

새로운 Anthracycline 항암제 DA-125의 항원성 및 면역독성에 대한 연구

백남기* · 강경구 · 김옥진 · 안병옥 · 이순복 · 김원배 · 양중익 · 정세영¹

동아제약주식회사 연구소,¹경희대학교 약학대학

A Study on Antigenicity and Immunodepressive Activity of DA-125, A New Anthracycline Anticancer Agent

Nam Gi BAIK*, Kyoung Koo KANG, Ok Jin KIM, Byoung Ok AHN, Soon Bok LEE,
Won Bae KIM, Junnick YANG and Se Young CHOUNG¹

Research Laboratories, Dong-A Pharmaceutical Co. Ltd., Kyunggido 449-900, Korea

¹College of Pharmacy, Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea

(Received August 26, 1993; accepted October 15, 1993)

Abstract—Immunologic potential of DA-125, a new anthracycline antitumor antibiotic, was investigated using guinea pigs and mice. In antigenicity experiments, guinea pigs were sensitized subcutaneously with DA-125 or DA-125 incorporated in complete Freund's adjuvant (CFA) once a week for three weeks. No systemic anaphylaxis was induced by intravenous injection of DA-125 or DA-125 incubated with guinea pig serum after 3 weeks from the last sensitization. None of sera of these animals showed any passive cutaneous anaphylactic reaction (PCA) when DA-125 or DA-125 incubated with guinea pig serum was used as a challenging antigen in homologous PCA experiment. On the other hand the treatment of guinea pigs with ovalbumin incorporated in CFA induced systemic anaphylactic reaction when challenged by intravenous injection of 5 mg/body of ovalbumin. Immunodiffusion test revealed no precipitating antibodies as detected in guinea pigs sensitized with DA-125. In 24-hour heterologous PCA reaction with sera of C57BL/6 mice immunized with DA-125 or DA-125 mixed with aluminum hydroxide gel (Alum), None of sera showed positive reaction when DA-125 or DA-125 incubated with rat serum was used as a challenging antigen. Sera of animals immunized with a mixture of ovalbumin and alum showed positive PCA reaction when 5 mg/body of ovalbumin was injected as a challenging antigen. In lymphocyte proliferation tests, spleen lymphocyte proliferation to PHA and LPS was similarly impaired by 12 mg/kg of DXR or 36 mg/kg of DA-125, and the immunodepressive activity of DA-125 showed a dose-dependent manner. From these results, it could be concluded that immunosuppression of DA-125 would be comparable to that of DXR and that DA-125 would not induce systemic allergic reaction in its clinical use.

Keywords □ DA-125, antigenicity, active systemic anaphylaxis (ASA), passive cutaneous anaphylaxis (PCA), mouse-rat PCA, immunodiffusion, immunotoxicity.

DA-125는 동아제약 연구소에서 합성한 새로운 anthracycline 유도체로서 구조식은 7-O-(2,6-dideoxy-2-fluoro- α -L-talopyranosyl)-adriamycinone-14- β -alaninate hydrochloride이며, Fig. 1과 같은 구조를 가지고 있다. DA-125는 마우스이식 L1210 및 P388 마우스 백혈병 세포와 인체암 세포를 이식한 누드마우스에서 anthracy-

cline계 항암제의 대표적인 물질인 doxorubicin(DXR) 보다 우수한 항암효과를 보이고 있으며 더욱이 중요한 심장독성이 DXR보다 약하다고 보고되고 있다(백 등, 1993a).

본 연구에서는 DA-125의 안전성 연구의 일환으로 능동전신성 아나필락시스, 수동피부 아나필락시스, 면역확산법 등의 시험을 통해 DA-125의 항원성을 평가하였으며, 임파구증식시험을 실시하여 세포성 및 체액성 면역에

*To whom correspondence should be addressed.

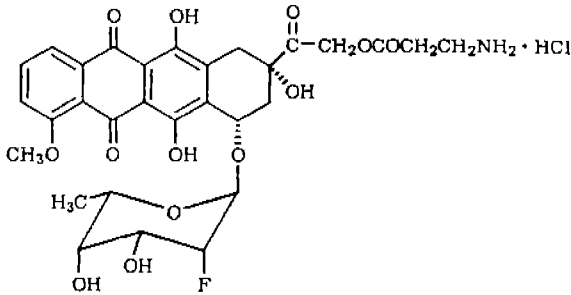


Fig. 1. Chemical structure of DA-125.

미치는 DA-125의 영향을 조사하였다.

