약학회지 제39권 제4호 351~359(1995)
Yakhak Hoeji Vol.39, No.4

Fluoroquinolone계 항생제인 DWQ-217의 *in vitro*와 *in vivo* 항균작용

김병오[#] · 최문정 · 한승희 · 김지연 · 심점순 · 박남준 · 손호정 · 이재욱 · 유영효 · 박명환
(주) 대웅제약 중앙연구소

(Received December 17, 1994)

Evaluation of *in Vitro* and *in Vivo* Antibacterial Activity of DWQ-217, a Fluoroquinolone

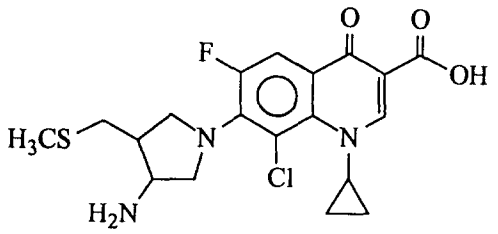
Byung O Kim[#], Moon Jung Choi, Seung Hee Han, Ji Yeon Kim, Jeom Soon Shim, Nam Jun Park, Ho Jung Son, Jae Wook Lee, Young Hyo Yu and Myung Hwan Park
R & D Center, Daewoong Pharmaceutical Co., Ltd., Sungnam, Kyunggi-Do 462-120, Korea

Abstract—The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities of DWQ-217 (1-cyclopropyl-6-fluoro-8-chloro-7-(3-amino-4-methylthiomethylpyrrolidinyl)-1,4-dihydro-4-oxo-quinoline-3-carboxylic acid) were compared with those of ciprofloxacin (CPFX) and vancomycin(VCM). DWQ-217 was superior to those of CPFX and VCM against gram positive bacteria. DWQ-217 showed excellent activity against MRSA (MIC of methicillin: ≥12.5 μg/ml), MIC_{90}=0.013. DWQ-217 possessed strong bactericidal action against gram positive and gram negative strains by MIC/MBC test and killing curve. DWQ-217 and CPFX were administered orally and subcutaneously to mice infected systemically with *S. aureus* and *S. pyogenes*. DWQ-217 was ≥5-16 fold(p.o.) and ≥3-5 fold(s.c.) more active than CPFX.

Keywords □ DWQ-217, MIC, MBC, PD_{50}, Viable cell, Killing curve.

퀴놀론계 항생제[1,3]는 반합성적으로 만들어지는 페니실린이나 세파계 항생제와는 달리 전합성으로 만들어지고 경구 투여가 가능하다. 또한 세균성 질병의 치료에 매우 효과적이며 항균력이 강력한 항생제로 알려져 있다.[1,3] 1962년 G. Y. Lasher에 의해 만들어진 Nalidixic acid[2,4]는 그람음성균 요로감염증에 대한 우수한 치료제로 처음 개발된 이후 항균력의 증강, 스펙트럼의 확대, 독성감소, 대사의 안정화등의 약학적 특성을 목적으로 많은 유도체들이 합성되었다. 1978년 일본에서 퀴놀론 모핵의 6번 위치에 불소 원자가 도입된 새로운 프로르퀴놀론계[2-5,9,11,12] 항생제인 Norfloxacin(NFLX)[4,12], Enoxacin(ENX), Ciprofloxacin(CPFX)[3,7-9], Ofloxacin(OFLX), Temafloxacin(TMFX)[10], Sparfloxacin(SPFX)[1,3] 등이 개발되어 우수한 퀴놀론계 항균요법 시대를 맞이하였다. 그러나 현재 사용되고 있는 퀴놀론계 항균제들은 그람음성균에 대한 항균력은 우수하나 그람양성균을 비롯한 MRSA에 약효가 떨어지는 문제점이 있다. 특히 1993년에 일본 후코오카에서 열린 일본화학요법학회에서는 1986년부터 현재까지 전체 포도상구균에 MRSA균주의 출현 빈도가 급속도로 증가하고 있다고 보고하였다.[9-11] 이에 본 저자 들은 기존 퀴놀론계 항생제의 그람음성균에 대한 활성을 유지하면서 그람양성균과 MRSA에 항균력이 좋은 항생제를 만들고자 하였다. 이러한 목적으로 퀴놀론 카르복실산 모핵[12]의 7번 위치에 3-아미노-4-메칠치오메칠피로리디닐기를 도입한 DWQ-217(Fig. 1)을 합성하여 *in vitro* 및 *in vivo* 항균실험을 수행하였는 바 그결과를 보고하고자 한다.

