



# 인공혈액의 현재와 전망 - 적혈구 대용제제를 중심으로

## Current Status and Future of Artificial Blood - Focusing on Red Blood Cell Substitutes

김 종 훈 · 이 기 영 | 연세의대 마취통증의학과 · 마취통증의학연구소 | Jong-Hoon Kim, MD · Ki-Young Lee, MD

Department of Anesthesiology and Pain Medicine, and Anesthesia and Pain Research Institute, Yonsei University College of Medicine

E-mail : kylee504@yuhs.ac

J Korean Med Assoc 2009; 52(2): 168 - 181

### Abstract

**B**lood substitutes, especially red blood cell (RBC) substitutes, have been developed for the past five decades and have several advantages over allogenic packed RBCs, including a prolonged half-life, lack of a cross-matching requirement, and minimal infection risk or concerns about immunologic reactions. There are two main groups in RBC substitutes: perfluorochemicals and hemoglobin-based oxygen carriers (HBOCs). HBOCs are made of hemoglobins from: human, bovine or recombinant and undergo three modification types: chemical (intramolecular cross-linking, polymerization, conjugation to macromolecules and combination of several chemical modifications), genetic, or technological (microencapsulation). The types, side effects, current status of clinical trials, and the future of HBOCs are described in details.

**Keywords:** Blood substitute; Red blood cell substitute; Hemoglobin based oxygen carrier

**핵심용어:** 혈액 대용제제; 적혈구 대용제제; 혈액소 기반 산소운반체

### 서론

**심**한 출혈이나 질병에 의해 수혈이 필요한 경우 현재까지는 대부분 동종혈액(homologous blood)의 수혈에 의존해 왔다. 하지만 헌혈만을 통해서 수혈에 필요한 혈액을 확보하는 것이 점차 어려워지고 있는 것이 우리나라 뿐만 아니라 세계적인 현실이다. 이는 과거와 비교해 수혈을 요구하는 각종 수술 및 재해는 증가하고 있으나 헌혈을 통해 확보할 수 있는 혈액량은 제한되기 때문이다. 한편, 동종혈액의 수혈은 채혈된 혈액을 분리, 검사, 진단, 보관하는 등의 과정에 막대한 비용이 소요되며, B·C형 바이러스성

간염이나 후천성면역결핍증 등과 같은 질환의 감염, 그리고 상이한 혈액형에 따른 면역학적 부작용 등의 문제들을 유발할 수 있다.

이러한 문제들을 일거에 해결할 수 있는 대안 중의 하나가 인공혈액(artificial blood)이다. 인공혈액은 면역학적 부작용이나 감염의 위험을 원천적으로 배제할 수 있을 뿐만 아니라, 대량 생산이 가능하고, 보관 및 투여 방법에 있어서의 편의성 때문에 응급 환자에서의 신속한 수혈이 가능하고, 전쟁, 지진 등 재난적 상황에 따른 대량 수혈 요구에도 대처할 수 있다.

현재, 인공혈액 연구는 산소를 운반하는 기능을 하는 인

공 적혈구, 혈액응고를 돕는 인공 혈소판 및 응고인자와 감 염을 막는 인공 면역체의 개발 등 3개 분야에서 진행되고 있 으며, 이 중에서도 인공 적혈구 분야에 대한 연구가 가장 앞 서있다. 따라서 본 필자들은 보편적으로 가장 많은 사용량 이 요구되며 또 최근에 가장 활발하게 연구되고 있는 인공 적혈구, 즉 적혈구 대용제제, 그 중에서도 혈액색소를 기반으 로한 산소운반체(hemoglobin based oxygen carriers, HBOC)를 중심으로 논하고자 한다.

## 인공혈액 개발의 배경

1900년에 혈액형(blood groups)이 발견되고, 1909년에 적혈구 표면에 있는 'ABO' 및 'Rhesus' 혈액형 항원의 특 성을 알게 되면서 외상 환자에게 동종혈액의 수혈이 시작되 었다(1~3). 이어 제1차 세계대전 초기에 구연산염(citrate) 이 안전하고 효과적인 항응고제 임을 알게 되면서 수혈이 비교적 안전하고 실용적인 치료로 인정되었으며(1), 제2차 세계대전과 함께 대량 수혈의 필요성이 제기됨에 따라 혈액 과 혈액 저장에 대한 연구가 진행되면서 비로소 현대적인 수혈의 시대가 열리게 되었다(4). 베트남전쟁 동안에는 혈 액공급량이 수요에 못 미치면서 헤모글로빈용액(hemog- lobin solutions)과 합성산소운반체(synthetic oxygen car- riers)의 개발이 시작되었고, 1980년대 중반 이후에도 수혈 할 혈액이 여전히 부족하고 후천성면역결핍증이나 바이러 스성 간염 등의 감염빈도가 높아지면서 혈액대용제(blood substitutes)의 개발에 박차를 가하게 되었다(5).

## 인공혈액의 기능 및 특성

혈액은 신체 조직에 산소를 공급하고, 포도당 등의 영양 분을 운반하며, 이산화탄소 등의 노폐물 수거, 면역 및 응고 기능 등 다양한 역할을 하지만, 최근까지 집중적으로 연구 되고 있는 인공혈액은 이러한 기능 중 인공적 혈구 기능, 즉 산소 운반 기능에 중점을 두고 개발되어 왔다. 즉, 인공혈액 이 인간의 적혈구를 대신하여 인체의 각 조직에 산소를 운 반해 주는 기능을 하도록 하는 것이다.

**Table 1.** Artificial O<sub>2</sub> carriers (9)

### Hemoglobin based O<sub>2</sub> carriers

- Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb, HemAssist<sup>®</sup>)
- Human recombinant hemoglobin version 1.1 (rHb1.1)
- Human recombinant hemoglobin version 2.0 (rHb2.0)
- Polymerized bovine hemoglobin (HBOC-201, Hemopure<sup>®</sup>)
- Human polymerized hemoglobin (PolyHeme<sup>®</sup>)
- Hemoglobin raffimer (Hemolink<sup>™</sup>)
- Maleimide-activated polyethylene glycol-modified hemoglobin (MP4, Hemospan<sup>®</sup>)
- Enzyme cross-linked polyhemoglobin

### Perfluorocarbon emulsions

Perflubron emulsion (Oxygent<sup>™</sup>)

### Nano-dimension artificial red blood cells

### Allosteric modifier (RSR13)

이러한 역할을 위한 적혈구 대용제제(Table 1)는 크게 혈 색소를 바탕으로한 산소운반체(HBOC)와 과불화화합물질 (perfluorochemicals)의 2가지 종류로 분류되며, 두 가지 모두 산소와 결합하는 능력이 있으나 기능적인 특성에서 완 전히 다르며, 실험이나 임상 연구를 통해 많이 발전한 상태 이지만 아직 유럽이나 미국 또는 캐나다에서 시판 승인을 받은 제품은 없다(6). 이 외에도 제3의 산소운반물질로서 여러 효소들을 포함하는 미립자 형태의 혈액색소제제(particulate hemoglobin preparations)가 연구되고 있는 데, 임상 적용까지는 아직 많은 시간이 필요한 상태이다(7, 8).

과불화화합물질 계통으로 개발된 제제로는 과불화탄 소(perfluorocarbons) 제품인 Fluosol-DA, Perflubron (Oxygent<sup>™</sup>)과 Oxycite 등이 있다(6). 과불화탄소는 화학 및 생물학적으로 불활성(inert)이며, 산소에 대한 용해도가 혈장의 20배 정도로 산소와 이산화탄소에 대하여 높은 용해 능(dissolving capacity)을 가져 물리적으로 동맥혈 내의 산소 용해를 증가시키는 역할을 한다(9~12). 과불화탄소는 물과 잘 섞이지 않아 유탁액(emulsion)으로 만들어 사용하 는데, 이 유탁액에는 미립자(particulate)가 포함되어있기 때문에 과부하(overload)로 인한 세망내피계(reticulo- endothelial system) 식세포(phagocyte)의 기능부전을 피하기 위해 소용량(low doses)으로 주입한다(9, 13). "Multimodal Blood Conservation Program"의 일부로 진

행된 연구에서 Oxygent™는 수술중 빈혈 내성(intraoperative anemia tolerance)을 증가시켰다(13).

