

새로운 간염치료제인 수용성 DDB 유도체(DDB-S)의 항원성 평가

한형미^o · 김진호 · 최경백 · 김형수 · 정승태 · 문전옥* · 이치호* · 김주일
독성부 면역독성과, 국립독성연구소, 식품의약품안전청,
*부산대학교 약학대학

Antigenicity of a Water Soluble Dimethyl Dimethoxy Biphenylate Derivative(DDB-S), a New Antihepatitis Agent

Hyung-Mee Han^o, Jin Ho Kim, Kyoung Baek Choi, Hyung Soo Kim,
Seung Tae Chung, Jeon-Ok Moon*, Chi-Ho Lee* and Jooil Kim

Immunotoxicology Division, Department of Toxicology, National Institute of Toxicological Research,
Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Gu, Seoul, 122-704, Korea

*College of Pharmacy, Pusan National University, San 30 Jangjeon-Dong,
Kumjeong-Gu, Pusan, 609-735, Korea

(Received May 14, 1998)

(Accepted July 1, 1998)

ABSTRACT : Dimethyl dimethoxy biphenylate (DDB) is an agent used to treat hepatitis. DDB-S (DDB-soluble), a new DDB derivative, was synthesized to increase water solubility of the original DDB. In the present study, the antigenic potential of DDB-S was examined by active systemic anaphylaxis (ASA), passive cutaneous anaphylaxis (PCA) and passive hemagglutination (PHA) tests. The experimental groups consist of a low dosage group, a high dosage group, the group emulsified with Freund's complete adjuvant (FCA, ASA test) or an alum (PCA and PHA tests) and the macromolecule conjugate group emulsified with FCA or an alum. In the ASA test, all experimental groups showed negative responses whereas the positive control group given ovalbumin plus FCA showed severe anaphylactic responses. In the heterologous PCA test using mice and rats, positive responses were not detected in any of the experimental groups. In the PHA test, all experimental groups showed negative responses whereas the positive control group given ovalbumin plus an alum showed 512~2048 PHA titers. These results demonstrated that DDB-S does not have any antigenic potential. These data can be utilized as a part of preclinical data for the development of DDB-S as an intravenous injection.

Key Words : DDB-S, Water soluble dimethyl dimethoxy biphenylate derivative, Antigenicity

I. 서 론

오미자(Schisandrae Fructus)는 예로부터 한방에서 널리 사용되어온 약재로서 간 장애개선 및 만성 바이러스성 B형 간염에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 오미자의 성분중 이러한 약효를 가진 물질을 탐색한 결과 오미자의 주성분중 하나인 Schisandrin C라는 물질이 간장보호 작용을 가지는 것으로 밝혀졌으며, 이에 근거하여 Schisandrin C를 천연물로부터 추출하는 방법대신에 합성하고자 하는 연구가 진행되어 왔다.

Dimethyl dimethoxy biphenylate(DDB)는 이러한

Schisandrin C의 합성에 필요한 중간물질로서 맨 처음 합성되었다. 그러나 그 후 여러 연구자들에 의하여 DDB 자체도 간장보호에 상당한 효과가 있는 것으로 밝혀졌는데, DDB는 사염화탄소로 유발된 간손상(Liu와 Lesca, 1982; Fu와 Liu, 1992) 및 aflatoxin B1 등의 발암성 물질에 의한 간세포의 DNA 손상(Qing과 Liu, 1992; Liu 등, 1995)에 보호작용을 나타냄이 보고되었다. 또한 DDB는 사람 간유래 종양세포의 성장을 억제시키며 종양세포의 특징적인 여러 가지 지표들을 감소시키고(Liu 등, 1996a; Liu 등, 1996b), 만성 B형 간염에도 치료효과가 있는 것으로 보고되었다(Liu, 1987).

이와 같이 DDB 자체가 간장보호에 효과가 있는 것으로 밝혀짐에 따라 DDB를 주성분으로 한 간장보호

^oTo whom correspondence should be addressed

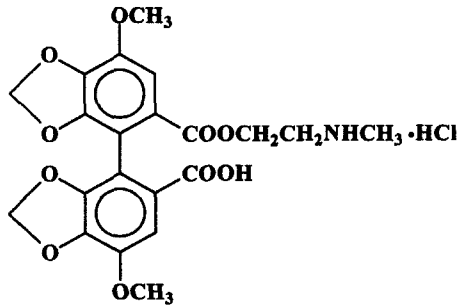


Fig. 1. Structure of DDB-S, a water soluble DDB derivative (2-methylaminoethyl 4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylenedioxybiphenyl-2-carboxylic acid-2'-carboxylate monohydrochloride).