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로



MW : 425.91

Fig. 1 — Chemical structure of DWQ-217.

실험방법

시험균주

표준균주 28균주와 OFLX내성균주 37균주 및 임상에서 분리한 *Staphylococcus aureus* 46균주, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 18균주, *Pseudomonas aeruginosa* 27균주 등을 사용하였다.

사용약제

DWQ-217, Sparfloxacin 및 Vancomycin(VCM)은 본 연구소에서 합성한 것을 사용하였으며, Ciprofloxacin은 한국 Bayer에서 공급받았다.

균주의 배양

항균력 측정에는 Mueller-Hinton 한천배지(MHA, Difco 0252-01-4)를 사용하였으며, 각종 균배양을 위한 액체배지로는 Fleisch extract broth(beef extract 1%, peptone 1%, NaCl 0.3%, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.2%, pH 7.4-7.5)를 사용하였다. *Streptococcus* spp.는 배지에 10% horse serum(또는 5% sheep blood)을 첨가하여 균주를 배양하였다.

최소 발육저지 농도(MIC)의 측정[13]

최소 발육저지 농도(Minimal inhibitory concentration: MIC)는 일본화학요법학회표준법(일본화학요법학회, 1975)에 준하여 한천평판 희석법으로 측정하였다.

Fleisch extract broth에 37 °C 에서 18시간 전배양한 균액을 10^7 cfu/m*l*이 되도록 희석한 후, 최고농도 100 μg/m*l*에서 최저농도 0.002 μg/m*l*가 되도록 2배 희석한 항생물질을 함유한 Mueller-Hinton 한천배지에 균희석액을 Autoinoculator(A Dynatec product MIC-2000 model)을 이용하여 접종한 뒤 37 °C, 18시간 배양한 후 균의 성장을 관찰할 수 없는 최소농도를 최소발육저지 농도(MIC)로 하였다.

살균작용

1) MIC/MBC(minimum bactericidal concentration) 측정: *Streptococcus, S. aureus, E. coli, P. aeruginosa* 균주들을 사용하여 MBC을 측정하였다. 시험 균주를 Mueller-Hinton broth(MHB)에 37 °C에서 18시간 배양한 후, 항생제를 2단계로 희석하고, 약제가 포함한 MHB에 접종하였다. 37 °C 에서 18시간 배양한 후, 육안으로 혼탁의 유무로 관찰하여 MIC 값을 정하고, MIC 이상의 농도 배양액을 MHA에 접종하여 37 °C 에서 24시간 배양 후, 균성장의 유무를 결정하였다.

2) 증식곡선에 미치는 영향

본 시험은 전 배양한 *S. aureus* smith, *E. coli* TEM, *P. aeruginosa* E-2 균액을 Fleisch extract broth (FEB)로 희석하여 진탕배양(37 °C, 18시간)하여 1시간 후에 1/4 MIC, 1/2 MIC, MIC, 2 MIC, 4 MIC 농도의 약제를 처리하여 약제작용 2시간, 4시간, 6시간, 24시간 후의 생균수를 측정하였다.

배지 pH에 따른 항균력 변화

S. pneumoniae type I, *S. aureus, E. coli* TEM, *P. aeruginosa, K. aerogenes* 1552E 균주를 사용하여 배지(MHA)의 pH를 6~8까지 조정하여 37 °C에서 18시간 배양한 후, MIC를 측정하였다.

전신감염동물에 대한 치료 효과

ICR계 생쥐, 체중 20 ± 1 g(雄)을 사용하였고, 감염균은 *S. pyogenes* A77, *S. aureus* Giorgio, *E. coli* 078을 사용하였다. MHB에 20시간 배양 후, 집균하여 소정의 균량을 생리식염수에 희석하여 복강내에 접종하였다. 감염 1시간후에 경구로 DWQ-217, CPFX을 투여하여 7일간의 생존유무를 관찰하여 Van der Waerden method로 ED_{50}치를 산출하였다.

형태 변화 관찰

전배양(37 °C, 18시간)한 *S. aureus* smith, *E. coli* 078 균액에 약제를 1/4 MIC, 1/2 MIC, MIC, 2 MIC, 4 MIC로 각각 처리하여 4시간 후에 균액을 slide

Table I—Antibacterial activity of DWQ-217 against standard strains of bacteria.

