

## Bucillamine 의 항류마티스 작용중 임파구에 대한 효과

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실, 가톨릭의과학 연구원 면역생물연구소\*

박성환 · 임순자\* · 민준기 · 박재호 · 홍연식 · 이상현 · 조철수 · 김호연

### — Abstract —

### Effects of Bucillamine on the Function of Human B Cell and T Cell

Sung-Hwan Park, Soon-Ja Lim\*, Jun-Ki Min, Jae-Ho Park,  
Yeon-Sik Hong, Sang-Heon Lee, Chul-Soo Cho, Ho-Youn Kim

*Department of Internal Medicine, Catholic University Medical College,  
Kangnam St. Mary's Hospital, #505, Banpo-Dong, Seocho-Ku, 137-040*

**Objective :** Bucillamine[N-(2-mercaptopropionyl)-L-cysteine] (BUC) is a thiol compound that differs from D-pencillamine(DPC) in that it contains two free sulfhydryl groups. Clinical trials have suggested that the efficacy of BUC in rheumatoid arthritis(RA) is as effective as DPC, but the mechanism of action remains unclear. We therefore examined the effects of BUC on the in vitro function of human B cell and T cell in comparision to those of DPC.

**Methods :** The effect of BUC and DPC on *Staphylococcus aureus* Cowan 1(SAC) induced IgM production by B cells from 11 healthy donors was examined. Phytohemagglutinin (PHA) induced proliferation and Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) and Interleukin-2 (IL-2) production by T cells was also examined.

**Results :** BUC and BUC-ID(SA981) suppressed the production of IgM at concentration of 0.1-100 ug/ml, whereas DPC suppressed at concentration of 100 ug/ml. BUC and DPC inhibited PHA induced DNA synthesis of peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) and T cell in a dose-dependent manner. DPC (10 ug/ml) significantly suppresed IFN- $\gamma$  production by PHA-stimulated T cells, but not suppressed IL-2 production, whereas BUC(10 ug/ml) not significantly suppressed IFN- $\gamma$  and IL-2 production.

**Conclusion :** BUC has immunosuppressive effects inhibiting the function of B cells and T cell proliferation, whereas the action of DPC is targeted at T lym-

phocytes. BUC may be effective in rheumatoid factor positive RA patients who have not responded to treatment with DPC.

Key Words : Bucillamine, D-penicillamine, Rheumatoid arthritis

용상의 차이점에 대해 살펴보고자 하였다.

## 서 론

Bucillamine은 분자내에 2 개의 thiol(SH)기를 갖고 있는 cysteine 유도체로 d-penicillamine과 화학적 구조가 유사한 항류마티스 약물(disease modifying antirheumatic drug, DMARD)의 일종이다<sup>9</sup>. 그러나 bucillamine이 류마티스 관절염에 작용하는 기전은 d-penicillamine과는 다른 것으로 보고되고 있다<sup>5-9,11</sup>. 즉, 류마티스 관절염의 실험모델인 collagen induced adjuvant arthritis에서 d-penicillamine이 효과가 없는 반면 bucillamine은 효과적으로 염증 및 조직의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>9</sup>.

항 류마티스 약물은 비스테로이드성 항염제에 반응을 보이지 않는 환자에서 효과적으로 증상을 완화시키고 관해를 유도할 수 있는 약물로 알려져 있지만 그 작용기전, 약물의 사용시기와 사용기간등에 대해서는 명확하게 밝혀지지 않았다. 그러나 류마티스 관절염의 치료에 있어서 약물 선택의 최근 경향은 항류마티스 약물을 비교적 조기에 시작하거나, 작용기전, 약물 대사, 부작용 등을 고려하여 항류마티스 약물의 복합요법을 실시하고 있다<sup>4, 16-17</sup>. 따라서 항류마티스 약물의 작용기전에 대한 연구는 약물 선택에 많은 도움을 준다.

bucillamine의 항류마티스 작용 기전에 대한 연구는 면역 조절의 효과를 중심으로 진행되어 왔다. 즉 임파구의 기능에 대한 영향을 알기 위해 시험관내에서 B, T임파구에 대한 bucillamine의 효과를 화학적 구조가 유사한 d-penicillamine과의 비교 연구가 진행되어 왔으나 그 정확한 기전은 밝혀지지 않았다.