제가 DDB 캡셀, 닛셀정, 포텍정 등 상품명의 경구용 제제로 시판되고 있다. 그러나 DDB는 물에 매우 난용성이므로 경구투여시 흡수가 불량하고 생물학적 이용효율이 낮은 것이 문제점으로 지적되어 왔다.

정맥주사용 DDB는 급성 간염환자나 또는 수술 후 간 기능이 저하된 환자들에게 투여하기 위하여 절실히 요구되어 왔으나 물에 난용성인 DDB를 수용성인 안정한 용액으로 만들 수 없으므로 주사제로서의 사용이 불가능한 형편이었다. 이에 부산대학교 약학대학 약제학 연구실에서는 DDB 자체의 생리활성은 그대로 유지하면서 물리화학적 특성만을 변경하여 주사제로 사용 가능한 수용성 DDB 유도체(water soluble DDB derivative, DDB-S)를 개발하였다. DDB-S는 기존의 DDB의 생리활성을 나타낸다고 예상되는 pharmacophore인 dimethoxy-dimethylene-dioxy-diphenyl group은 변경하지 않고 DDB의 ester 부분을 물에 가용성인 moiety로 대체함으로써 약물의 물리화학적 특성만을 개선하였으며, 화학명은 2-methylaminoethyl 4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylenedioxybiphenyl-2-carboxylic acid-2'-carboxylate monohydrochloride로서 Fig. 1과 같은 구조를 가지고 있다.

본 연구에서는 이러한 DDB-S를 정맥주사제로 개발하기 위한 전임상시험의 일환으로 항원성 시험을 수행하였다(Baek 등, 1994). 즉, 알레르기 유발 가능성을 시험하는 아나필락시스 쇼크 반응시험(active systemic anaphylaxis test, ASA test) 및 수동 피부 아나필락시스 반응시험(passive cutaneous anaphylaxis test, PCA test)을 실시하였으며, DDB-S에 대한 항체 생성 유무를 시험하는 간접 적혈구 응집 반응시험(passive hemagglutination test, PHA test)을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

시험물질인 DDB-S는 부산대학교 약학대학 약제학 연구실에서 제공하였으며, 인산완충생리식염액(phosphate buffered saline : PBS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)에 용해하여 사용하였다. 양성대조물질로서는 ovalbumin(OVA, Sigma Chemical Co.)을 인산완충생리식염액에 녹여서 사용하였으며, 음성대조물질로는 용매인 인산완충생리식염액을 사용하였다. Freund's complete adjuvant(FCA), Freund's incomplete adjuvant(FIA), aluminum hydroxide gel(alum)의 원료인 $Al_2(SO_4)_3 \cdot 8H_2O$ 및 DDB-S와 거대분자와의 결합에 사용된 bovine serum albumin(BSA), guinea pig serum albumin(GSA), glutaraldehyde, glycine 등은 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였고, 그 외 다른 시약들은 표준시약제조회사로부터 reagent grade의 시약을 구입하여 사용하였다.

2. 실험동물 및 사육조건

아나필락시스 쇼크 반응시험에는 200~350 g의 Hartley계 수컷 기니픽을 사용하였다. 기니픽은 온도 $22 \pm 2^\circ C$, 습도 $55 \pm 5\%$, 배기 10~12회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 150~300 Lux의 환경을 가진 기니픽 사육실에서 사육하였다. 수동 피부 아나필락시스 반응시험과 간접 적혈구 응집 반응시험을 위한 감작에는 20~30 g의 C57BL/6계 수컷 마우스를 사용하였고, 수동 피부 아나필락시스 반응시험의 야기에는 200~300 g의 Sprague-Dawley계 수컷 랫드를 사용하였다. C57BL/6계 마우스와 Sprague-Dawley계 랫드는 식품의약품안전청 실험동물실의 청정구역에서 생산된 specific pathogen-free 동물을 공급받아 온도 $23 \pm 1^\circ C$, 습도 $55 \pm 5\%$, 배기 10~18회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 300~500 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자에 넣어 사육하였다. 기니픽 사료는 제일제당(주)로부터 Vitamin C(1 g/kg)가 함유된 사료를 구입하였고, 마우스 및 랫드 사료는 신촌사료(주)로부터 구입하여 수돗물과 함께 자유로이 공급하였다. 기니픽, 마우스, 랫드 등 모든 시험동물은 체중을 지표로 한 무작위 추출법에 의해 각 군으로 나누었다. 기니픽 및 마우스의 감작기간동안 시험물질 감작군에서 대조군과 비교하여 체중 및 일반증상에 있어서 아무런 차이가 관찰되지 않았다.