Organism*	DWQ-217	Vancomycin	Ciprofloxacin
S. Pygoenes A77	0.195	0.391	0.781
S. faecium MD8b	0.391	0.391	0.391
S. pneumoniae type I	0.098	0.195	0.391
S. pneumoniae type II	0.098	0.195	0.781
S. aureus SG511	0.013	0.781	0.391
S. aureus FDA 209P	0.025	0.781	0.098
S. aureus smith	0.025	0.781	0.391
S. aureus C2379 (L-MRSA)[1]	0.049	1.563	0.391
S. aureus C5740 (H-MRSA)[2]	0.049	0.781	0.391
E. coli DC 0	0.781	>100	0.049
E. coli DC 2	0.098	>100	0.013
E. Coli TEM	0.049	>100	0.049
C. freundii ATCC 6750	0.781	>100	0.007
K. Pneumoniae NCTC 9632	0.049	>100	1.563
S. marcescens 421-094(OR)[3]	6.25	>100	0.049
S. marcescens IFO 12648	0.195	>100	0.391
P. aeruginosa 9027	3.125	>100	0.195
P. aeruginosa 1592E	1.563	>100	0.195
P. aeruginosa 1771	3.125	>100	0.195
P. aeruginosa 1771 m	1.563	>100	0.195
P. aeruginosa C-1198(OR)	3.125	>100	0.781
P. aeruginosa 101-181(OR)	3.125	>100	6.25
E. cloacae P99	25	>100	0.007
E. cloacae 132E	0.025	>100	0.049

(*MIC*: μg/m*l*)

1) L-MRSA: Low Methicilline Resistant *Staphylococcus aureus*
2) H-MRSA: Hight Methicilline Resistant *Staphylococcus aureus*, 3) OR: Ofloxacin resistant
* Inoculum size: 10^7 C.F.U./m*l*.

glass 위에 떨어뜨려 자연건조시킨 후, 고정하여 crystal violet 염색액으로 30초 염색하여 자연건조시킨 후 광학현미경으로 균의 형태를 관찰하였다.

결과 및 고찰

표준균주에 대한 항균력

DWQ-217의 표준균주에 대한 항균력은 CPFX, VCM과 비교한 결과를 Table I에 나타내었다. DWQ-217은 Table I에서의 결과와 같이 그람음성균과 그람양성균에 대해서 광범위한 항균력을 가진 것으로 나타났다. 그람양성균인 *S. aureus, S. pyogenes* 균주들에 대해서 DWQ-217은 0.025~0.391 μg/m*l*로 VCM과 CPFX보다는 2~16배까지 우수한 항균력을 보였다. 한편 그람음성균에 대해서는 DWQ-217은 *E. coli* 균주들, *Enterobacter, Salmonella* 등 각종 세균에 대하여 CPFX과 유사하거나 2~4배의 항균력이 감소하는 결과를 나타냈다. *P. aeruginosa* spp.에 대한 DWQ-217의 MIC치는 1.563~25 μg/m*l*로 CPFX보다 4~8배 항균력이 떨어졌다.

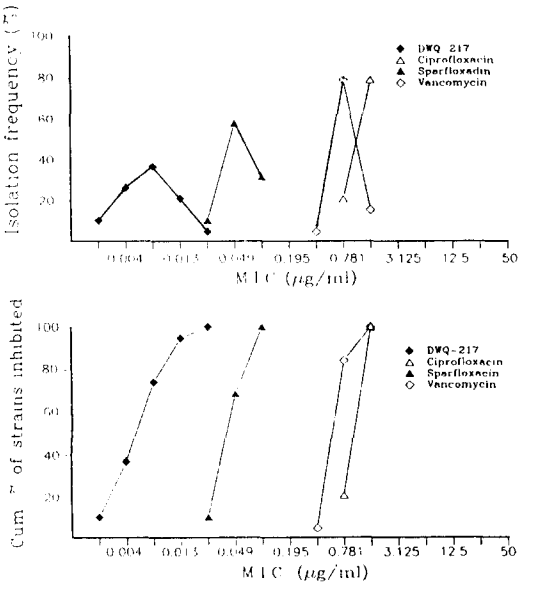


Fig. 2—Susceptibility of MRSA strains to DWQ-217.