본 연구에서는 bucillamine과 그 대사 유도체인 SA 981의 시험관내에서 T 세포 및 B 세포 기능에 대한 면역 억제 효과를 약물학적으로 의미있는 농도에서 측정하여 DPC와 비교함으로서 면역 조절 작

## 대상 및 방법

### 1. 세포의 분리

건강한 지원자 11명으로부터 제공받은 heparinized venous blood를 Ficoll-hypaque (Pharmacia, Pisca-taway, NJ, Sweden)를 사용하여 2000 rpm, 18°C에서 30분간 원심분리한다. 분리된 PBMC (peripheral blood mononuclear cells)는 5 mM L-leucine methylester HCL (Sigma, ST. Louis, Mo, U.S.A.)를 처리하여 monocytes와 natural killer(NK) cells을 제거한다. 위의 세포군을 RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, U.S.A.) 배양액으로 2회 세척한 다음 4%-Aminoethylisothiouronium (AET)-treated sheep RBC (Korea media co., Korea)와 함께 배양하여 Ficoll-hypaque gradients로 원침분리한다. rosette를 형성한 세포중 면양적 혈구를 증류수로 용혈시킨 후 nylon-wool column을 통과시킨다. rosette를 형성하지 않은 세포군 (non-T 세포)은 4% AET-SRBC로 다시 처리하여 Ficoll-hypaque gradients로 원심분리시켜 잔여의 T 세포를 제거한다. 최종적으로 얻은 T 세포 및 non-T 세포군은 각각 CD3 monoclonal antibody, CD20 monoclonal antibody를 이용한 flow cytometry (Beton Dickinson, Oxnard, CA, U.S.A.) 분석에서 90% 이상 양성임음을 확인한다.

### 2. IgM 생성 유도를 위한 B 세포의 배양

분리된 B 세포 (5x10<sup>4</sup>/well)를 96-well U-bottom microtiter plate (Costar Co., Cambridge, U.S.A.)에서 Santen pharmaceutical Co. (Osaka, Japan)에서 제공받은 bucillamine((BUC), 0, 1, 10, 100 µg/ml)과 SA-

981 (0, 0.1, 1, 10 ug/ml), Sigma 사에서 구입한 d-penicillamine( (DPC), 0, 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )과 반응 시킨 후 staphylococcus aureus cowan(SAC, Sigma)을 1 : 70 ug/ml 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 CuSO<sub>4</sub> (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 가첨가된 10% FBS, RPMI-1640 배양액으로 10 일간 배양한다. 배양후 상청액을 수집하여 실험전까지 -20°C에서 보관한다.

### 3. IgM의 측정

IgM의 측정은 Hirohata 10)등의 방법을 이용하였으며 약술하면 다음과 같다. Phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2에 anti-human IgM F(ab')<sub>2</sub> fragment (20 ug/ml : Jackson ImmunoResearch, West Grove, PV, U.S.A.) 50 ul을 96-well T-bottomed microtiter plates (Nunc, Roskilde, Denmark)에 도포하여 40°C에서 16-18 시간 방치한 후 차가운 PBS로 세번 세척한다. 10 % bovine serum albumin (BSA) 100 ul를 가하여 실온에서 3시간 30분 방치 후 PBS로 3번 세척한다. 1% BSA가 포함된 PBS로 희석된 배양 상청액 (1 : 25)과 표준 IgM (Jackson ImmunoResearch) 검체를 50ul 가한 후 37°C에서 1 시간 방치한 후 PBS로 세번 세척한다. 세척 후 PBS-BSA로 희석 (1 : 2000)된 peroxidase conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragment goat anti-human IgM (Jackson ImmunoResearch) 용액을 50 ul 가한 후 40°C에서 16-18시간 방치한다. 각 well에 o-phenylenediamine (OPD ; 0.2 mg/ml) 기질 용액을 가한 후 6 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액으로 효소반응을 중지시킨 다음 490 nm에서 분광광도계 (Titertek ELISA reader)로 흡광도를 (A490)를 측정한다.

### 4. 말초 혈액 단핵구와 T 임파구의 mitogen 자극반응에 대한 효과

PBMC와 T-cell (1x10<sup>5</sup> cells/well)는 CuSO<sub>4</sub> (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )가 있는 상태에서 PBMC는 Santen pharmaceutical Co. (Osaka, Japan)에서 제공받은 bucillamine((BUC), 0, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )과 SA-981 (0, 0.1, 1, 10 ug/ml), Sigma

