

새로운 퀴놀론 항균제 DW286의 살균작용

윤희정 · 민유홍 · 심미자* · 최응칠#

서울대학교 약학대학 · 종합약학연구소

*서울시립대학교 생명과학과

(Received September 2, 2003; Revised October 9, 2003)

Bactericidal Activity of DW286, a New Fluoroquinolone Antibiotic

Hee-Jeong Yun, Yu-Hong Min, Mi-Ja Shim* and Eung-Chil Choi#

College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*Department of Life Science, Seoul City University, Seoul 130-743, Korea

Abstract — The bactericidal activities of DW286, a new fluoroquinolone were investigated by comparing the minimal bactericidal concentrations (MBCs) and the time-kill curve of it against some Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. The MBCs of DW286 for the strains tested were either equal to or two-fold higher than the MICs, as were observed for the other fluoroquinolones. And DW286 exhibited rapid killing curves against the strains. Accordingly, it could be said that DW286 has bactericidal activity comparable to other fluoroquinolones.

Keywords □ DW286, fluoroquinolone, bactericidal activity, MIC, MBC

퀴놀론 계열 항생물질은 항말라리아 제제인 chloroquin 합성 연구과정 중 부산물로 발견된 nalidixic acid가 오프로미딘에 효과를 보여, 1963년 처음 임상적으로 사용되었으나 그 활성이 그람 음성균주에 제한되었다.^{1,2)} 그 이후, 이 구조를 기초로 하여 항균 스펙트럼 및 항균활성이 개선된 유도체를 개발하기 위한 노력들이 계속되었다.³⁾ 1970년대부터 2세대 항균제인 노르플록사신(norfloxacin), 시프로플록사신(ciprofloxacin) 오프록사신(ofloxacin) 등의 플로로 퀴놀론이 개발되었고, 제 3세대의 스파플록사신(sparfloxacin) 및 4세대의 트로바플록사신(trovafloxacin)을 거치며 그람 양성세균에 대한 활성의 증가 및 혐기성 세균에 대한 활성도 증가하여, 광범위 항균제로서 임상적으로 널리 사용되게 되었다.⁴⁻⁷⁾ 특히 플로로퀴놀론 항균제 가운데 시프로플록사신, 오프록사신, 스파플록사신등이 감염치료에 효과적으로 사용되고 있다. 또한 호흡기 감염 질환등에 보다 탁월한 효과가 있는 퀴놀론계 항균제를 개발하려는 연구가 최근에도 지속적으로 진행되고 있다.

퀴놀론 항균제는 세균의 DNA gyrase 및 topoisomerase IV에

작용하여 항균효과를 나타낸다.^{8,9)} DNA gyrase 및 topoisomerase IV와 결합한 퀴놀론은 이들의 활성을 억제하고, DNA replication fork의 진행을 저해하여 DNA 합성을 중단시킬 뿐 아니라, 동시에 DNA의 일시적 절단상태를 안정화시킴으로써, DNA의 염기 배열 순서를 바꾸거나 DNA에 손상을 입히는 것으로 보고되었다. 따라서 퀴놀론은 세균의 세포내에서 DNA가 정상적인 구조를 유지하는 것을 저해함으로써 살균효과를 나타내게 된다.⁸⁾ 신체의 정상적인 면역력이 저하된 감염증 환자에 있어서는 항균제의 살균능력은 매우 중요하므로, 항균제의 살균능력을 비교하는 것 역시 중요한 항균능력에 대한 평가자료이다.

DW286은 동화약품중앙연구소에서 합성한 신규 퀴놀론계 항생제로서, *in vitro* 항균효과에 있어, 그람 양성균에서는 트로바플록사신 및 제미플록사신보다도 우수한 항균효과를 나타내었고, 그람 음성균에서도 몇 균종을 제외하고는 트로바플록사신과 제미플록사신과 비슷한 효과를 나타내었으며, 약물동력학적 면에서도 우수하여, 새로운 신약후보물질로 기대되는 물질이다.¹⁰⁾ 본 연구에서는 DW286 항균제의 활성이 살균적인가 또는 정균적인가를 최소억제농도(MIC, minimal inhibitory concentration) 및 최소살균농도(MBC, minimal bactericidal concentration)를 비교하여 결정하고, 그 살균정도를 Time-kill curve를 통해 확인하였다.