3. DDB-S와 거대분자와의 결합

아나필락시스 쇼크 반응시험, 수동 피부 아나필락시스

스 반응시험 및 간접 적혈구 응집 반응시험에 있어서 실험동물을 감각시키기 위하여 사용하는 DDB-S와 거대분자와의 결합체는 다음과 같은 방법에 의하여 조제하였다. 0.4 M 인산완충액 5 ml(pH 7.5)에 DDB-S 29 mg을 용해시킨 다음 0.4 M 인산완충액 5 ml에 BSA 100 mg을 용해시킨 용액에 가하였다. 이 혼합용액을 서서히 교반하면서 20 mM glutaraldehyde 5 ml을 1방울씩 점적하여 결합을 유도하였다. 미반응된 glutaraldehyde를 제거하기 위하여 1 M glycine 1.5 ml을 가한 다음 centriprep-30(Amicon Inc., MA, U.S.A.)을 사용하여 3,000 g, 25°C에서 30분간 원심분리함으로써 반응액을 농축시켰다. 인산완충생리식염액을 가하여 농축과정을 4~5회 반복함으로써 남아있는 glutaraldehyde를 완전히 제거한 다음 단백질의 농도를 결정된 후 멸균생리식염수에 적당한 농도로 희석하여 시험에 사용하였다. 야기시에 사용된 DDB-S와 GSA와의 결합체(DDB-S-GSA)의 제조를 위하여는 BSA대신 GSA를 사용하여 DDB-S를 GSA에 결합시켰다. 또한 야기시에 사용된 GSA의 제조에 있어서는 DDB-S를 가하지 않고 GSA만을 가하여 위와 같은 조작을 실시하였다.

4. Alum의 제조

수동 피부 아나필락시스 반응시험 및 간접 적혈구 응집반응시험에 있어서 실험동물을 감각시키기 위하여 면역보조제로 사용하는 alum은 다음과 같은 방법에 의하여 조제하였다. $Al_2(SO_4)_3 \cdot 8H_2O$ 33 g을 50 ml의 이차 증류수에 용해시킨 다음 1 N NaOH 300 ml을 첨가한 후 상온에 방치하여 침전시켰다. 상층액을 제거한 후 이차증류수를 사용하여 14회 세척한 다음 homogenizer(Nissei AM-7 ACE Homogenizer)로 10~20분간 분쇄하여 상온에 보관하였다.

5. 아나필락시스 쇼크 반응시험

감작에 사용된 DDB-S의 용량설정은 기존 DDB의 사람에게의 투여량(50 mg 정제, 1회 1정, 1일 3회 복용)을 참고로 하여 임상적용량에 해당하는 0.75 mg/animal을 저용량 투여군으로 하였고, 그 10배에 해당하는 7.5 mg/animal을 고용량 투여군으로 하였다. 음성대조물질로는 용매인 인산완충생리식염액을 사용하였으며 양성대조물질로는 OVA를 사용하였다. 저용량, 고용량, 거대분자결합 및 면역보조제 혼합투여 여부에 따라 4군으로 분리하여 시험하였으며 감작량 및 감작

Table 1. Sensitization schedule of guinea pigs used in the active systemic anaphylaxis test

Group	Substance	Dose	Times	No. of animals	Route
I	DDB-S	0.75 mg/animal	7	11	i.p.
II	DDB-S	7.5 mg/animal	7	14	i.p.
III	DDB-S+FCA	7.5 mg/animal	3	12	i.p.
IV	DDB-S-BSA+FCA	1 mg/animal	3	26	i.p.
V	OVA+FCA	1 mg/animal	3	14	i.p.
VI	PBS	1 ml/animal	7	11	i.p.

