

## 새로운 혈액대용제제 PEG-헤모글로빈 SB1의 개에 대한 단회정맥투여 독성시험

한정희<sup>1\*</sup> · 차신우<sup>1</sup> · 김종춘<sup>1</sup> · 김충용<sup>1</sup> · 이미가엘<sup>1</sup> · 노 광<sup>2</sup>

<sup>1</sup>한국화학연구원 부설 안전성평가연구소, <sup>2</sup>선바이오(주)

### Toxicity Study of a New PEG-hemoglobin SB1, a Red Blood Cell Substitute: Single Intravenous Administration in Beagle dogs

Junghee HAN<sup>1\*</sup>, Shin Woo CHA<sup>1</sup>, Jong Choon KIM<sup>1</sup>, Choong Yong KIM<sup>1</sup>, Michael LEE<sup>1</sup>, Kwang NHO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Korea Institute of Toxicology, KRICT, P.O. Box 107, Yuseong, Daejeon, 305-600, Korea

<sup>2</sup>SunBio Inc., Anyang, Kyunggi-Do, Korea

(Received April 1, 2002 ; accepted May 25, 2002)

**Abstract**—This study was performed to investigate the acute toxicity of PEG-hemoglobin SB1, a blood substitute, in beagle dogs. The male and female dogs were administered intravenously at the doses of 0.4375, 0.875 and 1.75 g/kg body weight, respectively. After a single intravenous administration of SB1 to dogs, we observed them daily for 2 weeks. SB1 did not induce any toxic signs in the mortalities, clinical signs, body weight changes, and gross necropsy findings of dogs. Based on these results, acute toxicity, dogs SB1 may have no side effect and its LD<sub>50</sub> value may be over 1.75 g/kg (25 ml/kg) of body weight in dogs.

**Key words:** PEG-hemoglobin SB1, acute toxicity, dogs

뇌혈관의 혈전, 전색증, 출혈 등에 의해 뇌혈류가 차단되어 정상적인 산소와 영양분의 공급이 이루어지지 않아 발생하는 뇌졸중은 개인 뿐 아니라 사회적 경제적으로 많은 피해를 끼치고 있으나 아직 효율적인 치료제가 개발되지 않고 있다(Sweeney 등, 1995; Yager 등, 1997). 뇌졸중치료제는 혈전용해와 더불어 혈액의 점도를 낮추어 혈전 등으로 막혀있는 뇌혈류를 향상시켜 산소공급을 신속히 하는 것이 중요하다. 낮은 산소 친화도를 가지며 표면을 PEG (polyethylene glycol)로 수식한 인공적혈구세포가 적혈구세포의 대체 혈액제제로서의 개발가능성이 제시되었는데(Takahashi, 1995; Baldwin 등, 1998; Phillips 등, 1999), 인공적혈구세포를 PEG로 수식함으로써 비설치류의 hemorrhagic shock model (Usuba 등, 1994)과 total cardiopulmonary bypass model (Usuba 등, 1995)에서 산소운반효율이 증가되며 *in vitro*에서 인공적혈구세포의 응집과 혈관내 응고를 억제하는 것이 보고되었다(Sakaguchi 등, 1991). 최근에 국내에서 PEG-헤모글로빈 제제 SB1이 (주)선바이오에 의해 개발되었는데 소의 혈액에서 추출한 헤모글로빈에

PEG을 결합시켜 만든 물질로 뇌졸중에 의한 저산소상태(hypoxia)의 허혈성세포로 선택적으로 산소를 전달하여 세포괴사를 막아 주는 탁월한 효과를 나타내고 있는 것으로 알려지고 있다. 본 연구실에서는 PEG-헤모글로빈 SB1을 대상으로 랫드를 이용하여 단회 정맥투여시 생체내 동태에 관한 연구를 수행하여 랫드에 있어서 PEG-헤모글로빈 SB1이 혈액대용제제로서 혈중지속시간유지 등 동태론적 가능성을 제시하였다(Shin 등, 2000). 본 연구에서는 PEG-헤모글로빈 SB1에 대한 안전성평가의 일환으로 단회 투여시 발현될 수 있는 독성을 질적·양적으로 평가하고자 PEG-헤모글로빈 SB1을 단회 정맥 투여한 후 2주간 관찰한 개에 대하여 임상증상과 각종 내부장기에 대한 육안해부학적 분석을 실시하였다. 본 시험은 “의약품등의독성시험기준”(식품의약품안전청, 1999)에 준하여 실시하였다.

#### 실험방법

#### 시험물질

본 시험에는 선바이오(주)에서 입수한 PEG-헤모글로빈 SB1 (Lot No. SB19801, 헤모글로빈농도 70 mg/ml)을 사

\*To whom correspondence should be addressed.