실험방법

시험물질

동아제약 연구소에서 합성한 DA-125(Lot DA-125-033)를 사용하였고, 양성대조로는 ovalbumin(OVA, Lot 100H 0872, Sigma)과 doxorubicin(DXR, CTXB-2014, Meiji Seika)을 사용하였다. Adjuvant로는 complete Freund's adjuvant(CFA, Control 3231, Difco)와 荻田와 水島の 방법(1977)에 따라 제작한 aluminum hydroxide gel (Alum)을 사용하였다. 면역독성시험에서는 mitogen으로 phytohemagglutinin(PHA, Lot 41H-9412, Sigma)과 lipopolysaccharide(LPS, Lot 70H-4042, Sigma)를 사용하였으며, [methyl ³H]-thymidine(lot 3043197, NEN)을 임파구 증식의 지표로 하였다. 그외에 Evans blue(Lot 31H 0562, Sigma), agarose(Lot 101, Takara Biomed.), Tris-barbiturate buffer(pH 8.6±0.1, Lot 17041, Sigma), RPMI1640(Lot 62K7028, Gibco), 주사용 증류수(Lot AAW3AB, 증외제약), 주사용 생리식염수(Lot 3062F08, 대한약품공업주식회사) 그리고 L(+)-lactic acid(Lot 72H 0353, Sigma) 등을 사용하였다.

사용동물

C57BL/6계 수컷 마우스(사용시 체중 25~25 g, 9주령), ICR계 수컷 마우스(사용시 28~32 g, 9주령), Sprague-Dawley계 랫드(사용시 체중 390~450 g, 14주령) 그리고 Hartley계 기니픽(사용시 체중 330~360 g, 5주령)을 일본 Charles River사로부터 구입하여 2주 이상 검역 및 예비사육 후에 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 시험기간 중 모든 동물은 온도 23±2℃, 습도 45~65%, 그리고 조명시간 12시간(조명 8:00~20:00)으로 설정된 사육실에 수용하였으며, 마우스와 랫드에는 마우스용 사료(제일제당)를, 기니픽에는 기니픽용 고형사료(Oriental Yeast Co. Ltd., Japan)를 그리고 물은 상수도수를 자유섭취시켰다.

시험군 구성

항원성시험과 면역독성시험의 군구성은 아래 표와 같다.

1) Active systemic anaphylaxis

Group	No. of animals	Sensitization	Challenge
1	3	1 mM lactic acid	DA-125, 12.5 mg/kg
	3		OVA, 5 mg/body
2	3	DA-125, 2.5 mg/kg	DA-125, 12.5 mg/kg
	3		DA-125 + GSA, 5 mg/body
3	3	DA-125, 12.5 mg/kg	DA-125, 12.5 mg/kg
	3		DA-125 + GSA, 5 mg/body
4	3	DA-125 + CFA, 12.5 mg/kg	DA-125, 12.5 mg/kg
	3		DA-125 + GSA, 5 mg/body
5	6	OVA + CFA, 1 mg/body	OVA, 5 mg/body

2) Passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs

Group	No. of animals	Sensitization	Challenge
1	3	Anti-GP-1 mM lactic acid	DA-125, 12.5 mg/kg
	3		OVA, 5 mg/body
2	3	Anti-GP-DA-125, 2.5	DA-125, 12.5 mg/kg
	3		DA-125 + GSA, 5 mg/body
3	3	Anti-GP-DA-125, 12.5	DA-125, 12.5 mg/kg
	3		DA-125 + GSA, 5 mg/body
4	3	Anti-GP-DA-125 + CFA, 12.5	DA-125, 12.5 mg/kg
	3		DA-125 + GSA, 5 mg/body
5	3	Anti-GP-OVA + CFA	OVA 5 mg/body

3) Immunodiffusion (Ouchterlony method)

Group	No. of animals	Sensitization	Challenge
1	3	1 mM lactic acid	DA-125
	3		DA-125 + GPS
2	3	DA-125, 2.5 mg/kg	DA-125
	3		DA-125 + GPS
3	3	DA-125, 12.5 mg/kg	DA-125
	3		DA-125 + GPS
4	3	DA-125 + CFA, 12.5 mg/kg	DA-125
	3		DA-125 + GPS
5	6	OVA + CFA, 1 mg/body	OVA, DA-125, DA-125 + GPS

4) Mouse-rat PCA reaction

Group	No. of animals	Sensitization	Challenge
1	6	1 mM lactic acid	DA-125, 12.5 mg/kg
	6		OVA, 5 mg/body
2	6	DA-125, 2.5 mg/kg	DA-125, 12.5 mg/kg
	6		DA-125 + RSA, 5 mg/body
3	6	DA-125, 12.5 mg/kg	DA-125, 12.5 mg/kg
	6		DA-125 + RSA, 5 mg/body
4	6	DA-125 + CFA/ 12.5 mg/kg	DA-125, 12.5 mg/kg
	6		DA-125 + RSA, 5 mg/body
5	6	OVA + CFA, 1 mg/body	OVA, 5 mg/body

시험방법

감작항원 및 유발항원 조제

감작항원의 조제는 기니픽 감작시 DA-125를 pH 4.0의 1 mM lactic acid 용액에 용해시켜 조제하였으며, DA-125 + CFA 혼합 감작항원은 DA-125를 pH 4.0의 1 mM lactic acid 용액에 용해시킨 후 이 용액을 동량의 CFA와 혼합하여 조제하였다. Ovalbumin 감작항원은 ovalbumin을 saline에 용해시킨 후 동량의 CFA를 혼합하여 조제하였다. 마우스를 감작시 감작항원의 조제는 기니픽을 감작시와 모두 동일하게 조제하였으나 면역보조제로 alum을 사용하였다.

