

# 1. 전임상시험: 약력학(Pharmacodynamics)

## 1.1 Overview

에스비 주사액의 항암효과에 대한 In vivo와 in vitro에서의 다양한 전임상 평가 결과, 각종 암세포주에 대해 항암활성을 나타냈다.

## 1.2. In vitro에서의 항암효과

인체암세포주 A549(폐), COLO205, HT-29(대장), PC-3(전립선), G361(Melanoma)와 mouse 암세포주 B16(F10), P388(백혈병)을 사용해 sulforhodamin B(SRB) 분석법을 시행한 결과, 에스비주사액 0.3% ~ 10% 농도에서 용량의존적으로 암세포의 성장 억제 및 세포독성을 나타내었다.

SNU-1, SNU-5, SNU-16의 3개 위암세포주와 간암세포주로서 HepG2, Hep3B, 폐암세포주 A549, 유방암세포주 MCF-7, 자궁경부암세포주로서 HeLa 및 Caski 등의 각종 암세포종 그리고 대조로서 정상인의 말초단핵구를 이용하여 에스비주사액의 암세포에 대한 증식억제효과를 비교 검토한 결과, 위암세포주의 경우 ID<sub>50</sub>(50% Inhibitory Dose : 50%억제량)이 0.16 ~ 0.53mg/ml의 상당히 낮은 값이었고, 간암, 폐암, 유방암, 자궁경부암의 경우도 0.14 ~ 0.27mg/ml로서 정상세포값의 1/3 ~1/4에 불과하였다.

## 1.3. In vivo mouse 암세포주 이식 시험

CDF1 mouse에 mouse leukemia P388 0.2ml/20g을 복강내 주입하고 0.05 ~ 0.2ml/20g의 농도로 암세포 이식후 4시간째 1회 투여하고, 그 후 4일동안 복강 투여한 결과, 시험군의 생존율이 용량 의존적으로 증가하였다. SB주사액을 0.2ml/20g의 농도로 투여한 군에서 5일 후에 약 20%의 체중감소가 있었다.

## 1.4. In vivo 인체 암세포주 이식 시험

마우스의 피하에 Sarcoma 180 암세포를 5×10<sup>6</sup>cell/ml을 주사하고, 일주일후부터 시료 일정량을 피하 또는 경구 투여하였다. 20일 후 종양의 중량을 측정된 결과, 0.3ml/20g 피하주사시 종양 중량이 0.44g으로 대조군의 2.71g값의 16.1%에 불과하였는데, 이는 그 값이 42% 이하이면 유효한 것으로 인정되는 미국암연구소의 판정규정에 비추어 볼 때 매우 유효한 것으로 나타났다.

누드 마우스에 인체암세포주 HT-29, COLO205 0.2ml(1×10<sup>7</sup>cell/ml)/20g을 피하에 주입하고, 0.05 ~ 0.20ml/20g의 농도로 암세포 이식 후 5일동안 근육주사, 암세포 이식후 11일째부터 4일동안 추가로 주사하여 mouse의 체중 및 장기의 무게, 종양의 크기를 관찰한 결과, 시험군에서의 체중이나 장기의 무게 변화는 거의 없었고, 종양의 성장은 용량의존적으로 억제되었다. HT-29이식군에서는 양성대조군인 adriamycin은 61%, 시험군(0.1ml/20g, 0.2ml/20g)은 각각 70%, 82%의 종양 성장 억제율을 보였다. COLO205 이식군에서도 시험군에서의 용량의존적인 종양 성장 억제를 관찰할 수 있었다.

대장암세포주 HT-29, 폐암세포주 NCI-H23 0.3ml(1×10<sup>7</sup>cell/ml)/20g을 피하에 주입하고,

0.05ml 및 0.1ml/20g의 경우는 암세포 이식 후 5일동안 복강주사 및 암세포 이식 후 11일째 부터 5일동안 주사하였다. 0.2ml/20g의 경우는 암세포 이식 후 3일동안 복강주사 및 암세포 이식 후 7일째, 13일째부터 각각 3일동안 주사하고, 양성대조군으로 adriamycin 1mg/kg를 1일부터 15일까지 매일 복강으로 주사하고 종양의 크기 및 중량, 체중 변화를 관찰하였다. 체중변화는 0.2ml/20g군에서 시험전과 비교하여 약 14%의 체중감소가 있었고, 이는 3일간의 반복투여 후에 뚜렷이 관찰되었으며 투여를 중지하면 다시 체중이 회복되는 양상을 나타내었다.

대장암세포 HT-29이식시험에서 종양의 크기변화를 관찰한 결과 시험군에서 용량의존적인 종양형성저해 효과가 나타났다. 0.05ml/20g 투여군은 약한 종양형성저해 효과가 나타났으나, 7, 9일째 유의성( $p<0.05$ )이 관찰되었고, 0.1ml/20g 투여군의 경우는 모든 측정군에서 통계적으로 유의한 종양형성저가 관찰되었으며, 약물용량을 0.2ml/20g 으로 증가시키면 항암효과가 더욱 증대된 것으로 나타났으며 모든 측정군에서 통계적인 유의성을 나타내었다( $p<0.01$ ). 양성 대조군인 adriamycin 투여군도 역시 통계적으로 유의한 항암효과가 있었는데 그 정도는 에스비주사액 0.1ml/20g, 0.2ml/20g 투여군의 중간정도의 효과였다. 종양이식 후 16일째 HT-29의 종양을 절제하여 그 무게를 측정된 결과 0.2ml/20g 투여군에서 약 48%, 0.1ml/20g의 경우 약 35%의 성장억제율을 나타냈다( $p<0.01$ )