회수, 감작경로는 Table 1과 같다. 제 1군은 DDB-S 저용량, 제 2군은 DDB-S 고용량, 제 3군은 DDB-S와 FCA와의 혼합투여군, 제 4군은 DDB-S와 BSA의 결합체(DDB-S-BSA)와 FCA와의 혼합투여군으로 하였다. 시험물질은 모두 인산완충생리식염액에 녹여 사용하였고 시험물질 단독투여군에 있어서는 1주일에 3회, 총 7회 감작시켰으며 면역보조제 혼합투여군에서는 처음에는 FCA와 시험물질을 1 : 1(v/v)로 동량혼화한 유화액을, 그리고 2, 3회에는 FIA로 동량혼화한 유화액을 1주일에 1회씩 총 3회 복강내 주사하여 감작시켰다.

최종감작 2주 후에 기니피크의 각 군에 적절한 야기물질을 앞발 정맥내에 투여하였다. 이때 I군(DDB-S, 0.75 mg/animal), II군(DDB-S, 7.5 mg/animal), III군(DDB-S+FCA, 7.5 mg/animal), IV군(PBS, 1 ml/animal)은 감작시의 고용량에 해당하는 7.5 mg/animal의 DDB-S로, IV군(DDB-S BSA+FCA, 1 mg/animal)은 5 mg/animal의 DDB-S와 GSA와의 결합체(DDB-S GSA)로 야기시켰으며 BSA와 GSA의 교차반응을 일으킬 가능성에 대하여 시험하기 위하여 5 mg/animal의

Table 2. Criteria for the active systemic anaphylaxis test

1. Restlessness
2. Piloerection
3. Tremor
4. Rubbing or licking nose
5. Sneezing
6. Coughing
7. Hyperpnea
8. Urination
9. Evacuation
10. Lacrimation
11. Dyspnea
12. Rhonchus
13. Cyanosis
14. Staggering gait
15. Jumping
16. Gasping and writhing
17. Convulsion
18. Side position
19. Cheyne-Stoke's respiration
20. Death
Evaluation : [-] Asymptomatic
[±] Mild : symptom 1~4
[+] Moderate : symptom 1~10
[++] Severe : symptom 1~19
[+++] Death

GSA 단독으로도 야기하였다. 야기 후 30분 동안 전신의 증상을 관찰하여 아나필락시스 쇼크 유무를 확인하였으며 시험결과는 Table 2의 판정기준에 따라 평가하였다.

6. 수동 피부 아나필락시스 반응시험

감작에 사용된 DDB-S의 용량설정은 아나필락시스 쇼크 반응시험의 경우와 마찬가지로 기존 DDB의 사람에게의 투여량(50 mg 정제, 1회 1정, 1일 3회 복용)을 참고로 하여 임상적용량에 해당하는 0.075 mg/animal을 저용량 투여군으로 하였고, 그 10배에 해당하는 0.75 mg/animal을 고용량 투여군으로 하였다. 실험군, 감작량 및 감작회수, 감작경로는 Table 3에 수록된 바와 같으며 최종투여 2주일 후에 심장 채혈하여 각 개체별로 혈청을 분리하였다. 클리퍼를 이용하여 랫드 등 부위의 털을 가능한 넓게 깎아낸 다음, 등의 좌우에 피내주사부위를 미리 적색 매직으로 표시한 후, 평균 생리식염수로 8배부터 6단계 희석한 마우스 항혈청 50 μ l를 각 표시부위에 피내 주사하였다(26½ G, 1 ml 주사기 이용). 각 항혈청마다 2마리 랫드의 등 피부에 항혈청 희석액을 피내 주사하였다.