DA-125와 ovalbumin으로 단독 유발시는 각각의 물질만을 pH 4.0의 1 mM lactic acid 용액과 saline에 용해시켜 유발항원을 조제하였으며, DA-125와 혈청의 배양항원(DA-125+GPS 또는 DA-125+RS)은 DA-125를 기니픽 또는 랫드 혈청에 용해시켜 37°C에서 2시간 배양하여 조제하였다.

기니픽을 이용한 시험

능동전신성 아나필락시스(active systemic anaphylaxis) : 군당 6마리의 기니픽에 1군에는 1 mM lactic acid 용액을, 2군에는 DA-125 2.5 mg/kg을, 3군에는 DA-125 12.5 mg/kg을, 4군에는 DA-125와 complete Freund's adjuvant(CFA)의 혼합액 12.5 mg/kg을, 그리고 5군에는 ovalbumin과 CFA 동량 혼합액 1 mg/body의 감작항원을 주 1회씩 3주간 피하로 개체당 0.5 ml을 5개소에 분할 투여하여 감작시키고 3주 후에 유발항원을 정맥내 투여하여 ASA 반응을 관찰하였다. 증상은 유발항원 주사 후 2시간 동안 아래의 기준에 따라 관찰하였다.

Grade 0 : 무증상, 불안

- I : 위의 증상+전신떨림, 코비비기, 재채기, 기침
- II : 위의 증상+배뇨, 호흡곤란, 도약, 돌진
- III : 위의 증상+혈떡임, 몸부림, 경련
- IV : 폐사

수동피부 아나필락시스(passive cutaneous anaphylaxis) : ASA에서 감작시킨 기니픽을 최종 감작 후 17일째에 ether 마취하에 심장으로부터 2 ml의 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. 이하 PCA 반응은 Ovary(1958)의 방법에 따라 실시하였다. 즉 분리한 혈청을 생리식염수로 2배 계단 희석하여 2배에서 1024배까지 희석한 후 무처리 기니픽의 피내에 각각 0.1 ml씩 주사하였다. 혈청주사 4시간 후에 각각의 유발항원과 5% Evans blue액을 혼합한 것을 1 ml씩 정맥내 투여하고 30분 후에 방혈치사시켜 피부내측에 유출된 Evans blue 반점을 확인하였다. 반점이 직경 5 mm 이상인 것을 양성으로 하여 양성을 나타낸 최대 희석배수를 항체가로 하였다.

면역확산법(immunodiffusion) : Agarose를 Tris-barbiturate buffer에 1%로 용해시켜 GelBond film(84×94 mm) 위에 gel화 시켰다. 천공기를 이용하여 well을 뚫은

뒤 각각의 well에 항혈청과 항원액을 넣고 반응시켰다. 반응은 48시간 후까지 관찰하였다. 시험에서 기니픽 감작혈청은 원액으로, 항원은 DA-125 12.5, 2.5, 1, 0.5, 0.1 mg/ml을 pH 4.0, 1 mM lactic acid 용액에 용해시켜 OVA는 1.0, 0.5, 0.1 mg/ml을 증류수에 용해시켜 사용하였다. 또한 DA-125와 기니픽 혈청의 배양항원은 DA-125를 기니픽 혈청에 240 mg/ml의 농도로 용해시켜 37°C에서 2시간 배양한 것을 사용하였다.

마우스-랫드 PCA 반응(mouse-rat PCA reaction) : 각 군 6마리의 웅성 C57BL/6 마우스에 1군에는 1 mM lactic acid 용액, 2군에는 DA-125 2.5 mg/kg, 3군에는 DA-125 12.5 mg/kg을, 4군에는 DA-125와 aluminum hydroxide gel(Alum)의 동량 혼합액 12.5 mg/kg, 그리고 5군에는 ovalbumin과 alum 동량 혼합액 1 mg/body의 감작항원을 시험 1일과 15일째에 2회 0.5 ml/마리의 액량으로 복강내 투여하였다. 최종감작 후 1주와 2주 후에 각군 반수의 동물에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 SD 랫드를 이용하여 PCA 시험을 실시하였다. 랫드 PCA는 荻田과 水島(1977)의 방법에 따라 실시하였다. 즉 마우스 혈청을 생리식염수로 2배 계단희석하여 4배에서 1024배까지 희석된 마우스 희석혈청 0.1 ml을 랫드의 배부 피내에 주사하고 24시간 후에 각각의 유발항원과 Evans blue 혼합용액 1 ml을 랫드의 미정맥내로 투여하였다. 그리고 30분 후에 랫드를 방혈치사시켜 Evans blue 반점을 확인하고 직경 5 mm 이상인 경우를 양성으로 판정하여 양성을 나타낸 최대희석배수를 항체가로 하였다.