폐암세포 NCI-H23이식시험에서도 시험군에서 용량의존적인 종양형성저해 효과가 관찰되었다. 0.05ml투여군은 17일 이후부터 유의적인 효과가 관찰되었으며, 18, 19일에는 더욱 유의성이 증가하였다( $p<0.01$ ) 0.1ml/20g투여군은 모든 측정군에 있어17일 이후부터 유의적인 종양형성저해 효과를 나타냈으며( $p<0.05$ ), 약물용량을 0.2ml/20g으로 증가시키면 항암효과가 더욱 증대된 것으로 나타났고, 모든 측정에 있어 통계적인 유의성이 관찰되었다( $p<0.01$ ). 종양이식 19일째 종양을 절제하여 그 무게를 측정된 결과 0.05ml/20g에서 36%, 0.1ml/20g에서 51%, 0.2ml/20g에서 74%의 종양성장억제 효과가 관찰되었다. 통계처리결과 모든 시험군이 양성대조물질 처리군에 비해 유의성이 관찰되었다( $p<0.01$ ).

## 1.5. 일반약리시험

SB주사액은 중추신경계, 자율신경계, 소화기계, 호흡기계, 순환기계 등에 대한 효과가 비교적 없는 안전한 약물로 평가되었다.

### 1.5.1 중추신경계에 미치는 영향

#### *마우스 자발운동에 미치는 영향*

SB주사액을 마우스에 정맥내 주사한 후 30, 60, 90, 120분에 5분간 자발운동량을 측정된 결과, 시간이 경과함에 따라 마우스의 자발운동량이 약간씩 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 각 측정시간대에서의 SB주사액의 자발운동량은 대조군의 자발운동량과 비교할 때 통계적으로 유의성있는 차이를 보이지 않았다.

#### *Pentobarbital sodium 수면 작용에 미치는 영향*

마우스에 pentobarbital sodium 32mg/kg을 복강내로 투여하여 수면을 유도하고, 이에 대한 SB-31의 영향을 시험한 결과, SB-31 3ml/kg, 6ml/kg투여군은 각각 44.6분, 44.3분의 수면 시간을 나타내어 대조군의 수면시간인 41.4분과 비교할 때 통계적으로 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

#### *근이완 작용시험*

근이완 작용에 대한 SB-31의 효과를 Rota-rod법으로 약물 투여후 15, 30 및 60분에 각각 검토한 결과, SB-31을 투여받은 마우스는 모든 측정 시간대에서 대조군과 마찬가지로 Rota-rod의 회전봉으로부터 전혀 떨어지지 않았다. 따라서 SB-31은 근이완작용에 의한 협조 운동장애를 일으키지 않은 것으로 사료된다.

#### *항경련 작용시험*

SB주사액은 최대 전격(maximal electricshock)에 의한 경련 발현에 아무런 영향을 미치지 못하였고, pentylenetetrazole 투여에 의한 경련 발현 및 사망 시간에도 통계적으로 유의한 영향을 나타내지 않았다. 따라서 SB주사액은 항경련 작용이 없는 것으로 사료된다.

#### *정상체온에 대한 작용 시험*

SB주사액을 마우스에 정맥내 투여한 후 4시간동안 체온변화를 관찰한 결과, 시간이 경과함에 따라 SB주사액 투여군은 물론 대조군에서도 약간씩 체온이 하강하는 경향을 보였으나, 각 측정시간대에서 대조군의 체온 변화와 비교할 때 SB주사액은 통계적으로 유의성 있는 체온 변화를 일으키지 않았다.

### 1.5.2 자율신경계에 미치는 영향

#### *기니픽의 적출 회장에 대한 작용*

Guinea-pig 적출 회장의 longitudinal muscle-myenteric plexus preparation에 대해 SB 주사액 0.1, 1.0, 3.0  $\mu\text{l/ml}$ 은 두 고용량에서 용량 의존적으로 유의성있는 직접적인 이완작용을 나타냈으나 그 정도는 크지 않았다. SB주사액을 5분간 전처리하였을 때 histamine ( $2 \times 10^{-6}\text{M}$ )에 의해 유발된 수축에 대하여 1.0  $\mu\text{l/ml}$ 에서만 유의성 있게 증가시켰으나( $p < 0.05$ ) 용량 의존성은 없었으며, acetylcholine( $5 \times 10^{-7}\text{M}$ )에 의해 유발된 수축에 대하여서는 모든 용량에서 유의성 있는 영향을 나타내지 않았다. 따라서 SB주사액은 기니픽 회장 평활근 및 자율신경계에 미치는 영향이 미약한 안전한 약물로 평가된다.

### 1.5.3 소화기계에 미치는 영향

#### *장관 수송능에 대해 미치는 영향*

SB주사액 3ml/kg, 6ml/kg 투여군에서는 charcoal meal이 마우스 소장 전체길이의 51.2, 52.56%까지 각각 이동하였으나, 대조군에서의 이동거리 55.5%와 비교할 때 통계적으로 유의성 있는 차이를 나타내지는 않았다. 따라서 SB주사액은 시험용량 3ml/kg, 6ml/kg에서 장관의 charcoal meal 수송능에 아무런 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다.