용하였으며 실온에서의 산화방지를 위해 -20°C에서 냉동 보관 후 필요시에 온수에 녹여 사용하였다. 시험물질 희석용 용매는 링거 락테이트용액(하트만 용액, 중외제약)을 사용하였다.

**시험동물 및 사육환경**

5개월령의 Beagle dog을 중앙실험동물(주)로부터 구입하여 2주간 순화 사육하면서 임상증상, 혈액검사, 뇨검사, 안검사 및 심전도 검사를 실시하여 건강한 동물로 암수 각 8마리를 선택하여 시험에 사용하였다. 이 때 체중은 수컷이 7.0~8.3 kg이고 암컷이 6.4~8.3 kg 이었다. 동물의 식별은 이개부 내측의 tattoo 번호와 사육상자 전면에 개 체식별카드를 부착하였다.

동물은 스테인레스 철망사육상자(700W×700L×800H mm)에 개체별로 수용하여 온도 23±3°C, 상대습도 50±10%, 12시간명/12시간암 cycle 및 조도 150~300 Lux로 설정된 사육환경에서 전용 고품사료(오리엔탈효모사: 日本東京都 板橋區 小豆泥 3-6-10)를 300 g/day 그리고 멸균수 도수를 1000 ml/day로 제한 급여하였다.

**투여용량의 설정 및 시험군의 구성**

투여용량의 설정은 시험물질을 투여 직전의 개의 체중을 기준으로 하여 고용량군에는 임상예정용량(약 150 mg/kg)의 약 12배인 1.75 g/kg (25 ml/kg)으로 설정하였고, 공비 0.5를 적용하여 0.875 g/kg (12.5 ml/kg)과 0.4375 g/kg (6.25 ml/kg)의 중용량 및 저용량군과 용매대조군을 포함하여 4군의 시험군으로 구성하였다. 용매대조군에는 희석용 용매인 링거 락테이트용액 만을 투여하였다.

**시험물질의 투여**

투여액의 조제는 각각의 투여용량으로 SB1 원제를 링거 락테이트 용액을 사용하여 희석하였으며 27G의 주사기를 이용하여 좌우측 요측피정맥에 투여하였다. 용매대조군 및 1.75 g/kg 투여군은 4회, 0.875 g/kg 투여군은 2회로 분할하여 투여하였으며, 0.4375 g/kg 투여군은 단회로 투여하였다.

**일반증상 및 폐사의 관찰**

투여 당일에는 투여후 1시간에서 6시간까지 메시간마다 일반상태를 관찰하였고, 투여 다음날부터 14일까지는 매일 1회씩 일반증상의 변화, 운동성, 외관, 중독증상 및 사망동물의 유무를 주의깊게 관찰하였다.

**체중변화의 측정**

시험에 사용된 모든 동물에 대하여 투여개시전과 투여후 1, 3, 7 및 14일에 체중을 측정하였다.

**부검**

시험종료시 생존동물은 pentobarbital(중외제약)을 정맥내 투여하여 마취후 액와동맥 절단으로 방혈치사시킨 후 육안적으로 모든 장기를 검사하였다.

**통계학적 분석**

체중에 대한 유의성 검정법으로 Kruskal-Wallis analysis of variance (ANOVA)에서 유의차가 인정되는 F값이 관찰될 때 대조군과 처치군의 비교를 위하여 Dunnett's test를 실시하였다. 모든 통계해석에서 유의수준으로 p<0.05을 이용하였다.

**실험결과 및 고찰**

선바이오(주)에서 개발중에 있는 PEG-헤모글로빈 SB1의 개에 대한 단회정맥투여 독성여부를 조사하기 위하여, 식품의약품안전청고시 제1999-61호 “의약품등의독성시험기준 (1999년 12월 22일 제정)”에 의거하여 시험하였다. 본 시험물질을 링거 락테이트용액에 용해시켜 암·수 각각에 체중 kg당 1.75 g/kg을 최고용량으로 하여 일정공비(x0.5)로 희석한 3개의 용량군과 1개의 용매대조군을 설정한 후, 27G의 주사기를 이용하여 좌우측 요측피정맥에 투여하여 14일간 관찰하였다.

본 실험결과 고용량군(1.75 g/kg)에서도 사망예가 관찰되지 않아, PEG-헤모글로빈 SB1의 LD<sub>50</sub>가 1.75 g/kg이상임을 관찰할 수 있었다.

한편, 시험 전기간을 통하여 정맥투여시 암·수 모두에서 본 시험물질의 투여에 기인된 특이한 임상증상은 관찰할 수 없었다(Table I). 체중변화에 있어서도 시험 전기간을 통하여 암·수 모두에서 각 군간의 유의성있는 차이는 전혀 관찰되지 않았다(Table II). 부검결과, 전체 동물에서 본 시험물질의 투여에 기인한다고 사료되어지는 어떠한 유의할 만한 육안 해부학적인 병변도 관찰되지 않았다(Table III).