임파구증식시험(lymphocyte proliferation test)

시험설계 : 외견상 건강한 9주령의 수컷 ICR계 마우스 35마리를 군당 5마리씩 7개군으로 분리하여 DA-125 6, 12, 24, 36 mg/kg, doxorubicin 6, 12 mg/kg, 용매대조로 생리식염수를 각각 10 ml/kg의 액량으로 단회 미정맥내 주사하였다. 투여 후 3일에 모든 동물을 정추탈구법으로 도살하여 비장과 흉선을 분리, 장기중량을 측정하였으며, 통상적인 방법에 의해 병리조직학적 검사를 실시하였다.

비장세포의 분리 및 mitogen의 처리 : 무균적으로 분리한 비장을 stainless mesh(No. 22~24)상에서 10% fetal calf serum을 포함한 RPMI 1640배지를 가하면서 갈아 비장세포 부유액을 얻었다. 얻어진 비장세포(임파구) 부유액은 원심분리(1000 rpm, 10 min)와 세척을 2회 반복한 후 증류수에 단시간 노출시켜 결제조직과 적혈구를 제거하였다. RPMI 1640배지에 부유시킨 임파구를 trypan blue를 이용하여 1.2×10^6 viable cells/ml의 농도로 조정하였으며, 이 부유액 0.2 ml(2.5×10^5 cells)을 각 군별로 96-well microplate에 분주하였다. T 임파구 증식에 미치는 약물의 영향을 조사하기 위해 mitogen으로 PHA 1 μ g/10 μ l/well를, B 임파구의 mitogen으로 LPS 8 μ g/10 μ l/well을 각각 첨가하였다. 대조군에는 동량의 배지를 첨가하였으며, 각각의 조건은 triplicate로 실시하였다.

배양 및 방사능측정 : Mitogen을 처리한 96-well plate를 37°C, 5% CO₂, 가습조건에서 54시간 배양 후 methyl ³H-thymidine을 1 μCi/well이 되게 첨가하여 18 시간을 배양하였다. 배양 후 배양액을 cell harvester (LABO Science)로 glassmicrofiber filter(Whatman)에 모은 후 3차 증류수로 세척하고 methanol로 건조시켰다. 여과지를 바이알에 넣은 후 카테일용액(Formula 989) 2 ml을 가해 β-counter(Pakard Inc.)로 그 방사능을 측정하였으며, 각각의 cpm값의 평균을 구해 대조군에 대하여 % control치를 구하여 구간 비교를 실시하였다.

실험결과

능동전신성 아나필락시스

기니픽을 각각의 감작항원으로 감작도중 DA-125 12.5 mg/kg 감작군의 6마리 그리고 DA-125+CFA 12.5 mg/kg 감작군의 2마리가 3회째 감작투여 후 창백, 설사, 쇠약 그리고 수척 등의 증상을 보이다가 폐사하였다.

능동전신성 아나필락시스 시험결과는 Table I에 나타난 것과 같이 DA-125 2.5 및 DA-125+CFA 12.5 mg/kg 투여군에서 DA-125 12.5 mg/kg 또는 DA-125+GPS 5 mg/body의 유발주사에 의해 어떤 동물도 아나필락시스 쇼크 증상을 나타내지 않았다. 반면 양성대조군 ovalbumin과 CFA 혼합액을 1 mg/body로 투여한 군에서는 ovalbumin 5 mg/body의 유발주사에 의하여 전 동물이 전형적인 아나필락시스쇼크 증상을 나타내다가 유발항원주사 3~4분 후에 전 동물이 폐사하였다.

수동피부 아나필락시스

기니픽 동종 PCA 반응의 결과는 Table II에 나타났으며 DA-125 2.5, 12.5 mg/kg 그리고 DA-125+CFA 12.5 mg/kg 감작군에서 DA-125 12.5 mg/kg 또는 DA-125+GPS 5 mg/body의 유발주사시에 전 동물의 PCA 항체가 2 이하로 검출한계 이하를 나타냈으나 양성대조군인

OVA+CFA 감작군에서는 OVA 5 mg/body의 감작주사에 의해 전 동물이 1024의 PCA 항체가를 나타냈다.

면역확산 시험

면역확산 시험결과는 Table III에 나타내었다. 대조군과 DA-125로 감작시킨 기니픽의 혈청을 DA-125 단독 또는 DA-125와 기니픽 혈청 배양항원을 이용하여 agar gel immunodiffusion 반응을 실시하였을 때 침강선은 어느 군에서도 형성되지 않았다. 반면 양성대조군인 OVA 감작군에서는 모든 개체에서 명확한 침강선이 형성되었다.