한편, HBOC는 혈색소를 바탕으로 해서 만들어지는 제제로서 1957년 캐나다 맥길대학의 Thomas M. Chang 등에 의해 활발하게 연구되기 시작하여, 현재 과불화화합물질 보다는 HBOC에 더욱 많은 연구와 개발이 집중되고 있다. 앞서 설명한 바와 같이 HBOC는 여러 가지 기능 및 특성을 가지고 있다. HBOC는 적혈구를 대신하여 산소를 운반하는 역할을 함으로써 대수술을 받는 환자나 심한 외상환자에서 적혈구 대용제제로서 사용될 수 있고, 멸균(sterilization) 처리를 할 수 있기 때문에 다른 사람의 혈액을 수혈하는 데 따른 세균과 바이러스 등의 전파를 막아 감염 및 후천성면역결핍증 등 질병의 감염 위험을 피할 수 있다(14, 15). 그리고 일반혈액은 2~6°C의 냉장고에서 보관기간이 3주 내지는 길어야 42일에 불과하지만 HBOC는 1년에서 최대한 3년까지도 실온(room temperature)에서 보관할 수 있고(15), HBOC는 수혈자(recipient) 혈액에 노출되어 ABO 항원(ABO antigens)의 역할을 하는 단백질이나 당이 없어 교차시험(crossmatching)의 필요성이 없고 혈액형과 관계 없이 사용될 수 있기 때문에 응급상황에서의 즉각적인 수혈(spot transfusion)에 유용하다(14, 15). 또한, 과불화탄소 용액과 달리 HBOC는 실내 산소 농도에서도 효과를 볼 수 있는 장점이 있으며(15), 혈색소의 분자량이 적혈구의 1,000분의 1 정도로 작고, HBOC를 전해질용액과 혼합하여 투여할 때 점성(viscosity)이 낮아 조직으로의 관류(perfusion)를 개선시키는 효과가 있어 쇼크, 뇌졸중, 심근경색 및 다중장기부전증(multiple organ failure)에 효과적으로 사용될 수 있는 잠재력을 가진다.

동물 실험에서 HBOC는 출혈성 쇼크에서의 혈량 부족을 보상할 수 있었고, 교질삼투압(colloid osmotic pressure)과 장기로의 관류를 회복시켰으며, 거의 총 혈액량의 교환 시에도 장기와 조직에 산소를 전달하는 능력을 보여주었다(15). 그리고 HBOC는 혈장에 용해된 산소 전달과 함께 산소 추출(oxygen extraction)을 증가시킴으로써 정상적인 혈관으로 이루어진 조직 뿐만 아니라 심지어 협착후부 조직(poststenotic tissues)의 산소화도 증가시키는 효과를 나타

낸다(15). 즉, HBOC는 미세순환 부위에서의 확산성(diffusive) 산소전달을 개선시켜 조직손상을 감소시키는 역할을 할 수 있는 것으로 보이며(15), 수동적 확산(passive diffusion)보다는 혈색소를 통한 촉진확산(facilitated diffusion)을 통해 조직에 산소를 공급하기 때문에(7, 16) 과불화화합물질 보다 부작용이 적은 이점과 함께 임상적으로 효용 가치가 높다(17, 18). 한편, 동종혈액의 적혈구는 손상후 발생하는 다중장기부전증의 위험을 증가시키는 심각한 면역염증(immunoinflammatory) 반응을 유발할 수 있지만, HBOC는 다중장기부전증을 일으키는 전신염증반응(systemic inflammatory response)을 감소시킨다는 보고도 있다(19). HBOC의 수술기(periooperative) 사용에 관한 임상연구에 따르면 응급 출혈이나, 혈관, 심장 그리고 비심장(noncardiac) 수술에서 동종혈액의 수혈을 줄이거나 피할 수 있었다(15).

하지만 정상적인 적혈구의 수명이 120일 정도이고 수혈된 적혈구의 생존기간이 34일 정도인 데 반해 HBOC는 정맥내 투여 후 반감기가 1~2일로 매우 짧으며, 투여된 혈색소가 일산화질소(nitric oxide)와 결합함으로써 혈관수축(vasoconstriction)과 혈압상승을 유발할 수 있는 단점이 있다(15, 20).

## HBOC의 제조 과정

HBOC를 만들기 위해서는 혈색소가 필요한데 일반적으로 이를 위한 혈색소는 인간 또는 동물의 적혈구로부터 얻거나 유전자 재조합 기술(recombinant technology)을 통하여 미생물 또는 디엔에이(DNA)삽입 동물(transgenic animals)로부터 얻는다(5).

인간 적혈구로부터 얻는 혈색소는 주로 보관기간이 지나 폐기되는 저장혈 등에서 추출하는 데, 투여시 알레르기반응을 포함한 면역학적 부작용이 적은 데 반해 공급이 제한되는 단점이 있다. 한편, 동물로부터 얻는 혈색소는 주로 인간의 혈색소와 유사한 소의 혈색소(bovine hemoglobin)를 사용하는 데, 동물의 혈액에서 바이러스를 검사하는 데에 어려움이 있고 알레르기반응의 위험때문에 더 고도화 된 정

제(purification)를 필요로 하는 등의 단점이 있지만, 무제한적인 공급이 가능하고 비용이 적게 든다는 장점이 있다. 또한, 유전자 재조합을 이용한 혈색소는 대장균, 효모균(yeast) 및 동물 등의 유전자 조작을 통해 얻을 수 있는데, 세균이나 동물 자체의 오염 위험이 높기 때문에 더 복잡하고 정교한 정제 과정을 필요로 한다.

이렇게 얻은 혈색소로부터 HBOC를 만들기 위해서는 혈색소의 정제와 변형(modification) 과정이 필요하다. 정제 과정은 혈색소의 변형 시행 전과 후에 모두 필요한데, 이는 주로 혈색소 외의 세포 이물질과 변형되지 않은 사합체 혈색소(tetrameric hemoglobin)를 제거하기 위한 것이다. 혈색소의 변형은 크게 3가지로 분류되는 데, 첫 번째가 화학물질을 사용한 변형으로 혈색소의 분자내교차결합(intramolecular crosslinking)이나 중합(polymerization) 또는 거대분자로의 접합(conjugation to macromolecules) 및 이들 화학적 변형들을 조합하는 방식이고, 두 번째가 유전자 조작에 의한 변형 그리고 세 번째가 미세피막형성(microencapsulation)이다(5). 이러한 과정을 통해 혈색소 분자의 안정성을 확보하여 적절한 산소운반기능을 발휘하게 하며, 부작용을 감소시키는 물론 멸균 처리도 가능하다.

## HBOC의 발전 과정

HBOC는 발전 단계별로 크게 4세대(generation)로 나눌 수 있는데(21), 제1세대는 적혈구 세포막이 제거된 상태의 무기질 혈색소(stroma-free hemoglobin, SFHb)로서 혈관수축(vasoconstriction)을 유발하며 신장에 독성을 나타낸다. 제2세대는 신장 독성을 감소시키기 위해 알데히드 시약(aldehyde reagents)을 사용하여 혈색소를 중합시킨 것이거나 비균질적(heterogenous)이어서 혈관수축 작용이 남아있는 상태의 HBOC이다. 또한, 제3세대는 균질한 HBOC를 얻기 위해 특수한 방식의 분자내 교차결합을 시킨 것인데, 아직도 약간의 혈관 수축 작용을 가지고 있는 HBOC이다. 제4세대의 HBOC는 미세혈관 혈류(microvascular blood flow) 조절과 혈관벽으로의 산소 전달 과정에 영향을 미치는 요인들에 대한 새로운 지식을 바탕으로 혈관수축

을 감소시키기 위한 목적으로 만들어진 것이다.

인간 적혈구 내의 혈색소 분자는 2개의  $\alpha$ 와 2개의  $\beta$  폴리펩티드 사슬(polypeptide chains)이 철(iron)을 포함하고 있는 헴군(heme group)과 결합하여 이루어진 사합체(tetramer) 구조인데, 제1세대의 HBOC인 무기질 혈색소는 세포막이 제거된 상태이기 때문에 혈관 내로 투여되면 곧바로 신독성(nephrotoxicity)이 있는  $\alpha$ - $\beta$ -이합체( $\alpha$ - $\beta$ -dimer) 구조의 2개 소단위(subunit)로 분해된다(6, 9, 16). 이렇게 분해된 혈색소 이합체들은 신장을 통해 배설되는 데, 이때 혈색소 뿐만 아니라 산소도 동반하여 소실되며, 또한 혈색소 이합체가 삼투성이뇨제(osmotic diuretic)로 작용하여 오히려 혈관내 용적(intravascular volume)을 감소시키는 악영향을 미칠 수 있다. 한편, 혈색소는 분자량이 매우 작기 때문에 혈색소가 혈관의 세포간 접합부(intercellular junction)를 통해 내피세포(endothelial cells)로 혈관외유출(extravasation)되어 일산화질소(nitric oxide)와 결합함으로써 혈관수축을 일으키는 문제점도 있다(22). 그리고 혈색소가 조직에서 산소를 해리하기 위해서는 2, 3-DPG와 같은 보조인자(cofactor)가 필요한데 무기질 혈색소는 이를 포함하고 있지 않기 때문에 정상적인  $P_{50}$ (혈색소의 산소포화도가 50%일 때의 산소분압)인 26.7 mmHg보다 매우 낮은 12~14 mmHg의  $P_{50}$ 을 가진다. 이상의 여러 가지 이유들로 인하여 무기질 혈색소는 적혈구 대용제로서의 기능을 발휘하지 못한다.