내성균주에 대한 항균력

DWQ-217의 MRSA 균주에 대한 항균력은 0.002~

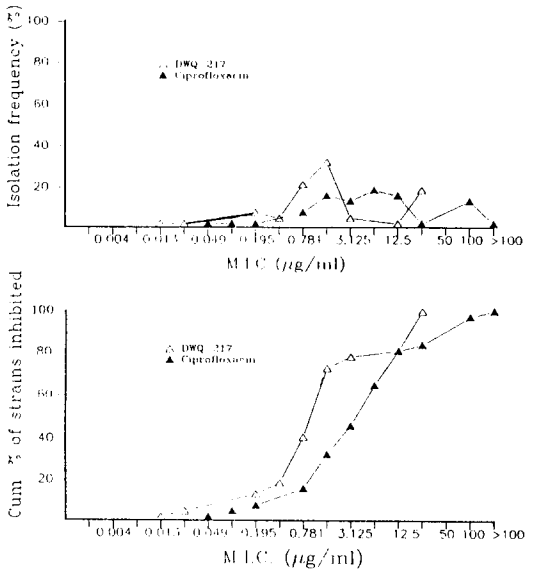


Fig. 3 — Susceptibility of Ofloxacin-resistant strains to DWQ-217.

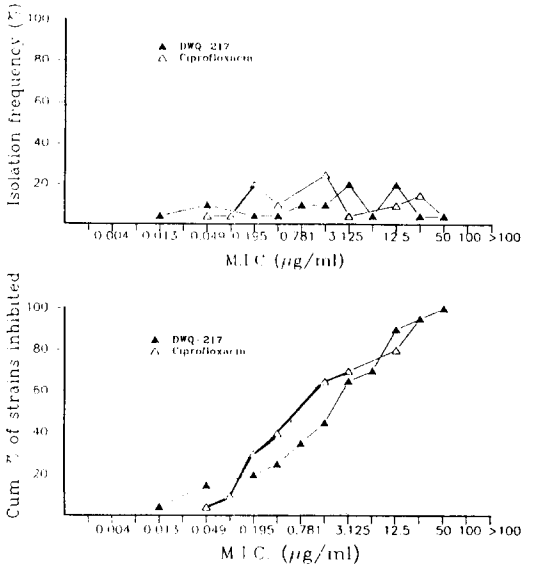


Fig. 4 — Susceplibility of *Pseudomonas aeruginosa* to DWQ-217

Table II — Comparison of MIC and MBC of DWQ-217 Inoculum Size: 10^6 C.F.U./m*l*

Test strains	DWQ-217			Ciprofloxacin		
	MIC	MBC		MIC	MBC	
		24 hr	48 hr		24 hr	48 hr
S. pyogenes A77	0.195	0.195	0.195	0.781	0.781	0.781
S. pneumoniae type I	0.098	0.098	0.098	0.391	0.781	0.781
S. aureus smith	0.025	0.025	0.025	0.195	0.391	0.391
S. aureus C2379	0.049	0.098	0.098	0.391	0.781	0.781
S. aureus C5740	0.049	0.195	0.195	0.391	3.125	3.125
E. coli DC 0	0.391	0.391	0.391	0.391	0.391	0.391
E. coli TEM	0.049	0.098	0.098	0.025	0.025	0.025
P. aeruginosa 1771 m	0.781	1.563	1.563	0.391	0.391	0.391
P. aeruginosa E-2	3.125	3.125	3.125	0.781	0.781	0.781

(MIC: μg/m*l*)

0.025 μg/m*l*로 CPFX(0.781~1.563 μg/m*l*), SPFX(0.025~0.098 μg/m*l*), VCM(0.391~1.563 μg/m*l*)보다 월등히 우수한 항균력을 나타내었다(Fig. 2). DWQ-217의 OFLX내성균주인 *S. aureus*(9균주), *S. epidermidis*(7균주), *P. aeruginosa*(11균주), *Serratia spp.*(6균주), *Klebsiella pneumoniae*(3균주), *Serratia spp.*(6균주) 및 *Enterococcus spp.*(4균주)에 대한 감수성 분포를 Fig. 3에 나타내었다. *S. aureus* 균주들에 대한 DWQ-217의 MIC_{90}은 1.563 μg/m*l*로 CPFX보다 32배 우수하였으며, *S. epidermidis*에 대한 DWQ-217의 MIC_{90}은 1.563 μg/m*l*로 CPFX보다 32배 우수하였다. 그러나 *P. aeruginosa spp.*와 *Serratia spp.*에 대해서는 CPFX보다 항균력이 유사하거나 2배 항균력이 감소하는 것으로 나타났다.

임상분리균주에 대한 감수성 분포

P. aeruginosa 임상분리균주(27균주)에 대한 DWQ-217의 감수성 분포를 Fig. 4에 나타내었다. DWQ-217의 MIC는 0.013~25 μg/m*l*으로 대조약물인 CPFX(0.049~25 μg/m*l*)과 동등하거나 다소 항균력이 떨어지는 것으로 나타났다.

