



Cephalosporin계 항생제 IDC7181에 대한 항원성시험

신지순 · 장호송 · 최은경 · 권운 · 채희열 · 조영민 · 김윤배 · 강종구
충북대학교 수의과대학

Antigenicity Study on IDC7181, a Quaternary Ammoniopropenyl Cephalosporin Possessing Two Vinyl Groups

Ji Soon Sin, Hu-Song Zhang, Ehn-Kyoung Choi, Woon Kwon, Hee-Youl Chai,
Young Min Cho, Yun-Bae Kim and Jong-Koo Kang

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Received November 17, 2003; Accepted December 8, 2003

ABSTRACT. Antigenic potential of a novel cephalosporin, IDC7181 was examined a active systemic anaphylaxis (ASA) and passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test, in guinea pig and mouse-rat models, respectively. In ASA test, IDC7181 induced the signs of restlessness in a few animals immunized with a high dose (100 mg/kg) of IDC7181 alone or in combination with Freund's complete adjuvant (FCA). In PCA test, only one of ten sera from the animals immunized with a high dose (100 mg/kg) of IDC7181 in the absence or presence of FCA showed positive reaction. The positive reaction, induced by IDC7181, which may be due to β -lactam ring, in ASA and PCA tests were negligible in comparison with those of traditional cephalosporins. Taken together, it is suggested that IDC7181 do not cause immunological problems in clinical dosage.

Keywords: IDC7181, Antigenicity, Active systemic anaphylaxis, Passive cutaneous anaphylaxis, Cephalosporin.

서 론

Cephalosporin계열의 항생제는 C3와 C7의 치환기를 변 화시키며, 꾸준히 사용되어 왔다. IDC7181은 새롭게 C3 side chain에 2개의 vinyl groups을 갖는 quaternary ammoniopropenyl cephalosporin을 합성한 것으로써 *in vitro*에서 항균 작용이 우수하고 *in vivo*에서의 전신 감염에 대한 뛰어난 효력을 나타내었다(Kang 등, 1998). 최근 C3에 vinyl기가 치환된 TOC-39, E-1007 같은 항생제는 *S. aureus*를 포함한 그람양성균 및 *P. aeruginosa*와 같은 그람음성균 등에 균형있는 광범위 효과를 보이는 것으로 알려져 있다(Toyosawa 등, 1994; Hanaki 등, 1995).

또한, 항균력, 흡수 및 대사를 결정짓는 중요한 부위인 C3에 heterocyclic thiomethyl, quaternary ammonium salt, vinyl 및 catechol 등을 도입시킨 cephalosporin계 항생제들은 강한 항균력을 가지며, β -lactamase에 대한 저항성을 향상시키는 것으로 보고되어 있다(Yoo 등, 1999).

한편, penicillin 이후로 cephalosporins는 중요한 항생제로 사용되고 있는데, IgE와 면역 반응을 유도하는 β -lactam ring을 가지고 있어(Romano 등, 2000), 이들 항생제의 과민반응은 임상적인 문제로 널리 알려져 있다. 환자에서 penicillin계 항생제는 0.7~10%의 과민반응을 유발시키는데 비해 cephalosporin류는 0.9~3.2%로 상대적으로 적은 과민반응을 야기한다. 한편, 항원성의 원인으로 dihydrothiazine ring의 cleavage에 의해 cephalosporins의 aminolysis 과정이 안정되지 못한 것으로 보고되었지만, 아직 정확한 allergenic determinant는 보고되지 않았다(Venemalm, 2001).

Correspondence to: Jong-Koo Kang, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Gaeshin-dong, Cheongju 361-763, Korea
E-mail: jkkang@cbu.ac.kr

따라서 본 시험에서는 IDC7181의 안전성 연구의 일환으로 항원성 유발여부를 평가하기 위해 최대 임상 예상 용량(10 mg/kg)의 1배 및 10배 용량으로 기니피그를 이용한 능동 전신성 아나필락시스 반응(active systemic anaphylaxis, ASA)과 마우스-랫드를 이용한 수동 피부 아나필락시스 반응(passive cutaneous anaphylaxis, PCA) 시험을 실시하였다.