이러한 무기질 혈색소의 단점을 보완하여 적혈구 대용제로서의 기능을 발휘하게 하는 방법은 혈색소를 변형하는 것이며, 앞서서도 언급한 바 있듯이 혈색소의 변형은 화학물질을 사용한 변형, 유전자 조작에 의한 변형 그리고 미세피막형성의 3가지로 나누어진다(5, 23).

화학물질을 사용한 혈색소의 변형은 혈색소의 파괴를 막아 산소 운반 기능을 보존하고 신장을 통한 빠른 배설 및 혈관수축 등의 부작용을 막기 위한 목적으로 이루어지며, 분자내교차결합, 4~5개의 혈색소분자를 결합시키는 중합, 거대분자로의 접합 및 이들 화학적 변형들을 조합하는 방식이 있다.

분자내교차결합은 무기질혈색소가 이합체로 분해되는 것을 막기 위한 시도로써 시행되었는데, diaspirin이나

glutaraldehyde와 같은 교차결합제를 사용하여 혈색소의 소단위들을 공유결합 시키는 것이다(24, 25). 분자내교차결합을 시킴으로써 신독성은 어느 정도 감소하였으나, 분자내교차결합 혈색소의 분자량이 작아 혈관내피세포로의 혈관외유출을 막지 못함으로써 혈관수축에 미치는 영향이 아직도 상당히 남아 있는 상태이며(22, 25), 심장독성(cardiotoxicity)을 일으키는 문제점이 있다(7).

접합혈색소는 무기질혈색소를 polyethylene glycol 또는 maleimide와 같은 거대분자에 접합시켜 분자량을 증가 시킴으로써 신독성을 감소시킬 뿐만 아니라 혈관내 반감기(intravascular half life)를 늘리고 혈관수축에 미치는 영향을 감소시킨 것이다(26).

중합혈색소는 사합체 혈색소를 중합하여 거대분자 사슬(macromolecular chains)로 만든 것이다(27). 중합을 통해서 교차결합이나 접합과 유사한 이점을 얻을 수 있으며, 중합체(polymer)의 크기를 조절함으로써 산소해리나 일산화질소와의 결합 특성을 정밀하게 조정할 수 있다(25, 28, 29). 또한, 변형과정을 거친 중합혈색소를 정제하여 사합체 혈색소를 2% 미만으로 감소시킴으로써 혈압상승의 부작용을 방지할 수 있다. 중합혈색소로는 인간 또는 소의 혈색소를 사용한 제품들이 있으며, 소로부터 얻는 무기질혈색소는 자원이 풍부하고, 재생가능하며, 산소 해리를 촉진하는 데에 2, 3-diphosphoglycerate (2, 3-DPG)를 필요로 하지 않는 장점이 있다(7, 23).

위에서 이미 간단히 언급한 바와 같이, 혈색소의 교차결합을 위해서는 diaspirin, glutaraldehyde, O-raffinose, 2-Nor-2-formylpyridoxal-5-phosphate 그리고 Bis (3, 5-dibromosalicyl) fumarate 등의 교차결합제(crosslinking agent)를 필요로 한다. 특히, O-raffinose, 2-Nor-2-formylpyridoxal-5-phosphate 그리고 Bis (3, 5-dibromosalicyl) fumarate 등의 이중 기능 교차결합제(dual function crosslinker)는 혈색소를 교차결합 시킴으로써 혈색소가 이합체로 분해되어 너무 빨리 배설되는 것을 막을 뿐만 아니라, 2, 3-DPG의 유사물질로도 작용하여 P<sub>50</sub>을 개선하는 효과도 있다.

화학적으로 변형된 혈색소는 신체 내에서 주로 세망내피

계(reticuloendothelial system)에 의해 제거되는 데, 순환혈액 중 반감기는 중합혈색소가 약 25~30시간이며, 접합혈색소는 이보다 더 길고, 분자내교차결합혈색소는 이보다 더 짧은 반감기를 가진다. 한편, 2, 3-DPG의 기능을 갖고 있지 못한 화학적 변형혈색소에 2, 3-DPG 유사물질을 추가하여 P<sub>50</sub>을 개선시키거나, 초과산화물 불균등화효소(superoxide dismutase, SOD)와 카탈라아제(catalase)와 같은 효소를 변형혈색소에 삽입(incorporation)함으로써 산소유리기(oxygen free radicals)로 인한 재관류손상(reperfusion injury)을 막을 수 있다.

화학적 변형 이외에도, 혈색소의 일산화질소 제거에 의한 혈관수축을 방지하기 위해 유전자 재조합기술을 이용해 일산화질소가 부착하는 혈색소의 아미노산 부위를 변화시키는 등의 유전자 조작에 의한 변형 방법도 있다(9, 15).

한편, 미세피막형성 혈색소는 혈액형 항원이 없는 피막(capsule)으로 사합체 혈색소를 감싼 것으로 2, 3-DPG를 피막 내부에 포함시킴으로써 P<sub>50</sub>과 산소해리곡선을 적혈구와 유사하게 만든 것이다. 미세피막형성 혈색소 역시 세망내피계를 통해 순환혈액으로부터 빨리 제거되는 문제점이 있으나 서브마이크론 지질막(submicron lipid membrane) 또는 polyethylene glycol과 같은 중합체(polymer)를 사용함으로써 순환시간을 개선시켜 평균 순환 반감기를 20시간 이상으로 연장시킬 수 있다. 특히 직경 200 나노미터(nanometer) 미만의 생체내분해 중합체막(biodegradable polymer membrane)을 사용함으로써 안정성과 생체내분해를 개선시켰다. 또한, 미세피막형성 혈색소 역시 피막내에 초과산화물 불균등화효소와 카탈라아제와 같은 효소 그리고 2, 3-DPG와 같은 보조인자를 포함시켜 다효소 체계(multienzyme system)를 구축함으로써 산소전달 기능을 강화하고 재관류 손상을 막을 수 있다.

## HBOC 제제의 종류와 개발 현황

HBOC 제제로서 실험실 또는 임상시험 단계에서 평가를 받았거나 받고있는 것으로는 Human Polymerized Hemoglobin (Polyheme<sup>®</sup>), Polymerized Bovine Hemoglo-

**Table 2.** Physico-chemical characteristics of modified hemoglobin solutions

	Source of Hb	Intramolecular modification	Intermolecular cross-linking	Concentration (g/dL)	Met.Hb (%)	Viscosity (cP)	COP (mm Hg)	P <sub>50</sub> (mm Hg)	T1/2 (h)	Non polymerized (%)	Clinical Develop. Phase
DCLHb	ODB	diaspirin	none	10	< 5.0	1.3	42	32	24	> 99	stopped
rHb1.1	Hum. rec.	glycine	none	5~10		1.9	42	33	2	na	stopped
rHb2.0	Hum. rec.	fusion of $\alpha$ -chains*	PEG-based*	10		2.4	68	31		na	stopped
HBOC-201	bovine		glutaraldehyde	13?	< 5.0	1.3	17	32~38	24	< 5	III finished
PolyHeme <sup>®</sup> ODB	ODB	pyridoxal phosphate	glutaraldehyde	10	< 8.0			26~30	24	≤ 1	III finished
Hemolink <sup>™</sup> ODB	ODB	o-raffinose	o-raffinose	10	< 15.0			34	20	30~40	stopped
MP4	ODB	PEG conjugation	none	4.2? .2	< 0.5	2.5? .0	55? 0	10	24	100	II / III

Hb = hemoglobin, Met Hb = methemoglobin, COP = colloid oncotic pressure, P<sub>50</sub> = O<sub>2</sub> partial pressure associated with a 50% hemoglobin saturation, T1/2 = intravascular half life (maximal values listed), ODB = outdated donor blood, hum. rec. = human recombinant, PEG = polyethylene glycol, na = not applicable, \*no more precise information was available in June 2004 (6, 9, 85)

DCLHb = HemAssist<sup>®</sup> = diaspirin cross-linked hemoglobin (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL)

rHb1.1 = human recombinant hemoglobin version 1.1 (Somatogen Inc., Boulder, CO, later Baxter Healthcare Corp.)

rHb2.0 = human recombinant hemoglobin version 2.0 (Baxter Healthcare Corp.)

