



## 게잡이 원숭이에 있어 새로운 헤파린유도체의 단회투여 독성스크리닝

김충용<sup>1</sup> · 김상균<sup>2</sup> · 우영아<sup>1</sup> · 정은주<sup>1</sup> · 한수철<sup>1</sup> · 허정두<sup>1</sup> · 박귀례<sup>3</sup> · 변영로<sup>4</sup>

<sup>1</sup>한국화학연구원 안전성평가연구소, <sup>2</sup>광주과학기술원, <sup>3</sup>국립독성연구원, <sup>4</sup>서울대학교 약학대학

## Toxicity Screening After Single Dose of a Newly Developed Oral Heparin Derivative in Male Cynomolgus Monkeys

Choong-Yong Kim<sup>1</sup>, SangKyoon Kim<sup>2</sup>, Young-Ah Woo<sup>1</sup>, EunJu Jeong<sup>1</sup>, Su-Cheol Han<sup>1</sup>,  
Jeong-Doo Heo<sup>1</sup>, KuiLea Park<sup>3</sup> and Youngro Byun<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Non-Human Primate Team, Toxicology Division, Korea Institute of Toxicology,  
KRICT, P.O. Box123, Yuseong, Daejeon,

<sup>2</sup>Department of Materials Science and Engineering, Gwangju Institute of Science and Technology,

<sup>3</sup>National Institute of Toxicological Research,

<sup>4</sup>College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Received May 22, 2007; Accepted June 5, 2007

Toxicity screening of a newly developed oral heparin derivative were carried out in 6 male cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), composed of a treatment group and vehicle control group. A newly orally active heparin derivative, developed by Seoul National University, was once given to treatment group at dose of 500 mg/kg. A treatment group did not show any change in body weights, hematological parameters including platelet-related variables (platelet, PDW, PCT, MPV) and serum biochemical parameters (e.g., AST, ALT, BUN, etc.) for 2 weeks compared with those of vehicle control group. We also confirmed the maximum plasma concentration ( $C_{max}$ , 1.73 IU/ml) and the time ( $T_{max}$ , 1 hr) to reach  $C_{max}$ . The present study will be valuable in the proper interpretation for non-clinical study using cynomolgus monkeys in the development of new drug of heparin derivative.

**Key words:** Cynomolgus monkeys, Oral heparin derivative, Toxicity screening.

### 서 론

혈액응고란 조직손상으로 부터의 출혈을 막기 위한 주된 방어기전이며, 항응고 제제는 심부정맥혈전증(deep vein thrombosis, DVT) 치료에 많이 사용하고 있다(Aken *et al.*, 2001; Hirsh, 2003; Gonze *et al.*, 2000; Strandness, 2001). 한 해 심정맥 혈전증으로 고생하는 사람이 매년 미국에서만 25만명이 넘고 그 중 10만 여명은 치명적인 죽음을 가져오는 폐색전으로 발전하고 있다(Hirsh and Fuster, 1994; Alpert and Dalen, 1994). 이

러한 혈전증은 비만, 고령화등과 함께 우리나라에서도 많이 발생하고 있으며, 외과적 수술 후, 상처, 심장 질환자, 과거 혈전증자등에게서 빈번히 발생하고 있다. 이러한 사람들은 혈전의 생성을 막기 위해 헤파린, 비타민 K 및 와파린 등 항혈전 제제를 최소 수 개월에서 평생 동안 꾸준히 복용해야 한다(Hirsh, 2003). 그러나, 현재 시판되고 있는 항 혈전제는 정맥이나 피하주사제로 나와 있어 장기 복용해야 하는 환자들에게 많은 사용상 불편함을 초래하고 있다. 현재까지 최선의 치료법은 병원에서 주사제 헤파린으로 3~5일간 치료한 다음 퇴원 후 와파린을 경구로 복용 하는게 제일 좋은 방법으로 알려져 있다. 와파린은 늦은 작용시점, 효율성 그리고 높은 약물 작용성등의 부작용들이 있으며, 임신부의 태아에게 치명적 부작용을 나타내기 때문에 시급히 새로운 경구용 항 혈전제의 개발이

Correspondence to: Youngro Byun, College of Pharmacy, Seoul National University, San 56-1, Sillim-dong, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea  
E-mail: yrbyun@snu.ac.kr

필요한 상황에 있다(Hull *et al.*, 1982).