#### *위액분비 억제에 대한 시험*

위액 분비에 대한 SB주사액의 영향을 측정한 결과, SB주사액 6ml/kg은 위액 분비량(juice volume), 산도(juice concentration) 및 총산배출(Acid output)에는 통계적으로 별다른 변화를 일으키지 않았으나, 위액의 pH는 약 13%( $p < 0.05$ )정도 감소되는 결과가 나타났다. 따라서 SB주사액은 시험 용량에서 위액의 pH에는 영향이 있었으나, 전반적인 위액분비 작용에는 별다른 영향이 없는 것으로 판단된다.

### 1.5.4 호흡기계에 미치는 영향

#### *Anesthetized rat의 호흡수에 대한 영향*

SB주사액 3ml/kg, 6ml/kg을 anesthetized rat에 정맥투여시, SB주사액 3ml/kg저용량 투여군에서는 대조군과 비교할 때 유의성 있는 호흡수의 증가가 관찰되지 않았으나, SB주사액 6ml/kg의 고용량 투여군에서는 대조군과 비교시 호흡수가 시간이 경과함에 따라 서서히 증가되기 시작하여 약물 투여 90분과 120분 후에 유의성 있는 호흡수의 증가가 나타났다(각각 28.9%, 31.3%,  $p < 0.05$ ). 그러나 약물 투여 240분 후에는 호흡수의 증가폭이 둔화되어(20.9%) 회복되는 경향을 보였으며, 대조군과 비교할 때 통계적으로도 유의성이 없었다. 이상의 결과로 보아 SB주사액은 6ml/kg의 고농도에서 일시적으로 약간의 호흡수 증가를 나타낸 것을 제외하고는 시험 용량에서 호흡수에 대해 유의성 있는 영향을 나타내지 않아, 호흡기계에 대하여 비교적 안전한 약물로 사료된다.

### 1.5.5 순환기계에 미치는 영향

#### *흰쥐의 혈압 및 심박수에 대한 영향*

SB주사액 3,6,10ml/kg 을 비마취 흰쥐에 정맥투여시 고용량 10ml/kg에서만 투여후 20분에서 2시간경에 유의성 있는 혈압상승(최대혈압상승 : 30분후 32.2%)을 보였으며, 30분 이후 서

서히 회복되어 투여후 2시간 이후 정상으로 복귀하였다. 심박수의 경우 6ml/kg 투여시 20분에서 30분경 일시적으로 증가하였다. 이상의 결과로 보아 SB주사액은 최고 용량에서 약간의 초기 혈압상승을 나타낸 것을 제외하고는 시험 용량에서 혈압 및 심박수에 미치는 영향이 거의 없는 것으로 나타난 것으로 보아, 순환기계에 대하여 비교적 안전한 약물로 사료된다.

#### 1.5.6 심혈관계에 대한 효과

##### *랫드의 적출 심장에 대한 효과*

에스비 주사액의 심장에 대한 직접적인 효과를 관찰하기 위하여 랫드의 심장을 적출하여 에스비 주사액을 일정농도( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ )로 희석하여 투여한 결과, 생리액 투여시와 비교해서 별다른 차이를 보이지 않았다. 1000배 희석액까지는 심근수축력(LVDP)과 심근의 이완상태(-dp/dt와 +dp/dt의 비율) 모두 대조액과 비교했을 때 차이가 없었다. 100배 희석액에서는 심근수축력이 증가되는 양성변력작용을 나타내었고 심근의 휴식율이 다소 떨어졌으나 고농도인 점과 대조액 투여시의 변화를 비교해 본다면 심장에 대한 부담은 매우 적은 것으로 보였다. 10 ~ 15초 정도 짧은 기간 효과를 나타낸 후 바로 wash out되었으며, 심박동수와 심혈류량에도 영향을 나타내지 않았다.

##### *혈액응고에 미치는 영향*

에스비 주사액의 혈액 응고에 미치는 영향을 알아보기 위하여 건강한 성인의 혈장을 이용하여 Prothrombin time(PT)과 APTT(activated prothrombin time)을 측정하였다.

SB주사액을 주사용수로 희석하여 $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  배 희석액을 제조하고 Pursatilla saponin F와 H 일정량을 주사용수에 녹인 후 희석하여 1000, 100, 10, 1 $\mu$ g/ml용액을 제조하였다.

대조혈장의 PT와 APTT는 각각 13.3  $\pm$ 0.2초, 39.2  $\pm$ 1.0초를 나타내었는데 PSF와 PSH가 각각 1 ~ 1000  $\mu$ g/ml 가해진 혈장의 PT와 APTT는 모두 대조혈장에 비해 1% 미만의 미미한 변화를 보였고, 농도에 따른 차이도 없었으며 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

대조혈장의 PT는 12.3  $\pm$ 0.6초이었고, SB주사액 희석액이 가해진 혈장은 농도와 관계없이 2%정도의 증가를 나타내었으나 유의성 있는 차이는 아니었다. 대조혈장의 APTT는 33.3  $\pm$ 1.6초이었는데 가해진 SB-31의 농도에 따라 증가되었다. SB-31이  $10^{-5}$  배로 희석된 혈장에서는 5.9%,  $10^{-4}$  와  $10^{-3}$  배로 희석된 혈장에서는 각각 6.9%, 7.7% 증가하였으며  $10^{-2}$  배로 희석된 혈장에서는 11.5%의 증가를 나타내었으나 대조혈장에 비해 모든 농도에서 유의성 있는 차이는 없었다.