살균작용

1) MIC/MBC

Table III — Influence of Medium pH on the antibacterial activity

Organism	Medium pH	DWQ-217	Ciprofloxacin	Sparfloxacin
St. pneumoniae type I	6	N.G.[1]	N.G.	N.G.
	7	0.049	0.195	0.098
	8	0.098	0.195	0.098
S. aureus smith	6	0.049	0.098	0.098
	7	0.025	0.098	0.049
	8	0.025	0.049	0.049
S. aureus C2379 (L-MRSA)[2]	6	0.049	0.195	0.195
	7	0.013	0.195	0.049
	8	0.049	0.195	0.049
E. coli TEM	6	0.098	0.049	0.098
	7	0.025	0.013	0.049
	8	0.049	0.004	0.007
P. aeruginosa 1771 m	6	0.391	0.195	0.781
	7	0.781	0.098	0.781
	8	1.563	0.195	0.391
P. aeruginosa E-2	6	1.563	0.391	6.25
	7	1.563	0.195	1.563
	8	3.125	0.098	0.781
K. aerogenes 1552E	6	0.391	0.098	0.781
	7	0.098	0.098	0.195
	8	0.098	0.013	0.049

(MIC: μg/ml)

1) N.G.: No Growth
2) L-MRSA: Low Methicilline Resistant *Staphylococcus aureus*
* Inoculum size: 10^7 C.F.U./ml.

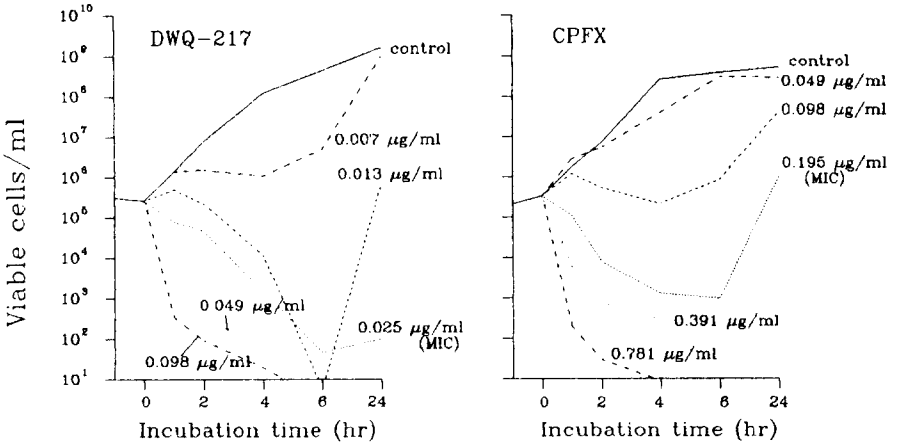


Fig. 5 — Effect of DWQ-217 and ciprofloxacin on viability of *S. aureus* smith.

DWQ-217에 대한 MIC와 MBC 결과를 Table II에 나타내었다. DWQ-217의 MIC와 MBC 결과는 큰 차이가 없었으며, 특히 그람양성균에서는 대조물질인 CPFX보다 MBC치가 4배에서 최고 16배 이상 살균작용이 우수한 것으로 나타났다.

2) 증식곡선에 미치는 영향

S. aureus smith, *E. coli TEM*, *P. aeruginosa* E-2을 사용하여 증식곡선에 대한 DWQ-217의 효과를 조사하였다(Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7). DWQ-217의 *S. aureus* smith에 대한 살균작용을 검토한 결과, 약제 투여 60분부터 0.013 μg/ml 농도 이상에서 살균작용이 관찰되었으며, 24시간 후에는 균의 재성장이 확인되었다. *E. coli*

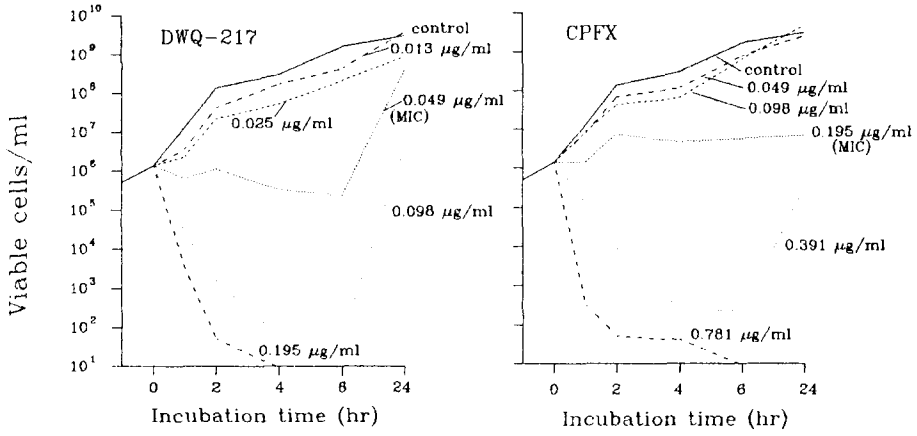


Fig. 6 — Effect of DWQ-217 and ciprofloxacin on viability of *E. coli* TEM.