항 혈전제제에 있어 헤파린은 가장 널리 사용되고 있으며 잘 모니터링 되어진 안정적 약물이다. 이 약물은 경구제제가 아니라는 단점을 가지고 있어 과거 많은 연구자들이 경구제제화 개발에 노력하였고(Malkov *et al.*, 2002; Mark *et al.*, 1998), 헤파린에 담즙산을 결합한 헤파린 유도체의 개발, 더욱이 헤파린의 친수성 성질과 담즙산의 소수성 성질에 의한 입자화에 기인하는 미비점(Lee *et al.*, 2006) 등을 보완하기 위하여 dimethyl sulfoxide (DMSO)라는 담즙산의 용매를 이용하여 물에서 용해도가 좋은 구조적으로 이성질체인 헤파린 유도체가 합성된 바 있다(Lee *et al.*, 1998, 2001; Kim *et al.*, 2006). 본 연구에서는 새롭게 개발된 헤파린유도체의 독성을 스크리닝을 하였다. 특히 헤파린의 독성연구로는 과다투여시 주로 혈소판감소증이 보고(Cines *et al.*, 2007; 정영미, 2006; Menajovsky, 2005)된 바 있어 임상예정용량의 167배 용량까지 원숭이에 단회투여하여 이에 대한 독성 프로파일을 파악하였다.

## 재료 및 방법

**시험동물.** 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 영장류 동물실에서 사육된 중국산 cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)로서 수컷 6마리를 이용하였다. 연령은 4~5년생으로 체중은 3,562~4,764 g이었다.

**사육환경.** 공시동물은 온도  $23 \pm 3^\circ\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 10\%$ , 환기횟수 10~20회/hr, 조명시간 12 hr(07:00 점등~19:00 소등) 및 조도 150~300 Lux로 실내는 음압(3 mmAq 이상)으로 유지되는 조건에서 사육하였다. 동물실의 온·습도는 자동 온습도측정기에 의하여 매시간 마다 측정되었으며, 조도 등의 환경조건은 정기적으로 측정되었고, 동물실의 환경측정 결과 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

**사료 및 물.** 사료는 영장류 전용 고형사료(PS, 오리엔탈탈효모 주식회사: 日本 東京都 板橋區 小豆泥 3-6-10)를 사육기간동안 1일 동물체중의 약 4%를 제한급여 하였다. 또한 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 검역실에서 미생물검사와 사료공급처에서 오염물질을 확인한 바, 본 시험에 영향을 미칠만한 요인은 발견되지 않았다.

물은 상수도수를 미세여과기와 자외선유수살균기를 이용하여 소독시킨 후 자유섭취시켰다. 급여 전에 일반수질 검사를 실시하였으며, 물 중의 오염물질 분석에 있어서 시험에 영향을 미칠만한 요인은 발견되지 않았다.

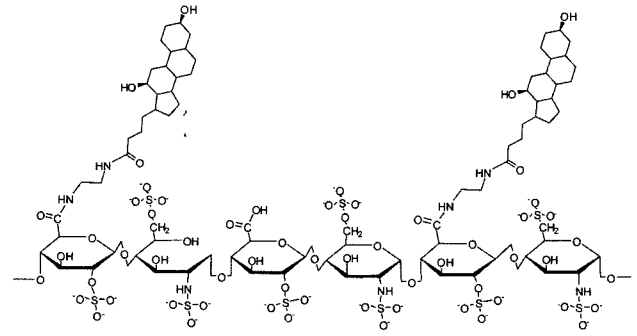


Fig. 1. Schematic structure of LMWH-DOCA.

**시험군 구성.** 시험군은 군당 3마리씩으로 시험물질 및 부형제 대조물질 투여군을 두었다.

**시험물질 헤파린 유도체 및 투여용량.** Fig. 1에서 보는 바와 같이 시험물질 헤파린유도체는 경구투여제제를 목적으로 개발된 항 혈전제제로써, 간단히 설명하면, 장내 흡수율을 높이기 위해 헤파린에 소수성 성질을 가지는 담즙산인 데옥시콜릭산을 결합시켰으며 이를 LMWH-DOCA라 명하였고, 이는 수용액상에서 입자화를 이루는 경향이 있어 용해도를 높이기 위해 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 유기용매 입자를 LMWH-DOCA의 DOCA부분에 결합시켜 물에서 용해도가 좋은 구조적으로 이성질체인 헤파린 유도체를 서울대학교 약학대학 연구팀에서 개발되었다(Lee *et al.*, 1998, 2001; Kim *et al.*, 2006). 투여용량은 임상예정용량의 167배에 상응하는 500 mg/kg B.W. 용량으로 경구투여하였다.