재료 및 방법

시험물질

시험물질인 IDC7181은 새롭게 합성된 두 개의 vinyl group을 가진 quaternary ammoniopropenyl cephalosporin계 항생제로(Fig. 1), 황색분말상의 시험물질을 일동제약(주)에서 공급받아 밀봉하여 상온에서 보관하면서 시험하였다. 양성대조물질로는 ovalbumin(OA)을 Sigma chemical co.(St. louis, MO, USA)로부터, 면역보조제로는 Freund's complete adjvant(FCA)를 GIBCO BRL(N.Y., USA)로부터 구입하여 사용하였다. 그외에 Evan's blue는 Sigma chemical co.에서 saline은 중위제약에서 구입하였다.

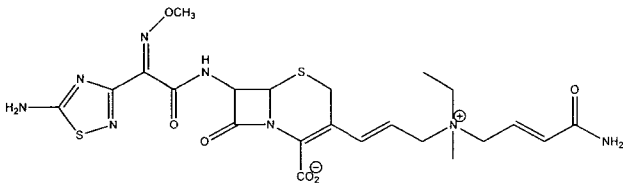


Fig. 1. Chemical structure of IDC7181(7β-[(z)-2-(5-amino-1,2,4-thiadiazol-3-yl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[(E)-3-[(E)-(1-carbamoyl-1-propen-3-yl)-3-ethylmethylammonio]-1-propen-1-yl]-3-cephem-4-carboxylate), a new quaternary ammoniopropenyl cephalosporin possessing two vinyl groups.

실험동물 및 사육조건

모든 실험 동물은 대한바이오링크(음성, 충북)에서 구입하여, 일주일 이상의 순화기간을 거친 후, 건강한 동물만을 선별하여, ASA 시험을 위해서는 5주령의 Dunkin-Hartley계 수컷 기니피그, PCA 시험을 위해서는 5주령의 C57BL/6 수컷 마우스와 9주령의 Sprague-Dawley 수컷 랫드를 선별하여 사용하였다. 모든 동물실은 온도 23±2°C, 습도 50±10%, 환기횟수 10~12회/hr, 조명시간 12시간(07:00~19:00)의 조건으로 유지되었다. 마우스와 랫드는 실험동물용 고품사료(제일사료)를, 기니피그는 토끼용 고품사료(푸리나사료)를 급여하였으며, 음수는 정수된 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

능동 전신성 아나필락시스 반응시험

군당 5마리의 guinea pigs에 1군에는 매체대조물질을, 2군에는 사람에서의 최대 임상 예정 용량인 IDC7181 10 mg/kg을, 3군에는 최대 임상 예정 용량의 10배량인 IDC7181 100 mg/kg의 감작항원을 주 2회씩 3주간 총 7회, 개체당 0.5 ml의 액량으로 5개소에 피하로 분할 투여하였다. 4군에는 IDC7181 100 mg/kg과 FCA의 동량 혼합액을, 5군에는 ovalbumin(5 mg/kg)과 FCA의 동량 혼합액을 주 일회씩 3주간 총 4회씩, 개체당 1 ml을 피하로 투여하여 감작시켰다(Table 1).

음성대조군 및 시험군의 야기항원량은 "의약품등의 독성시험 기준"(식품의약품안전청, 1999)의 아나필락시스 쇼크반응시험 방법에 준하여 저용량의 10배인 100 mg/kg으로 하였으며, 양성대조군인 ovalbumin 군에서는 감작항원 용량의 10배인 50 mg/kg으로 설정하였다. 최종감작 후 10일과 20일에 야기항원을 기니피그의 metatarsal vein에 정맥내투여하고 30분 동안 전신의 증상을 관찰하여 anaphylaxis 증상을 판정하였다.