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-880-7874 (팩스) 02-886-5802
(E-mail) ecchoi@snu.ac.kr

실험방법

시약 및 균주

DW286은 동화약품 중앙연구소에서 합성한 것을 사용하였으며, 대조 항균제로 Ciprofloxacin(CPFX, Bayer, 독일), Trovafloxacin(TVFX, Pfizer, 미국)을 사용하였다. MIC와 MBC 측정 을 위한 균주로 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC MB4-02 균주를 사용하였으며, 시험균주의 배양은 Difco사의 Mueller-Hinton 배지(Detroit, USA)를 사용하였다.

MIC의 측정

실험 대상 균주들에 대한 항균제의 최소저지농도측정은 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, U.S.A.) 의 액체배지 희석법에 의하여 실시되었다.¹¹⁾ 최고 농도에서 2배 계열 희석하여 최저농도 0.004 µg/ml이 되도록 항균제 희석 계열을 만들었다. 여기에 최종 균액농도가 10⁵ CFU/ml이 되도록 전배양한 균액을 접종하고, 37°C에서 18시간 배양하였다. 균의 성장을 관찰할 수 없는 최소농도를 MIC로 하였다.

MBC 측정 및 살균작용의 결정

MIC 측정을 실시한 후, MIC 농도 이상의 각각의 실험관에서

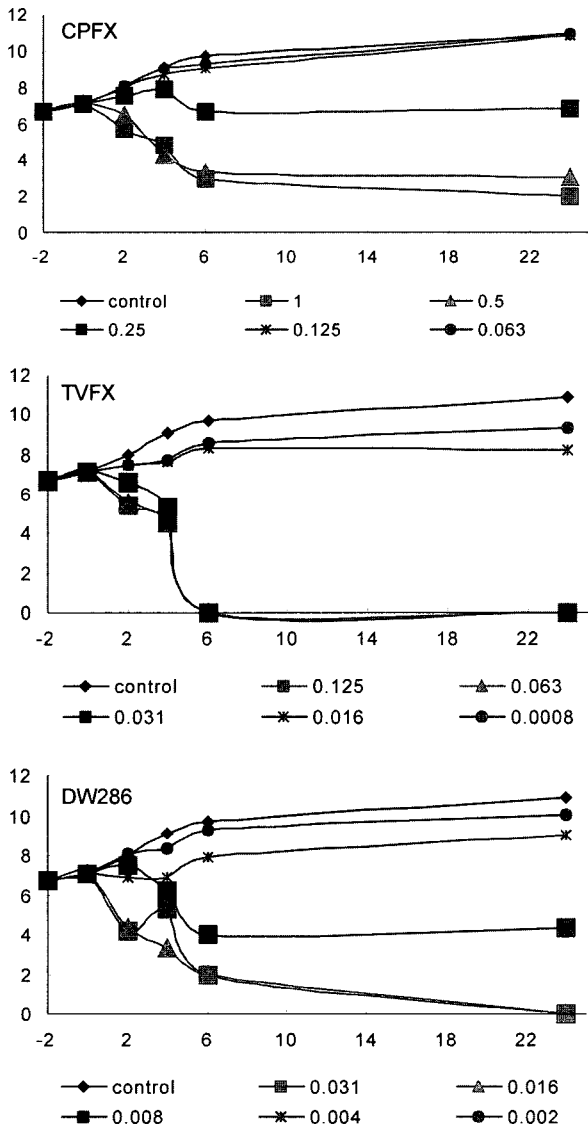


Fig. 1 – Time-kill analysis of CPFX, TVFX, and DW286 in *S. aureus* ATCC 25923. X axis: incubation time in hour, antibiotic concentration added in the culture in µg/ml. Y axis: viable cells after incubation in logCFU/ml.