**채혈 및 보정.** 채혈 및 보정 등 동물시험에 적용되는 모든 수순은 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소(AAALAC International 인증획득, 1998)의 동물관리 사용위원회(IACUC)에 의해 검토되어 실시되었다.

**일반증상 및 체중측정.** 일반증상관찰은 투여전과 후에 1일 2회 실시하였고, 체중은 투여개시 전, 투여개시 후, 1일, 3일, 7일 및 14일째에 측정하였다.

**혈액학적 및 혈액생화학적 검사.** 게잡이 원숭이는 분석을 위하여 대퇴정맥 또는 요측피정맥에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액의 일부는 EDTA-2K 함유 채혈병(CBC bottle, 세원메디칼)을 사용하여 응고를 방지하였고, 나머지는 혈액생화학적 검사를 위해 혈청분리관에 옮겨 담았다. 혈액학적 검사는 투여개시 전, 투여개시 후 1일, 3일, 7일, 14일째 채혈하여 20분 이내에 혈구자동계측장치(ADVIA 120, Bayer, USA)를 이용하여 측정하였다. 혈

**Table 1.** Abbreviations, unit and analysis methods of the items

Items	Units	Methods
RBC (Red blood cell)	$\times 10^6/\text{mm}^3$	Laser optical (Flow cytometry)
HGB (Hemoglobin concentration)	g/dl	Cyanmethemoglobin spectrophotometry
HCT (Hematocrit)	%	Calculation from MCV
MCV (Mean corpuscular volume)	fI	Laser optical (Flow cytometry)
MCH (Mean corpuscular hemoglobin)	pg	(HGB/RBC) $\times 10$
RET (Reticulocyte count)	%	Laser optical with cytochemical reaction
RDW (Red cell distribution width)	%	Laser optical flow cytometry
WBC (White blood cell)	$\times 10^3/\text{mm}^3$	Laser optical with cytochemical reaction
Platelet	$\times 10^3/\text{mm}^3$	Laser optical Flow cytometry
PDW (Platelet distribution width)	%	Laser optical Flow cytometry
PCT (Plateletcrit)	%fl	Laser optical flow cytometry
MPV (Mean platelet volume)		Laser optical flow cytometry
AST (Aspartate aminotransferase)	IU/l	UV-rate
ALT (Alanine aminotransferase)	IU/l	UV-rate
ALP (Alkaline phosphatase)	IU/l	P-NPP
BUN (Blood urea nitrogen)	mg/dl	UV rate
CREA (Creatinine)	mg/dl	Jaffe
GLU (Glucose)	mg/dl	Hexokinase
T-CHO (Total cholesterol)	mg/dl	Enzyme
A/G (Albumin globulin ratio)	ratio	ALB/(TP-ALB)
TP (Total protein)	g/dl	Biuret
ALB (Albumin)	g/dl	BCG
CPK (Creatine phosphokinase)	IU/l	UV-Rate
TG (Triglyceride)	mg/dl	Enzyme
Ca (Calcium)	mg/dl	OCPC
IP (Inorganic phosphorous)	mg/dl	UV
PL (Phospholipid)	mg/dl	Enzyme
T-BIL (Total bilirubin)	mg/dl	Enzyme
Na (Sodium)	mmol/l	Electrode
K (Potassium)	mmol/l	Electrode
Cl (Chloride)	mmol/l	Electrode

액생화학적 검사는 투여개시 후 7일 및 14일째 채혈하여 채혈후 30분 이내에 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 분리된 혈청을  $-80^\circ\text{C}$ 에 보관하여 3개월 이내에 자동 분석장치(Shimadzu CL-7200, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 측정하였으며, chloride(Cl), sodium(Na) 및 potassium(K)은 전해질자동분석장치(644, Na/K/Cl analyzer Ciba-corning USA)를 이용하여 측정하였다. 혈액 및 혈액생화학적 검사의 방법과 단위는 Table 1과 같다.

