

신규 퀴놀론 항균제 DW-116의 소핵시험

문은이, 이 진, 최청하, 이치우, 정용호, 윤성준, 이덕근*

동화약품공업(주) 중앙연구소

Micronucleus Test of DW-116, a Novel Antibacterial Quinolone

Eun Yi MOON, Jin LEE, Chung Ha CHOI, Chi Woo LEE, Yong Ho CHUNG,
Sung June YOON and Dug Keun LEE*

Research Laboratories of Dong-Wha Pharm. Ind. Co. Ltd., 189, Anyang-dong,
Anyang City, Kyunggi-do, Korea 430-010.

(Received June 9, 1996; accepted September 20, 1996)

Abstract – DW-116 {1-(5-fluoro-2-pyridyl)-6-fluoro-7-(4-methyl-1-piperazinyl)-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid hydrochloride} is a new quinolone antibiotic with a broad antibacterial spectrum against G(+) and G(-) bacteria. DW-116 was evaluated for the appearance of micronucleus in polychromatic erythrocytes (PCEs) of mouse bone marrow cells after intraperitoneal and oral single administration. We prepared the bone marrow cells at 30hr after drug administration and they were used for measuring PCE with micronucleus. The results showed there was no statistically significant increase in the numbers of PCEs with micronucleus in all DW-116 administered groups compared with a negative control group. The results also showed that the ratio of normochromatic erythrocytes(NCEs) to PCEs of all DW-116 administered groups was not significantly different from that of a negative control group. These results suggested that DW-116 may not cause any chromosomal damage and it has no *in vivo* mutagenic potential under these experimental conditions.

Keywords □ DW-116, PCE, NCE, micronucleus

현재 퀴놀론계 항균제는 nalidixic acid 이후 발전을 거듭하여 오늘에 이르고 있다. 그러나 지금까지 개발된 퀴놀론계 항균제는 중추신경계에 대한 부작용과 광독성 및 연골관절독성 등의 문제점을 지니고 있어 아직도 개선해야할 점이 많은 약물로 평가되고 있다. 따라서 앞으로 퀴놀론계 항균제의 신약개발은 그람양성균과 그람음성균에 광범위하고 더욱 강력한 약효를 가지며, 경구투여 후의 흡수율이 높고 반감기가 길어 사용하기에 편리한 1일 1회 요법제로서의 개발과 더불어 독성과 부작용이 적은 안전한 약물을 개발하느냐 하는 것이 중요하다고 생각된다.

DW-116은 그람음성균과 그람양성균에 모두 적용되는 광범위한 항균력을 갖는 새로운 퀴놀론계항균제로서 *in vitro*약효는 현재 시판중인 약물인 ciprofloxacin, ofloxacin등에 비해 비슷하거나 다소 뒤떨어지는 것으로 알려졌다(Han 등, 1995). 그러나 경구투여 후 체내 흡수율이 좋아 최고혈중농도가 크게 증가되고 반감기가 길며 조직분포가 좋

고 조직내 농도가 높은 약동력학적인 특성을 가지고 있어(Lec 등, 1995; Lee, 1995) *in vivo*약효는 호흡기 감염과 비뇨기 감염에서 ciprofloxacin과 대등하며 ofloxacin이나 rifloxacin보다 우수한 약효를 보였다(Han 등, 1995a). 특히, 근육 감염의 경우에는 ciprofloxacin보다도 우수한 약효를 보이는 것으로 알려졌다(Han 등, 1995b). 독성에 있어서도 다른 퀴놀론계 항균제보다 부작용과 독성이 적은 것으로 나타났다(Kwon 등, 1995). 이상과 같이 DW-116은 *in vitro* 약효로부터 예상되는 것보다 *in vivo*약효가 뛰어남을 알 수 있으며 반감기가 긴 약동력학적인 특성을 고려할때 1일 1회 요법이 가능한 신약후보물질이라 사료된다.

따라서 본 연구에서는 이전의 연구자가 보고한 독성에 대한 결과를 참고로(Kwon 등, 1995), DW-116이 투여경로에 따라 *in vivo* 유전 독성을 나타내는지 생쥐를 이용한 소핵실험을 통하여 알아 보고자 하였다. 특히, 예상되는 임상 투여 경로인 경구투여 후의 소핵실험 결과로부터 DW-116이 유전독성 유발 가능성이 없는 안전성이 확보된 신약 후보물질임을 제시하고자 하였다.

* To whom correspondence should be addressed.