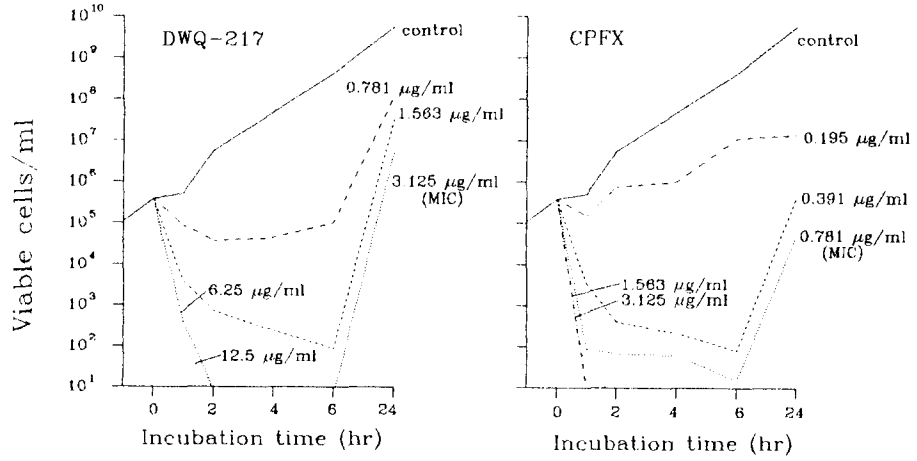


Fig. 7 — Effect of DWQ-217 and ciprofloxacin on viability of *P. aeruginosa* E-2.

Table IV — Protective effect of DWQ-217 and ciprofloxacin on systemic infections in mice

Strains	Challenge dose	Administration route of Drug	Compounds	PD_{50}(mg/kg) (95% Confidence Limit)
St. pyogenes A77	1.5×10^{3} cfu/mouse (5.0×10^{3} cfu/ml)	P. O.	DWQ-217	18.55 (12.45~27.62)
			CPFX*	>100
		S. C.	DWQ-217	14.60 (9.11~23.38)
			CPFX	>50
St. aureus Giorgio	9.0×10^{5} cfu/mouse (3.0×10^{6} cfu/ml)	P. O.	DWQ-217	6.31 (2.37~16.86)
			CPFX	>100
		S. C.	DWQ-217	5.89 (3.21~10.73)
			CPFX	23.44
E. coli 078	6.0×10^{6} cfu/mouse (2.0×10^{7} cfu/ml)	P. O.	DWQ-217	6.62 (4.06~10.80)
			CPFX	2.41 (1.23~4.73)
		S. C.	DWQ-217	3.20 (2.66~3.85)
			CPFX	0.28 (0.21~0.37)