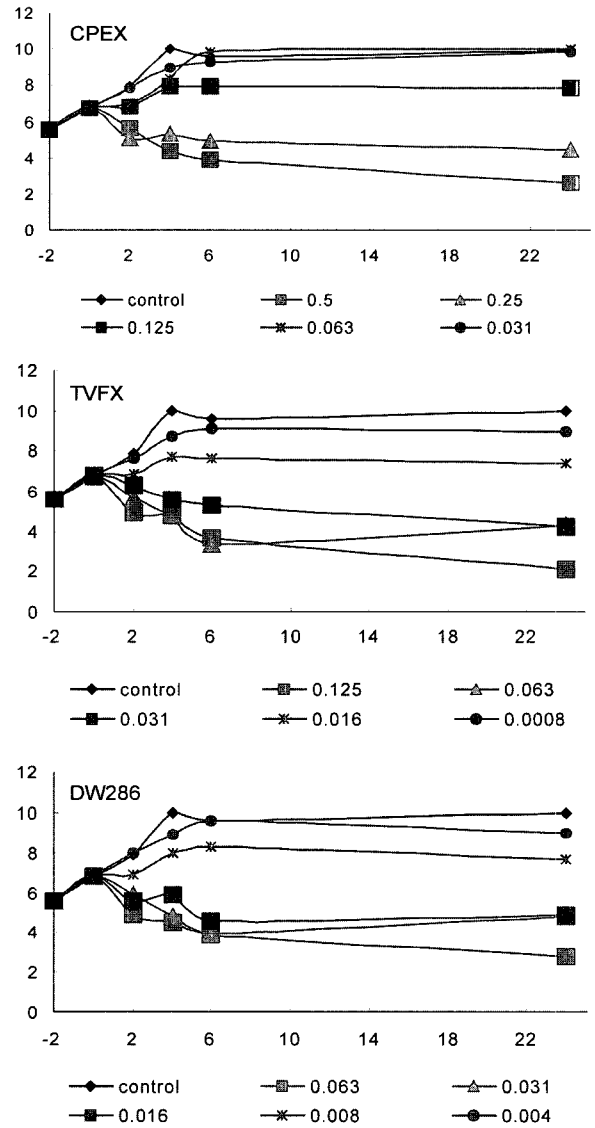


Fig. 2 – Time-kill analysis of CPFX, TVFX, and DW286 in *B. subtilis* ATCC 6633. X axis: incubation time in hour, antibiotic concentration added in the culture in µg/ml. Y axis: viable cells after incubation in logCFU/ml.

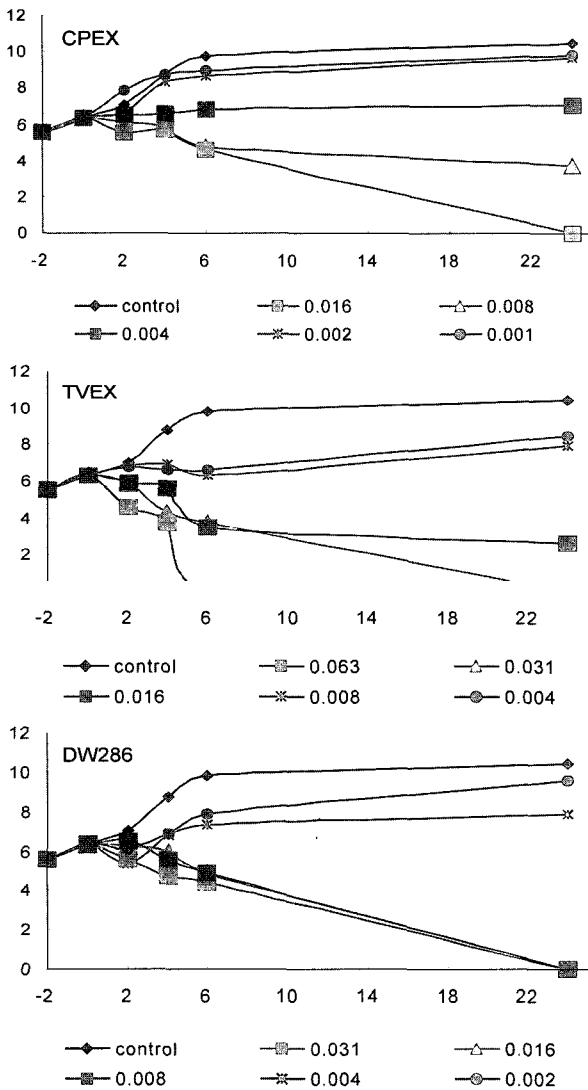


Fig. 3 - Time-kill analysis of CPFEX, TVEX, and DW286 in *E. coli* ATCC 25922. X axis: incubation time in hour, antibiotic concentration added in the culture in $\mu\text{g/ml}$. Y axis: viable cells after incubation in logCFU/ml.