실험방법

실험동물 및 시약

청정구역(Charles Liver, Japan)에서 생산된 SPF(특정병원체 부재) 7주령 수컷 ICR생쥐를 공급받아 온도 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$ 배기 10-18회/시간, 형광등 명암 12시간 간격 교대, 조도 300-500 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자에 6마리씩 넣어 1주일간의 순화 사육 후에 실험에 사용하였다. 순화기간을 거친 모든 동물의 체중을 측정하여, 평균체중(g) $\pm 20\%$ 의 범위에 드는 동물을 선별하여 무작위로 각 군에 6마리씩 배분하였다.

사료는 삼양사료의 실험동물용사료를 자유급식하였고, 음료수로는 수도물을 자유로이 공급하였다. 사용한 시약은 특별한 언급이 없는 한 미국 Sigma사의 제품을 사용하였다. 염색시약인 May-Gruenwald 및 Giemsa는 영국의 BDH사의 제품을 사용하였으며 FBS는 미국의 GIBCO사에서 구입하여 사용하였다.

실험물질의 조제 및 투여

실험물질인 DW-116은 동화약품공업(주)의 중앙연구소에서 제조한 백색의 결정성 가루이며 순도 99.0%이상, Lot No는 9501이었다.

실험물질의 투여량은 예비실험을 통하여 결정된 것으로서, 복강투여의 경우에는 복강투여시의 LD_{50} 값의(Kwon 등, 1995) 절반용량인 377 mg/kg을 최고농도로 하여 312.5, 188.5, 156.25 mg/10 ml/kg의 4개 농도를 설정하였고, 경구투여의 경우에는 경구투여시의 LD_{50} 값의(Kwon 등, 1995) 절반인 1550 mg/kg을 최고농도로 하여 775, 387.5 mg/kg의 3개 농도로 설정하였다. 실험물질은 투여직전에 소정의 양을 주사용 증류수에 현탁하여 사용하였다. 양성대조물질로는 cyclophosphamide를 70 mg/kg으로 복강투여 하였다. 음성대조물질로는 실험물질의 조제에 사용한 용매인 주사용 증류수를 사용하였고, 각 농도의 실험물질용액과 음성대조물질 및 양성대조물질은 10 ml/kg의 용량으로 복강내 또는 경구로 1회 투여하였다.

골수세포표본의 제작

각 농도의 실험물질을 복강내 또는 경구 투여하고 30시간 후에 Schmid(1976)의 방법에 따라 골수표본을 제작하였다. 경추탈골에 의해 도살한 동물의 대퇴골을 분리하여 양 골단을 절단한 후 약 2 ml의 FBS(Fetal Bovine Serum, GIBCO)에 1 ml용 1회용 주사기(23 gauge)를 이용하여 골수세포를 부유시켜 잘 현탁시킨 후 1,500 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 상등액을 제거한 후 침전된 골수세포를 파스퇴르 피펫으로 소량의 혈청에 고르게 현탁시켜 청결한 슬라이드에 도말하고 공기중에 충분히 건조시킨 다음 메탄올에 5분간 고정하였다. 각각의 동물에 대하여 슬라이드는 2개씩 만들었다.

건조가 끝난 표본을 Schmid(1975, 1976)의 방법에 따라 다음과 같이 염색하였다. 원액의 May-Gruenwald(BDH)액에 3분간 염색하고 증류수로 세척한 후 1:1 희석된 May-Gruenwald액에 다시 2분간 염색하였다. 표본을 다시 증류수로 세척한 후 1:6으로 희석된 Giemsa(BDH)액에서 10분간 염색하여 증류수에 수회 세척하고 공기중에서 충분히 건조시켰다.

골수도말표본의 관찰

관찰은 광학현미경으로 2명의 관찰자에 의해 맹검법으로 검경하였다. 생쥐 개체당 400개의 적혈구에서 다염성적혈구(polychromatic erythrocytes, PCEs)와 정염성적혈구(normochromatic erythrocytes, NCEs)의 비를 구하고 다시 2000개의 다염성적혈구중에서 소핵을 가진 다염성적혈구의 생성빈도를 구하였다. 계수시 소핵의 크기는 세포직경의 1/2로부터 식별가능한 범위까지로 하였으며, 주변 유핵세포의 핵과 염색상이 동일한 것을 선택하였다.

통계학적 평가

결과의 통계처리는 Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W법에 따라 행하였다. DW-116 및 cyclophosphamide 투여군의 다염성적혈구중의 소핵생성빈도에 대하여 음성대조군인 용매투여군과의 통계학적인 유의성을 조사하였으며, 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율(NCE/PCE+NCE)의 경우에도 같은 방법으로 통계학적 유의성을 검정하였다(유의수준 $p < 0.05$).

