

흰쥐에 있어서 PEG- 헤모글로빈 SB1의 단회정맥투여 약물동태

신호철[#] · 심희옥 · 유승룡 · 김종춘 · 양승돈 · 정문구

한국화학연구소 안전성연구부 약물독성동태연구실

(Received March 1, 2000)

Pharmacokinetics of a New PEG-hemoglobin SB1 for Single Intravenous Administration to Rats

Ho-Chul Shin[#], Hee-Ok Shim, Seoung-Ryong Yu, Jong-Choon Kim, Sung-Don Yang and Moon-Koo Chung

Department of Pharmacokinetics and Toxicokinetics, Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon 305-600, Korea

Abstract – An intravenous pharmacokinetics for a new red cell substitute, PEG-hemoglobin SB1, was studied in SD rats. Total-hemoglobin and its metabolite methemoglobin in the plasma were determined using a spectrophotometer. The limit of quantitation was 0.01 g/dL and the C.V. for interday assay reproducibility was less than 6%. Upon intravenous administration of anticipated clinical dose, 10 ml (0.7 gHb)/kg, plasma concentration curve of total-hemoglobin was well described by one-compartment model. The $t_{1/2}$, CL_r , V_d and AUC^{0-48hr} were 8.23 ± 0.96 hr, 0.06 ± 0.01 dL/hr/kg, 0.66 ± 0.05 dL/kg and 13.6 ± 1.01 g·hr/dL, respectively, in male rats (n=5, mean \pm SD). Those parameters in female rats were 9.21 ± 2.31 hr, 0.06 ± 0.01 dL/hr/kg, 0.79 ± 0.08 dL/kg and 13.0 ± 2.36 g·hr/dL, respectively. Similar kinetic profiles between males and females were also obtained from other parameters. Small amount of methemoglobin, an oxidative metabolite of SB1, was detected in the plasma of both sexes, where the $AUC^{0-48 hr,m}$ and $t_{1/2,m}$ were approximately 1.5 g·hr/dL and 20 hr, respectively. The present work provides a critical kinetic data for the effective clinical applications of PEG-hemoglobin SB1.

Keywords □ PEG-hemoglobin SB1, pharmacokinetics, rats.

뇌졸중은 뇌혈관성질환의 일종으로 흔히 중풍으로 잘 알려져 있다. 뇌혈관의 혈전, 전색증, 출혈 등에 의해 뇌혈류가 차단되어 정상적인 산소와 영양분의 공급이 이루어지지 않아 발생하는 질병으로 개인 뿐 아니라 사회적으로도 많은 피해를 끼치고 있으나 아직 효과적인 치료제가 개발되지 않고 있다.^{1,2)} 뇌졸중치료제는 혈전 용해와 더불어 혈액의 점도를 낮추어 혈전 등으로 막혀 있는 뇌혈류를 향상시켜 산소공급을 신속히 하는 것이 중요하다. 이러한 목적으로 Enzon사 Shorr를 비롯한 몇몇 연구그룹을 중심으로 적혈구세포의 대체 혈액제제의 개발에 관심을 보여왔다.³⁻⁶⁾ 최근에 국내에서 PEG-

헤모글로빈제제 SB1이 (주)선바이오에 의해 개발되었는데⁷⁾ 이는 소의 혈액에서 추출한 헤모글로빈에 polyethylene glycol(PEG)을 결합시켜 만든 물질로 뇌졸중에 의한 저산소상태(hypoxia)의 허혈성세포로 선택적으로 산소를 전달하여 세포괴사를 막아 주는 탁월한 효과를 나타내고 있는 것으로 알려지고 있다. 따라서 본 연구에서는 PEG-헤모글로빈 SB1을 대상으로 생체내 동태를 파악하기 위해 흰쥐를 이용하여 단회 정맥투여후 약물동태 연구를 수행하였다.

실험방법

시약 및 기기

PEG-헤모글로빈 SB1(헤모글로빈농도 7 g/dL, (주) 선

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) +82-42-860-7393 (팩스) +82-42-860-7488

바이오)를 사용하였으며 실온에서의 산화방지를 위해 -20°C에서 냉동보관후 필요시에 온수에 녹여 사용하였다. 분석용 시약으로는 dipotassium hydrogenphosphate 및 potassium dihydrogenphosphate(Showa화학, Tokyo, Japan), saponin 및 acetic acid(Sigma, MO, USA), potassium ferricyanide(Osaka이화학, Osaka, Japan) 그리고 sodium cyanide(Tedia, Ohio, USA)를 이용하였다. 분석기기로는 분광광도계(Spectrophotometer, Beckman DU-600, USA) 및 Coulter Counter (T540, Coulter, USA)를 사용하였다.