HBOC-201 = Hemopure<sup>®</sup> = polymerized bovine hemoglobin (Biopure Corp., Cambridge, MA)

PolyHeme<sup>®</sup> = human polymerized hemoglobin (Northfield Laboratories Inc., Evanston, IL)

Hemolink<sup>™</sup> = hemoglobin raffimer (Hemosol Inc., Toronto, Ontario, Canada)

MP4 = Hemospan<sup>®</sup> = Maleimide-activated polyethylene glycol-modified hemoglobin (Sangart Inc., San Diego, CA)

binbased Oxygen Carrier (HBOC-201, Hemopure<sup>®</sup>), Hemoglobin Raffimer (HemoLink<sup>™</sup>), Diaspirin Cross-linked Hemoglobin (HemAssist<sup>®</sup>), Human Recombinant Hemoglobin (rHb), Enzyme Cross-linked Poly-hemoglobin, Maleimide-activated Polyethylene-glycol Modified Hemoglobin (MP4, Hemospan<sup>®</sup>), Zero-linked Hemoglobin (ZL-HbBv) 그리고 Recombinant Hybrid of Human- $\alpha$ -chains and Bovine- $\beta$ -chains 등이 있다(Table 2)(6).

이 중에는 Baxter 사(Baxter Healthcare Corp., Deerfield, Illinois, USA)의 HemAssist<sup>®</sup>와 Hemosol 사(Hemosol Inc., Toronto, Ontario, Canada)의 HemoLink<sup>™</sup>와 같이 개발이 도중에 중단된 것들도 있으나, 나머지 제제들 중에는 3기(phase III) 임상시험을 완료한 것도 있다. 다만, 현재까지 어떤 제제도 유럽이나 미국 또는 캐나다에서

임상 시판을 위한 최종 승인을 받지 못한 상태이다.

### 1. HemAssist<sup>®</sup> (Diaspirin Cross-linked Hemoglobin, DCLHb)

Baxter 사의 HemAssist<sup>®</sup> (DCLHb)는 혈액소의  $\alpha$ -소단위들을 diaspirin을 사용해서 교차결합시켜  $\alpha$ - $\beta$ -이합체로의 분해를 막고 산소 친화력을 감소시킨 것으로(30, 31), 심장 또는 비심장 수술을 받는 환자에서 동종혈액의 수혈을 감소시켰으나(32, 24), 1996년 미국 FDA로부터 3기 임상시험을 승인받고 미국과 유럽에서 외상환자를 대상으로 시험하는 도중에 미국의 시험대상자 중 DCLHb를 투여받은 환자에서의 사망률 증가로 인해 모든 임상시험이 중단되었다(24, 33, 34). 이러한 사망률 증가는 혈관수축으로 인한 고혈압에 의해 출혈이 더 심해졌기 때문으로 추정되었다(33, 34). 이 외에도 DCLHb의 투여는 황달, 췌장염 그리고

비뇨계통의 합병증을 유발하였고(6), Schubert 등(35)에 의하면 약 1,000 mg/kg의 HemAssist 투여 후 약 24~30시간 동안의 혈압 상승, 장폐쇄증(ileus)과 췌장염 등의 위장관계 부작용, 아밀라아제(amylase), 빌리루빈(bilirubin), 아미노전이효소(transaminases), 혈중요소질소(blood urea nitrogen) 그리고 크레아틴 포스포키나제(creatin phosphokinase) 수치의 상승, 황달(jaundice) 그리고 혈색소뇨(hemoglobinuria) 등의 부작용을 나타냈다.

## 2. HemoLink™ (Hemoglobin Raffimer)

Hemosol 사의 HemoLink™는 O-raffinose에 의해 혈색소의 β-시슬들을 교차결합시켜 안정적인 사합체로 만들고, 표면의 아미노산을 결합하여 혈색소 중합체로 만든 것으로 심장수술을 받는 환자에서 동종혈액의 수혈을 감소시켰다(36~38). 그러나 HBOC 제제의 일반적인 부작용인 고혈압, 췌장 효소 수치의 증가, 빌리루빈의 증가 등이 관찰되었고, 관상동맥우회로술을 받는 환자에서 3기 임상시험을 시행하는 중에 심장독성의 문제로 인해 시험이 중단되었다(14, 21).

## 3. Hemospan® (Maleimide-activated Polyethylene glycol Modified Haemoglobin, MP4)

Sangart 사(Sangart Inc., San Diego, California, USA)에 의해 개발된 접합혈색소이자 혈장증량제(plasma expander)인 Hemospan®(MP4)은 저장기한이 지난 인간의 혈색소를 maleimide-activated polyethylene glycol에 표면 접합(surface conjugation)시켜 분자의 크기를 크게 만든 것이다. 이렇게 분자의 크기를 증대시킨 목적은 HBOC 제제의 일반적인 부작용인 고혈압을 감소시키기 위한 것인데, 이는 혈관수축이 혈색소에 의한 일산화질소 제거에 의해서만 나타나는 것이 아니라 소동맥(arteriole)에서의 과도한 산소 해리에 따른 고산소혈증도 자동조절기능(auto-regulation)을 촉발하여 혈관수축을 유발할 수 있다는 가설에 근거한 것이다(39, 40). 즉, 산소와의 친화력이 크면서 혈색소 분자의 크기가 클수록 혈색소의 확산과 혈관 외 유출이 감소함으로써 혈관수축도 감소할 것을 기대하는 것이

다(41~43). 그러나 MP4의 투여 후에도 혈압의 상승이 관찰되었는데, 이는 대부분의 다른 HBOC제제들이 소동맥의 수축에 기인한 혈압상승인 데 반해 MP4의 경우는 MP4 자체의 교질적 특성(colloidal properties)으로 인한 심박출량 증가에 기인하는 것으로 추정된다(44). 자원자를 대상으로 한 1기 임상시험에서 이전의 다른 HBOC제제와 달리 MP4는 임상적으로 의미있는 고혈압이나 위장관계 합병증을 보이지 않았으며(45), 고관절 수술을 받는 90명의 고령 환자를 대상으로 한 2기 임상시험에서도 동일한 소견을 보였다(46). 이 시험에서 MP4는 특별히 심각한 부작용을 보이지 않았는데, 아밀라아제와 지질분해효소(lipase) 그리고 간 효소 수치의 미약한 상승은 통계적으로 의미가 없었고, 다만 서맥이 더 자주 나타나는 경향을 보였으나(46) 이러한 환자들에서 수술 전에 β-차단제와 같은 약물이 사용되었는 지 등에 대한 정보는 알 수 없었다. 현재 MP4는 혈액대용제로서 유럽에서는 3기, 미국에서는 2기 임상시험 중에 있고, 스웨덴에서는 심각한 사지 허혈(critical limb ischemia)을 위한 2기 임상시험 중에 있으며(47), 중등도의(moderate) 효용성과 허용할 수 있는 범위 내의 부작용을 보여주고 있다(7).

## 4. Hemopure® (HBOC-201, Polymerized Bovine Hemoglobin-based Oxygen Carrier)

Biopure 사(Biopure Corp., Cambridge, Massachusetts, USA)의 Hemopure® (HBOC-201)는 소에서 추출한 혈색소를 glutaraldehyde-lysine을 이용해 중합한 것으로 추가적인 여과(filtration) 과정을 통해 중합되지 않은 사합체 혈색소를 제거한 것이다(28, 48). 정형외과, 혈관 그리고 심장 수술을 받는 환자들을 대상으로 한 연구에서 HBOC-201의 투여는 59%의 환자에서 동종혈액의 수혈을 감소시켰으나, 혈관수축, 아밀라아제와 지질분해효소 수치의 상승과 같이 췌장 질환을 의심케 하는 소견과 복부 통증, 삼킴곤란(dysphagia), 구역(nausea), 소변감소증(oliguria), 후기에 나타나는 메트헤모글로빈혈증(methemoglobinemia) 및 항HBOC-201 면역글로블린G (antiHBOC-201 IgG)의 출현 등의 부작용을 나타냈다(16, 49~53). 하지만 HBOC-201은 심폐우회로술과 복부대동맥재건술을 받는 환자들에

서 심각한 문제 없이 사용된 경험이 있으며(16, 50, 54), Jahr 등(55)은 HBOC-201이 동종혈액의 수혈을 완전히 대체할 수는 없지만 소생술이 필요한 심각한 중환자에서 적혈구가 재생산되거나 동종혈액의 수혈이 가능한 시점까지는 사용될 수 있다고 하였다. HBOC-201 (Hemopure<sup>®</sup>)는 3기 임상시험을 완료하고, 미국 FDA로부터는 아직 시판 승인을 얻지 못했지만, 2001년 남아프리카에서 급성빈혈 상태에 있는 성인 수술 환자에서의 임상 사용을 승인 받았다(13, 56).