사에서 구입한 d-penicillamine( (DPC), 0, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을, T세포는 BUC (0, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), DPC (0, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )가 포함된 배양액에 재부유하여 37°C에서 1시간 방치한다. 방치 후 배양액으로 두 번 세척하고 Phytohemagglutinin( (PHA), Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) 25ug/ml 를 처리하여 U-bottomed microtiter plate (1x105 cells/well)에 배양한다. 72 시간 배양후 3H-thymidine (1 uCi/well ; NEN, Boston, MA, U.S.A.)을 가하여 -counter (Pacard, Downers groves, IL, U.S.A.)로 계측하여 세포의 proliferation 정도를 조사한다. cytokine에 대한 영향을 조사하기 위해 96시간 배양후 상청액을 수집하여 IL-2, IFN- $\gamma$  ELISA kit (R & D, Minneapolis, MN, U.S.A)를 이용하여 약물 농도에 따른 각각의 cytokine을 측정한다.

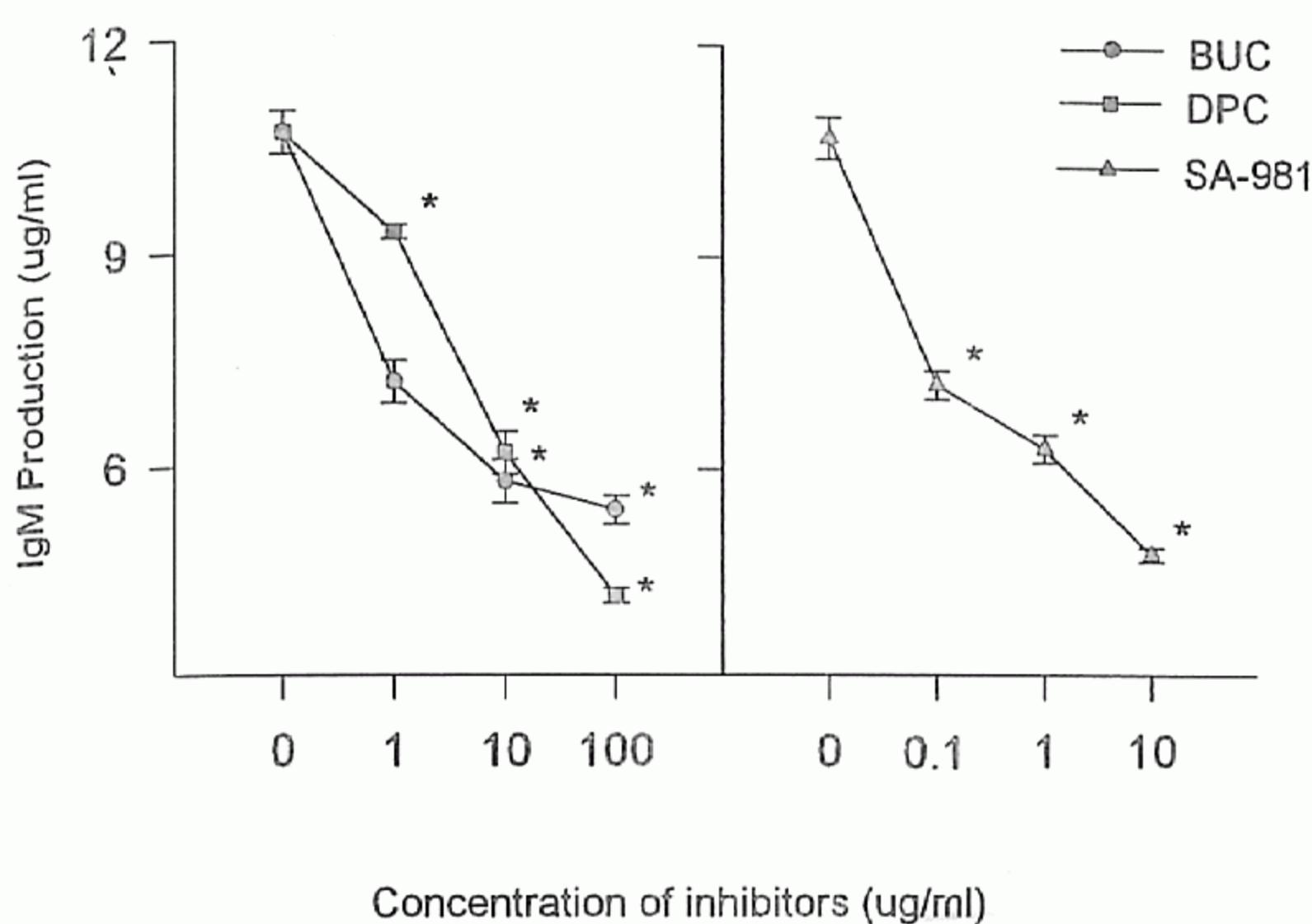
## 결 과

### 1. B 임파구의 IgM 생성에 대한 bucillamine의 효과

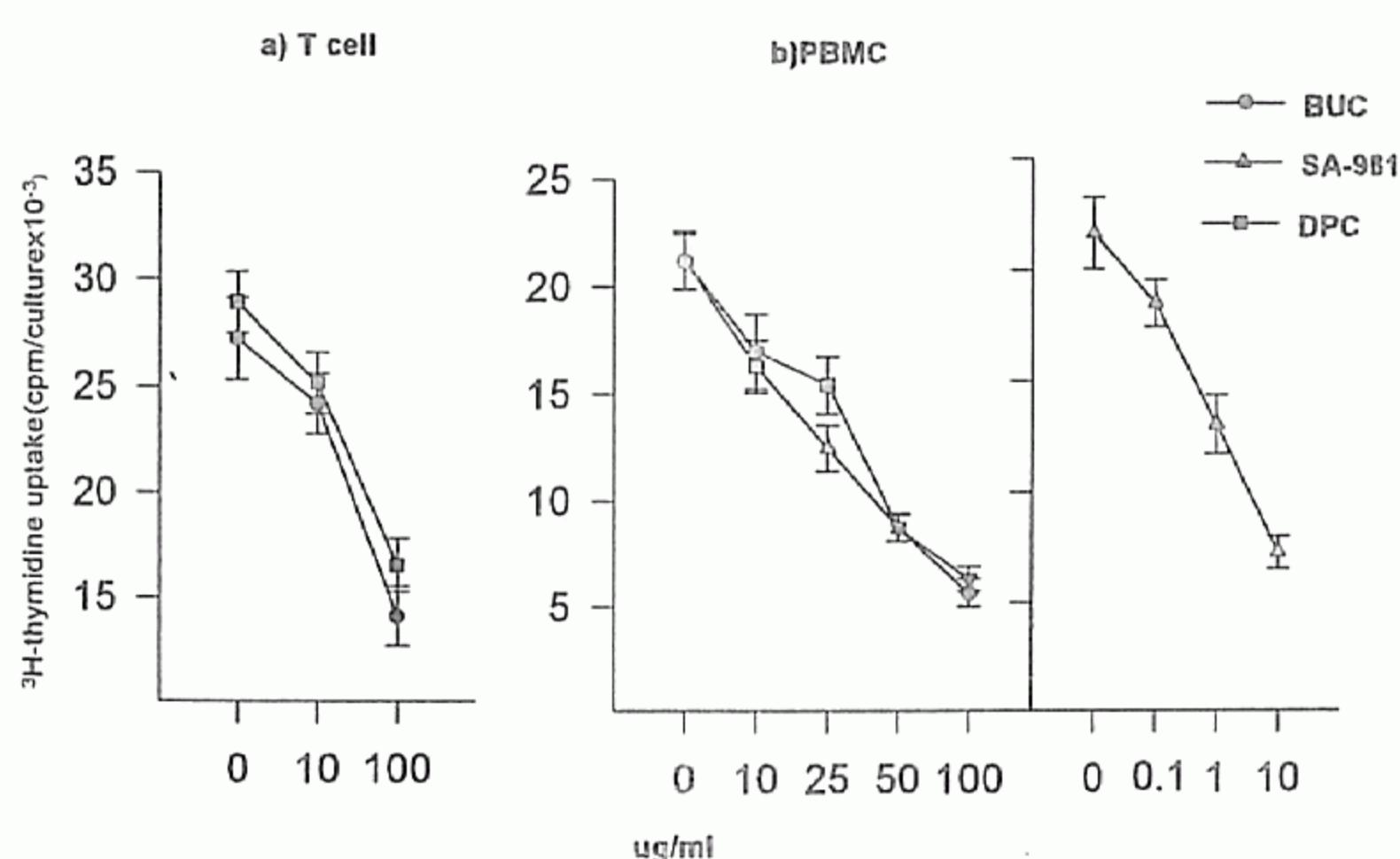
bucillamine(BUC)의 B 세포에 대한 영향을 조사하고 그 효과를 d-penicillamine(DPC)과 비교하기 위해 0, 1, 10, 100 ug/ml의 농도의 BUC, DPC과 bucillamine 대사 중간유도체인 SA-981을 CUSO<sub>4</sub> (5ug/ml) 존재하에 10 일간 배양후 측정한 IgM 농도는 Fig. 1과 같다. 즉 약제의 농도가 증가함에 따라 IgM 생성의 억제효과가 증가함을 알 수 있다. DPC와 비교할때 BUC는 1 ug/ml의 농도에서부터 IgM생성의 억제 효과가 통계적으로 유의하게 관찰되었고, BUC 대사 유도체인 SA981은 0.1 ug/ml의 농도에서부터 IgM 생성의 억제 효과가 관찰되기 시작하였다.