항혈청을 피내 주사한 다음 24시간 후에 감작시의 고용량에 해당하는 DDB-S와 1% Evan's blue를 동량혼화한 혼합액 1 ml를 랫드의 미정맥내에 주사하였다(23 G, 3 ml 주사기 이용). 인산완충생리식염액으로 감작한 음성대조군에도 7.5 mg/animal의 DDB-S를 투여하였다. 단백질합 혼합투여군에는 DDB-S와 GSA 결합체(DDB-S-GSA, 5 mg/animal) 및 GSA(5 mg/animal)를 각각 투여하였다. 야기항원을 랫드 미정맥내에 주사한 뒤 30분 후에 랫드를 방혈치사 시켰다. 항혈청 주사부위를 다시 적색매직으로 정확히 표시한 뒤, 해부용 가위를 이용하여 랫드의 등 피부를 벗겨내어 항혈청 주사부위에 나타나는 청색 반점을 관찰하였다. 청색 반점의 직경이 5 mm 이상인 것을 양성으로 하고, 양성을 나타내는 항혈청의 최대 희석배율을 그 항혈청의 PCA항체가로 결정하였다.

Table 3. Sensitization schedule of mice used in the passive cutaneous anaphylaxis test and the passive hemagglutination test

Group	Substance	Dose	Times	No. of animals	Route
I	DDB-S	0.075 mg/animal	7	10	i.p.
II	DDB-S	0.75 mg/animal	7	10	i.p.
III	DDB-S+alum	0.75 mg/animal	3	10	i.p.
IV	DDB-S-BSA+alum	0.1 mg/animal	3	10	i.p.
V	OVA+alum	0.1 mg/animal	3	10	i.p.
VI	PBS	0.2 ml/animal	7	10	i.p.

7. 간접 적혈구 응집 반응시험

Alsever 용액에 저장(4°C, 1 : 1비율)되어있는 면양적혈구 6 ml을 원심분리(500 g, 10 min)하여 상등액을 버리고 생리식염액으로 부유액을 만든 다음 원심분리에 의한 세척과정을 3회 반복하였다. 마지막 원심분리시 침전된 적혈구 1 ml을 20 ml PBS에 부유시켰다. 부유된 적혈구 15 ml을 취한 다음, 동량의 0.005%(w/v) tannic acid를 가하여 37°C에서 15분간 혼화하였다. 500 g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 PBS로 1회 세척한 후 15 ml PBS에 부유시켰다. PBS 20 ml에 위와 같이 tannic acid 처리된 면양적혈구 5 ml을 넣고 0.5 mg/ml의 항원을 가한 다음 37°C에서 30분간 혼화하였다. 500 g에서 10분간 원심분리를 실시하여 상등액을 제거하고 10 ml 희석액(2 mg/ml gelatin in saline)에 부유시켜 1회 세척한 다음 최종적으로 1%가 되도록 희석액에 부유시켰다. 시험군에 따라 피부에 사용된 항원으로는 DDB-S와 GSA의 결합체(DDB-S-GSA), GSA 혹은 OVA를 사용하였다.

수동 피부 아나필락시스 반응시험의 경우와 같은 schedule(Table 3)에 의하여 마우스를 감작하여 얻어진 항혈청을 희석액으로 8배부터 적당한 배율까지 96 well microplate에서 연속적으로 2배수 희석하였다. 항원피복된 1% 적혈구 부유액 50 μ l에 희석된 항혈청 50 μ l를 섞었다. 항혈청의 음성대조물질로는 희석액을 사용하였다. 각 well의 내용물을 잘 섞어서 상온에서 12시간 이상 방치한 후, 적혈구의 응집유무를 육안으로 관찰하였다. 응집의 판정은 완전응집(+), 부분응집(\pm), 응집이 일어나지 않음(-)으로 구분하였으며, 응집이 관찰된 항혈청의 최고희석배율을 그 항혈청의 PHA 응집가로 결정하였다.

III. 결 과

1. 아나필락시스 쇼크 반응시험

기니픽을 사용하여 실시한 아나필락시스 쇼크 반응시험의 결과는 Table 4에 제시되어 있다. 본 Table 4에 나타나있는 바와 같이 여러 가지 다른 schedule로 감작된 기니픽을 7.5 mg/animal의 DDB-S로 야기했을 경우 아무런 아나필락시스 반응을 나타내지 않았다. 또한 DDB-S와 BSA의 결합체(DDB-S-BSA)로 감작한 기니픽을 DDB-S와 GSA의 결합체(DDB-S-GSA)로 주사하여 아나필락시스 반응을 유도했을 경우에도 아무런 양성 반응을 나타내지 않았으며, GSA 단독으로 야기