**혈중 헤파린농도 측정방법.** 혈중의 헤파린은 크로모제닉스 사의 항 factor Xa 활성도를 측정하여 헤파린농도를 측정하였다(Lee *et al.*, 2001). 표준용액은 먼저 100 IU의 헤파린을 100 IU/ml의 농도로 0.9% NaCl용액에 희석하여 만들었고 이것을 tris-Hcl buffer에 다시 1000배 희석하여 0.1 IU/ml의 용액을 조제하였다. 각 튜브에 빈 혈장 100  $\mu\text{l}$ 에 100  $\mu\text{l}$ 의 안티트롬빈 III를 넣은 후 잘 섞고, 위 0.1 IU/ml의 용액을 0  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 300  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$  및 700  $\mu\text{l}$ 를 각각 넣고, 나머지를 tris buffer로 채워 전체양을 1,000  $\mu\text{l}$ 로 맞췄다. 이 때 만들어진 각 샘플들은 헤파린의 factor Xa의 0, 0.1, 0.3, 0.5, 및 0.7 IU/ml의 농도를 나

**Table 2.** Body weight and food consumption after single dose of a newly developed oral heparin derivative

Body weight	Group*	
	Control	Treatment
Day 0	4,120 $\pm$ 346	4,130 $\pm$ 242
Day 1	4,126 $\pm$ 315	4,138 $\pm$ 241
Day 3	4,119 $\pm$ 362	4,168 $\pm$ 247
Day 7	4,069 $\pm$ 357	4,147 $\pm$ 270
Day 14	4,142 $\pm$ 364	4,246 $\pm$ 226

\*Each value represents mean  $\pm$  SD (n = 3).

타내었다. 이 중 200  $\mu\text{l}$ 를 따 튜브에 각각 담고  $37^\circ\text{C}$  water bath에 3~4분 동안 담겼다. 이 때  $25^\circ\text{C}$ 에서 따뜻해진 factor Xa를 100  $\mu\text{l}$ 를 넣어 30초간 반응시키고 다시 factor Xa의 기질인 S-2222( $37^\circ\text{C}$ )를 넣어 3분간 반응시켰다. 이렇게 반응된 기질은 UV 405 nm에서 읽을 수 있는 색깔을 나타내었다. 혈중 헤파린 측정방법은 이와 마찬가지로, 헤파린을 포함하고 있는 혈장 100  $\mu\text{l}$ 에 100  $\mu\text{l}$ 의 안티 트롬빈을 넣은 다음 800  $\mu\text{l}$ 의 tris-Hcl buffer로 채웠다. 이 중 200  $\mu\text{l}$ 를 따서 똑 같은 방법으로 기질의 UV값을 측정하고 그 활성도를 측정하였다.

**Table 3.** Hematological parameters after single dose of a newly developed oral heparin derivative

	Day 0		Day 1		Day 3		Day 7		Day 14	
	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment
RBC (Red blood cell)	5.55 ± 0.32	5.37 ± 0.42	5.46 ± 0.44	5.33 ± 0.42	5.29 ± 0.38	5.23 ± 0.59	5.63 ± 0.49	5.58 ± 0.80	5.72 ± 0.25	5.64 ± 0.72
HGB (Hemoglobin concentration)	12.80 ± 0.26	12.30 ± 0.85	12.50 ± 0.64	12.20 ± 0.80	12.30 ± 0.58	12.00 ± 1.25	13.10 ± 0.69	12.80 ± 1.27	13.20 ± 0.12	12.80 ± 1.08
HCT (Hematocrit)	42.60 ± 0.89	41.30 ± 1.81	42.30 ± 2.06	40.8 ± 1.76	40.50 ± 1.86	39.70 ± 2.94	42.8 ± 2.57	41.5 ± 3.91	43.2 ± 0.85	41.9 ± 2.92
MCV (Mean corpuscular volume)	76.90 ± 3.81	77.30 ± 5.85	77.90 ± 3.94	76.60 ± 3.92	76.80 ± 3.69	76.10 ± 4.43	76.20 ± 3.43	74.80 ± 4.16	75.6 ± 3.23	74.6 ± 4.88
MCH (Mean corpuscular hemoglobin)	23.10 ± 1.01	23.00 ± 1.42	23.90 ± 0.98	22.90 ± 1.38	23.90 ± 0.98	23.30 ± 0.84	23.40 ± 1.15	23.00 ± 1.56	23.00 ± 0.95	22.90 ± 1.53
RET% (Reticulocyte count)	1.30 ± 0.26	1.70 ± 0.46	1.30 ± 0.23	1.80 ± 0.38	1.30 ± 0.21	2.20 ± 0.65	1.50 ± 0.32	2.20 ± 0.76	1.10 ± 0.06	1.70 ± 0.55
WBC (White blood cell)	8.12 ± 3.01	10.09 ± 1.24	8.21 ± 1.42	8.74 ± 0.75	7.99 ± 1.76	8.30 ± 0.77	6.97 ± 1.17	6.85 ± 1.04	8.73 ± 1.13	9.08 ± 0.34