### 2. PHA 자극에 따른 말초 단핵구 세포 및 T 임파구 증식에 대한 bucillamine의 효과

BUC 및 DPC (0, 10, 25, 50, 100 ug/ml), SA-981 (0, 0.1, 1, 10 ug/ml)의 농도를 말초단핵구 세포와 전처치후, PHA 자극에 따른 세포 증식에 대한 약물의 효과를 비교한 결과 약물 농도가



**Fig. 1.** Dose-dependent inhibition of in vitro production of IgM by D-penicillamine (DPC), bucillamine (BUC) and bucillamine intramolecular disulfide (SA-981). B cells ( $5 \times 10^4$ /well) were stimulated with SAC in the presence of  $\text{CuSO}_4$  (5 ug/ml). Various concentrations of DPC, BUC or SA-981 were added. After 10 days of incubation, the supernatants were harvested and assayed for IgM content by ELISA. Each point represents the mean SEM of 11 samples. Student's t test of each point was performed by comparison with the control. \*:  $p < 0.05$



**Fig. 2.** Dose-dependent inhibition of PHA induced response of human peripheral T cell (a) and mononuclear cell (PBNC, b) by bucillamine, D-penicillamine and SA-981.

증가함에 따라 세포 증식의 억제 효과가 증가하는 소견을 보였다 (Fig. 2-b). BUC 및 DPC (0, 10, 100 ug/ml)의 농도를 T 세포와 전처치후, PHA 자극에 따른 세포 증식에 대한 약물의 효과를 비교한 결과 약물 농도가 증가함에 따라 세포 증식의 억제 효과가 증가하는 소견을 보였다 (Fig. 2-a).

### 3. BUC 과 DPC가 T 임파구의 IL-2 및 IFN- $\gamma$ 생성능에 미치는 영향

BUC 및 DPC 를 처치 하기전과 10, 100 ug/ml 처리후 PHA 자극에 대한 IL-2 생성의 차이를 조사한 결과 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다 (Table 1). BUC 농도에 따른 IFN- $\gamma$ 의 생성의 감

Table 1. Effects of T cell production of IL-2 and IFN- $\gamma$  by DPC and BUC

Drug	Cytokine	Concentrations		
		0 ug/ml	10 ug/ml	100 ug/ml
bucillamine (BUC)	IL-2	569.8±8.4	547.6±21.5	532.6±22.7
	IFN- $\gamma$	522.6±34.3	425.5±97.1	252.8±38.1*
d-penicillamine (DPC)	IL-2	503.1±34.7	506.8±43.1	487.4±48.1
	IFN- $\gamma$	441.1±51.3	254.5±30.7*	196.5±21.9

\* : p < 0.05

소는 100 ug/ml 농도에서 관찰되었고, DPC는 10 ug/ml의 농도에서부터 IFN- $\gamma$ 의 생성이 통계적으로 유의하게 감소하였다 (Table 1).

## 고 찰

류마티스 관절염 (rheumatoid arthritis, RA)은 활막 조직의 만성적인 염증으로 인한 조직파괴가 특징적인 소견이며 여기에는 여러 종류의 면역학적인 이상(immunological abnormalities)이 깊이 관련되어 있다<sup>4)</sup>. RA의 병인에는 다클론성 B세포의 증식소견과 아울러 T 임파구의 기능이상이 알려지고 있다. 즉 B세포의 기능이상으로 인한 자가항체로서 rheumatoid factor가 특징적으로 검출되고, 면역글로불린 등이 비특이적으로 증가되어 있으며, 또한 T임파구 및 monocyte에서 생성 분비되는 여러종류의 cytokine 등이 직접, 혹은 간접적으로 병리기전에 관여하는 것으로 알려져 있다. Bucillamine (BUC)과 d-penicillamine (DPC)는 immuno-modulator로서 T 및 B 임파구에 대한 면역억제 작용을 나타내며 이들의 약리작용은 거의 유사한 것으로 알려져 왔다. 그러나, 최근 rat의 제2형 collagen유도 관절염에서 BUC이 DPC와는 다르게 활액 내막세포의 증식 억제등 유익한 효과를 나타냈고, T 임파구의 기능에 대해서도 DPC와 유사한 억제작용을 나타낼 뿐만아니라, 그 대사산물 중의 하나인 SA-981(intramolecular disulfide form)을 형성하여 DPC보다 강력하고 독특한 면역억제 작용이 발휘됨이 보고되면서 BUC가 화학구조상 유사체인 DPC와는 다른 작용기전을 갖는것으로 밝혀지고 있다<sup>3,5-9,11-15)</sup>.