Table 1. Experimental design for active systemic anaphylaxis test in guinea pigs. FCA, Freund's complete adjuvant

Group	Sensitizing antigen (mg/kg)	No. of animal	Route of sensitization	Challenging antigen (mg/kg)	Route of challenge
1	Saline	5	S.C.	IDC7181 (100)	I.V.
2	IDC7181(10)	5	S.C.	IDC7181 (100)	I.V.
3	IDC7181(100)	5	S.C.	IDC7181 (100)	I.V.
4	IDC7181(100) + FCA	5	S.C.	IDC7181 (100)	I.V.
5	Ovalbumin(5) + FCA	5	S.C.	Ovalbumin(50)	I.V.

Table 2. Experimental design for passive cutaneous anaphylaxis test in mouse-rat model. FCA, Freund's complete adjuvant

Group	Sensitizing antigen (mg/kg)	No. of animal	Route of sensitization	Challenging antigen (mg/kg)	Route of challenge
1	Saline	5	S.C.	IDC7181 (100)	I.V.
2	IDC7181(10)	5	S.C.	IDC7181 (100)	I.V.
3	IDC7181(100)	5	S.C.	IDC7181 (100)	I.V.
4	IDC7181(100) + FCA	5	S.C.	IDC7181 (100)	I.V.
5	Ovalbumin(5) + FCA	5	S.C.	Ovalbumin(50)	I.V.

Anaphylaxis의 유무를 활동성, 코 비비기, 재채기, 기침, 배뇨, 호흡곤란, 도약 및 경련, 사망 등으로 관찰하고, 종합적으로 shock의 정도에 따라, 음성은 아무런 임상증상이 관찰되지 않을 때 grade 0, 불안, 입모, 진전, 및 코를 문지르거나 활는 경우 grade I, 재채기, 기침, 호흡촉진, 배뇨, 배변, 및 유루가 있을 때 grade II, 호흡곤란, 찻찻 거림, 청색증, 보행불안, 도약, 혈떡거리고 몸부림침, 경련, 황와, Chene-stroke 호흡의 증상이 관찰되면 grade III, 그리고 동물이 사망했을 때 grade IV로 판정하였다.

수동 피부 아나필락시스 반응시험

군당 5마리의 C57BL/6계 마우스에 1군에는 매체대조 물질을, 2군에는 IDC7181 10 mg/kg, 3군에는 IDC7181 100 mg/kg의 감작항원을 주 2회씩 3주간 피하로 투여하였다. 4군에는 IDC7181 10 mg/kg과 FCA의 동량 혼합액을, 5군에는 ovalbumin 5 mg/kg과 FCA의 동량 혼합액을 주 1회씩 3주간 피하로 투여하여 감작하였다(Table 2). 그리고, 최종감작 1주 후에 각군 동물의 혈액을 채취하여 혈청을 분리하여, 냉동 보관하였다.

분리한 혈청을 생리식염수로 2배 단계 희석하여 4~1024배로 희석한 다음 50 µl씩을 랫드 등쪽 부위의 피내에 주사하고 주사 24시간 후에 1% Evan's blue를 동량 함유한 각각 고용량의 항원 1 ml을 랫드 미정맥내로 투여하였다. 그리고 30분 후에 랫드를 방혈치사시켜 피부 내측에 유출된 청색반을 확인하여 반점의 장단경의 평균이 5 mm 이상인 경우를 양성으로 판정하였으며, 항체가는 양성을 나타낸 최대 희석배수로 나타내었다.

결과 및 고찰

일동제약에서 새롭게 개발한 cephalosporin계 항생제인 IDC7181의 항원성을 알아보기 위하여 기니픽에서 ASA 반응, 마우스-랫드 모델에서 PCA 반응을 실시하였다.