### 5. Polyheme<sup>®</sup>(Human Polymerized Hemoglobin)

Northfield Laboratories 사(Northfield Laboratories Inc., Evanston, Illinois, USA)의 Polyheme<sup>®</sup>은 저장기간이 지나 폐기되는 인간의 저장혈로부터 얻은 혈색소를 산소 친화력을 감소시키기 위해 pyridoxylation시키고 glutaraldehyde를 이용해 중합하여 만든 것이다(48, 57, 58). Polyheme<sup>®</sup>은 동물실험과 외상 및 응급수술을 통한 임상연구에서 동종혈액의 수혈을 감소시켰으며, 매우 낮은 적혈구 용적률(hematocrit) 상태에서도 양호한 내성을 보여주었고(29, 57, 59), 빌리루빈과 아밀라아제의 증가 이외에는 별다른 심각한 부작용을 보이지 않았으며, 특히 고혈압을 유발하지 않는 점이 흥미롭고 주목된다(6). 응급수술을 받는 171명을 대상으로 한 연구에서 낮은 적혈구 용적률을 가진 환자들에게 Polyheme<sup>®</sup>의 투여 후 양호한 생존율을 보였으나, 이전의 다른 HBOC 제제를 사용한 연구들과 비교할 때 현저한 우월성을 보이지는 않았다(17). 한편, Polyheme<sup>®</sup>은 “Polyheme Urban Ambulance Trial”을 통해 외상환자를 대상으로 3기 임상시험을 완료하였으나, 3기 임상시험 고안(design)에서의 윤리적인 문제가 논란이 되고 있다.(56, 60). 수혈이 필요한 외상환자로 이루어진 임상시험 고안에서 대조군은 병원 도착 전에 생리식염수를 투여 받고 병원 도착 후에는 동종혈액을 투여 받도록 되어 있어 별다른 문제 제기가 없었으나, 시험군은 병원 도착 전에 HBOC 제제인 Polyheme<sup>®</sup>을 투여 받고 병원 도착 후에도 병원 내에 사용할 수 있는 동종혈액을 보유하고 있는 데도 불구하고 환자나 보호자의 동의 절차 없이 Polyheme<sup>®</sup>을 투여 받

도록 하여 이에 대한 윤리적인 비난을 받고 있다(60). 이러한 윤리적인 문제 외에도 미국의 식품의약국(Food and Drug Administration, FDA)이 Northfield Laboratories 사에 시험약제인 Polyheme<sup>®</sup>의 투여에 대하여 환자 측으로부터 동의를 받는 절차를 생략할 수 있도록 면제 권한을 준 것이 타당한 조치였는 지에 대한 의문도 제기되었다(60). 하지만 예비안전실험(preliminary safety study)에서 Polyheme<sup>®</sup>은 문제가 될 정도의 심각한 혈관수축을 일으키지 않았으며 아무런 심혈관계 부작용도 나타내지 않았는데 이는 정제와 중합을 통한 변형의 결과로 보이며(17, 29), 따라서 Polyheme에 대한 윤리적인 논란이 종식되고 임상적인 효용성이 입증된다면 병원 밖에서의 출혈성 쇼크의 치료에 획기적인 개선을 가져올 것으로 기대된다.

### 6. Human Recombinant Hemoglobin (rHb)

Human Recombinant Haemoglobin (rHb)은 대장균(Escherichia coli)에서 유전자 발현된 인간 혈색소를 아미노산 배열을 변화시켜 안정화한 제제로서(61, 62), 이러한 변이를 통해 산소와의 친화력과 신독성을 감소시켰다. 일산화질소 제거로 인한 혈관수축과 이에 따른 전신(systemic) 및 폐 고혈압은 rHb의 부작용 중의 하나이며, 아밀라아제와 지질분해효소의 증가는 rHb가 췌장 미세혈류에 장애를 초래하는 것을 의미한다(63). 이후 rHb의 진전된 변형(rHb 2.0)을 통해 이러한 혈관 반응은 경감되었고(22, 64), 개와 쥐의 소생술에서 효과가 있는 것으로 입증되었으나(63, 65), 현재 더 이상의 개발이 중단된 상태이다.

### 7. Enzyme Cross-linked PolyHemoglobin

Enzyme Cross-linked Polyhemoglobin은 중합혈색소에 카탈라아제와 초과산화물 불균등화효소를 교차결합시킨 것으로 축적된 하이포크산틴(hypoxanthine)과 재관류시에 새로 공급되는 산소로부터 산소자유기가 생성되는 것을 방지하기 제제이다(6). 동물실험에서 재관류 손상으로부터의 보호 효과와 자유기 제거 효과가 입증되었지만(66, 67), 임상 적용을 위해서는 더 많은 동물 및 임상 연구가 필요하다.



## 8. Zero-linked Hemoglobin (ZL-HbBv)

Zero-linked Hemoglobin (ZL-HbBv)은 최근에 고안된 분자내 결합이 없는 소 혈색소 중합체로서, 분자의 크기가 커서 혈관 외 유출이 적고 산소 친화력이 높은 것이 특징이다(21, 68). 아직 연구가 많이 진행되지 않아 참고할 만한 연구 결과가 없는 상태이다.

## 미립자형 HBOC 제제

### 1. Hemoglobin Containing Liposomes (Neo Red Cells)

정제된 혈색소를 작은 크기(0.1~0.3  $\mu\text{m}$ )의 소포(vesicle)로 감싼 것으로 소포막의 재료로는 인지질(phospholipids), 콜레스테롤(cholesterol) 그리고  $\alpha$ -토코페롤( $\alpha$ -tocopherol)이 사용된다(69). 이렇게 혈색소를 소포로 감싸는 목적은 혈색소의 혈관내 반감기를 늘리고, 혈관수축 부작용을 감소시키며, 2, 3-DPG 또는 메트헤모글로빈 환원 효소(methemoglobin-reductase) 같은 유용한 물질을 삽입하여 혈색소의 산소 친화력을 조절하고 메트헤모글로빈 형성을 감소시키기 위함이다(48, 69, 70). 이 외에도 카탈라아제와 초과산화물 불균등화효소와 같은 효소를 소포내에 삽입함으로써 재관류손상을 감소시킬 수 있다(71). 하지만 이러한 새로운 적혈구 제제가 실용화되기까지는 많은 시간이 필요하리라 생각된다.

### 2. Polymersome Encapsulated Hemoglobin (PEH)

소의 혈색소를 polyethylene-glycol (PEG)로 이루어진 중합체소포(polymersome)로 감싼 것으로, PEG는 생물학적으로 불활성인 중합체로서 생체내 투여시에도 안전하며, 약물전달체계(drug delivery system)에 이용되고 있다(8). PEG는 중합체소포의 막에 바람직한 삼투 특성(osmotic property)을 부여하여 역학적인 저항성(mechanical resistance)을 가지고 투과성(permeability)을 조절함으로써 삼투압 차이에 의한 문제들을 경감시키는 역할을 할 수 있으며, 소포를 적절한 크기로 만드는 것을 가능하게 한다(6). 산소와의 친화력은 인간의 적혈구와 유사하며, 아직 생체내 시험이 이루어지지 못하고 있는 단계이다.

## 과불화탄소 제제

### • Perflubron (Oxygent™)

Perflubron (perfluoro-octyl bromide, Oxygent™)은 정맥 투여 후 세망내피계에 의해 흡수되는 데, perflubron의 혈관내 반감기는 투여량에 의해 결정되며 보통 수 시간 정도이다(72~75). Perflubron 입자는 세망내피계에서 분해되며, 이는 다시 혈류를 타고 폐를 통해 배출된다(72, 73). 혈액회석을 통한 동물실험에서 perflubron은 장기 기능을 개선시키고 말초조직의 산소화를 회복시켰는데(76~78), 이것은 perflubron 입자가 산소를 적절히 해리함은 물론 적혈구에 비해 크기가 매우 작아서 아주 좁거나 심지어는 거의 막힌 혈관을 통해서도 산소를 전달할 수 있었기 때문으로 추정된다(6). Perflubron은 인간을 대상으로 한 연구에서 동종혈액의 수혈을 늦추거나 감소시킬 수 있었으며(74, 75, 79~81), 이러한 효과는 대용량에서 더욱 뚜렷하였다(79). 심각한 부작용은 나타나지 않았으며, 근육통과 미열을 동반한 유행성감기(flu)와 유사한 증상과 수술 후 3~7일에 혈소판이 약 15% 정도 감소되는 부작용이 보고되었으나, 혈액응고검사와 출혈시간 그리고 혈소판 응집에 대한 별다른 영향은 없었다(82). 2001년에 심장수술 환자를 대상으로 한 3기 임상시험에서 신경학적인 부작용이 보고되어 시험이 중단되었으나, 이러한 신경학적인 부작용이 perflubron 자체에 의한 것이 아니라 심폐우회로술의 초기에 너무 빨리 혈액을 수집함으로써 발생했을 것으로 추정하고 있다(48). 현재 이 제제에 대한 뚜렷한 개발 움직임은 보이지 않고 있다.