Table 4. Results of the active systemic anaphylaxis test in guinea pigs

Group	Sensitization	Challenge	No. of animals	Severity of anaphylaxis					Positive ratio
				-	±	+	++	+++	
I	DDB-S (0.75 mg/animal)	DDB-S (7.5 mg/animal)	11	-	-	-	-	-	0/11
II	DDB-S (7.5 mg/animal)	DDB-S (7.5 mg/animal)	14	-	-	-	-	-	0/14
III	DDB-S+FCA (7.5 mg/animal)	DDB-S (7.5 mg/animal)	12	-	-	-	-	-	0/12
IV	DDB-S-BSA+FCA (1 mg/animal)	DDB-S-GSA (5 mg/animal)	13	-	-	-	-	-	0/13
V	DDB-S-BSA+FCA (1 mg/animal)	GSA (5 mg/animal)	13	-	-	-	-	-	0/13
VI	OVA+FCA (1 mg/animal)	OVA (10 mg/animal)	14	-	-	-	-	14	14/14
VII	PBS (1 ml/animal)	DDB-S (7.5 mg/animal)	11	-	-	-	-	-	0/11

시켰을 경우에도 모두 음성의 반응을 나타내었다. 양성대조군인 OVA 혼합투여군에서는 14마리 모두에서 중증의 아나필락시스 쇼크 반응증상을 보이면서 사망하였으며 용매대조군인 인산완충생리식염액 투여군에서는 감각에 사용된 고용량인 7.5 mg/animal의 DDB-S로 야기하였으나 아나필락시스 쇼크 반응을 나타내지 않았다. 따라서 새로운 간염치료제인 DDB-S는 단독 투여군, 면역보조제 혼합투여군 및 단백질합 혼합투여군 모두에서 아나필락시스 쇼크 반응을 나타내지 않았다.

2. 수동 피부 아나필락시스 반응시험

각 군 감각 마우스 혈청에 대하여 랫드를 이용한 수동 피부 아나필락시스 반응시험 결과를 Table 5에 나타내었다. 저용량투여군(0.075 mg/animal), 고용량투여군(0.75 mg/animal) 및 면역보조제 혼합투여군(0.75 mg/animal DDB-S+alum)에서 채혈한 항혈청을 랫드의 배부피부에 피내주사한 다음 7.5 mg/animal DDB-S로

야기시킨 결과 모두 음성의 결과를 나타내었다. 또한 단백질합 혼합투여군(DDB-S-BSA+alum, 0.1 mg/animal)에 있어서는 DDB-S와 GSA와의 결합체(DDB-S-GSA, 5 mg/animal)로 야기시키거나 GSA 단독(5 mg/animal)으로 야기시켰을 경우 모두 음성의 결과를 나타내었다. 양성대조군인 OVA 혼합투여군에 있어서는 10마리 모두 양성반응을 나타내었으며 PCA 항체가는 64배(7마리), 128배(2마리) 및 256배(1마리)로 나타났다. 인산완충생리식염액을 투여한 음성대조군에서는 7.5 mg/animal의 DDB-S로 야기시켰을 경우 모두 음성 반응이 나타났다. 이상의 실험결과 새로운 간염치료제인 DDB-S는 수동 피부 아나필락시스 반응시험에서 조직친화성 IgE 항체를 생성하지 않음을 알 수 있었다.

3. 간접 적혈구 응집 반응시험

마우스 항혈청에 대한 간접 적혈구 응집 반응시험의 결과를 Table 6에 나타내었다. 저용량투여군(0.075 mg/

Table 5. Results of the 24hr heterologous passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test

Group	Challenge	No. of mice	No. of mice showing the indicated PCA titer*							Positive ratio
			negative	8	16	32	64	128	≥256	
DDB-S (0.75 mg/animal)	DDB-S (7.5 mg/animal)	10	10	-	-	-	-	-	-	0/10
DDB-S (0.75 mg/animal)	DDB-S (7.5 mg/animal)	10	10	-	-	-	-	-	-	0/10
DDB-S+alum (0.75 mg/animal)	DDB-S (7.5 mg/animal)	10	10	-	-	-	-	-	-	0/10
DDB-S-BSA+alum (0.1 mg/animal)	DDB-S-GSA (5 mg/animal)	10	10	-	-	-	-	-	-	0/10
DDB-S-BSA+alum (0.1 mg/animal)	GSA (5 mg/animal)	7	7	-	-	-	-	-	-	0/7
OVA+alum (0.1 mg/animal)	OVA (10 mg/animal)	10	-	-	-	-	7	2	1	10/10
PBS (0.2 ml/animal)	DDB-S (7.5 mg/animal)	10	10	-	-	-	-	-	-	0/10

*: maximum dilution factor exhibiting a positive response in the PCA test.