분 3개월 이내에 효과가 나타나는 것으로 보고되었다.

본 실험에서 B 임파구 기능에 대한 BUC 및 DPC의 면역억제 효과를 조사하기 위해 SAC 자극 후 유도된 IgM 생성의 억제효과를 조사한 결과는 Hirohata 등<sup>8,9)</sup>의 결과와 마찬가지로 CuSO<sub>4</sub> 존재하에서 BUC, DPC 모두 양제의 농도가 증가함에 따라 IgM 생성의 억제효과가 증가하였다. CuSO<sub>4</sub> 5 ug/ml 존재하에 IgM 생성의 억제 효과는 SA981과 BUC는 DPC와는 달리 각각 약물학적으로 의미있는 농도로 알려진 0.1 ug/ml, 1ug/ml 농도에서 통계적으로 의미있는 억제효과가 관찰되어 생체내에서 DPC 보다 B 임파구의 면역 억제 기능에 깊이 관여함을 추정할 수 있다. 또한 Hirohata<sup>8)</sup> 등이 B임파구의 배양배지에 CuSO<sub>4</sub>를 첨가하지 않고 DPC만 처리하였을 때에는 IgM 생성의 억제효과가 관찰되지 않았다는 보고는 BUC가 DPC 보다 B임파구의 면역억제기능에 깊이 관여한다는 사실을 지지해 준다.

BUC, BUC의 disulfide 형태인 SA981, DPC 모두 CuSO<sub>4</sub> 존재하에서 PHA에 의해 유도된 말초 혈액 단핵구의 DNA 합성은 각 양제의 용량이 증가함에 따라 억제의 정도가 증가하였다. 이를 양제의 T 임파구의 면역 억제 기능에 대한 효과를 살펴보기 위해 시행한 결과에서도 양제 농도의 증가에 따라 T 세포의 PHA 자극에 대한 DNA 합성의 억제역시 증가하는 dose dependent manner의 억제가 관찰되었다. T 세포의 증식 억제와 관련된 인자를 찾기 위해 BUC, DPC 처리후 T세포의 IL-2, IFN- $\gamma$ 의 생성능을 조사한 결과 BUC, DPC 모두 100 ug/ml에서 IL-2 생산의 억제효과는 통계적으로 유

BUC는 일본에서 개발되어 일본 및 국내에서 류마티스 관절염 환자를 대상으로 임상 실험을 실시한 결과, 류마티스 관절염의 치료에 효과적이며 부작용이 비교적 적은 안전한 약물로 보고되고 있다<sup>1,2,11)</sup>. 특히 약물의 효과가 비교적 초기에 나타나기 시작하여 대부

## — 박성환 외 : Bucillamine 의 항류마티스 작용증 임파구에 대한 효과 —

의한 차이가 관찰되었다. IFN-r 는 DPC 에서는 10 ug/ml 에서 부터 생산의 억제가 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 BUC는 100 ug/ml에서 관찰되었다. 즉 약물학적으로 의미있는 농도의 BUC, DPC 모두 CuSO<sub>4</sub>존재하에서 T세포의 증식 억제효과는 관찰되지만 류마티스 관절염의 염증에 관여하는 IFN-r 의 억제효과는 DPC 에서만 관찰되었다. Hashimoto<sup>5)</sup>등은 30 ug/ml 의 BUC 및 SA981 이 T세포의 IL-2 생산에 억제효과가 있음을 보고한 결과는 다소 다른 결과를 보였지만 일반적으로 약물학적으로 의미있는 농도인 0.1-5 ug/ml 에서는 IL-2 생산의 억제 효과가 없는 것으로 보고한 Hirohata<sup>9)</sup> 의 보고와는 일치하였다. 이상과 같이 본 실험의 결과 BUC는 약물학적으로 의미있는 농도인 10 ug/ml 이하의 농도에서 CuSO<sub>4</sub> 존재하에 B 임파구의 IgM 생산을 억제하며 PHA에 의해 유도된 T세포의 증식도 억제하는 효과가 있음을 알 수 있다.