Each value represents as mean value (n = 3).

**Table 4.** Platelet-related parameters after single dose of a newly developed oral heparin derivative

	Platelet	PDW%	PCT	MPV
Day 0				
Control group	380.00 ± 57.20	58.10 ± 2.63	0.34 ± 0.04	8.90 ± 0.57
Treatment group	350.00 ± 80.80	58.50 ± 3.81	0.31 ± 0.08	8.80 ± 0.44
Day 1				
Control group	360.00 ± 58.30	61.40 ± 3.17	0.33 ± 0.05	9.00 ± 0.60
Treatment group	338.00 ± 80.30	57.8 ± 3.90	0.29 ± 0.07	8.50 ± 0.25
Day 3				
Control group	358.00 ± 65.80	61.80 ± 3.68	0.32 ± 0.05	9.10 ± 0.60
Treatment group	334.00 ± 57.00	59.2 ± 4.85	0.29 ± 0.06	8.70 ± 0.50
Day 7				
Control group	385.00 ± 62.50	59.90 ± 2.27	0.34 ± 0.05	8.80 ± 0.35
Treatment group	399.00 ± 91.90	57.6 ± 2.89	0.33 ± 0.07	8.30 ± 0.76
Day 14				
Control group	376.00 ± 56.50	64.40 ± 0.81	0.35 ± 0.04	9.40 ± 0.90
Treatment group	378.00 ± 80.30	59.6 ± 3.66	0.34 ± 0.07	8.90 ± 0.58

PDW% (Platelet distribution width), PCT (Plateletcrit), MPV (Mean platelet volume).  
Each value represents as mean value (n = 3).

## 결 과

**일반증상 및, 체중 측정.** 투여 후 14일간 관찰기간 동안 시험물질 투여와 관련된 일반증상은 나타나지 않았다. Table 2에서 보는 바와 같이 경구용 헤파린유도체 투여군의 체중변화가 부형제 대조군의 체중변화와 비교하여 통계학적 유의성있는 변화가 관찰되지 않았다.

**혈액학적 검사.** 혈액학적 변화를 Table 3에 보인 바와 같이 백혈구, 적혈구 등 관련지표들의 측정치가 부형제대조군의 결과에 비해 통계학적 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다. 특히 혈소판수, 혈소판 분포계수(platelet distribution width, PDW), 혈소판용적치(plateletcrit, PCT) 및 평균혈소판용적(mean platelet volume, MPV)

등 혈소판 관련지표들에 있어서도 부형제대조군의 결과에 비해 통계학적 유의성있는 변화가 관찰되지 않았다 (Table 4).