Table 6. Results of the passive hemagglutination (PHA) test

Group	Absorbed antigen	No. of mice	No. of mice showing the indicated PHA titer*												Positive ratio	
			negative	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192		
DDB-S (0.075 mg/animal)	DDB-S-GSA	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/10
DDB-S (0.075 mg/animal)	DDB-S-GSA	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/10
DDB-S+alum (0.075 mg/animal)	DDB-S-GSA	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/10
DDB-S-BSA+alum (0.1 mg/animal)	DDB-S-GSA	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/10
DDB-S-BSA+alum (0.1 mg/animal)	GSA	7	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/7
OVA+alum (0.1 mg/animal)	OVA	10	-	-	-	-	-	-	-	3	6	1	-	-	-	10/10
PBS (0.2 mg/animal)	DDB-S-GSA	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/10

*: maximum dilution factor exhibiting agglutination in the PHA test.

animal), 고용량투여군(0.75 mg/animal), 면역보조제 혼합투여군(0.75 mg/animal) 및 단백질합 혼합투여군(DDB-S-BSA+alum, 0.1 mg/animal)에 있어서 모두 음성의 결과를 나타내었다. 양성대조군인 OVA 혼합투여군의 항 OVA 혈청에서는 10마리 모두에서 혈구응집 반응이 나타났는데, 512배(3마리), 1,024배(6마리), 2,048배(1마리)의 희석혈청에서 양성반응이 나타났다. 한편 음성대조군에서는 10마리 모두에서 혈구응집 반응이 관찰되지 않았다. 이상의 실험결과 DDB-S는 항체 생성을 유도하지 않는 것으로 생각된다.

IV. 고 찰

간기능 회복과 만성 바이러스성 간염에 효과가 있는 것으로 밝혀진 오미자의 성분인 Schisandrin C의 합성 중간체인 DDB는 간장장애에 상당한 효과가 있는 것으로 알려졌으며, 현재 여러 제약 회사에서 경구투여 제제로 시판중이다. 그러나 DDB는 물에 매우 난용성이어서 경구투여시 흡수가 불량할 뿐만 아니라 약효 또한 낮으리라 예상됨에 따라 생물학적 이용효율을 높이기 위한 다양한 약제학적 연구가 이루어져 왔다(Gu 등, 1989; Gu 등, 1990).

정맥주사용 DDB는 간염으로 입원한 환자나 수술 후 간기능이 저하된 환자들에 있어서 간기능을 빠른 시간내에 회복시키기 위하여 그 개발이 절실히 요구되어 왔으나 기존의 DDB는 난용성이어서 정맥주사제로의 개발이 불가능한 실정이었다. 한편 새로운 간염치료제인 수용성 DDB 유도체(DDB-S)는 기존의 DDB가 가지고 있는 고유의 생리활성을 유지하면서 구조변경에 의하여 수용성을 높인 DDB 유도체이다.

본 연구에서는 DDB-S를 정맥주사제로 개발하기 위한 안전성 평가의 일환으로 항원성 시험을 실시하였

다. 항원성 시험은 신물질의 알레르기 유발가능성 여부를 검색하기 위하여 실시하는 시험으로서, 정맥주사제의 경우에는 시험물질이 알레르기 유발물질일 경우 그로 인한 위험성이 크므로 임상시험전에 반드시 실시하도록 규정되어 있는 시험이다. DDB-S의 항원성 여부를 평가하기 위하여 제 1형 과민반응 유발유무를 확인하기 위한 시험인 아나필락시스 쇼크 반응시험, 조직친화성 IgE 항체의 생성유무를 확인하기 위한 시험인 수동 피부 아나필락시스 반응시험 및 시험물질에 대한 항체생성 여부를 시험하는 간접 적혈구 응집 반응시험을 실시하였다. 각 동물에 대한 감작량은 기존 DDB의 사람에게의 투여량을 참고로 하여 설정하였으며, 또한 항원감작의 효율을 증가시키기 위하여 면역보조제를 혼합투여한 군과 DDB-S를 거대분자인 BSA와 결합시킨 단백질합투여군 및 OVA를 사용한 양성대조군으로 시험군을 설정하였다.