## 1.5.7 기타

### *쥐의 뇨량 및 전해질 배출에 대한 영향*

SB주사액 3, 6ml/kg을 비마취 흰쥐에 정맥투여시 뇨량에 대해 3ml/kg용량에서는 약물 투여 전에 비해 2-5시간 사이에서 6ml/kg용량에서는 4-5시간 사이에서 유의성 있게 감소시켰으나 vehicle군에 비해서는 큰 차이가 없었다. 나트륨 배출에 대해 3ml/kg 용량에서는 약물 투여 전에 비해 2시간 20분 - 5시간 사이에서 유의성 있게 증가시켰으나 6ml/kg용량에서는 영향이 없었다. 칼륨배출에 대해서는 용량 의존적으로 감소시키는 경향을 나타냈으나 약물 투여전과 비교해 최고용량 6ml/kg에서 투여후 1시간 20분 - 2시간 사이에서만 유의성 있게 감소시켰으며 이후 점차 회복되었다.

이상의 결과로 보아 SB주사액은 시험용량에서 전해질 배출에 대한 조절작용이 어느정도 관찰되었으나 명확한 용량의존성은 나타내지 않았으며 예상 임상 용량을 고려할 때 신장기능에 대한 작용은 비교적 약한 약물로 사료된다.

## 2. 전임상시험 : 독성(Toxicity)

### 2.1 단일용량 급성독성 시험

마우스, 랫드, 개에 대한 급성 비경구 투여 시험에서, mouse에 SB주사액을 경구 및 피하투여 시에는 사망례가 없었고, 정맥투여시 LD<sub>50</sub> 은13.05ml/kg 이었다. 랫드에서는 투여경로에 관계없이 모두 LD<sub>50</sub> 이 20ml/kg를 초과하는 것으로 나타났다. beagle dog에서는 암, 수 공히 LD<sub>50</sub> 이 5 ~7.5ml/kg 이었으며, 독성을 나타내는 주요 장기는 폐, 신장, 간, 위장관, 장간막 등이었다. SB주사액의 Beagle dog에 대한 단회투여 정맥 독성시험에 있어 LD<sub>50</sub>은 사람의 임상예정용량(0.1ml/kg)의 50 ~ 75배로서 비교적 안전성이 높은 항암제임이 시사되었다.

### 2.2 반복투여 독성시험

SB주사액의 반복투여에 의한 독성을 평가하기 위하여 랫드와 개를 이용한 시험결과는 다음과 같다.

랫드의 경우 SB주사액 1일 1회 4주간 연속투여시 일반증상이나 폐사율에 있어 대조군과 처치군과의 차이가 없었고, 체중증가량, 사료섭취량, 음수소비량, 안검사, 요검사, 혈액학적 검사의 결과에 있어서도 대조군과의 유의성은 관찰되지 않았다. 혈액학적인 소견에 있어서 SB주사액 고용량투여군 일부에서 대조군에 비하여 감소하였으나 빈혈소견 등은 인정되지 않았으며, 변동값은 모두 생리학적인 정상적인 범위내에 있었다.

또한 혈청생화학적치에서 간장, 신장의 독성학적인 지표가 되는 효소들이 오히려 SB 주사액 고용량투여군에서 유의성있게 감소되었다. 병리조직학적인 소견으로는 신장의 뇨세관 간질의 세포침윤, 간장의 sinusoid내에 소육아종형성(microgranuloma), Glissson's sheath에 경도

의 세포침윤, 비장의 골수외조혈상, 폐포벽의 비후, 폐농양 등이 관찰되었으나, 이중 용량의존적인 결과는 없었고, 무처치 대조군에서도 고르게 관찰되어 SB주사액에 기인한 병변은 아닌 것으로 판단된다.

4주반복 투여에 있어 랫드의 최고용량인 2.5ml/kg은 사람의 1회 임상예정용량(0.1ml/kg B.W.)의 약 25배 용량으로 랫트 암수 모두에 특기할 만한 부작용 및 임상증상을 유발하지 않는 무해용량인 것으로 보아, SB주사액이 인체에 부작용이 없는 비교적 안전한 항암제인 것으로 사료된다.

Beagle dog에 대한 4주간 정맥투여시험에서도 체중증가, 사료섭취량 및 음수소비량, 안검사 등에 있어서 대조군과 처치군간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 혈액학적검사에서 0.9ml/kg 투여군에서 투여 14일째 및 28일째에 대조군에 비하여 혈소판의 유의성 있는 감소가 인정되었으나 4주 회복시험에 있어 이 수치는 뚜렷이 회복되는 경향을 나타내었다. 병리학적인 소견으로는 간장의 Glisson's sheath에 경도의 세포침윤, 비장의 hemosiderin과립축적, 림프여포의 hyperplasia, 폐포벽의 경도의 비후 등이 있었으나 이러한 병리조직학적인 소견들은 용량의존적인 결과는 없었으며, 대조군에서도 고르게 관찰되었다.

SB주사액의 beagle dog에 대한 4주 연속 정맥 투여에 있어 0.9ml/kg는 사람의 1회 임상예정용량(0.1ml/kg)의 약 9배의 용량으로, 특기할 만한 부작용 및 임상증상이 유발되지 않았다. 따라서, beagle dog에서의 최고무해용량은 0.9ml/kg 이상인 것으로 나타났고, 이는 SB주사액이 비교적 인체에 안전성이 높은 항암제임을 시사하는 것으로 사료된다.