**혈액생화학적 검사.** 혈액생화학적 검사결과를 Table 5에 나타내었다. 투여후 3일째 혈중요소 및 투여후 14일째 크레아틴 측정농도가 부형제대조군의 결과에 비해 헤파린투여군에서 통계학적 유의성있게 증가하였다.

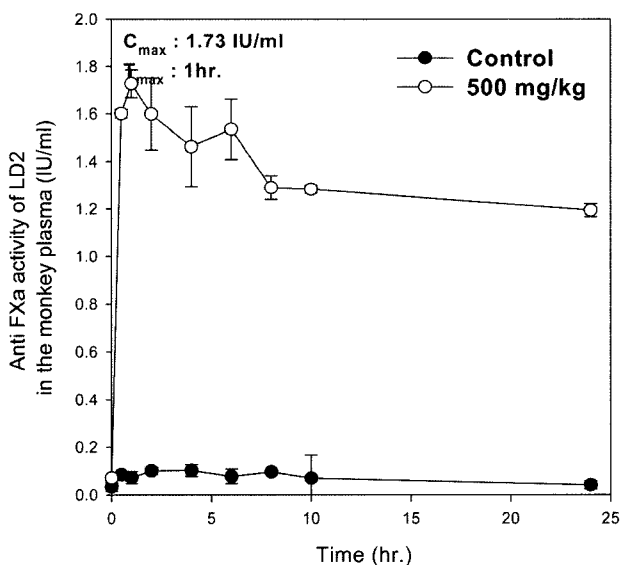
**혈중 약물의 농도.** 약물의 최대혈중농도는 1.73 IU/ml 이었으며, 투여 후 1시간에서 나타났다. 약물의 혈중농도는 시간이 지남에 따라 서서히 감소하였으나 24시간이 경과하여도 혈중농도는 1.2 IU/ml로써 매우 높은 농도가 유지되었다(Fig. 2).

**Table 5.** Serum biochemical values in cynomolgus monkeys after single dose of a newly developed oral heparin derivative

	Day 3		Day 14	
	Control	Treatment	Control	Treatment
AST (IU/l)	32.30 ± 4.80	47.10 ± 18.64	30.60 ± 3.92	36.40 ± 8.05
ALT (IU/l)	37.40 ± 5.61	59.00 ± 15.71	32.90 ± 20.21	30.80 ± 3.15
ALP (IU/l)	1,042.90 ± 229.44	1,033.10 ± 250.51	1,020.00 ± 216.98	1,175.60 ± 353.66
BUN (mg/dl)	17.10 ± 0.81	21.80 ± 2.84*	17.10 ± 1.07	21.80 ± 4.68
CREA (mg/dl)	0.96 ± 0.12	1.09 ± 0.08	0.95 ± 0.04	1.20 ± 0.06**
GLU (mg/dl)	55.10 ± 10.45	69.30 ± 14.95	56.90 ± 10.57	78.10 ± 11.81
T-CHO (mg/dl)	95.30 ± 16.86	115.00 ± 26.91	100.10 ± 20.44	110.40 ± 27.14
A/G (ratio)	1.56 ± 0.12	1.46 ± 0.09	1.58 ± 0.13	1.47 ± 0.11
TP (g/dl)	7.01 ± 0.09	7.25 ± 0.52	7.09 ± 0.05	7.31 ± 0.39
ALB (g/dl)	4.27 ± 0.17	4.29 ± 0.25	4.34 ± 0.16	4.34 ± 0.14
CPK (IU/l)	256.00 ± 48.30	514.00 ± 186.80	269.00 ± 51.20	631.00 ± 383.6
TG (mg/dl)	25.30 ± 2.29	29.00 ± 9.18	19.30 ± 1.05	30.00 ± 11.46
Ca (mg/dl)	10.22 ± 0.28	9.83 ± 0.53	10.51 ± 0.26	10.04 ± 0.52
IP (mg/dl)	6.79 ± 0.57	6.07 ± 0.75	6.75 ± 0.632	5.63 ± 0.310
PL (mg/dl)	164.00 ± 30.50	176.00 ± 40.80	167.00 ± 34.60	173.00 ± 41.50
T-BIL (mg/dl)	0.17 ± 0.07	0.14 ± 0.04	0.14 ± 0.05	0.13 ± 0.04
Na (mmol/l)	150.00 ± 1.00	150.00 ± 1.00	150.00 ± 1.20	148.00 ± 0.60
K (mmol/l)	4.28 ± 0.35	4.20 ± 0.32	4.43 ± 0.39	4.11 ± 0.54
Cl (mmol/l)	109.00 ± 0.60	109.00 ± 3.50	109.00 ± 1.50	109.00 ± 3.10

Each value represents as mean value (n = 3).

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CREA creatinine; GLU, glucose; T-CHO, total cholesterol; A/G, albumin/globulin; TP, total protein; ALB, albumin; CPK, creatine phosphokinase; TG, triglyceride; IP, inorganic phosphate; PL, Phospholipid; T-BIL, total bilirubin.



**Fig. 2.** The concentration profile of heparin derivatives in the blood of treated monkeys. The anti-Xa activity of the LMWH-DOCA conjugate was determined using a Factor Xa (FXa) chromogenic assay as described elsewhere (Lee *et al.*, 2001).