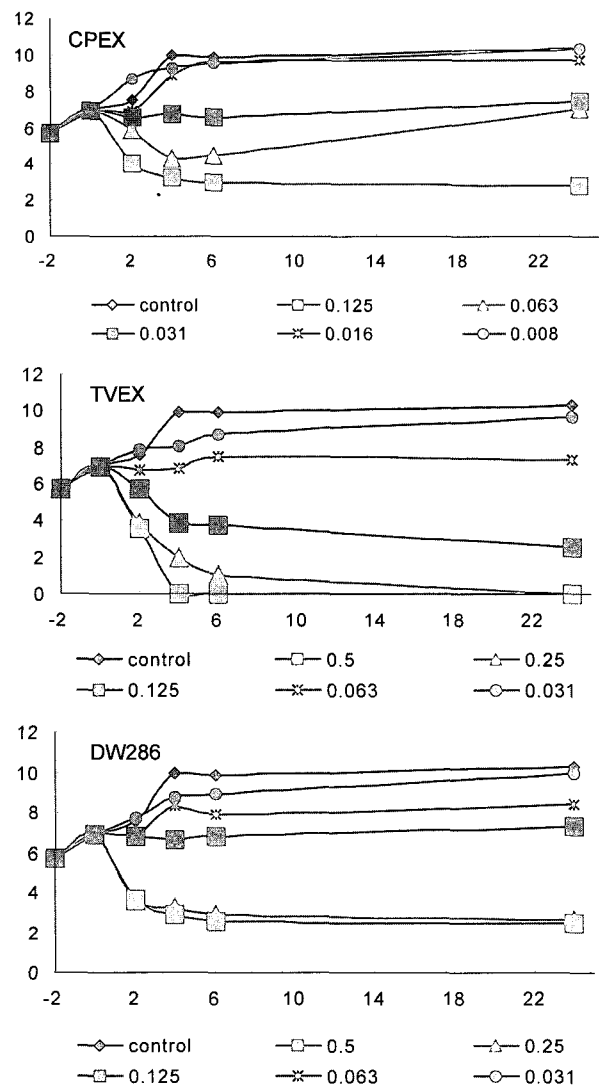


Fig. 4 - Time-kill analysis of CPFEX, TVEX, and DW286 in *K. pneumoniae* MB4-02. X axis: incubation time in hour, antibiotic concentration added in the culture in $\mu\text{g/ml}$. Y axis: viable cells after incubation in logCFU/ml.

배양액 50 μl 를 취하여, 항균제를 함유하지 않은 고체배지 표면에 도말한 후, 37°C에서 18시간 배양한 후 집락생성여부와 그 수를 확인하였다. 최소살균농도(MBC)는 접종균량의 99.9% 이상 사멸한 항균제의 가장 낮은 농도로 하였다. 살균작용의 결정은 MBC의 농도가 같은 실험계의 MIC와 같거나 2단계 이하일 때 그 활성을 살균작용으로 하였다.

Time-kill 곡선의 결정

퀴놀론의 살균 능력을 측정하기 위해, MIC 농도를 중심으로 한 2배 계열 다섯 농도의 항균제를 포함한 액체배지에, 배양된 균액을 약 10^6 CFU/ml의 농도가 되도록 각각 접종하고, 0, 2, 4, 6, 24시간에 균액을 100 μl 씩 채취하여 식염수에 10배계열로 희

석하여, 고체배지에 도말한 후, 37°C에서 18시간 배양하여 시간별 생균수를 확인하였다.¹²⁾ 고체배지에 포함된 균집락의 수가 30~300개 인 것을 기준으로 생균수를 계산하였으며, 고체배지 도말시 항생제 잔류를 막기위해 배양액은 적어도 10배 이상의 식염수에 희석되었다.¹²⁾

실험결과 및 고찰

각 균주에 대한 DW286과의 비교 퀴놀론 항균제의 MIC와 MBC를 Table I에 나타내었다. 본 연구실에서 사용하고 있는 그람양성균주, *S. aureus* ATCC 25923 및 *B. subtilis* ATCC 6633에 DW286의 MIC는 0.008 및 0.016 $\mu\text{g/ml}$ 로서 시프로플록사신

Table I - The MIC and MBC of fluoroquinolones

Microorganism	Compound	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	TVFX	0.031	0.031
	CPFX	0.25	0.5
	DW286	0.008	0.008
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	TVFX	0.031	0.125
	CPFX	0.125	0.5
	DW286	0.016	0.063
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	TVFX	0.016	0.016
	CPFX	0.004	0.008
	DW286	0.008	0.008
<i>Klebsiella pneumoniae</i> MB4-02	TVFX	0.125	0.125
	CPFX	0.031	0.125
	DW286	0.125	0.25

TVFX: trovafloxacin, CPFX: ciprofloxacin
Mueller-Hinton Broth (Difco), inoculum size, 10^5 CFU/plate.
The MBC was defined as the lowest concentration of drug which killed >99.9% of the inoculum.