기니픽에서의 능동 전신성 아나필락시스 시험의 결과는 Table 3에 나타내었다. 용매대조군과 IDC7181 10 mg/kg

Table 3. Active systemic anaphylaxis reaction in guinea pigs. FCA, Freund's complete adjuvant

Antigen	Dose (mg/kg)	No. of animal	Severity ^a				
			0	I	II	III	IV
Saline	-	5	5	0	0	0	0
IDC7181	10	5	5	0	0	0	0
	100	5	3	2	0	0	0
IDC7181 + FCA	100	5	4	1	0	0	0
Ovalbumin + FCA	5	5	0	0	0	0	5

^aGrade: 0, Negative; I, Mild; II, Moderate; III, Severe; IV, Death.

투여군에서는 아나필락시스 증상이 전혀 관찰되지 않았다. 한편, IDC7181 100 mg/kg으로 감작한 군에서는 5마리

Table 4. Passive cutaneous anaphylaxis reaction in mouse rat model. FCA, Freund's complete adjuvant.

Antigen	Dose	No. of serum	No. of rat	Challenging antigen		
				saline	IDC7181	Ovalbumin
Saline	-	3	1	<4	-	-
			2	<4	-	-
			3	<4	-	-
			4	<4	-	-
			5	<4	-	-
			6	<4	-	-
			7	<4	-	-
			8	<4	-	-
			9	<4	-	-
			10	<4	-	-
IDC7181	10 mg/kg	5	11	-	<4	-
			12	-	<4	-
			13	-	<4	-
			14	-	<4	-
			15	-	<4	-
			16	-	<4	-
			17	-	<4	-
			18	-	<4	-
			19	-	<4	-
			20	-	<4	-
IDC7181	100 mg/kg	5	21	-	<4	-
			22	-	<4	-
			23	-	<4	-
			24	-	<4	-
			25	-	<4	-
			26	-	4	-
			27	-	<4	-
			28	-	<4	-
			29	-	<4	-
			30	-	<4	-
IDC7181 + FCA	100 mg/kg	5	31	-	<4	-
			32	-	<4	-
			33	-	<4	-
			34	-	<4	-
			35	-	<4	-
			36	-	<4	-
			37	-	<4	-
			38	-	4	-
			39	-	<4	-
			40	-	<4	-
Ovalbumin + FCA	5 mg/kg	5	41	-	-	128
			42	-	-	128
			43	-	-	64
			44	-	-	128
			45	-	-	128
			46	-	-	64
			47	-	-	128
			48	-	-	128
			49	-	-	128
			50	-	-	128

중 2마리에서 유발항원 주사 후에 불안증상이 관찰되어 grade I로 판정되었으며, 나머지 3마리에서는 증상이 나타나지 않았다. 또한, IDC7181과 면역보조제를 혼합하여 감작한 군에서는 5마리 중 1마리에서 유발항원 주사 후 불안증상이 관찰되어 grade I로 판정되었고, 나머지 4마리에서는 증상이 관찰되지 않았다. 그러나, 항원성 결과로 나타난 불안증상은 정상적인 상태에서도 환경에 따라 나타날 수 있는 행동으로 물리적 자극에 대한 반응과 크게 구분되지 않는 위양성의 반응으로 여겨진다. 반면, 양성대조군인 OA 투여군에서는 유발항원 주사 후 3~5분 이내에 재채기, 기침, 도약, 전신경련 및 황와 등의 전형적인 아나필락시스 쇼크 증상을 보이며, 모든 동물이 폐사하였다.