실험동물 - Sprague Dawley 계통의 SPF(특정병원체 부재) 흰쥐(한국화학연구소 실험동물육종실)를 이용하였으며 약 6주령의 체중 150~230 g의 동물을 사용하였다. 동물은 약 5주령에 입수하여 SPF 동물실에서 순화시킨 후 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 본 연구에 사용하였다. 사육환경은 온도 23±3°C, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시), 환기횟수 10~20회/hr 및 조도 150~300 Lux로 설정하였다. 사료는 실험동물용 고형사료((주)제일사료)를 방사선조사(25 kGy)로 멸균하였고, 물은 상수도수를 자외선살균기로 소독시켜서 자유 섭취시켰다. 사료 및 물 중의 오염물질 분석 결과 연구에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

혈액시료처리 및 약물분석 - 약물의 투여량은 암수 모두 임상 예정용량인 체중 kg당 10 ml(0.7 gHb)로 하였으며 투여액의 조제는 투여직전에 온수로 녹여 그대로 사용하였다. 투여경로는 임상 예정경로인 정맥으로 하였다. 투여액량의 계산은 투여당일에 측정된 체중을 기준으로 하여 계산하였으며 투여전 절식은 실시하지 않았다.

혈액시료는 미정맥으로부터 채취하였으며, 투여전, 투여후 10분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 12시간, 24시간 및 48시간째에 반복 채혈하였다. 혈액은 헤파린 처리시험관에 ice-cold상태로 채취하였으며 혈장은 원심분리법으로 분리하여 분석에 사용하였다.

혈장중의 약물분석은 투여된 약제로 total-헤모글로빈과 대사체로서 methemoglobin을 대상으로 분광광도계를 이용하여 분석하였다. 그리고 표준물질로 SB1에 대한 total-헤모글로빈의 경우 Coulter Counter를 이용하여 두 분석기기의 정량결과를 비교검토 하였다. 분광광도계를 이용한 분석법은 Beutler법⁸⁾에 따라 실시하였으며 calibration factor의 측정과 total-헤모글로빈,

methemoglobin의 농도계산은 다음과 같이 하였다.

$$F_D = \text{Hb(g/dl)} / \text{OD}_D$$

$$F_A = \text{Hb} / (\text{OD}_A - \text{OD}_B)$$

$$F_B = 100 \times (F_A / F_D)$$

$$\text{Total-hemoglobin} = F_D \times \text{OD}_D$$

$$\text{Methemoglobin} = (\text{OD}_A - \text{OD}_B) \times F_A$$

여기서 OD_A는 혈장시료에 인산원충액으로 희석후 측정된 흡광도(optical density, OD)를, OD_B는 ferricyanide 첨가후 측정된 OD를, OD_D는 증화 cyanide용액 첨가한 후 측정된 OD를 각각 나타낸다.

약물동태해석

Total-헤모글로빈에 대한 약물동태해석은 one-compartment open model을 이용하여 first order elimination을 적용 해석하였다.⁹⁾ 동태 파라미터로는 소실속도상수(k₁₀), 소실반감기(t_{1/2}), 전신클리어런스(CL), 혈중농도모멘트곡선하면적(AUMC), 평균체류시간(MRT) 그리고 분포용적(V_d)을 산출하였다. 대사체 methemoglobin에 대해서는 모델비의존적해석법에 따라 최고혈중농도(C_{max,m}), 최고혈중농도 도달시간(t_{max,m})을 실험데이터로부터 직접 산출하였으며, 소실반감기(t_{1/2,m})는 소실상의 농도 3~4점의 직선회귀로부터 산출하였다. 혈중농도곡선하면적은 total-헤모글로빈(AUC^{0-48hr}) 및 methemoglobin(AUC^{0-48hr,m})의 경우 모두 trapezoidal rule을 이용하여 산출하였다. 약물혈중농도 및 동태 파라미터 값 등 모든 데이터에 대해 mean±S.D. 값으로 나타내었으며 성간의 통계적 유의성 검토는 t-검정법을 이용하였다.