SB주사액의 랫드에서의 13주 반복 투여결과, 혈액학적 검사에 있어 일부 몇몇 혈액학적에서 유의차가 인정되었으나, 암수 성차가 없었으며, 결과치가 산발적이며 용량의존적이지 않았다. 혈액생화학적 검사에서는 시험물질 투여군에서 수컷 저용량군에서는 대조군에 비하여 potassium치에서 유의성 있는 증가가 인정되었으며, creatinine, total protein 및 Calcium 치에서 유의성 있는 감소가 인정되었다. 중용량군에서는 creatin kinase치 및 potassium치에서 유의성 있는 증가가 관찰되었고, total bilirubin, total protein 및 calcium치에서 유의성 있는 감소가 인정되었다. 고용량군에서는 AST, creatin kinase 및 potassium치에서 유의성 있는 증가가 나타났으며, total bilirubin 및 Calcium 치에서 유의성 있는 감소가 인정되었다. 그리고 암컷의 경우에는 저용량군에서는 대조군에 비하여 Glucose, Creatinine, Total protein, albumin 및 calcium치에서 유의성 있는 감소가 인정되었다. 중용량군에서는 AST 및 Creatin kinase치에서 유의성 있는 증가가, total bilirubin치에서 유의성 있는 감소가 인정되었다. 표적장기 손상의 지표 및 병인의 지표가 되는 여러 해당항목의 혈액생화학적 수치에 있어서 시험물질 투여군의 결과치들이 대조군보다 낮게 측정되었고, 또한 같은 항목에서도 오히려 저용량군 또는 대조군에서 높게 관찰되는 예가 빈번하고 암수 산발적이며 용량의존적이 아니었다. 그리고 대부분의 수치들이 정상 생리학적 범위내에 있었고 각 효소치 해당항목의 표적장기에 대한 부검소견 또는 병리학적 소견에서 약물투여에 의한 특기할 만한 독성변화가 관찰되지 않는 것과 일치하였다.

Beagle dog을 이용한 13주 반복투여정맥시험 및 4주 회복시험 결과 일반 증상 및 사망 동물은 관찰되지 않았고, 체중의 변화, 사료 및 음수섭취량의 변화도 없었다.

혈액학적 검사치에 있어서 암, 수 모든 시험물질 투여군과 대조군에서 시험물질 투여전과 투여후의 각 측정항목에 있어 산발적인 변화는 있었으나 약물 투여에 기인한 뚜렷한 변화는 인정되지 않았다. 혈액생화학적인 검사치에 있어서는 암, 수 모든 시험물질 투여군에서 대조군에 비해 시험물질 투여전과 투여후의 각 측정항목에 있어서 변화가 거의 없고, 정상범주의 측정치를 나타내었다.

## 2.3 유전독성 시험

### 2.3.1 변이원성 시험

Salmonella typhimurum균주 TA1535, TA1537, TA100, TA98의 모든 균주에 있어서 복귀돌연변이콜로니수가 SB-31투여 5개 농도 500 $\mu$ g/pate, 100 $\mu$ g/pate, 50 $\mu$ g/pate, 10 $\mu$ g/pate, 5 $\mu$ g/plate의 모든 농도에서 복귀돌연변이콜로니수가 음성대조군과 비교하여 상승되지 않았으며, 용량-반응관계가 인정되지 않아 복귀돌연변이유발능 음성으로 판정되었다. 또한 S-9mix의 유무에 관계없이 용매대조군(saline)과 비교해서 유발돌연변이 콜로니수의 상승은 관찰되지 않았다. 따라서 SB주사액은 Salmonella typhimurum에 대하여 변이원성이 없는 물질로 사료된다.

### 2.3.2 소핵시험

마우스 골수세포를 이용한 소핵시험에서 SB주사액 투여군은 소핵유발작용에 있어 용매대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으므로 SB주사액은 마우스 골수세포에 대한 소핵이상을 유발하지 않는 것으로 판단되었다.

### 2.3.3 염색체이상 시험

#### 직접법

음성대조군(PBS), 0.393 $\mu$ l/ml, 0.785 $\mu$ l/ml, 1.57 $\mu$ l/ml군, 양성대조군에서 100개의 중기상당 염색체 이상빈도는 0.5, 1.5, 1.0, 53.0이었다. 시험물질투여군의 염색체이상 빈도에 대한 음성대조군과의 차이를 조사한 결과, 통계학적으로 유의한 증가는 나타나지 않았으며, 양성대조군에서는 통계적으로 유의한 증가를 나타내었다( $p < 0.01$ ).

#### 대사활성화법

음성대조군, 6.68 $\mu$ l/ml, 13.35 $\mu$ l/ml, 26.7 $\mu$ l/ml군, 양성대조군에서 100개의 중기상당 염색체 이상의 빈도는 0.5, 0.5, 0.0, 0.5, 78.5이었다. 시험물질투여군의 염색체이상 빈도에 대한 음성대조군과의 차이를 조사한 결과, 통계학적인 유의적인 증가는 나타나지 않았으며, 양성대조군에서는 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다( $p < 0.01$ ).