## HBOC의 문제점 및 해결책

HBOC의 임상적 발전은 몇 가지 부작용으로 인해 지장을 받게 되었는데, 이에 해당하는 것으로는 무세포 혈색소(cell free hemoglobin)의 혈관수축효과로 인한 혈압상승, 헤모글로빈(hemoprotein)의 자동산화(autoxidation)로 인한 메트헤모글로빈 형성, 그리고 산화 스트레스(oxidative stress)를 일으키는 자유기 생성 등이 포함된다(83). 앞에서

도 언급한 바와 같이 이러한 문제점들은 혈액소의 정제 및 변형 그리고 변형 혈액소 또는 혈액소를 포함하는 미립자 소포 내에 카탈라아제와 초과산화물 불균등화효소 등의 다효소 체계(multienzyme system)를 구축해 나감으로써 해결되고 있다.

한편, Kao 등(84)은 수술이나 외상 그리고 뇌졸중 환자들에서 HBOC가 사망률과 심근경색의 발생을 증가시킨다고 하였고, Natanson 등(85)도 임상 시험이 실시된 5가지 혈액 대용제, 즉 Baxter 사의 HemAssist<sup>®</sup>, Biopure 사의 Hemopure<sup>®</sup>, Hemosol 사의 HemoLink<sup>™</sup>, Northfield Laboratory 사의 Polyheme<sup>®</sup>, Sangart 사의 Hemospan<sup>®</sup>을 대상으로 시행한 메타분석(meta-analysis)에서 이들 HBOC 제제들을 투여받은 환자들의 사망률이 대조군 환자들보다 30% 정도 증가하였고, 심장 발작의 위험도가 2.7배 증가하였다고 보고하였다. Natanson 등(85)은 이러한 결과가 HBOC 제제의 혈액소 분자가 일산화질소와 결합하여 혈관을 수축시키고 혈류를 감소시키며, 전염증매개체(pro-inflammatory mediators)와 강력한 혈관수축제(vasoconstrictors)를 유리하고, 혈소판 불활성화(inactivation) 기능의 소실을 유발하여, 심장이나 기타 장기의 혈관에 혈전증(thrombosis)을 일으키는 것에 기인하는 것으로 추정했다. 하지만 Natanson 등(85)의 연구는 몇 가지 문제점을 내포하고 있는데, 첫째, 자료수집에 있어서의 제한성으로 인해 해당 HBOC 제제들에 대한 모든 자료를 수집하기 어려웠다는 점, 둘째, 각 HBOC 제제 간에 심근경색 및 사망률의 위험도에 차이가 없었다고하나 부작용으로 인해 임상 시험이 이미 중단된 HBOC 제제들도 대상에 포함하고 있는 점 그리고, 셋째, 대조군에 사용된 처치가 생리식염수, 동종 혈액, 혈장증량제 등으로 다양하여 비균질적이었다는 점 등이 연구 결과의 정확성에 의문을 제기한다.

## HBOC와 나노생명공학

나노생명공학은 혈액소 분자의 교차결합을 통해 중합혈액소(polyhemoglobin)을 만들고, 여기에 카탈라아제와 초과산화물 불균등화효소를 결합시켜 산소운반 기능과 함께

산소자유기를 제거하는 기능을 가능하게 하였다(86). 여기서 진일보한 시도로는 나노차원(nanodimension)의 인공적혈구에 혈액소를 비롯하여 인간의 적혈구 내에 존재하는 모든 효소들을 포함하는 다효소 체계를 구축하는 것이다(86). 이 외에도 중합혈액소와 섬유소원(fibrinogen)을 결합시켜 산소운반 및 혈소판 유사 기능을 동시에 수행하게 하는 등 다기능(multifunctional) 혈액소 제제들의 개발이 시도되고 있다(86).

## 결론

Polyheme<sup>®</sup>, Hemopure<sup>®</sup>, Hemospan<sup>®</sup> 등이 유망한 HBOC 제제로서 개발되어 임상시험 중에 있거나 또는 임상 시험을 마치고 환자에의 실제 적용을 위한 평가를 기다리고 있다. 한편, 현재까지의 인공혈액은 산소운반 기능에 초점을 맞춰 개발되어 왔지만, 다음 세대의 인공혈액은 효과적인 산소공급기능과 함께 혈액 응고인자와 인공면역체는 물론 영양물질 공급까지도 가능한 전천후 혈액이 될 것으로 기대된다.

## 참고문헌

1. Mollison PL, Engelfriet P. Blood Transfusion. Semin Hematol 1999; 36: 48-58.
2. Landsteiner, Karl Landsteiner. Biography. Nobel Lectures-Physiology or Medicine 1922-1941. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1965.
3. Spiess, BD. Choose one: Damned if you do/damned if you don't! Crit Care Med 2005; 33: 1871-1874.
4. Alter HJ, Klein HG. The hazards of blood transfusion in historical perspective blood. 2008; 112: 2617-2626.
5. Smani Y, Labrude P, Vigneron C, Faivre B. Hemoglobin-based oxygen carriers and trials to substitute red blood cells. Transfus Clin Biol 2007; 14: 464-473.
6. Kocian R, Spahn DR. Haemoglobin, oxygen carriers and perioperative organ perfusion. Best Pract Res Clin Anaesthesiol 2008; 22: 63-80.
7. Winslow, RM. Current status of oxygen carriers ( 'blood substitutes'). Vox Sanguinis. 2006; 91: 102-110.
8. Arifin DR, Palmer AF. Polymersome encapsulated hemo-