실험결과 및 고찰

일반증상

SB1을 투여한 모든 동물에서 육안적으로 일반증상을 관찰한 결과, 특이적 이상소견은 보이지 않았다. 따라서 흰쥐에 있어서 SB1제제 10 ml/kg의 단회투여용량은 임상적으로 특이 독성소견을 나타내지 않을 것으로 보인다. PEG의 적용으로 헤모글로빈의 독성을 완화시켜 주는 결과도 다수 보고된 바 있다.^{10,11)}

분석법

혈장중의 약물은 투여된 약제 total-헤모글로빈과 대

Table I – Interday assay reproducibility

| Day | OD | | | Calibration factor | | |
|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|----------------|----------------|
| | OD _A | OD _B | OD _D | F _D | F _A | F _B |
| 1 | 0.333 | 0.083 | 0.174 | 72.5 | 50.3 | 69.3 |
| 2 | 0.326 | 0.080 | 0.167 | 75.6 | 51.2 | 67.7 |
| 3 | 0.349 | 0.085 | 0.177 | 71.3 | 47.6 | 66.8 |
| 4 | 0.317 | 0.077 | 0.156 | 80.9 | 52.7 | 65.2 |
| 5 | 0.302 | 0.075 | 0.165 | 76.2 | 55.6 | 73.0 |
| Mean ± S.D. | | | | 75.3 ± 3.73 | 51.5 ± 2.96 | 68.4 ± 2.97 |
| C.V. (%) | | | | 4.95 | 5.75 | 4.34 |

Standard plasma (25 μ l) was subjected for calibration.

사체로서 methemoglobin을 대상으로 분광광도계를 이용하여 분석하였다. 분석기기로는 Coulter Counter와 분광광도계가 검토되었으나 분광광도계의 경우 Coulter Counter에 비해 혈장중 정량한계가 약 1/50정도로 현저히 낮아 분광광도계를 선택하였다. 표준물질 SB1에 대한 total-헤모글로빈의 측정시 Coulter Counter를 이용한 결과와 분광광도계를 이용한 경우가 아주 유사한 값을 보여 분광광도계의 정량에 신뢰성이 있음을 알 수 있었다. 본 분광광도계를 이용한 분석법은 정량한계가 약 0.01 g/dl 정도로 일간 변동계수(C.V.)도 6% 이하로 나타나(Table I) 혈중에서 SB1 및 그 대사체 methemoglobin을 정량하여 약물동태연구를 수행하기에 충분한 조건으로 평가되었다.

약물동태

원위를 이용해 시험제 SB1의 정맥투여후 관찰된

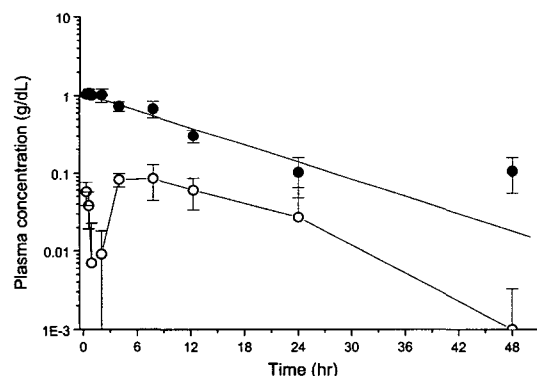


Fig. 1 – Plasma concentration-time curves of total-hemoglobin (●) and its metabolite methemoglobin (○) following intravenous injection of PEG-hemoglobin SB1 at a dose of 10 ml (0.7 gHb)/kg in male rats (n=5).

혈중농도프로파일은 Fig. 1 및 2에서와 같이 one-compartment open모델로 잘 해석되었다. 실측치에 대한 모델 값도 상당히 근접되어(AIC criteria, 암수 모두 < -24.7), 모델해석상의 문제점은 없을 것으로 판단되었다. Total-헤모글로빈에 대한 동태 파라미터는 Table II와 같다. 암수 성간에 큰 차이 없이 $t_{1/2}$ 가 8-9 hr 정도, MRT가 12~13 hr 정도, CL_r 가 0.056-0.062 dL/hr/kg정도를 각각 보여 생체소실 속도상의 성간 유의적 차이($P > 0.05$)는 인정되지 않았다. 그리고 AUC 및 분포용적, AUMC 등에서도 거의 유사한 값을 나타내었다. SB1과 유사구조의 PEG-헤모글로빈 제제에 대한 생체 반감기가 개에서 60 hr 정도¹²⁾, 토끼에서 40 hr 정도¹⁰⁾로 보고된 것을 비교해 볼 때, 본 PEG-hemoglobin SB1제제는 다른 동물종에 비해 흰쥐에서는 비교적 빠른 생체소실을 나타낸다 하겠다. Conover 등¹³⁾의 보고에서도 유사 PEG-헤모글로빈제