이상의 결과로 보아 SB주사액은 CHL(Chinese Hamster Lung Fibroblast) 세포에 대해 염색체 이상을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

## 2.4. 항원성 시험

### 2.4.1 능동성 전신 아나필락시스 반응: Active Systemic Anaphylaxis(ASA)

SB주사액의 기니픽에 대한 아나필락시스 쇼크반응 유무를 검색하기 위하여 SB주사액 0.1ml/kg(저용량군), 1.0ml/kg투여군(고용량군), 1.0ml/kg + FCA(Freund's complete adjuvant), 양성대조군인 Ovalbumin(5mg/kg) + FCA투여군, 매체대조군(0.9% NaCl)의 5군을 설정하여 각 군당 5마리씩 수컷 Hartley계 기니픽에 대하여 제 1, 5, 11, 16일 및 26일에 감작항원을 피하투여하여 감작시켰다. 그리고 최종감작 후 10일, 20일 후 야기항원을 기니픽의 부전골정맥(metatarsal vein)에 정맥투여하고 30분간 아나필락시스 쇼크반응을 관찰하였다.

시험 결과 제 1차 야기항원 투여시 SB주사액 0.1ml/kg 에서는 5례 중 2례에 있어서 진전, 재채기, 황와, 경련 등의 severe한 아나필락시스 쇼크반응을 보이다 사망하였다. 그러나 나머지 3례에 있어서는 moderate한 아나필락시스 쇼크반응을 보이다가 곧 회복하였다. 제 2차 야기항원 투여시 3례에서 moderate, severe한 아나필락시스 쇼크반응을 보이다가 회복하였다.

SB주사액 1.0ml/kg 에서는 제 1차 야기항원 투여시 5례 중 1례에 있어 진전 등의 mild한 아나필락시스 쇼크반응을 보이다 회복하였고, 나머지 4례에 있어서는 특기할 만한 임상반응은 관찰되지 않았다. 제 2차 야기항원 투여시 5례 중 1례에 있어서 진전, 혈떡거리고 몸부리침 등의 임상증상이 관찰되었으나 곧 회복되었다.

이상의 결과로 보아 SB주사액은 기니픽에 대하여 아나필락시스 쇼크반응이 유발하여 이 동물에서 항원성이 있음이 밝혀졌다. 이러한 결과는 SB주사액의 주요 성분이 식물성 당단백질이라는 점에 기인한 것으로 사료된다.

### 2.4.2 수동 피부 아나필락시스 반응 : Passive Cutaneous Anaphylaxis(PCA)

기니픽과 마찬가지로 SB주사액 0.1ml/kg(저용량군), SB주사액 1.0ml/kg(고용량군), 고용량 + FCA, 양성대조군인 Ovalbumin(5mg/kg) + FCA투여군, 매체투여군(0.9% NaCl)의 5군을 설정하여 C<sub>57</sub>BL/6계 마우스 수컷을 군당 5마리씩 배치하되 FCA(면역보조제)투여군에서는 총 4회, FCA 비투여군에서는 주 2회씩 총 7회에 걸쳐 감작항원을 피하투여하여 감작시켰다. 그리고 최종 감작 7일 후 마우스 복대정맥에서 채혈을 실시하고 여기에서 얻어진 피검혈청을 4배에서 1024배까지 2단계 희석하여 개체별로 PCA반응을 행하였다. 피검혈청을 랫드의 배부 피내에 투여하고 24시간 후 1 Evans blue에 야기항원액을 동량 혼합하여 미정맥에 투여하였으며, 야기 30분 후에 랫드의 배부 피부를 각피한 후 청색반의 유무를 관찰하였다.

시험결과, SB주사액 저용량 투여군에서 마우스 5마리의 혈청 중 2개의 혈청에서 32 ~64배까지 희석하였을 때 약물의 특이적인 IgE 항체와 관련된 청색반점이 관찰되었다. 또한 SB주사액 고용량 투여군에서는 5마리 혈청중 1개에서 32 ~64배까지 희석하였을 때 약물의 특이적인 IgE 항체와 관련된 청색반점이 관찰되었다. 한편 SB주사액 고용량 + FCA 투여군에서는 모든 마우스 혈청에서 64 ~ 512배까지 희석하였을 때 약물의 특이적인 IgE항체와 관련된 청색반점이 관찰되었다. 또한 양성 대조군에서는 모든 마우스 혈청에서 256 ~ 1024배까지 희석하였을

때 약물의 특이적인 IgE항체와 관련된 청색반점이 관찰되었다.

이상의 결과로 보아 SB주사액은 마우스-랫드계를 이용한 수동 피부 아나필락시스 유발 시험에서 항원성이 있는 것으로 나타났다.

#### 2.4.3 간접 적혈구 응집반응 시험 : Indirect Hemagglutination Test(IHT)

마우스 항혈청에 대한 간접적혈구 응집반응 시험(IHA) 결과 SB주사액 0.1ml/kg(저용량), SB주사액 1.0ml/kg(고용량), SB주사액 고용량 + FCA(면역보조제)의 혼합투여군의 항혈청에서는 약물의 특이적인 항체와 관련된 혈구 응집반응은 관찰되지 않았다.

### 2.5. 국소 독성 시험

#### 2.5.1 피부 자극성 시험

6마리의 New Zealand White계 수컷 토끼를 이용하여 SB주사액을 1ml/head(0.5ml/site)로 경피적용하여 시험한 결과 일반증상, 체중변화, 부검소견에서 시험약에 기인한 특이병변은 관찰되지 않았으며, 홍반 및 가피, 부종 등의 피부반응결과를 Draize의 Primary Irritation Index(P.I.I.)를 이용해 산출한 결과, “0”으로 나타나 “비자극 물질”로 판정되었다.

이상의 결과로 보아 SB주사액은 피부자극에 대한 안전성이 높은 제제로 사료된다.