이상의 결과로부터 선바이오(주) PEG-헤모글로빈 SB1

**Table I.** Mortality and clinical signs in dogs administered PEG-hemoglobin SB1

Dose (g/kg)	Mortality		Clinical signs	
	Male	Female	Male	Female
0	0/2 <sup>a</sup>	0/2	- <sup>b</sup>	-
0.4375	0/2	0/2	-	-
0.875	0/2	0/2	-	-
1.75	0/2	0/2	-	-

<sup>a</sup>Values are expressed as number of dead animals/total number of animals, <sup>b</sup>No clinical signs were observed.

**Table II.** Changes of body weights in dogs administered PEG-hemoglobin SB1

Sex	Days after treatment	Dose (g/kg)			
		0	0.4375	0.875	1.75
Male	0	7730 ± 434 <sup>a</sup>	7970 ± 779	7810 ± 644	7720 ± 185
	1	8060 ± 159	8070 ± 907	7930 ± 669	7880 ± 242
	3	8110 ± 486	8250 ± 974	8070 ± 701	7830 ± 98.3
	7	8111 ± 301	8240 ± 869	8030 ± 529	7890 ± 73.5
	14	8450 ± 320	8470 ± 853	8370 ± 759	8280 ± 112
Female	0	7460 ± 155	7360 ± 1370	7310 ± 842	7210 ± 50.9
	1	7550 ± 67.9	7310 ± 1420	7420 ± 718	7460 ± 137
	3	7560 ± 209	7420 ± 1280	7630 ± 683	7440 ± 247
	7	7640 ± 23.3	7580 ± 1280	7660 ± 674	7510 ± 219
	14	8040 ± 89.1	7800 ± 1110	7880 ± 761	7830 ± 117

<sup>a</sup>Each Value represents mean ± S.D.

**Table III.** Gross findings of necropsy in dogs administered PEG-hemoglobin SB1

Dose (g/kg)	Male	Female
0	0/2 <sup>a</sup>	0/2
0.4375	0/2	0/2
0.875	0/2	0/2
1.75	0/2	0/2

<sup>a</sup>Values are expressed as number of abnormal animals/total number of animals.

은 개에 체중 kg당 1.75 g/kg의 용량으로 정맥투여시 사망 예는 물론 어떠한 유의한 임상증상을 유발하지 않아 새로운 혈액대용제제로서의 가능성이 제시되었다.

### 감사의 말씀

본 연구는 선바이오 주식회사의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

### 참고문헌

- Baldwin, A. L., Wilson, L. M. and Valeski, J. E. (1998). Ultrastructural effects of intravascularly injected polyethylene glycol-hemoglobin in intestinal mucosa. *Am. J. Physiol.*, **275**, H615-625.
- Phillips, W. T., Klipper, R. W., Awasthi, V. D., Rudolph, A. S., Cliff, R., Kwasiborski, V. and Goins, B. A. (1999). Polyethylene glycol-modified liposome-encapsulated hemoglobin: a long circulating red cell substitute. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **288**, 665-670.
- Sakaguchi, K., Miyauchi, Y., Suzuki, K. and Takahashi, A. (1991). A effects on the Neo Red Cell on the blood coagulation system and the complement system. *Jpn. J. Artif. Organs*, **20**, 620-625.
- Sweeney, M. I., Yager, J. Y., Walz, W. and Juurlink, B. H. (1995). Cellular mechanisms involved in brain ischemia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **73**, 1523-1535.
- Shin, H., Shim, H., Yu, S., Kim J., Yang, S. and Chung, M. (2000). Pharmacokinetics of a New PEG-hemoglobin SB1 for single intravenous administration to rats. *Yakhak Hoeji*, **44**, 232-236.
- Takahashi, A. (1995). Characterization of Neo Red Cells (NRCs), their function and safety *in vivo* tests. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, **23**, 247-254.
- Usuba, A., Motoki, R., Sakaguchi, K., Suzuki, K. and Kamitani, T. (1994). Effect of neo red cells on the hemodynamics and blood gas transport in canine hemorrhagic shock and its safety for vital organs. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, **22**, 503-506.
- Usuba, A., Motoki, R., Ogata, Y., Suzuki, K. and Kamitani, T. (1995). Effect and safety of liposome-encapsulated hemoglobin Neo Red Cells (NCRs) as a perfusate for total cardiovascular bypass. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, **23**, 337-346.
- Yager, J. Y. and Thornhill, J. A. (1997). The effect of age on susceptibility to hypoxic-ischemic brain damage. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **21**, 167-174.
- 식품의약품안전청고시 제1999-61호 의약품등의 독성시험기준, 식품의약품안전청 (1999. 12. 22. 제정)