

<sup>a)</sup>Time after topical application

<sup>b)</sup>P.I.I. (primary irritation index) = total/4

안구자극지수 중 최고값을 급성안구자극지수 (acute ocular irritation index, A.O.I.)로 하였다. 이 결과를 바탕

으로 Table 2에 따라 시험물질의 안점막 자극 정도를 평가하였다 (Ballantyne, 1993; Draize 등, 1944).

Table 4. Results of eye reaction (group summary)

Group	Animal No.	T1 (No eye washing)					T2 (Eye washing)				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Degree of opacity (A)	Day 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Day 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Day 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Day 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cornea	Day 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Diffuse arcus of opacity (B)	Day 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Day 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Day 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Iris (C)	Day 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Day 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Rcdness (D)	Day 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Day 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Day 3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Conjunctiva	Day 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Edema (E)	Day 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Day 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Day 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conjunctiva Discharge (F)	Day 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Day 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Day 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	I.O.I	Day 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Day 2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Day 3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Day 4		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
M.O.I	Day 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Day 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Day 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Day 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Day 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Day 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

I.O.I. (individual ocular irritation index) = (A×5) + (C×5) + (D + E + F) × 2

M.O.I. (mean ocular irritation index)

<sup>a)</sup>A.O.I. (acute ocular irritation index) = the maximum value of M.O.I

## 결 과

피부 및 안점막 반응 관찰결과는 Table 3 및 4와 같다.

토끼의 피부에 시험물질 HM10411 0.5% 용액을 0.5 ml씩 도포한 후 24시간 및 72시간이 경과한 시점에서, 시험물질 투여에 의한 것으로 생각되는 어떠한 피부반응 소견도 관찰되지 않았다.

토끼의 안구에 시험물질 HM10411 0.5% 용액 0.1 ml씩 점안한 결과, 1, 2, 3, 4 및 7일째에 각막, 홍채 및 결막에 있어서 시험물질의 투여에 의한 것으로 생각되는 어떠한 안점막 자극 소견도 관찰할 수 없었다.

## 고찰 및 결론

HM10411은 한미약품 (주) 중앙연구소에서 유전자 재조합 기술을 이용하여 대장균에서 발현시켜 얻은 rhG-CSF로, 항암화학요법 및 방사선 조사에 의한 호중구 감소증의 치료, 골수이식후의 과립구 회복촉진 등을 목적으로 개발된 조절물질이다.

HM10411에 대한 국소자극성을 평가하기 위하여 0.5%의 농도로 New Zealand White 토끼의 피부에 1회 도포하고, 안구에 1회 점안한 후 피부자극성 및 안점막 자극성을 관찰하였다. 피부반응 관찰 결과, 토끼의 피부에 시험물질 및 부형물질을 도포한 후 24시간 및 72시간이 경과하였을 때, 정상 및 손상피부 모두에서 피부반응은 전혀 관찰되지 않았으며 피부자극지수 (P.I.I.)의 산출결과는 '0'이었다. 안구에 시험물질을 점안한 후 1, 2, 3, 4 및 7일째에 안과학적인 검사를 실시한 결과, 모든 개체의 각막, 홍채 및 결막에서 시험물질의 투여와 관련된 소견은 전혀 관찰되지 않았으며, 평균안구자극지수 (M.O.I) 및 급성안구자극지수 (A.O.I)는 모두 '0'이었다. 이러한 결과들은 기존의 rhG-CSF 제제에 대한 국소독성시험 결과들과 동일하였다 (Kim 등, 1994; Kim 등, 1997; Choi 등, 1999).

이상의 결과에서 HM 10411은 임상 사용농도의 20배에 해당하는 0.5% 용액에서 피부 및 안점막에 대한 자극이 없는 비자극성 물질로 사료된다.

## 참고문헌

- Ballantyne, B. (1993). *Ophthalmic toxicology in General & Applied Toxicology* (Ballan type, B. ed), M. Stockton press, New York, 567-593.
- Choi, Y.S., Ahn, K.K., Juhn, J.H., Lee, J.S., Moon, B.S. and

- You K.H. (1999). Study on local irritation of YHB 6211, a recombinant human granulocyte-colony stimulating factor, in rabbits. *J. Toxicol. Pub. Health*, 15, 259-262.
- Draize, J.H., Woodward, G. and Calvery, H.O. (1944). Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 82, 377-390.
- Kim, O.J., Ahn, B.O., Lee, S.B., Kim, W.B. and Yang, J.I. (1994). Studies on local irritation of DA-3030, a new granulocyte colony stimulating factor, *J. Appl. Pharmacol.*, 2, 247-255.
- Kim, J.H., Lim, D.M., Kim, D.H., Chung, J.S., Kim, J.H. and Kim, H.S. (1997). Study on local irritation of CJ-50001 (rG-CSF) in rabbits, *Korean J. Toxicol.*, 13, 307-310.
- Nagata, S. (1994). Granulocyte colony stimulating factor and its receptor in The Cytokine Handbook (Thompson, A. Ed), (Academic press, New York), 371-385.
- Nagata S. (1995). Granulocyte colony stimulating factor in Handbook of Experimental Pharmacology Volume 95/I, Peptide Growth Factors and Their Receptors I (Sporn, M.B. and Roberts, A.B. Ed.), (Springer-Verlag., New York), 699-722.
- Ottmann, O.G., Welte, K., Souza, L.M. and Moore, M.A. (1987). Proliferative effects of a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rG-CSF) on highly enriched hematopoietic progenitor cells. *Hematol. Bluttransfus*, 31, 244-247.
- Patrick, Z. and Maibach, H. (1994). Dermatotoxicology in Principles and Methods of Toxicology (Hayes, A.W. ed), Raven Press, London, 767-863.
- Roberts, A.W. and Maibach, H. (1994). Granulocyte colony-stimulating factor induces selective elevation of progenitor cells in the peripheral blood of mice. *Exp. Hematol.*, 22, 1156-1163.
- Sheridan, W.P., Wolf, M., Lusk, J., Layton, J.E., Souza, L., Morstyn, G., Dodds, A., Maher, D., Green, M.M. and Fox, R.H. (1989). Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophil recovery after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *Lancet*, 2, 891-295.