#### 2.5.2 안점막 자극 시험

SB주사액의 토끼의 안점막에 접촉 후 국소적으로 나타내는 안자극성을 검토하기 위하여 건강한 9마리 수컷 New Zealand White토끼의 한쪽 눈에 시험물질을 1회 처치하고, 처치하지 않은 한쪽눈을 대조군으로 하여 각막, 홍채 및 결막의 손상정도를 관찰하였다. 검체 투여후 1, 2, 3, 4 및 7일에 각각 홍채, 각막, 결막에 대한 안구병변의 등급을 점수한 바, 검체투여에 의해 유발된 어떠한 안구병변도 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아 SB주사액은 토끼의 안점막에 있어 어떠한 안구병변도 유발하지 않는 안전한 제제로 사료된다.

### 2.6. 생식 발생 독성 시험

에스비 주사액의 생식 발생 독성시험 결과는 다음과 같다.

생식 발생 독성시험

연구 형태	동물종	경로	투여량	결과
수태능 및 초기배 발생시험	Rat	정맥	0, 0.1, 0.3, 0.9ml/kg	최고무해용량 > 0.9ml/kg/day
출생전후 발생시험 및 모체기능 시험	Rat	정맥	0, 0.1, 0.3, 0.9ml/kg	0.9ml/kg까지는 생식독성 없으나 차세대 출생 후 성숙이 완료되는 시기 까지 체중감소 관찰됨.

### 2.6.1 수태능 및 초기배 발생 시험

에스비 주사액의 임상적용시 나타날 수 있는 수태능력 및 초기배 발생에 대한 생식독성 유무를 확인하기 위하여 랫드에 대하여 수컷에 있어서는 교미전 4주간 그리고 교미후 임신 확인일까지, 암컷 동물에 있어서는 교미전 2주간, 일부는 부검 전일까지 그리고 일부는 교미확인 후 7일간 약물을 정맥투여하여 수태능력 및 초기배 발생에 미치는 영향을 검색하였다.

실험결과, 암컷동물의 발정주기와 임신지표에 대해서 모든 처치군이 대조군에 비해 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 수컷 랫드의 장기무게에 있어서는 비장의 무게가 다소 용량의존적으로 증가되는 것이 관찰되었으나, 통계학적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

수컷 랫드에 있어서 정소당 정자수, 1g 정소내 정자수, 일일 정자 생산량이 투여군간에 있어 용량의존적으로 감소되는 경향을 보였으나, 대조군과 비교할 때 통계학적인 유의차를 나타내지 않았다.

### 2.6.2 출생 전· 후 발생 및 모체기능 시험

에스비 주사액의 임상적용시 나타날 수 있는 출생 전 후 발생 및 모체기능에 대한 독성 유무를 확인하기 위하여 임신한 랫드 배자의 착상시기인 임신 5일에서 분만후 21일까지 1일 1회 정맥 투여하였다(27). 시험 결과 에스비 주사액 투여군과 대조군에서 모체 및 차세대를 포함한 모든 동물에 대하여 시험전기간동안 시험 물질 투여에 의해서 야기된 특이한 임상 증상은 관찰되지 않았다. 고용량군에서 유산이 1예 관찰되었으나, 이외 투여군과 대조군의 모든 모동물에서 유산, 조산 및 난산 등은 이상은 관찰되지 않았고, 임신기간, 생존태자수, 사망태자수, 성비, 외부이상 태자의 수, 포육 4일 생존율, 이유율, 출산율 등에 있어서 모든 투여군과 대조군간에 어떠한 차이도 관찰되지 않았다. 단지 불임에서 있어서 대조군에서는 1마리, 저용량군에서 2마리, 중용량군에서 2마리가 관찰되었다. 외부 이상 태자수는 고용량군에서 제대허니아 1예, 곡미가 1예, 저용량군에서 곡미가 2예 관찰되었다.

차세대 성장 및 행동발달 시험에서 분만 후 F1의 체중은 대조군과 비교하여 볼 때 고용량군 수컷 랫드에 있어서 생후 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 35일에, 동일군 암컷 랫드에 있어서 생후 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 35일에 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 그러나 이러한 체중감소는 성성숙기 이후로 접어들면서 관찰되지 않았으며, 대조군 수준으로 회복되는 경향을 나타냈다. 태자의 발육, 행동발달 및 기능 검사 결과, 대조군과 투여군간에 어떠한 유의성도 인정되지 않았다.

이상의 결과로 보아, 에스비 주사액은 임신 후 착상기부터 이유 전일까지 정맥으로 투여하였을 때 0.9ml/kg/day의 용량까지의 투여는 제 1세대(F0)는 물론 차세대(F1)에까지 출생 전후 발생 및 모체기능에 있어 생식독성을 나타내지 않는 것으로 사료된다. 그러나, 고용량군의 차세대 체중 변화에 있어서 출생 후 성성숙이 완료되는 시기까지 체중감소가 관찰되는 것으로 보아, 임신·수유부에게 본 시료를 고용량으로 수회 반복 투여하는 것은 고려되어야 한다고 사료된다.