마우스-랫드 PCA 시험

마우스-랫드 PCA 시험결과는 Table IV와 같다. DA-125 2.5, 12.5 mg/kg 그리고 DA-125+alum 12.5 mg/kg 감작군에서 DA-125 12.5 mg/kg 또는 DA-125+RS 5 mg/body의 유발주사에 의해 모든 동물의 PCA 항체가 4 이하로 검출한계 이하를 나타냈으나 양성대조군인 OVA+alum 감작군에서는 2번째 감작주사 1주 후에 채취한 동물의 혈청은 3마리 모두 16의 PCA 항체가를 나타냈으며, 2번째 감작주사 2주 후에 채취한 동물의 혈청은 8의 PCA 항체가를 나타냈다.

임파구 증식시험

체중 및 장기중량에 대한 영향 : 각 약물이 체중과 흉선 및 비장중량에 미치는 영향은 Table V와 같다. 체중측정 결과 투여 후 3일에 모든 약물투여군에서는 체중증가의 억제가 인정되었으며, DXR 12 mg/kg 용량군과 DA-125 36 mg/kg 용량군에서는 대조군에 비해 유의한 체중증가 억제를 보였다. 비장과 흉선중량 측정결과에서도 모든 약물투여군은 대조군에 비해 용량상관성을 보이며 유의한 감소를 나타내었다.

병리조직 검사 : 약물투여 후 3일에 실시한 비장과 흉선에 대한 병리조직학적 검사결과 약물의 영향으로 판단되는 변화로는 흉선 피질부의 위축과 세포충실도의 감소, 비장의 백비수위축 등이 관찰되었다. DXR 12 mg

Table I. Effects of DA-125 on active systemic anaphylaxis in guinea pigs

Sensitization	Route	Challenging antigen	Number of animals	Severity				
				0 ^b	I	II	III	IV
1 mM lactic acid	sc	DA-125 12.5 mg/kg	3	3	0	0	0	0
		OVA, 5.0 mg/body	3	3	0	0	0	0
DA-125 2.5 mg/kg	sc	DA-125 12.5 mg/kg	3	3	0	0	0	0
		DA-125+GPS ^a 5 mg/body	3	3	0	0	0	0
DA-125 12.5 mg/kg	sc	all death before challenge	0	—	—	—	—	
			0	—	—	—	—	
DA-125+CFA 12.5 mg/kg	sc	DA-125 12.5 mg/kg	2	2	0	0	0	0
		DA-125+GPS, 5 mg/body	2	2	0	0	0	0
OVA+CFA 1 mg/body	sc	OVA, 5 mg/body	6	0	0	0	0	6

^aDA-125+GPS : antigen solution in which DA-125 was incubated with guinea pig serum at 37°C for 2 hours.

^b(0) normal, restless; (I) above symptoms plus trembling, rubbing nose, sneezing, coughing; (II) above symptoms plus urination, respiratory depress, jumping, rushing; (III) above symptoms plus gasping, writhing, convulsion; (IV) death.

— : Challenge could not be conducted due to all death of the animals before challenge.

Table II. Results of passive cutaneous anaphylaxis of DA-125 in guinea pigs

Sensitizing antigen	Number of guinea pig antisera	Challenging antigen		
		DA-125 12.5 mg/kg	DA-125+GPS ^a 5 m/body	OVA 5 mg/body
1 mM lactic acid	1	<2 ^b	NT ^c	<2
	2	<2	NT	<2
	3	<2	NT	<2
DA-125 2.5 mg/kg	4	<2	<2	NT
	5	<2	<2	NT
	6	<2	<2	NT
DA-125 12.5 mg/kg	7	<2	<2	NT
	8	<2	<2	NT
	9	<2	<2	NT
DA-125+CFA 12.5 mg/kg	10	<2	<2	NT
	11	<2	<2	NT
	12	<2	<2	NT
OVA+CFA 1 mg/body	13	NT	NT	1024
	14	NT	NT	1024
	15	NT	NT	1024

^aDA-125+GPS, antigen solution in which DA-125 was incubated with guinea pig serum at 37°C for 2 hours.

^bPCA titer.

^cNot tested.

Table III. Results of immunodiffusion of DA-125

Sensitizing antigen	Guinea pig serum No.	DA-125 mg/ml					DA-125+GPS ^a mg/ml			OVA mg/ml		
		12.5	2.5	1.0	0.5	0.1	1	0.5	0.1	1.0	0.5	0.1
1 mM lactic acid	1	-	-	-	-	-	-	-	-	NT ^b	NT	NT
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
DA-125 2.5 mg/kg	4	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
DA-125 12.5 mg/kg	7	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
DA-125+CFA 12.5 mg/kg	10	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
OVA+CFA 1 mg/body	13	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

^aAntigen solution in which DA-125 was incubated with guinea pig serum at 37°C for 2 hours. 2.

^bNot tested.