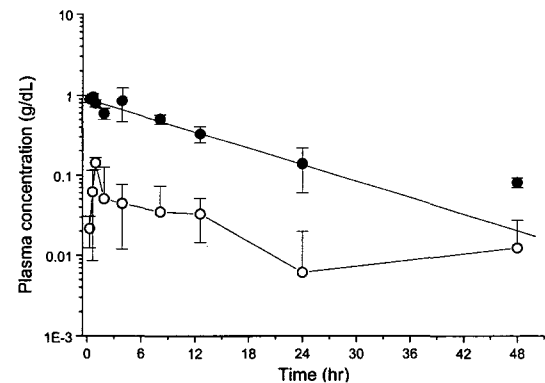


Fig. 2 – Plasma concentration-time curves of total-hemoglobin (●) and its metabolite methemoglobin (○) following intravenous injection of PEG-hemoglobin SB1 at a dose of 10 ml (0.7 gHb)/kg in female rats (n=5).

Table II – Pharmacokinetic parameters for total-hemoglobin following intravenous injection of PEG-hemoglobin SB1 to rats

| Pharmacokinetic parameters (unit) | Male (n=5) | Female (n=5) |
|-----------------------------------|---------------|---------------|
| $t_{1/2}$ (hr) | 8.231 ± 0.955 | 9.209 ± 2.306 |
| CL_t (dL/hr/kg) | 0.056 ± 0.007 | 0.062 ± 0.011 |
| V_d (dL/kg) | 0.658 ± 0.053 | 0.791 ± 0.084 |
| AUMC (hr ² ·g/dL) | 151.9 ± 34.89 | 163.1 ± 84.43 |
| MRT (hr) | 11.88 ± 1.377 | 13.29 ± 3.327 |
| AUC^{0-48hr} (g·hr/dL) | 13.61 ± 1.010 | 12.99 ± 2.360 |

Dose : 10 ml (0.7 gHb)/kg.
All values are means ± S.D.

Table III – Pharmacokinetic parameters for methemoglobin following intravenous injection of PEG-hemoglobin SB1 to rats

| Pharmacokinetic parameters (unit) | Male (n=5) | Female (n=5) |
|-----------------------------------|---------------|---------------|
| $C_{max,m}$ (g/dL) | 5.688 ± 4.540 | 1.082 ± 0.486 |
| $t_{max,m}$ (hr) | 0.156 ± 0.024 | 0.240 ± 0.340 |
| $t_{1/2,m}$ (hr) | 22.45 ± 18.10 | 18.45 ± 12.70 |
| MRT _m (hr) | 9.955 ± 4.537 | 13.38 ± 7.165 |
| $AUC^{0-48hr,m}$ (g·hr/dL) | 1.626 ± 0.900 | 0.997 ± 0.432 |

All values are means ± S.D..

제에 대한 흰쥐의 생체반감기가 약 15 hr 정도를 보였으며 본 실험에서는 8~9 hr을 나타내 현격한 차이는 보이지 않았다.

Methemoglobin은 헤모글로빈의 한 종류로서 철색소 Fe²⁺가 Fe³⁺로 산화된 형태로 산소분자를 운반하거나 결합능력은 없다. Table III에서는 methemoglobin의 모델비의존적 동태 파라미터로 최고혈중농도, 반감기, $AUC^{0-48hr,m}$ 및 MRT_m를 나타내고 있는데 비교적 표준편차 범위는 크지만 암수간에 큰 차이는 없었다. 생체반감기가 약 20시간 정도로 total-헤모글로빈의 반감기에 비해서는 2배 정도 길게 산출되었는데, 이는 대사물의 소실속도가 SB1의 소실속도보다 느리다는 해석이 가능하다. Total-헤모글로빈 가운데 차지하는 대사체 methemoglobin의 비율은 AUC로 단순비교가 가능한데, $AUC^{0-48hr}/AUC^{0-48hr,m}$ 값이 10% 미만에 불과해 대사체 methemoglobin의 혈중 분포는 적은 것으로 보였다.

따라서 본 시험물질 PEG-헤모글로빈 SB1은 흰쥐에서 정맥내 적용으로 성간에 큰 차이 없이 반감기가 약 10시간 정도로 상당시간 혈중에 유지될 것으로 보이며 순환혈액계에 비활성대사체인 methemoglobin의 분포

도 적어 새로운 혈액 대용제제로서의 가능성이 제시되었고 임상적용을 위한 동태론적 약물정보를 제공할 수 있게 되었다.