임상 예정 용량에 10배에 해당하는 고농도의 IDC7181에 감작된 일부의 기니픽은 유발 항원 투여 후에 미약한 항원성 반응을 보여주었다. 즉, cephalosporin계 항생제인 cephalothin, ceftizoxime, ceftazidime, cefmetazole 등의 기니픽에 대한 항원성 시험의 결과와 비교하였을 때 (Hattori 등, 1997), 동계열의 항생제인 IDC7181은 기니픽에서 극히 미약한 항원성을 보이거나 혹은 항원성이 확인되지 않았다. 따라서, 사람에게 적용을 하여도 큰 부작용 없이 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

IDC7181에 대한 마우스-랫드 모델에서의 PCA시험 결과는 Table 4와 같다. Mouse-rat 이중 PCA 반응은 IgE형의 항체 생성 유무를 확인하는 시험계로 널리 이용되고 있다. 본 시험에서도 IDC7181을 단독 혹은 IgE형의 항체 형성을 촉진하는 면역보조제를 같이 사용하여 시험한 결과, IDC7181을 단독으로 감작한 저용량군에서는 모든 동물의 혈청에서 항체가 4 이하로 검출한계 이하를 나타내었다. 그러나 IDC7181 고용량군 및 IDC7181과 면역보조제를 함께 감작시킨 군에서는 10마리 중 각각 1마리에서 4배의 항체 희석배수에서 양성을 나타내어 IDC 7181은 마우스에서도 약하나마 IgE형의 항체생성능을 가지는 것으로 추정이 되었다. 한편, 양성대조군인 OA 감작군에서는 모든 동물에서 64~128배에서 양성을 나타내었다.

이상의 기니픽을 이용한 ASA와 마우스-랫드를 이용한 PCA 시험 결과로 판단할때, IDC7181은 마우스에서 IgE 계열의 항체를 약하게 생성시킬 있는 것으로 사료된다. 그렇지만, 미약하게 나타난 반응은 면역관련 부작용이 아

닌 이물에 대한 동물의 정상적인 생체 반응일 가능성을 배제할수 없으며, 실제 임상 적용시 IDC7181에 의한 면역관련 부작용은 거의 없을 것으로 추정된다.

감사의 글

본 시험은 일동제약(주)의 지원 및 보건복지부 보건의료 기술개발사업의 일환으로 실시되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Hanaki, H., Akagi, H., Yasuo, M., Otani, T., Hyodo, A. and Hiramatsu, K. (1995): TOC-39, a novel parenteral broad spectrum cephalosporin with excellent activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 1120-1126.
- Hattori, H., Yamaguchi, F., Waga, N., Kato, M. and Nomura, M. (1997): An assessment of antigenic potential of β -lactam antibiotics, low molecular weight drugs, using guinea pig models. *Toxicology*, **123**, 149-160.
- Kang, J.H., Yu, S.W., Lee, S.Y. and Kim, K.W. (1998): Synthesis and biological activity of quaternary ammoniopropenyl cephalosporins having two vinyl groups. *J. Antibiot.*, **51**, 378-380.
- Romano, A., Mayorga, C., Torres, M.J., Artesani, M.C., Suau, R., Sanchez, F., Perez, E., Venuti, A. and Blanca, M. (2000): Immediate allergic reactions to cephalosporins: Cross-reactivity and selective responses. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **106**, 1177-1183.
- Toyosawa, T., Watanabe, N., Hata, K., Ohba, F., Moriyama, M., Ueno, J., Nakamura, M. and Katsu, K. (1994): Therapeutic efficacy of E1077 against respiratory tract infection caused by *P. aeruginosa* and *S. aureus* in mice using an *in vivo* pharmacokinetic model simulating human plasma concentration. *Abs. 34th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.*, No. F113, Oct. 4-7, Orlando.
- Venemalm, L. (2001): Pyrazinone conjugates as potential cephalosporin allergens. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 1869-1870.
- Yoo, J.S., Ha, J.C., Ko, O.H., Yoo, J.C. and Kang, H.R. (1999): Synthesis and antimicrobial evaluation of 3-substituted pyrolidine cephalosporins. *J. Pharm. Soc. Korea*, **43**, 306-315.
- 식품의약품안전청 (1999): 의약품등의 독성시험기준, 식품의약품안전청, 서울, 고시 제1999-61호.