### 고찰

본 시험에서는 계잡이 원숭이에 있어서 헤파린유도체를 임상예정용량의 167배에 상응하는 500 mg/kg으로 단회

경구투여를 하여 급성적인 독성을 파악하기 위하여 시험 물질을 투여한 후 사망률, 일반증상, 체중, 혈액학 및 혈액생화학적 측정을 실시하였다.

Heparin의 독성발현은 출혈, 골감소증(osteopenia), 혈소판감소증(thrombocytopenia) 등이 있다(Cines *et al.*, 2007; 정영미, 2006; Menajovsky, 2005). 출혈은 heparin 투여의 주된 독성으로 투여 용량이 연관이 있으며, 골감소증은 헤파린과 골아세포(osteoblast)와의 결합에 의해 파골세포(osteoclast)를 활성화시키는 것에 기인하며, 혈소판감소증은 면역반응의 매개에 기인하는 것으로 알려져 있다. 특히 혈소판감소증은 선천적 혹은 후천적일 수 있고 발생원인은 혈소판의 생산감소, 파괴 및 소모증가 그리고 혈관 밖으로의 유출 등에 기인한다고 보고되었다(Cines *et al.*, 2007; 정영미, 2006; Menajovsky, 2005) 이러한 혈소판에 대한 독성평가에 있어, PDW는 혈소판 기능의 평가와 생성의 변화를 예측해 보는 지표, MPV는 거대혈소판의 지표, 또한 PCT는 혈소판용적의 백분율로 혈소판이 증가여부를 진단하는 지표 등이 사용되어 혈소판감소증 관련성 여부가 평가되고 있다.

본 시험물질인 헤파린유도체는 DVT(Deep Vein Thrombosis)를 예방하기 위한 약물로서 최소유효혈중농도기 0.1 IU/ml으로 알려져 있다(Ginsberg, 1999). 본 시험의 결과에서 약물의 최대혈중농도는 1.73 IU/ml 이었으며 24시간째에는 1.2 IU/ml가 유지되었다(Fig. 2). 따라서 초

대혈중농도는 최소유효혈중농도보다 17.3배가 높으며, 24시간 동안 유효혈중농도보다 12배가 높은 약물의 혈중농도가 유지되었다. 또한 혈액생화학적 검사 결과, 투여군에 있어 투여후 3일째 BUN 측정치 및 투여후 14일째 CREA 측정치가 부형제대조군 결과에 비해 통계학적 유의성있게 증가하였으나 생리학적 측정치 범위(BUN, 15.17~23.37 mg/dl, Kim et al., 2004; CREA, 1.0~1.4 mg/dl, Wolford et al., 1986) 내 범위에어서 독성학적 의미 없는 변화로 사료된다. 또한, 시험물질 투여와 관련된 사망률, 일반증상, 체중 및 혈액학적 변화가 관찰되지 않았고, 특히 혈소판 수, PDW, MPV 및 PCT의 수치 등 혈소판 관련지표를 분석하였으나, 부형제투여군의 결과에 비해 유의성없는 변화가 관찰되어 혈소판 관련하여 부작용이 없는 것으로 판단되었다.

이상의 결과에서 헤파린유도체의 500 mg/kg 단회 경구투여는 혈중에서 DVT예방 유효혈중농도의 12배 정도로 24시간 유지되었으며 사망률, 일반증상, 체중변화 및 혈액학 지표에 독성을 유발하지 않은 것으로 생각된다. 따라서, 본 시험물질은 500 mg/kg 투여용량에서는 독성이 없는 것으로 판단되며, 이러한 결과는 헤파린유도체 전임상 평가에 있어 기초자료로 활용될 수 있기를 기대한다.

### 감사의 말씀

본 논문은 식품의약품안전청(06132독성평423, 영장류를 이용한 독성평가기술 개발, 2005-2006)지원에 의해 수행되었으며, 영장류 독성시험수행에 수고해 주신 이필수, 강구화, 박남수, 이갑수, 한강현 선생님께 감사드립니다.