- globin: a novel type oxygen carrier. *Biomacromolecules* 2005; 6: 2172-2181.
9. Spahn DR, Kocian R. Artificial O<sub>2</sub> carriers: status in 2005. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 4099-4114.
  10. Spahn DR, Pasch D. Physiological properties of blood substitutes. *News Physiol Sci* 2001; 16: 38-41.
  11. Riess, JG. Perfluorocarbon-based oxygen delivery. *Art Cells Blood Subs Immob Biotech* 2006; 34: 567-580.
  12. Riess, JG. Understanding the fundamentals of perfluorocarbons and perfluorocarbon emulsions relevant to in vivo oxygen delivery. *Art Cells Blood Subs Immob Biotech*. 2005; 33: 47-63.
  13. Habler O, Pape A, Meier J, Zwissler B. Artificial oxygen carriers as an alternative to red blood cell transfusion. *Anaesthesist* 2005; 54: 741-754.
  14. Stollings JL, Oyen LJ. Oxygen therapeutics: oxygen delivery without blood. *Pharmacotherapy* 2006; 26: 1453-1464.
  15. Standl T. Autologous transfusion-from euphoria to reason: clinical practice based on scientific knowledge. (Part IV). Artificial oxygen carriers: cell-free hemoglobin solutions-current status 2004. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2005; 40: 38-45.
  16. Jahr JS, Walker V, Manoochehri K. Blood substitutes as pharmacotherapies in clinical practice. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2007; 20: 325-330.
  17. Gould SA, Moore EE, Hoyt DB, Ness PM, Norris EJ, Carson JL, Hides GA, Freeman IH, DeWoskin R, Moss GS. The life-sustaining capacity of human polymerized hemoglobin when red cells might be unavailable. *J Am Coll Surg* 2002; 195: 445-452; discussion 452-455.
  18. Olofsson, C, Ahl T, Johansson T, Larsson S, Nellgård P, Ponzer S, Fagrell B, Przybelski R, Keipert P, Winslow N, Winslow RM. A multicenter clinical study of the safety and activity of maleimide-polyethylene glycol-modified Hemoglobin (Hemospan) in patients undergoing major orthopedic surgery. *Anesthesiology* 2006; 105: 1153-1163.
  19. Moore EE, Cheng AM, Moore HB, Masuno T, Johnson JL. Hemoglobin-based oxygen carriers in trauma care: scientific rationale for the US multicenter prehospital trial. *World J Surg* 2006; 30: 1247-1257.
  20. Standl T. A new oxygen transport agent. *Haematologica* 2005; 90: 437-438.
  21. Winslow RM. Red cell substitutes. *Semin Hematol* 2007; 44: 51-59.
  22. Doherty DH, Doyle MP, Curry SR, Vali RJ, Fattor TJ, Olson JS, Lemon DD. Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 672-676.
  23. Stollings JL, Oyen, LJ. Oxygen therapeutics: oxygen delivery without blood. *Pharmacotherapy* 2006; 26: 1453-1464.
  24. Schubert A, Przybelski RJ, Eidt JF, Lasky LC, Marks KE, Karafa M, Novick AC, O' Hara JF Jr, Saunders ME, Blue JW, Tetzlaff JE, Mascha E; Perioperative Avoidance or Reduction of Transfusion Trial (PARTT) Study Group. Diaspirin-crosslinked hemoglobin reduces blood transfusion in noncardiac surgery: a multicenter, randomized, controlled, double-blinded trial. *Anesth Analg* 2003; 97: 323-332.
  25. Yu B, Liu Z, Chang TMS. Polyhemoglobin with different percentage of tetrameric hemoglobin and effects on vasoactivity and electrocardiogram. *Art Cells Blood Subs Immob Biotech* 2006; 34: 159-173.
  26. Kim HW, Greenburg AG. Artificial oxygen carriers as red blood cell substitutes: a selected review and current status. *Art Organs* 2004; 28: 813-828.
  27. Chang TMS. Blood substitutes: principles, methods, products and clinical trials. 1st ed. Basel: Karger Landes Systems, 1997.
  28. Chang TMS. Blood substitutes based on nanobiotechnology. *Trends Biotechnol* 2006; 24: 372-377.
  29. Gould SA, Moore EE, Hoyt DB, Burch JM, Haenel JB, Garcia J, DeWoskin R, Moss GS. The first randomized trial of human polymerized hemoglobin as a blood substitute in acute trauma and emergent surgery. *J Am Coll Surg* 1998; 187: 113-120; discussion 120-122.
  30. Chatterjee R, Welty EV, Walder RY, Pruitt SL, Rogers PH, Arnone A, Walder JA. Isolation and characterization of a new hemoglobin derivative cross-linked between the alpha chains (lysine 99 alpha 1-lysine 99 alpha 2). *J Biol Chem* 1986; 261: 9929-9937.
  31. Vandegriff KD, Medina F, Marini MA, Winslow RM. Equilibrium oxygen binding to human hemoglobin cross-linked between the alpha chains by bis (3,5-dibromosalicyl) fumarate. *J Biol Chem* 1989; 264: 17824-17833.
  32. Lamy ML, Daily EK, Brichant JF, Larbuisson RP, Demeyere RH, Vandermeersch EA, Lehot JJ, Parsloe MR, Berridge JC, Sinclair CJ, Baron JF, Przybelski RJ. Randomized trial of diaspirin cross-linked hemoglobin solution as an alternative to blood transfusion after cardiac surgery. The DCLHb Cardiac Surgery Trial Collaborative Group. *Anesthesiology* 2000; 92: 646-656.
  33. Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D, Cipolle M, Runge J, Mallory MN, Rodman G Jr. Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock: a randomized controlled efficacy trial. *JAMA* 1999; 282: 1857-1864.
  34. Kerner T, Ahlers O, Veit S, Riou B, Saunders M, Pison U; European DCLHb Trauma Study Group. DCL-Hb for trauma patients with severe hemorrhagic shock: the European "On-

- Scene" multicenter study. *Intensive Care Med* 2003; 29: 378-385.
35. Schubert A, O'Hara JF Jr, Przybelski RJ, Tetzlaff JE, Marks KE, Mascha E, Novick AC. Effect of diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb HemAssist) during high blood loss surgery on selected indices of organ function. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2002; 30: 259-283.
  36. Cheng DC, Mazer CD, Martineau R, Ralph-Edwards A, Karski J, Robblee J, Finegan B, Hall RI, Latimer R, Vuylsteke A. A phase II dose-response study of hemoglobin raffimer (Hemo-link) in elective coronary artery bypass surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 127: 79-86.
  37. Hill SE, Gottschalk LI, Grichnik K. Safety and preliminary efficacy of hemoglobin raffimer for patients undergoing coronary artery bypass surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2002; 16: 695-702.
  38. Greenburg AG, Kim HW; Hemolink Study Group. Use of an oxygen therapeutic as an adjunct to intraoperative autologous donation to reduce transfusion requirements in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *J Am Coll Surg* 2004; 198: 373-383; discussion 384-385.
  39. Intaglietta M, Johnson PC, Winslow RM. Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovasc Res* 1996; 32: 632-643.
  40. Winslow RM, Vandegriff K, Wettstein R. Autoregulation and vasoconstriction: foundation for a new generation of blood substitutes. *Blood* 2002; 100: 210.
  41. McCarthy MR, Vandegriff KD, Winslow RM. The role of facilitated diffusion in oxygen transport by cell-free hemoglobins: implications for the design of hemoglobin-based oxygen carriers. *Biophys Chem* 2001; 92: 103-117.
  42. Vandegriff KD, Malavalli A, Wooldridge J, Lohman J, Winslow RM. MP4, a new nonvasoactive PEG-Hb conjugate. *Transfusion* 2003; 43: 509-516.
  43. Sakai H, Hara H, Yuasa M, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Molecular dimensions of Hb-based O<sub>2</sub> carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H908-915.
  44. Tsai AG, Cabrales P, Manjula BN, Acharya SA, Winslow RM, Intaglietta M. Dissociation of local nitric oxide concentration and vasoconstriction in the presence of cell-free hemoglobin oxygen carriers. *Blood* 2006; 108: 3603-3610.
  45. Björkholm M, Fagrell B, Przybelski R, Winslow N, Young M, Winslow RM. A phase I single blind clinical trial of a new oxygen transport agent (MP4), human hemoglobin modified with maleimide-activated polyethylene glycol. *Haematologica* 2005; 90: 505-515.
  46. Olofsson C, Ahl T, Johansson T, Larsson S, Nellgård P, Ponzer S, Fagrell B, Przybelski R, Keipert P, Winslow N, Winslow RM. A multicenter clinical study of the safety and activity of maleimide-polyethylene glycol-modified Hemoglobin (Hemospan) in patients undergoing major orthopedic surgery. *Anesthesiology* 2006; 105: 1153-1163.
  47. Smani Y. Hemospan: a hemoglobin-based oxygen carrier for potential use as a blood substitute and for the potential treatment of critical limb ischemia. *Curr Opin Investig Drugs* 2008; 9: 1009-1019.
  48. Stowell CP, Levin J, Spiess BD, Winslow RM. Progress in the development of RBC substitutes. *Transfusion* 2001; 41: 287-299.
  49. Jahr JS, Mackenzie C, Pearce LB, Pitman A, Greenburg AG. HBOC-201 as an alternative to blood transfusion: efficacy and safety evaluation in a multicenter phase III trial in elective orthopedic surgery. *J Trauma* 2008; 64: 1484-1497.
  50. LaMuraglia GM, O'Hara PJ, Baker WH, Naslund TC, Norris EJ, Li J, Vandermeersch E. The reduction of the allogenic transfusion requirement in aortic surgery with a hemoglobin-based solution. *J Vasc Surg* 2000; 31: 299-308.
  51. Kasper SM, Grüne F, Walter M, Amr N, Erasmi H, Buzello W. The effects of increased doses of bovine hemoglobin on hemodynamics and oxygen transport in patients undergoing preoperative hemodilution for elective abdominal aortic surgery. *Anesth Analg* 1998; 87: 284-291.
  52. Levy JH, Goodnough LT, Greilich PE, Parr GV, Stewart RW, Gratz I, Wahr J, Williams J, Comunale ME, Doblar D, Silvay G, Cohen M, Jahr JS, Vlahakes GJ. Polymerized bovine hemo-globin solution as a replacement for allogeneic red blood cell transfusion after cardiac surgery: results of a randomized, double-blind trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 124: 35-42.
  53. Sprung J, Kindscher JD, Wahr JA, Levy JH, Monk TG, Moritz MW, O'Hara PJ. The use of bovine hemoglobin glutamer-250 (Hemopure) in surgical patients: results of a multicenter, randomized, single-blinded trial. *Anesth Analg* 2002; 94: 799-808.
  54. Sprung J, Popp H, O'Hara P, Woletz J. The successful use of hemoglobin-based oxygen carrier as a primary blood substitute during abdominal aneurysm repair with large blood loss. *Anesth Analg* 2001; 92: 1413-1415.
  55. Jahr JS, Moallempour M, Lim JC. HBOC-201, hemoglobin glutamer-250 (bovine), Hemopure (Biopure Corporation). *Expert Opin Biol Ther* 2008; 8: 1425-1433.
  56. Henkel-Honke T, Oleck M. Artificial oxygen carriers: a current review. *AANA J* 2007; 75: 205-211.
  57. Rosen AL, Gould SA, Sehgal LR, Sehgal HL, Levine HD, DeWoskin RD, Moss GS. Effect of hemoglobin solution on compensation to anemia in the erythrocyte-free primate. *J Appl Physiol* 1990; 68: 938-943.