보다 10~20배 이상 우수하였으며, 트로바플록사신보다도 2배 정도 우수하였다. 그람음성균 *E. coli* ATCC 25922 및 *Kl. pneumoniae* MB4-02의 경우에 있어서는 시프로플록사신보다는 조금 활성이 낮았지만, 트로바플록사신과는 비슷한 효과를 나타내었다. DW286의 MBC는 대조항생제들과 마찬가지로 MIC값과 같거나 1~2단계 상승하여, DW286은 살균적으로 작용한다고 볼 수 있다. 따라서 DW286의 작용은 플로로퀴놀론이 살균적으로 작용한다는 일반론에서 벗어나지 않는다고 할 수 있다. Time-kill 곡선의 측정에서, DW286은 MIC 농도 이상에서는, 항생제 처리 2시간 이내에 이미 살균효과를 나타내기 시작했으며, 균을 사멸시키는 속도는 전체적으로 트로바플록사신보다 느렸지만, *S. aureus* ATCC 25923 및 *E. coli* ATCC 25922에서 24시간 이내에 균을 100% 사멸시키는 우수한 살균효과를 나타내었다(Figs. 1-4).

결 론

DW286은 *in vitro* 활성 및 *in vivo* 활성 면에서 우수하고, 약물동력학적 인 면에서도 우수한 것이 보고된 바 있다.¹⁰⁾ 따라서, DW286이 살균적으로 작용하며, 그 살균능력 또한 우수하다는 본 실험의 결과는 이 항균제가 면역능이 저하된 감염증 환자에도 적용될 수 있을 가능성을 제시하는 것으로, 새로운 항생제로 개발할 가치가 있다고 생각할 수 있다.

감사의 말씀

본연구는한국과학재단의 특정기초연구사업(R01-1999-00110)과 보건복지부의 보건의료기술연구개발사업(00-PJ1-CH15-0002)

의 지원에 의해 수행되었으며, 지원에 감사한다.

문 헌

- 1) Lesher, G. Y., Forelich, E. D., Gruet, M. D., Bailey, J. H. and Brundage R. P. : 1,8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J. Med. Pharm. Chem.* **5**, 1063 (1962).
- 2) Albrecht, R. : Development of antibacterial agents of the nalidixic acid type. *Prog. Drug Res.* **21**, 99 (1977).
- 3) Ball, P. : Quinolone generations; natural history or natural selection? *J. Antimicrob. Chemother.* **46**(Topic T1), 17 (2000).
- 4) Neu, H. C. : Ciprofloxacin; an overview and prostatic appraisal. *Am. J. Med.* **82**(suppl 4A), 395 (1987).
- 5) Aldridge, K. E. : Increased activity of a new chlorofluoroquinolone, BAY y 3118, compared with activities of ciprofloxacin, sparfloxacin and other antimicrobial agents against anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1671 (1994).
- 6) Piddock, L. J. V. : Newer fluoroquinolones and Gram positive bacteria. *ASM News* **59**, 603 (1993).
- 7) Zabinski, R. A., Walker, K. J., Larsson A. J., Moody, J. A., Kaatz, G. W. and Rotschafer, J. C. : Effect of aerobic and anaerobic environments on antistaphylococcal activities of five fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 507 (1995).
- 8) Shen, L. L., Mitscher, L. A., Sharma, P. N., O'Donnell, T. J., Chu, D. W. T., Cooper, C. S., Rosen, T. and Pernet, A. G. : Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials, A cooperative drug-DNA binding model. *Biochem.* **28**, 3886 (1989).
- 9) Ferrero, L., Cameron, B., Manse, B., Lagneaux, D., Crouzet, J., Famechon, A. and Blanche, F. : Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV; a primary target of fluoroquinolones. *Mol. Microbiol.* **13**, 641 (1994).
- 10) Yun, H. J., Min, Y. H., Lim, J. A., Kang, J. W., Kim, S. Y., Kim, M. J., Jeong, J. H., Choi, Y. J., Kwon, H. J., Jung, Y. H., Shim, M. J. and Choi, E. C. : *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of DW286, a new fluoronaphthyridone antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**, 3071 (2002).
- 11) National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Document M7A5.* National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 11. NCCLS (2000).
- 12) Knapp, C. and Moody, J. A. : Tests to assess bactericidal activity, In H. D. Isenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook.* American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1992).