### 참고문헌

- Aken, H.V., Bode, C.B., Darius, H., Diehm, C., Encke, A., Gulba, D.C., Haas, S., Haccke, W., Puhl, W., Quante, M., Riess, H., Scharf, R., Schellong, S., Schror, K., Schulte, K.-L. and Tebbe, U. (2001). Anticoagulation: The present and future. *Clin. Appl. Thrombo. Hemost.*, **7**, 195-204.
- Alpert, J.S. and Dalen, J.E. (1994). Epidemiology and natural history of venous thromboembolism. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **36**, 417-422.
- Cines, D.B., Rauova, L., Arepally, G., Reilly, M.P., McKenzie, S.E., Sachais, B.S. and Poncz, M. (2007). Heparin-induced thrombocytopenia: an autoimmune disorder regulated through dynamic autoantigen assembly/disassembly. *J. Clin. Apher.*, **22**, 31-36.
- Gonze, M.D., Salartash, K., Sternbergh III, W.C., Baughman, R.A., Leone-Bay, A. and Money, S.R. (2000). Orally administered unfractionated heparin with carrier agent is therapeutic for deep venous thrombosis. *Circulation*, **101**, 2658-2661.
- Ginsberg, J.S. (1999). Thromboembolism and pregnancy. *Thromb. Haemost.*, **82**, 620-625.
- Hirsh, J. and Fuster, V. (1994). Guide to anticoagulant therapy, Part 1: heparin. *Circulation*, **89**, 1444-1468.
- Hirsh, J. (2003). Current anticoagulant therapy-unmet clinical needs. *Throm. Res.*, **109**, S1-S8.
- Hull, R., Delmore, T., Carter, C., Hirsh, J., Genton, E., Gent, M., Turpie, G. and McLaughlin, D. (1982). Adjusted subcutaneous heparin versus warfarin sodium in the long-term treatment of venous thrombosis. *N. Engl. J. Med.*, **306**, 189-194.
- Kim, S.K., Vaishali, B., Lee, E., Lee, S., Lee, Y.K., Kumar, T.S., Moon, H.T. and Byun, Y. (2006). Oral delivery of chemical conjugates of heparin and deoxycholic acid in aqueous formulation. *Thromb. Res.*, **117**, 419-427.
- Lee, Y., Moon, H.T. and Byun, Y. (1998). Preparation of slightly hydrophobic heparin derivatives which can be used for solvent casting in polymeric formulation. *Thromb. Res.*, **92**, 149-156.
- Lee, Y., Nam, J.H., Shin, H.C. and Byun, Y. (2001). Conjugation of low-molecular-weight heparin and deoxycholic acid for the development of a new oral anticoagulant agent. *Circulation*, **104**, 3116-3120.
- Lee, Y.K., Kim, S.K., Lee, D.Y., Lee, S., Kim, C.Y., Shin, H.C. and Moon, H.T. (2006). Efficacy of orally active chemical conjugate of low molecular weight heparin and deoxycholic acid in rats, mice and monkeys. *J. Control Release*, **111**, 290-298.
- Malkov, D., Wang, H., Dinh, S., Steven, D. and Gomez-Orellana, I. (2002). Pathway of oral absorption of heparin with sodium N-(8-(2 hydroxybenzoyl)amino) caprylate. *Pharm. Res.*, **19**, 1180-1184.
- Mark, D.G., Jeffrey, D.M. and Andrea, L.B. (1998). Orally administered heparin for preventing deep venous thrombosis. *Am. J. Surg.*, **176**, 176-178.
- Menajovsky, L.B. (2005). Heparin-induced thrombocytopenia: clinical manifestations and management. *Am. J. Med.*, **118**(Suppl. 8A), 21S-30S.
- Strandness, D.E. Jr. (2001). Anticoagulant therapy: Current status and shortcomings. *Seminars in Interventional Radiology*, **18**, 113-118.
- Wolford, S.T., Schroer, R.A., Gohs, F.X., Gallo, P.P., Brodeck, M., Falk, H.B. and Ruhren, R.R. (1986). Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *J. Toxicol. Environ. Heal.*, **18**, 161-188.
- 김충용, 이현숙, 한수철, 허정두, 하창수, 권명상, 정문구 (2004). Cynomolgus monkey에 있어 혈액학 및 혈액생화학적 지표. *한국실험동물학회지*, **20**, 44-48.
- 정영미 (2006). 항응고제치료에 사용되는 약물. *병원약사회지*, **23**, 5-11.