/kg 용량군과 DA-125 24, 36 mg/kg 용량군에서는 흉선 피질부의 위축과 성숙 림파구수의 감소, 수질부의 세포 충실도 감소 등이 인정되었으며, 그 외의 투여군에서는 대조군에 비해 특기할 만한 변화가 관찰되지 않았다. 한편 비장의 조직소견에서는 DA-125 36 mg/kg 용량군에서만 백비수의 약한 위축이 관찰되었으며, 그 외의

약물투여군에서의 조직상은 대조군과 유사하거나 개체에 따라서는 대조군에서 보다 백비수가 증대되어 관찰되기도 하였다. 병리조직검사서 두 약물에 의한 독성병변 양상은 유사한 것으로 판단되었으며, 약물간의 특이한 차이는 인정되지 않았다.

림파구증식에 미치는 영향 : Mitogen에 의한 림파구

Table IV. Results of passive cutaneous anaphylaxis of DA-125 in rats

Sensitizing antigen	Serum sampling time	Number of mouse antisera	Challenging antigen		
			DA-125 12.5 mg/kg	DA-125 + RS ^a 5 mg/body	OVA 5 mg/body
1 mM lactic acid	1 week ^b after 2nd immu.	1	<4 ^c	NT ^d	<4
		2	<4	NT	<4
		3	<4	NT	<4
	2 weeks after 2nd immu.	4	<4	NT	<4
		5	<4	NT	<4
		6	<4	NT	<4
DA-125 2.5 mg/kg	1 week after 2nd immu.	7	<4	<4	NT
		8	<4	<4	NT
		9	<4	<4	NT
	2 weeks after 2nd immu.	10	<4	<4	NT
		11	<4	<4	NT
		12	<4	<4	NT
DA-125 12.5 mg/kg	1 week after 2nd immu.	13	<4	<4	NT
		14	<4	<4	NT
		15	<4	<4	NT
	2 weeks after 2nd immu.	16	<4	<4	NT
		17	<4	<4	NT
		18	<4	<4	NT
DA-125+alum 12.5 mg/kg	1 week after 2nd immu.	19	<4	<4	NT
		20	<4	<4	NT
		21	<4	<4	NT
	2 weeks after 2nd immu.	22	<4	<4	NT
		23	<4	<4	NT
		24	<4	<4	NT
OVA+alum 1 mg/body	1 week after 2nd immu.	25	NT	NT	16
		26	NT	NT	16
		27	NT	NT	16
	2 weeks after 2nd immu.	28	NT	NT	8
		29	NT	NT	8
		30	NT	NT	8

^aDA-125+RS, antigen solution in which DA-125 was incubated with rat serum at 37°C for 2 hours.

^b1 week after second immunization.

^cPCA titer.

^dNot tested.

Table V. Effects of DXR or DA-125 on body and organ weights

Group	Body weight change (g)		Organ weights (mg) ^a	
	Day 0	Day 3	Spleen wt.	Thymus wt
Saline	31.4± 2.7	33.4± 2.2	146.0± 4.4	42.3± 7.5
DXR 6 mg/kg	30.8± 1.4	31.1± 1.5	104.7± 14.6 ^b	22.3± 1.5 ^b
DXR 12 mg/kg	30.9± 2.0	27.8± 0.9 ^b	49.0± 12.8 ^b	12.7± 1.5 ^b
DA-125 6 mg/kg	29.3± 1.1	30.7± 1.4	81.3± 8.1 ^b	18.3± 5.7 ^b
DA-125 12 mg/kg	31.1± 2.1	30.1± 4.7	70.7± 7.5 ^b	17.3± 2.1 ^b
DA-125 24 mg/kg	31.7± 2.1	30.9± 2.2	59.6± 6.6 ^b	14.7± 3.5 ^b
DA-125 36 mg/kg	31.0± 1.8	29.1± 0.9 ^b	91.3± 34.7 ^b	14.0± 1.0 ^b

^aOrgan weights were measured 3 days after single intravenous administration.

^bSignificantly different from control group (p<0.05).

Table VI. Effects of DXR or DA-125 on [methyl-³H] thymidine incorporation in lymphocytes

Group	Mitogen-gree	PHA	LPS
Saline	5087±1609 ^a	17912±932	59680±11786
DXR 6 mg/kg	2697±787 (53.0) ^b	13963±1175 (78.0)	72785±6178 (122.0)
DXR 12 mg/kg	4943±240 (97.2)	6259±2172 (34.9)	12889±2630 (21.6)
DA-125 6 mg/kg	5878±3316 (115.5)	16613±2709 (92.7)	65151±10690 (109.2)
DA-125 12 mg/kg	4955±1941 (97.4)	12690±1125 (70.8)	45075±5903 (75.5)
DA-125 24 mg/kg	5371±1694 (105.6)	10749±2409 (60.0)	25805 ^c (43.2)
DA-125 36 mg/kg	4534±2991 (89.1)	7296±467 (40.7)	19274±3567 (32.3)

^aUnit : cpm.