결론

혈액 적혈구 대체물질로 개발된 PEG-헤모글로빈 SB1을 대상으로 흰쥐에 임상예정용량인 10 ml(0.7 gHb)/kg으로 단회 정맥투여후 약물동태시험을 수행한 바, total-헤모글로빈의 경우 암수 성간에 큰 차이 없이 $t_{1/2}$ 가 8-9 hr 정도를, MRT가 12-13 hr 정도를, CL_t 가 0.05~0.06 dL/hr/kg 정도를 각각 나타내었고 AUC 및 분포용적도 13~14 g·hr/dL 및 0.7~0.8 dL/kg 정도를 나타내었다. 대사체 methemoglobin은 total-헤모글로빈에 비해 약 10% 이하로 혈중에서 검출되었으며 $C_{max,m}$, $t_{1/2,m}$, $AUC^{0-48hr,m}$ 및 MRT_m 등에서도 성간의 차이를 보이지 않았다. 따라서 본 시험을 통하여 PEG-헤모글로빈 SB1은 새로운 혈액 대용제제로서의 혈중 지속시간 유지 등 동태론적 가능성이 제시되었고, 임상적용을 위한 주요 약물동태 정보를 제공할 수 있었다.

문헌

- 1) Sweeney, M. I., Yager, J. Y., Walz, W. and Juurlink, B. H. : Cellular mechanisms involved in brain ischemia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **73**, 1523 (1995).
- 2) Yager, J. Y. and Thornhill, J. A. : The effect of age on susceptibility to hypoxic-ischemic brain damage. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **21**, 167 (1997).
- 3) Baldwin, A. L., Wilson, L. M. and Valeski, J. E. : Ultrastructural effects of intravascularly injected polyethylene glycol-hemoglobin in intestinal mucosa. *Am. J. Physiol.* **275**, H615 (1998).
- 4) Gilbert, C., Nho, K., Johnson, M., Linberg, R. and Short, R. : Hemoglobinuria in rats: a sensitive test of renal filtering and absorption of PEG-hemoglobin, a red blood cell substitute. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **22**, 535 (1994).
- 5) Phillips, W. T., Klipper, R. W., Awasthi, V. D., Rudolph, A. S., Cliff, R., Kwasiborski, V. and Goins, B. A. : Polyethylene glycol-modified liposome-encapsulated hemoglobin: a long circulating red cell substitute. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **288**, 665 (1999).
- 6) Yu, W. P. and Chang, T. M. : Submicron polymer

- membrane hemoglobin nanocapsules as potential blood substitutes: preparation and characterization. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **24**, 169 (1996).
- 7) Kim, E. J., Lee, R. K., Bak J. Y. and Choi, G. K. : General pharmacology of PEG-hemoglobin SB1. *J. Appl. Pharmacol.* **7**, 170 (1999).
- 8) Williams, W. J., Beutler, E., Erslev, A. J. and Lichtman, M. A. : *Hematology* 4th ed., McGraw Hill Publ. Co., p. 1732 (1996).
- 9) Gibaldi, M. : *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics* 4th ed., Lea and Febiger, Philadelphia, p. 5 (1991).
- 10) Conover, C. D., Gilbert, C. W., Shum, K. L. and Shorr, R. G. : The impact of polyethylene glycol conjugation on bovine hemoglobin's circulatory half-life and renal effects in a rabbit top-loaded transfusion model. *Artif. Organs* **21**, 907 (1997).
- 11) Conover, C. D., Rinberg, R., Gilbert, C. W., Shum, K. L. and Shorr, R. G. : Effect of polyethylene glycol conjugated bovine hemoglobin in both top-loaded and exchange transfusion rat models. *Artif. Organs* **21**, 1066 (1997).
- 12) Conover, C. D., Lejeune, L., Shum, K., Gilbert, C. and Shorr, R. G. : Physiological effect of polyethylene glycol conjugation on stroma-free bovine hemoglobin in the conscious dog after partial exchange transfusion. *Artif. Organs* **21**, 369 (1997).
- 13) Conover, C. D., Rinberg, R., Shum, K. L. and Shorr, R. G. : The ability of polyethylene glycol conjugated bovine hemoglobin (PEG-Hb) to adequately deliver oxygen in both exchange transfusion and top-loaded rat models. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **27**, 93 (1999).