ASA 시험결과 DDB-S는 저용량군, 고용량군, 면역보조제 혼합투여군 및 단백질합 혼합투여군 모두에 있어서 아나필락시스 쇼크 반응을 나타내지 않았다. 또한 PCA 시험 및 PHA 시험에서도 모든 시험군에서 음성을 나타내었으며 따라서 DDB-S는 조직친화성 IgE 항체를 생성하지 않으며 항체생성을 유도하지 않는 것으로 생각된다. 이상의 실험결과를 종합해 볼 때 DDB-S는 임상시험에서 항원성으로 인한 부작용을 일으킬 가능성은 희박할 것으로 생각된다. 이러한 실험결과는 DDB-S를 정맥주사용으로 개발하는데 필요한 전임상 안전성 자료로서 활용될 수 있으리라고 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 보건의료기술개발과제의 연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Baek, N.J., Kim, D.H., Lee, D.E., Sunwoo, Y., Han, H. M., Chung, S.T., Kim, P.S., and Kim, H.S. (1994): Antigenicity of CFC-101 (*Pseudomonas* vaccine) in guinea pigs and mice. *J. Appl. Pharmacol.*, **2**, 331-3354.
- Fu, T. and Liu, G. (1992): Protective effects of dimethyl-4,4'-dimethylenedioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate on damages of isolated rat hepatocytes induced by carbon tetrachloride and D-galactosamine. *Biomed. Environ. Sci.*, **5**, 185-194.
- Gu, S.J., Gao, W.W., Qiao, P.X., Wang, A.G., and Qiang, Z.Y. (1989): The dissolution rate and physical dispersion state of preparation of biphenyl dimethyl dicarboxylate. *Acta Pharmaceutica Sinica*, **24**, 859-864.
- Gu, S.J., Wang, X.L., Gao, W.W., Qiao, P.X., Wang, A. G., Qiang, Z.Y., and Song, Z.Y. (1990): Bioavailability studies on the preparations of biphenyl dimethyl dicarboxylate. *Acta Pharmaceutica Sinica*, **25**(3), 215-219.
- Liu, K.T. and Lesca, P. (1982): Pharmacological properties of dibenzo[a,c]cyclooctene derivatives isolated from *Fructus Schizandrae Chinensis* III. Inhibitory effects on carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation, metabolism and covalent binding of carbon tetrachloride to lipids. *Chem. Biol. Interactions*, **41**, 39-47.
- Liu, G. (1987): Therapeutic effects of biphenyl dimethyl dicarboxylate(DDB) on chronic viral hepatitis B.. *Proc. CAMS and PUMC*. **2**, 228-233.
- Liu, T.Y., Hwua, Y.S., Chao, T.W., and Chi, C.W. (1995): Mechanistic study of the inhibition of aflatoxin B1-induced hepatotoxicity by dimethyl-4,4'-dimethylene dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate. *Cancer Letters*, **89**, 201-205.
- Liu, Z.Y., Cui, Q., and Liu, G.T. (1996a): Effects of dimethyl-4,4'-dimethylene dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate(DDB) on several phenotypes of BEL-7402 hepatocarcinoma cell line and its mechanism. *Acta. Pharm. Sin.*, **31**, 101-106.
- Liu, Z., Liu, G., and Zhang, S. (1996b): Reversing effects of dimethyl-4,4'-dimethylene dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate(DDB) on phenotypes of human hepatocarcinoma cells line. *Cancer Letters*, **108**, 67-72.
- Qing, W. and Liu, G. (1992): Protective effects of dimethyl-4,4'-dimethylene dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate(DDB) against carcinogen-induced rat liver nuclear DNA damage. *Biomed. Environ. Sci.* **5**, 201-207.