Hashimoto 등<sup>5)</sup>은 bucillamine 이 T 세포 증식에 작용하는 시기를 조사하기 위해 배양시작, 배양 후 24시간, 48시간후 BUC 처치후 T 세포의 증식 억제 효과를 조사한 결과 배양 시작 시기에 BUC 처치군에서 가장 많은 억제 효과가 관찰되어 BUC 는 T 세포 반응의 비교적 초기단계에 작용하는것으로 보고하였다. 또한 SA981 은 30 ug/ml의 농도에서 임파구의 생존에 영향을 미치지 않으며, 처치 시기에 영향을 받지 않는 것으로 보고하면서 약물의 비특이적 독성 반응에 의한 T 세포의 증식 억제 효과가 아님을 주장하였다. IL-2 생산에 있어서 BUC 는 CuSO<sub>4</sub> 존재하에서 억제 효과가 증가하지만, SA 981 은 CuSO<sub>4</sub> 의 영향을 받지 않고 IL-2 억제 효과가 증가하는 것으로 알려져 있다. 그러나 BUC, BUC-ID 의 약물학적 농도인 1 ug/ml 에서는 IL-2 생성의 억제 효과는 없으며 DPC 는 10 ug/ ml 에서 억제 효과가 관찰되는 것으로 보고되었다<sup>3,5)</sup>. Hirohata 등은 3 ug/ml 농도의 DPC 에서 T 임파구의 IFN-r 의 생성억제가 관찰되지만, SA 981 은 0.3 ug/ml 에서 IgM 억제 효과는 관찰되지만 IFN-r 에는 영향이 없는 것으로 보고하였다<sup>9)</sup>.

또한 Akamatsu<sup>3)</sup>등은 BUC 는 BUC-ID 를 통

해 DPC 의 작용기전과는 달리 CuSO<sub>4</sub> 없이도 T 임파구, B임파구의 억제 효과를 나타내며 catalase 에 의해 억제 효과가 반전되지 않는 특징이 있음을 주장하였다. 이는 DPC 의 주작용 기전인 T 임파구에서 IL-2, IFN-r 의 생산을 억제하여 T 세포의 기능을 억제하여, helper T 세포의 기능 억제를 통한 간접적인 면역 글로불린의 억제와는 차이가 있음을 시사해준다.

결론적으로 BUC 는 약물학적으로 의미있는 농도에서 생체내에서 DPC와 유사한 T세포 억제 효과외에도 대사유도체 (intramolecular disulfide)인 SA981 을 통하여 B 세포의 억제효과가 있음을 알 수 있다. 따라서 DPC 에 반응하지 않는 류마티스 관절염 환자중 B 임파구의 활성화로 인한 류마티스 인자가 양성인 환자의 치료에 적응할수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

연구 목적: bucillamine 의 항류마티스 작용 기전을 알기 위하여 bucillamine(BUC) 과 그 대사유도체인 (BUC-ID, SA 981) 의 T 임파구와 B 임파구의 기능에 대한 시험관내 효과를 약물학적으로 의미있는 농도에서 측정하여 d-penicillamine (DPC) 의 효과와 비교함으로서 면역 조절 작용상의 차이점에 대해 살펴보려 하였다. 방법: 건강 지원자 11 명의 말초 단핵구에서 B, T 임파구를 분리한 후 Staphylococcus aureus Cowan 1 (SAC) 자극에 대한 IgM 생산 및 Phytohemagglutinin (PHA) 자극에 대한 T 세포의 증식과 Interferon-r(IFN-r) 및 Interleukin-2 (IL-2) 생산에 대한 BUC 및 SA-981 의 효과를 조사하였다. 결과: BUC, DPC 모두 억제의 농도가 증가함에 따라 IgM 생성에 대한 억제 효과가 증가하였다. IgM 생성의 억제 효과는 SA981 과 BUC 는 DPC 와는 달리 각각 약물학적으로 의미있는 농도로 알려진 0.1 ug/ml, 1ug/ml 에서 통계적으로 의미있는 억제효과가 관찰되었다. BUC, DPC 의 약물 농도가 증가함에 따라 PHA자극에 대한 T 세포 증식의 억제 효과가 증가하는 소견을 보였다. DPC 는 10 ug/ml 의 농도에서 IFN-r 의 생산억제 효과가 통

계적으로 유의하게 관찰 되기 시작하였으나 IL-2 생산에는 영향이 없었다. BUC는 10 ug/ml 의 농도에서 IFN- $\gamma$  및 IL-2 생산에는 영향이 없었다 결론: BUC는 T 임파구 증식의 억제 효과면에서는 DPC 와 유사하지만, intramolecular disulfide 형태인 SA981 을 통해 생체내에서 DPC 보다 B 세포의 면역 억제 기능에 깊이 관여함을 추정할 수 있다. 따라서 DPC에 반응하지 않는 RA 환자중 B 임파구 활성화로 인한 류마티스 인자 양성인 환자의 치료에 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다.