^b% of control.

^cOnly a single datum was available.

증식에 미치는 각 약물의 영향은 Table VI과 같다.

Mitogen 부재시 각 약물의 임파구증식에 대한 영향은 미미한 것으로 나타났다. Mitogen에 의한 T 임파구와 B 임파구의 증식에 대한 각 약물의 영향을 비교한 결과 DXR과 DA-125 모두 용량의존성을 나타내며 T 임파구와 B 임파구의 증식을 억제하였다. DXR 12 mg/kg 용량군에서는 T 임파구와 B 임파구의 증식이 대조군에 비해 각각 34.9, 21.6%로 억제되었으며, 동일용량의 DA-125 투여군에서는 대조군에 비해 각각 70.8, 75.5%로 나타났다. DA-125 36 mg/kg의 용량군에서는 T 임파구와 B 임파구의 증식능이 대조군에 비해 각각 40.7, 32.3%로 나타났다. DXR 6 mg/kg 용량군과 DA-125 6 mg/kg 용량군에서는 대조군과 유사한 정도의 임파구증식능을 나타내어 약물의 영향이 적은 것으로 판단되었다.

고 찰

새로운 anthracycline계 항암제인 DA-125의 면역계에 대한 영향을 검토하기 위하여 항원성시험과 면역독성시험을 실시하였다. 항원성을 조사하기 위해 DA-125를 추정임상사용량, 그리고 추정임상사용량의 5배량 및 추정임상사용량의 5배량과 면역보조제인 complete Freund's adjuvant 또는 aluminum hydroxide gel(Alum)과의 혼합물을 기니픽과 마우스에 피하 또는 복강내 투여로 감작시킨 후 기니픽에서 능동전신성 아나필락시스반응(ASA), 수동피부 아나필락시스반응(PCA) 랫드에서 PCA 반응 그리고 기니픽 혈청을 이용한 면역확산시험을 실시하였다. 면역독성시험에서는 임파구증식시험계를 이용하여 세포성 면역과 체액성 면역에 대한 DA-125의 영향을 조사하였으며, 또한 그 영향정도를 동일계의 대표적

항암제인 doxorubicin(DXR)과 비교하였다.

항원성시험결과 기니픽에 DA-125 단독 또는 adjuvant와 혼합투여에 의한 아나필락시스쇼크 및 혈청중 PCA 항체는 인정되지 않았으나 양성대조인 ovalbumin 투여군에서는 전 동물이 아나필락시스쇼크 증상을 보이고 폐사하였으며, 이 동물의 혈청을 이용한 동종 PCA 반응결과 1024의 PCA 항체가를 나타냈다. 이러한 결과는 기니픽에서 DXR의 항원성이 인정되지 않았다고 하는 시험결과(淸原 등, 1972)와는 일치하는 결과였으나 또다른 anthracycline계 항암제인 tetrahydropyran-yl-adriamycin(THP-ADM)이 기니픽과 마우스에서 약한 항원성을 나타냈다고 하는 보고(幕部 등, 미발표)와는 차이를 나타내는 결과였다. 면역확산법을 이용하여 기니픽에서 DA-125 반복 감작에 의한 혈중 항체생성 유무를 검토한 결과 DA-125를 단독 또는 면역보조제인 complete Freund's adjuvant와 혼합하여 감작시킨 군 모두에서 침강선이 형성되지 않아 면역확산법에 의해 검출가능한 IgG 계열의 항체는 형성되지 않은 것으로 나타났으며 양성대조인 OVA 감작군에서는 침강선이 형성되어 IgG 계열의 항체가 생성된 것을 알 수 있었다. 이 시험의 결과는 기니픽에서의 능동전신성 아나필락시스 시험과 기니픽 및 랫드 PCA 시험에서 DA-125에 의한 반응이 모두 음성으로 나타난 결과와 함께 DA-125가 기니픽에서 항원성을 나타내지 않는 것을 의미하는 결과이다. 마우스-랫드 이중 PCA 반응은 기니픽 PCA 반응과 달리 IgG₁이 관여하지 않는다고 하는 것이 Mota와 Wong(1969)의 보고로 알려진 이후로 마우스-랫드 PCA 반응은 IgE형의 항체생성 유발유무를 확인하는 시험계로 자주 이용되고 있다. 본 시험결과 DA-125는 약물 단독 또는 IgE형의 항체생성을 촉진하는 면역보조제인 alum과의 혼합투여에 의하여 감작시 마우스-랫드 PCA 반응에서 PCA 항체가 4이하로 검출한계 이하를 나타내 DA-125 특이성의 IgE형 항체를 생성시키지 않는 것으로 판단되었다. 반면 양성대조로 사용한 ovalbumin과 alum 혼합투여군에서는 최종감작 1주 및 2주 후에 실시한 2회의 랫드 PCA 반응에서 각각 16과 8의 PCA 항체가 나타나 ovalbumin 특이성의 IgE형 항체가 생성된 것으로 나타났다.