58. Jahr JS, Varma N. PolyHeme. Northfield Laboratories. *IDrugs* 2004; 7: 478-482.
59. Gould SA, Moore EE, Moore FA, Haenel JB, Burch JM, Sehgal H, Sehgal L, DeWoskin R, Moss GS. Clinical utility of human polymerized hemoglobin as a blood substitute after acute trauma and urgent surgery. *J Trauma* 1997; 43: 325-331; discussion 331-332.
60. Sameer S. Apte. Blood substitutes-the polyheme trials. *Mcgill J Med* 2008; 11: 59-65.
61. Hoffman SJ, Looker DL, Roehrich JM, Cozart PE, Durfee SL, Tedesco JL, Stetler GL. Expression of fully functional tetrameric human hemoglobin in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 8521-8525.
62. Looker D, Abbott-Brown D, Cozart P, Durfee S, Hoffman S, Mathews AJ, Miller-Roehrich J, Shoemaker S, Trimble S, Fermi G, Komiyama NH, Nagai K, Stetler GL. A human recombinant haemoglobin designed for use as a blood substitute. *Nature* 1992; 356: 258-260.
63. Siegel JH, Fabian M, Smith JA, Costantino D. Use of recombinant hemoglobin solution in reversing lethal hemorrhagic hypovolemic oxygen debt shock. *J Trauma* 1997; 42: 199-212.
64. Olson JS, Foley EW, Rogge C, Tsai AL, Doyle MP, Lemon DD. No scavenging and the hypertensive effect of hemoglobin-based blood substitutes. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 685-697.
65. Loeb AL, McIntosh LJ, Raj NR, Longnecker DE. Resuscitation after hemorrhage using recombinant human hemoglobin (rHb1.1) in rats: effects on nitric oxide and prostanoid systems. *Crit Care Med* 1998; 26: 1071-1080.
66. Razack S, D'Agnillo F, Chang TM. Crosslinked hemoglobin-superoxide dismutase-catalase scavenges free radicals in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion injury. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1997; 25: 181-192.
67. Powanda DD, Chang TM. Cross-linked polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase supplies oxygen without causing blood-brain barrier disruption or brain edema in a rat model of transient global brain ischemia-reperfusion. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2002; 30: 23-37.
68. Matheson B, Razynska A, Kwansa H, Bucci E. Appearance of dissociable and cross-linked hemoglobins in the renal hilar lymph. *J Lab Clin Med* 2000; 135: 459-464.
69. Sakai H, Hamada K, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E. Physical properties of hemoglobin vesicles as red cell substitutes. *Biotechnol Prog* 1996; 12: 119-125.
70. Hopman MT, Dueck C, Monroe M, Philips WT, Skinner JS. Limits to maximal performance in individuals with spinal cord injury. *Int J Sports Med* 1998; 19: 98-103.
71. Chang TM. Future generations of red blood cell substitutes. *J Intern Med* 2003; 253: 527-535.
72. Spahn DR, Leone BJ, Reves JG, Pasch T. Cardiovascular and coronary physiology of acute isovolemic hemodilution: a review of nonoxygen-carrying and oxygen-carrying solutions. *Anesth Analg* 1994; 78: 1000-1021.
73. Riess JG. Overview of progress in the fluorocarbon approach to in vivo oxygen delivery. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol* 1992; 20: 183-202.
74. Wahr JA, Trouwborst A, Spence RK, Henny CP, Cernaianu AC, Graziano GP, Tremper KK, Flaim KE, Keipert PE, Faithfull NS, Clymer JJ. A pilot study of the effects of a perflubron emulsion, AF 0104, on mixed venous oxygen tension in anesthetized surgical patients. *Anesth Analg* 1996; 82: 103-107.
75. Leese PT, Noveck RJ, Shorr JS, Woods CM, Flaim KE, Keipert PE. Randomized safety studies of intravenous perflubron emulsion. I. Effects on coagulation function in healthy volunteers. *Anesth Analg* 2000; 91: 804-811.
76. Habler OP, Kleen MS, Hutter JW, Podtschaske AH, Tiede M, Kemming GI, Welte MV, Corso CO, Batra S, Keipert PE, Faithfull NS, Messmer KF. Effects of hyperoxic ventilation on hemodilution-induced changes in anesthetized dogs. *Transfusion* 1998; 38: 135-144.
77. Keipert PE, Faithfull NS, Bradley JD, Hazard DY, Hogan J, Levisetti MS, Peters RM. Oxygen delivery augmentation by low-dose perfluorochemical emulsion during profound normovolemic hemodilution. *Adv Exp Med Biol* 1994; 345: 197-204.
78. Holman WL, Spruell RD, Ferguson ER, Clymer JJ, Vicente WV, Murrah CP, Pacifico AD. Tissue oxygenation with graded dissolved oxygen delivery during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110: 774-785.
79. Spahn DR, van Brempt R, Theilmeier G, Reibold JP, Welte M, Heinzerling H, Birck KM, Keipert PE, Messmer K, Heinzerling H, Birck KM, Keipert PE, Messmer K. Perflubron emulsion delays blood transfusions in orthopedic surgery. European Perflubron Emulsion Study Group. *Anesthesiology* 1999; 91: 1195-1208.
80. Noveck RJ, Shannon EJ, Leese PT, Shorr JS, Flaim KE, Keipert PE, Woods CM. Randomized safety studies of intravenous perflubron emulsion. II. Effects on immune function in healthy volunteers. *Anesth Analg* 2000; 91: 812-822.
81. Spahn DR, Waschke KF, Standl T, Motsch J, Van Huynegem L, Welte M, Gombotz H, Coriat P, Verkh L, Faithfull S, Keipert P; European Perflubron Emulsion in Non-Cardiac Surgery Study Group. Use of perflubron emulsion to decrease allogeneic blood transfusion in high-blood-loss non-cardiac surgery: results of a European phase 3 study. *Anesthesiology* 2002; 97: 1338-1349.
82. Spahn DR, Kocian R. The place of artificial oxygen carriers in reducing allogeneic blood transfusions and augmenting tissue oxygenation. *Can J Anaesth* 2003; 50: S41-47.

83. Vigneron C, Smani Y, Faivre B. Blood substitutes: state of the art and technical setbacks and why we are still disappointed. *Bull Acad Natl Med* 2007; 191: 837-847; discussion 847.
84. Kao LS, Gallus A. Review: Hemoglobin-based blood substitutes increase mortality and myocardial infarction in surgical, trauma, and stroke settings. *ACP J Club* 2008; 149: 4.
85. Natanson C, Kern S, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. *JAMA* 2008; 299: 2304-2312.
86. Chang TMS. Nanobiotechnological modification of hemoglobin and enzymes from this laboratory. *Biochemica et Biophysica Acta: Proteins & Proteomics* 2008; 1784: 1435-1440.



### Peer Reviewers' Commentary

전 세계적으로 수혈에 필요한 동종혈액의 부족으로 많은 문제가 야기되고 있으며, 특히 우리나라는 더욱 심각한 상황인 것으로 알려져 있다. 또한, 동종 혈액 수혈에는 감염성 질환의 전파와 면역학적 부작용이라는 위험이 상존하며 막대한 관리비용이 소요되기 때문에 이를 극복하기 위해 인공 혈액 특히 적혈구 대용제제의 개발에 관심이 집중되어 왔다. 적혈구 대용제제는 크게 혈색소 기반 산소운반체(HBOC)와 과불화화합물질(perfluorocarbon)로 구분해 볼수 있는데, 과불화화합물질을 기반으로한 적혈구 대용제제는 아직까지는 개발 단계에 머물러 있지만, 혈색소 기반 산소 운반체는 Polyheme<sup>®</sup>, Hemopure<sup>®</sup>, Hemospan<sup>®</sup> 등의 제제가 실제 인체 적용 수준에 이를 정도로 발전하였다. 이 혈색소 기반 산소 운반체는 실온에서 장기간 보관이 가능하고 대기중의 산소농도에서도 사용가능하며, 조직 관류 개선 효과가 있어서 더욱 긍정적이라 할수 있다. 하지만, 이러한 제제들이 실제 환자에게 사용되기까지는 아직도 해결해야 할 문제들이 산재해 있음을 부인할 수는 없다. 본 논문은 인공 혈액 제제 중 적혈구 대용제제에 관하여 개발 배경, 특성, 제조과정, 종류, 개발 현황과 문제점에 대하여 포괄적이면서 함축적으로 잘 설명해 주고 있으며, 향후 우리 나라에서도 생명공학기술 특히 나노생명공학기술을 활용한 제제 개발의 필요성을 잘 역설하고 있다.

[정리: 편집위원회]