* CPFX : ciprofloxacin

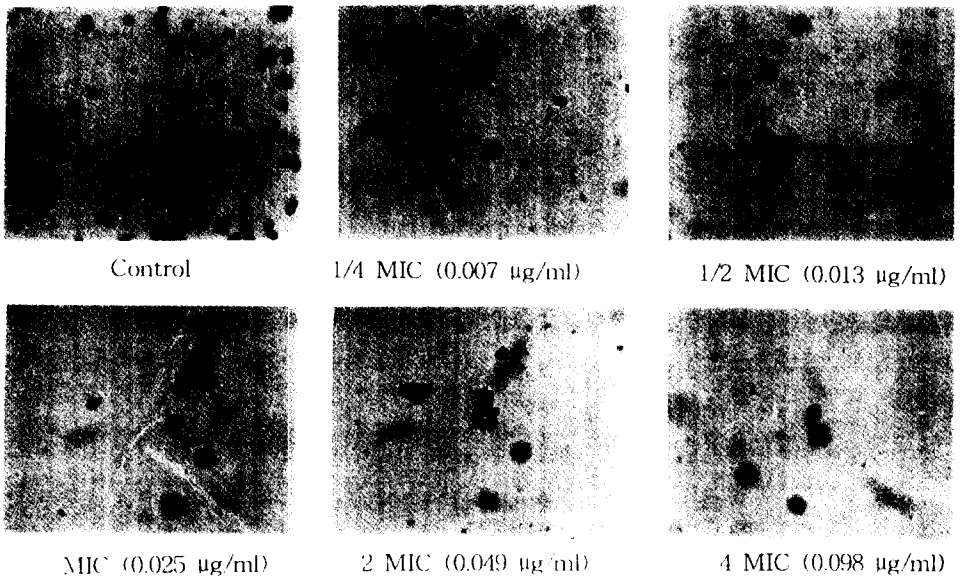


Fig. 8 — Microscopic observation of *S. arueus* smith exposed to DWQ-217(× 1,000).

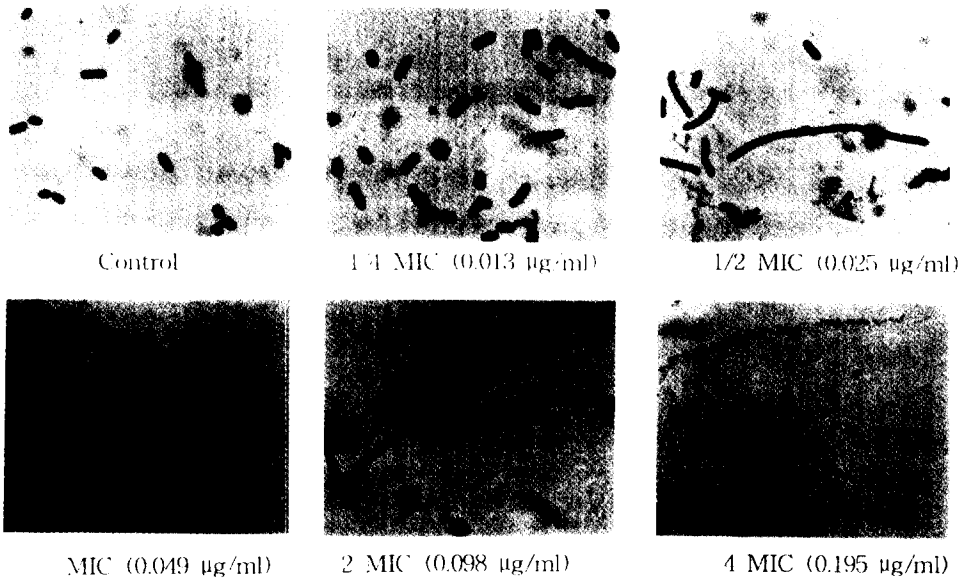


Fig. 9 — Microscopic observation of *E. coli* TEM exposed to DWQ-217(× 1,000).

TEM에 대한 DWQ-217의 살균작용은 0.098 μg/ml 이하에서는 발견하지 못했으나 0.195 μg/ml에서는 완전히 살균되었다. 또한 *P. aeruginosa* E-2에 대한 살균작용은 약제농도가 3.125 μg/ml 이상에서 살균작용을 보였다.

생쥐 전신감염에 대한 감염방어 효과

생쥐 감염방어 실험으로 ED_{50}을 산출하여 DWQ-217의 *in vivo* 항균력을 대조약물과 비교하였다(Table IV). 경구주사와 피하주사 시 *S. pyogenes* A77, *S. aureus* Giorgio에 대한 DWQ-217의 PD_{50}치는 CPFX보다 3배에서 최고 16배 이상 우수한 항균력을 보였다. 그러나 *E. coli* 078에 대해서는 DWQ-217이 대조물질인 CPFX보다 PD_{50}치가 3배 정도 효과가 감소하였다.

형태 변화 관찰

S. aureus smith에 대한 형태 관찰은 Fig. 8에 나타내었다. DWQ-217의 MIC(0.098 μg/ml) 이상의 농도에서 세포가 신장되는 것이 관찰되었다. 또한 *E. coli* TEM에 대해서 DWQ-217을 처리하여 현미경으로 관찰한 결과를 Fig. 9에 나타내었으며, DWQ-217의 MIC(0.025 μg/ml)값 이상의 농도에서 약제투여 4시간 후에 filament 형상으로 관찰되었다.

결 론

표준균주의 그람양성균에 대한 DWQ-217의 MIC는 0.391 μg/ml 이하로 CPFX와 VCM보다는 2~16배 우수하였다. 그람음성균주에 대한 DWQ-217의 MIC는 0.781 μg/ml이하이고 CPFX와 동등하거나 2~4배 정도 항균력이 떨어졌다.