임파구증식 시험에서 약물투여 후 3일에 비장세포를 분리하였는데 이는 DA-125의 단회 정맥내 투여시 말초 혈액 중 백혈구수와 비중, 흉선 등 면역관련장기 등의 중량이 가장 감소하는 시기이기 때문이었다(백 등, 1993 b). 그러나 예비시험에서 약물투여 후 1일에 비장세포를 분리하여 임파구 증식시험을 실시한 결과에서는 비록 말초혈액 중 백혈구수와 비중, 흉선중량의 감소가 경미하였으나 PHA와 LPS에 의한 T, B 임파구의 증식은 투여 후 3일에서보다 더 억제된 것으로 판단되었다(미발표 자료). 이러한 결과는 동일계 항암제인 FCE 23762의 시험결과와 일치하는 것으로 생각되었다. FCE 23762의 시험에서는 약물투여 후 1일부터 4일까지 연일 비장세

포를 분리하여 Con A와 LPS에 대한 임파구증식능을 비교한 결과 투여 후 1, 2일에 증식능이 가장 억제되었다가 투여 후 3일부터 신속히 회복되었다고 하였다(Fornasiero 등, 1992). 그러므로 임파구증식능을 지표로 볼때 anthracycline계 항암제의 경우 투여즉시 면역기체에 손상을 주며, 이에 따른 혈중 백혈구수와 비장, 흉선 등의 위축이 이차적으로 발현되는 것으로 판단되었다.

한편 임파구증식 시험에서 DXR과 DA-125는 모두 비장, 흉선의 중량과 임파구증식능에 대해 용량의존적으로 유사한 억제를 나타내었으며, 병리조직상에서도 차이점은 인정되지 않았다. 그러나 DXR 12 mg/kg 용량군에서는 대조군에 비교하여 T, B 임파구에 대해 34.9, 21.6%로 증식능을 억제하였으나 그 3배 용량인 DA-125 36 mg/kg 용량군에서는 T, B 임파구에 대해 40.7, 32.3 정도의 억제가 나타나 임파구증식에 미치는 면역독성은 DA-125가 DXR에 비해 약한 것으로 판단되었다. DXR과 DA-125의 고용량군에서는 또한 T 임파구보다 B 임파구가 더 영향을 받는 경향을 나타내었다.

이상의 결과에 의하면 DA-125는 추정임상사용량의 5배량까지 단독 또는 면역보조제와의 혼합감작에 의하여 아나필락시스쇼크 및 혈청중 항체생성을 일으키지 않는 것으로 나타나 임상에서 약물자체만을 투약할 경우 약물에 의한 전신성 allergy 반응이 나타날 가능성은 희박할 것으로 판단되었으며, 임파구증식시험을 이용한 면역독성시험결과에서 DA-125는 투여 후 3일에 용량의존적인 임파구증식능억제를 보였으나 이는 동일계의 DXR보다도 경미하여 DA-125의 임상적용시 심각한 면역독성이 발현될 가능성 또한 적은 것으로 사료되었다.

감사의 말씀

이 연구는 1993년도 보건사회부 신약개발연구지원에

의해 이루어졌으며 이에 진심으로 감사드립니다.

참고문헌

Mota, I. and Wong, D. (1969). Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Science*, **8**, 813-820.

Ovary, Z. (1958). Immediate reactions in the skin of experimental animals provoked by antibody-antigen interactions. *Prog. Allergy* **5**, 459-508.

Fornasiero, M. C., Ferrari, M., Gnocchi, P., Trizio, D. and Isseta, A. M. (1992). Immunodepressive activity of FCE 23762 on humoral and cell-mediated immune responses in normal mice: Comparison with doxorubicin. *Agents Actions* **37**, 311-318.

清原 晃, 久保 和博, 岡部 正實, 宮岐 英治, 馬場 治次, 岩田 博子, 高平 汎志 (1972). Adriamycin의 一般藥理作用. *應用藥理* **6**, 1075-1088.

荻田忠厚, 水島 裕 (1977). 藥物의 抗原性의 檢討-とくにIgE形抗體產生檢討の爲めの動物 モデルについて. *醫藥のめゆみ* **100**, 812-814.

幕部 勝, 淺岡宏康, 井澤正典, 永井修子. THP의 抗原性に關する 研究(personal communication).

백남기, 안병욱, 이순복, 김원배, 양중익, 渡邊俊彦 (1993a). 새로운 항암성 항생물질 DA-125의 심장독성에 대한 평가. *응용약물학회지* **1**, 9-19.

백남기, 안병욱, 이순복, 김원배, 양중익, 오혜영, 정해관, 하광원 (1993b). 새로운 anthracycline계 항암제 DA-125의 조혈기체에 미치는 영향 및 변이원성 연구. 대한암학회 학술대회 초록집. *Poster발표* **22**, 118.