### 2.7. 면역 독성 시험

에스비 주사액 0.05, 0.2, 0.8ml/kg을 수컷 랫드에 13주간 정맥투여하여 면역기능에 미치는 영향을 평가하고, 그 비장을 적출하여 세포성 기타면역시험과 체액성 기타면역시험을 실시한 결과(28), 세포성 면역인 T림프구에 대한 mitogen증식시험에 있어서, 에스비 주사액을 투여한 모든 용량군에서 적출한 비장세포에 대하여 mitogen인 Con A(Concanavalin A), PHA(phytohemagglutinin)를 사용한 림프구유약화시험에서 T림프구에 대하여 어떠한 변화도 유발하지 않았다. 또한 체액성 면역인 B림프구에 대한 mitogen증식시험에 있어서, 에스비 주사액을 투여한 모든 용량군에서 적출한 비장세포에 대하여 mitogen인 LPS(lipopolysaccharide)를 사용한 림프구유약화시험에서 B림프구에 대하여 어떠한 변화도 유발하지 않았다.

### 3. 전임상시험 : 약동학(pharmacokinetics)

에스비 주사액을 랫드와 토끼에 정맥 주사후 glycyrrhizin을 지표로 하여 분포 및 배설 양상을 연구하였다. 랫드 고용량군에는 SB주사액 1앰플(glycyrrhizin으로서 450 $\mu$ g)을, 저용량군에는 1/5앰플(glycyrrhizin으로서 90 $\mu$ g)을 각각 주사한 후 혈액과 담즙 및 뇨를 채취하였다. 토끼의 경우 고용량군에는 3앰플(glycyrrhizin으로서 1350 $\mu$ g)을, 저용량군에는 1앰플(glycyrrhizin으로서 450 $\mu$ g)을 각각 투여한 후 채혈하였다. 각 시간별로 모아진 혈액, 담즙 및 뇨중 glycyrrhizin과 그 대사체인 glycyrrhetic acid의 농도는 HPLC를 통해 분석되었다.

#### 3.1. 랫드에서의 분포 및 배설

##### 3.1.1 Glycyrrhizin의 혈중 농도 변화

혈중 glycyrrhizin은 투여 후 분포되는 시기(distribution phase)와 분포 후 소실되는 시기(elimination phase)의 구별이 뚜렷하여 투여 후 0.75에서 1시간까지는 조직으로의 빠른 분포를 나타내었고, 1시간 이후에는 서서히 배설되는 양상을 나타내어 2-compartment model에 적합한 것으로 나타났다.

랫드에서 고용량군과 저용량군에서의 주요 약물동태 파라미터를 보면, 반감기( $t_{1/2}$ )는 각각  $2.26 \pm 0.29$ h,  $1.47 \pm 0.34$ h로 고용량군의 배설반감기가 유의성 있게 길어졌으며 분포용적( $V_{ss}$ )은  $98.06 \pm 6.07$ ml와  $65.46 \pm 11.19$ ml 였고, 클리어런스(CL)는  $48.57 \pm 2.77$ ml/h와  $67.42 \pm 9.85$ ml/h였다.

##### 3.1.2 담즙을 통한 glycyrrhizin의 배설

랫드 고용량군과 저용량군에서 glycyrrhizin은 각각 투여량의 71.18%와 92.22%가 담즙으로 배설되었다.

##### 3.1.3 뇨를 통한 glycyrrhizin의 배설

본 시험의 0.1 $\mu$ g/ml 측정감도로는 고용량군과 저용량군 모두에서 glycyrrhizin이 검출되지 않았다.

### 3.1.4 대사체 glycyrrhetic acid로의 배설

랫드의 혈액과 담즙 및 뇨중 glycyrrhetic acid는 검출되지 않았다. Glycyrrhizin은 경구 투여시 장내의 세균에 의해 분해되어 주 대사체인 glycyrrhetic acid로 전환, 흡수되어 혈중 및 담즙에서 관찰되는데 본 시험에서와 같은 정맥 투여시에는 glycyrrhetic acid는 매우 낮은 혈중농도로 나타낼 것으로 예상되었으며, 0.1 $\mu$ g/ml 측정 감도로는 검출되지 않았다. 또한 biliary fistula model의 경우에는 담즙이 장간순환(entero-hepatic circulation)을 하지 못하고 체외로 빠져나가는 상황으로 glycyrrhetic acid의 혈중농도는 더 낮아질 것으로 예상되었으며, 본 시험에서는 검출되지 않았다.

## 3.2. 토끼에서의 분포 및 배설

### 3.2.1 토끼에서의 glycyrrhizin의 혈중 농도

혈중 glycyrrhizin은 랫드의 경우와 비슷하게 투여 후 30분까지 조직으로의 빠른 분포를 나타내었고, 그 후에는 서서히 배설되는 양상을 나타내었다. 토끼에서의 분포 및 배설 또한 2-compartment model에 적합한 것으로 나타났다.

토끼의 고용량군과 저용량군의 주요 약물동태 파라미터를 보면, 반감기( $t_{1/2}$ )는 각각 5.30  $\pm$  0.36h, 2.82  $\pm$  0.40h였으며 분포용적( $V_{ss}$ )은 235.24  $\pm$  30.72ml와 341.32  $\pm$  28.58ml 였고, 클리어런스(CL)는 50.93  $\pm$  5.93ml/h와 103.82  $\pm$  9.35ml/h였다.

### 3.2.2 토끼에서의 glycyrrhetic acid의 혈중 농도

토끼의 혈액 중 glycyrrhetic acid는 검출되지 않았다. Biliary fistula model의 랫드와는 달리 담즙이 체외로 배출되지 않고 장간순환을 하는 토끼의 경우 glycyrrhizin이 장내세균에 의해 대사되어 glycyrrhetic acid로 전환된 후 재흡수될 수 있지만 본 시험에서는 자외선 검출기로 측정될 수 없는 낮은 농도였던 것으로 판단된다.