MRSA내성균주와 임상분리균주에 대해서도 DWQ-217은 우수한 항균활성을 보였다. 54종에 대한 MIC을 측정한 결과 DWQ-217은 *S. aureus, S. pneumoniae*, MRSA에 대해서 CPFX, SPFX, 그리고 VCM보다 항균력이 월등히 우수하였다. 그러나 그람음성균에 대해서는 CPFX보다 항균력이 약하였다. DWQ-217은 OFLX내성균주에 대해서도 우수한 항균력을 보였다. MIC와 MBC 차이는 별로 인정되지 않고, DWQ-217은 증식 곡선에 대해서는 DWQ-217의 *S. aureus* smith에 대한 살균작용에 관하여 검토한 결과 약제 투여 60분부터 0.013 μg/ml 농도 이상에서 살균작용이 관찰되었으며, 24시간 후에는 균의 재성장이 확인되었다. *E. coli* TEM에 대한 DWQ-217의 살균작용은 0.098 μg/ml 이하에서는 발견하지 못했으나 0.195 μg/ml에서는 완전히 살균되었다. 또한 *P. aeruginosa* E-2에 대한 살균작용은 약제농도가 3.125 μg/ml 이상에서 살균작용을 보였다. 마우스 감염 방어실험에서 DWQ-217을 경구주사와 피하주사 시, *S. pyogenes* A77, *S. aureus* Giorgio에 대한 DWQ-217의 PD_{50}치는 CPFX보다 3배에서 최고 16배 이상 우수한 항균력을 보인 반면, *E. coli* 078에 대해서는 DWQ-217이 대조물질인 CPFX보다 ED_{50}치가 3배 정도 효과가 감소하였다. 형태관찰 실험에서는 *S. aureus* smith가 MIC(0.098 μg/ml) 이상의 농도에서 세포가 신장되는 것이 관찰되었으며, *E. coli* TEM은 DWQ-217의 MIC(0.025 μg/ml)값 이상의 농도에서 약제투여 4시간 후에 filament 형상으로 나타났다.

문 헌

1) Chin, N. X., Gu, J. and Zhang, Y.: *In vitro* activity of sparfloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 567 (1991).
2) Ito, A., Hirai, K., Inoue, M., Koga, H., Suzue, S., Irikura, T. and Misuhashi, S.: *In vitro* antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog. *Antimicrob. Agents Chemother.* **77**, 103 (1980).
3) Bary, A. L. and Fuchs, P. C.: *In vitro* activites of sparfloxacin, tosufloxacin, ciprofloxacin, and fleroxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 955 (1991).
4) Hirai, K., Ito, A., Suzue, S., Irikura, T., Inoue, M. and Mitsuhashi, M.: Mode of action of AM-715, a new nalidixic acid analog. *Gunma Reports on Medical Science* **19**, 375 (1982).
5) Sato, K., Matsura, Y., Inoue, M., Une, T., Osada, Y., Ogawa, H. and Mitsuhashi, S.: *In vitro* activity of DL-8280, a new axazine derivative. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**, 548 (1982).
6) Shimizu, M., Takase, Y., Nakamura, S., Katae, H. and Minami, A.: Pipemidic acid: Its activities against various experimental infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **9**, 569 (1976).
7) Chin, N. and Neu, H. C.: Ciprofloxacin, a quinolone carboxylic acid compound active against aerobic and anaerobic bateria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **25**, 319 (1991).
8) Burine, J. and Burine, R.: Ciprofloxacin. *Drugs Future* **9**, 179 (1984).
9) Caekenberghe, D. L. and Pattyn, S.: *In vitro* activity of ciprofloxacin compared with those of other new fluorinated piperazinyl-substituted quinolone derivatives. *Antimicrb. Agents. Chemother.* **25**, 518 (1984).
10) Hardy, D. J.: *In vitro* activity of temafloxacin against gram-negative bacteria : an overview. *Am. J. Med.* **91**(Suppl. 64), 19 (1991)
11) Fujimaki, K., Noumi, T. and Mitsuhashi, S.: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of T-3262, a new fluoroquinolone. *Antimicrb. Agents.*

Chemother. **32**, 827 (1988).

12) Yoon, G. J., Lee, J. W., Park, N. J., Lee, K. S. and Kang, T. C.: A novel quinolone carboxylic acid derivative. wo 92/04342 (1992).

13) Japan Society of chemotherapy (日本化學療法學會): 最小發育沮止濃度(MIC)測定法. *Chemotherapy* **23**, 1 (1975).