### 참 고 문 헌

- 1) 김현아, 송영욱: 류마티스 관절염 환자에서 d-penicillamine 과 Bucillamine 효과에 관한 비교 연구. 대한류마티스학회지 2:164-173, 1995
- 2) 배상철, 이인홍, 유대현, 김성윤: 류마티스 관절염 환자에서 N-(2-Mercapto-2-methylpropionyl) -L-cysteine(SA96)의 임상시험. 대한 내과학회지 44:416-424, 1993
- 3) Akamatsu T, Matsubara T, Saegusa Y, Mizuno K: Inhibition of mitogen-induced response of human peripheral blood mononuclear cells by bucillamine, a new antirheumatic sulfhydryl drug. *Rheumatol Int* 1994, 13: 197-201
- 4) Cash JM, Klippel JH : Second-line drug therapy for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 330:1368-1375, 1994
- 5) Hashimoto K, Lipsky PE : Immunosuppression by the disease modifying antirheumatic drug bucillamine: Inhibition of human T lymphocyte function by bucillamine and its metabolites. *J Rheumatol* 20 : 953-957, 1993
- 6) Hayashi M, Matsunaga K, Okahara A, Mita S: Effect of bucillamine(SA96) on type II collagen induced arthritis in rats. *J. Rheumatol.* 18: 691-624, 1991
- 7) Hirohata S, Inoue T, Miyamoto T. Frequency analysis of human peripheral B cells producing IgM-rheumatoid factor: Differential effects of stimulation with monoclonal antibodies to CD3 and *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 145: 1681-1686, 1990
- 8) Hirohata S, Lipsky PE : Regulation of B cell function by bucillamine, a novel disease-modifying antirheumatic drug. *Clin Immunol Immunopathol* 66:43-51, 1993
- 9) Hirohata S, Lipsky PE : Comparative inhibitory effects of bucillamine and D-penicillamine on the function of human B cells and T cells. *Arthritis rheum* 37:942-950, 1994
- 10) Hirohata S, Yamada A, Inoue T: A sensitive and simple method for determination of IgM in cerebrospinal fluid by a solid -phase enzyme immunoassay: Comparision of two different methods. *J Neuro Sci* 67: 115-118, 1985
- 11) Kashiwazaki S, Shiokawa Y: Bucillamine : A new immunomodulator. *Int. J. Immunother* 3:1-6, 1987
- 12) Lipsky PE: Mechanism of action on D-penicillamine in rheumatoid arthritis. *Adv Inflamm Res* 7: 175-184, 1984
- 13) Lipsky PE, Ziff M: The effect of D-penicillamine on mitogen-induced human lymphocyte proliferation: synergistic inhibition by D-penicillamine and copper salts. *J Immunol* 120, 1006-1013, 1978
- 14) Lipsky PE, Ziff M: Inhibition of human helper T cell function in vitro by D-penicillamine and CuSO<sub>4</sub>. *J Clin Invest* 65, 1069-1076, 1980
- 15) Mita S, Matsunaga K: Differences in the effects of the anti-rheumatic drugs, bucillamine and D-penicillamine, on mitogen-induced proliferation of mouse spleen cells. *Agents Actions* 30: 363-368, 1990
- 16) O'Dell JR. Haire CE, Erikson N, Drymalski W, Palmer W, Eckhoff PJ. Garwood V. Maloey P. Klassen CN, Wees S, Klein H, Moore GF: Treatment of rheumatoid arthritis with methotrexate alone, sulfasalazine and hydroxychloroquine, or a combination of all three medications. *N Engl J Med* 334:1287-1291, 1996
- 17) Tugwell P. Pincus T, Yocun D, Stein M, Gluck O, Kraag G, McKendry R, Tesser J, Baker P, Barer P, Wells G: combination therapy with cyclosporine and methotrexate in severe rheumatoid arthritis. the methotrexate-cyclosporine combination study group. *N Engl J Med* 333:137-141, 1995