실험결과

DW-116이 체내에 복강내 및 경구 투여되었을 때 *in vivo* 유전독성을 나타내는지를 소핵실험을 통하여 알아보았다. 소핵실험결과는 Table I과 II에 나타내었다. DW-116을 복강내 투여하고 30시간 후에 골수세포를 취하여 다염성 적혈구의 소핵 생성 빈도를 측정된 결과 모든 투여농도군에서 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있는 소핵생성 빈도의 증가가 나타나지 않았다(Table I). 음성대조군이 $0.10 \pm 0.09\%$ 의 소핵 생성 빈도를 보였는데 DW-116 투여군중 최고용량군에서도 $0.22 \pm 0.15\%$ 의 소핵 생성 빈도를 보여 통계학적으로 유의성을 나타내지 않았다. 한편 DW-116의 투여용량이 증가함에 따라 소핵 생성 빈도가 용량의존적으로 증가하는 경향이 있으나 음성대조군과의 통계학적인 유의성을 보이지 않으므로 DW-116은 본 실험 조건하에서 복강내 투여시 소핵생성을 증가시키지 않는 것으로 사료된다.

DW-116을 예상되는 임상 투여 경로인 경구로 투여하고 30시간 후에 골수세포를 취하여 관찰한 결과에서도 음성대조군에 대한 실험물질투여군의 소핵 생성 빈도는 통계학적으로 유의한 변화를 보이지 않았다(Table II). 음성대조군이

Table I. Micronucleus test of DW-116 with ICR male mouse medicated by *i.p.*

Test Compound	Dose (mg/kg)	Number of Animals	Sampling Time (hr)	MNPCE (%) ¹⁾	Ratio of NCE/PCE+NCE ²⁾
Distilled Water		6	30	0.10±0.09	0.48±0.13
DW-116	377	6	30	0.22±0.15	0.53±0.10
	312.5	6	30	0.18±0.19	0.53±0.09
	188.5	6	30	0.07±0.08	0.41±0.09
	156.25	6	30	0.03±0.08	0.46±0.09
	70	6	30	4.03±1.41*	0.62±0.11*

Bone marrow cells were prepared at 30 hr after single intraperitoneal administration.

¹⁾MNPCE: micronucleated polychromatic erythrocytes/2,000 polychromatic erythrocytes(Mean SD).

²⁾NCE/PCE+NCE: normochromatic erythrocytes/200 erythrocytes(Mean SD). *: significantly different from distilled water (p<0.05).

Table II. Micronucleus test of DW-116 with ICR male mouse medicated by *i.p.*

Test Compound	Dose (mg/kg)	Number of Animals	Sampling Time (hour)	MNPCE (%) ¹⁾	Ratio of NCE/PCE+NCE ²⁾
Distilled Water		6	30	0.13±0.08	0.48±0.07
DW-116	1550	6	30	0.12±0.12	0.47±0.08
	775	6	30	0.08±0.08	0.47±0.06
	387.5	6	30	0.08±0.12	0.48±0.05
	70	6	30	6.82±2.86*	0.65±0.09*

Bone marrow cells were prepared at 30 hr after single oral administration.

¹⁾MNPCE: micronucleated polychromatic erythrocytes/2,000 polychromatic erythrocytes(Mean SD).

²⁾NCE/PCE+NCE: normochromatic erythrocytes/200 erythrocytes(Mean SD). *: significantly different from distilled water (p<0.05).

0.13±0.08%의 소핵 생성 빈도를 보였는데 DW-116투여군 중 최고용량투여군에서도 0.12±0.12%의 소핵 생성 빈도를 보여 통계학적인 유의성을 나타내지 않았다. 775 mg/kg 투여군과 387.5 mg/kg투여군에서도 소핵 생성 빈도는 통계학적으로 유의한 증가는 보이지 않았다. 즉, DW-116은 본 실험조건하에서 경구투여시에도 소핵생성을 증가시키지 않는것으로 사료된다. 반면, cyclophosphamide(70 mg/10 ml/kg, *i.p.*)투여군에서는 Table I과 II에서 알수있듯이 4.03±1.41%와 6.82±2.86%의 소핵을 가진 다염성적혈구가 관찰되었으며 음성대조군과 비교할때 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 이로써 DW-116의 소핵시험이 정상적으로 진행되었음을 알 수 있었다.

한편, 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율에 있어서도 투여경로에 관계없이 모든 농도의 DW-116투여군에서 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있는 차이를 보이지 않았으나, 양성대조군의 경우에는 정염성적혈구의 비율이 통계학적으로 유의성있게 증가한 결과를 보였다(Table I, II).

고 찰

새로운 퀴놀론계 항균제인 DW-116은 *in vitro*약효로부터 예상할 수 있는 것보다 훨씬 우수한 *in vivo* 약효를 가진 신약후보물질로서 독성과 부작용이 적은 것으로 알려졌다

(Han 등, 1995a; Hwang 등, 1995b; Kwon 등, 1995). 본 연구에서는 DW-116의 투여경로에 따른 유전독성을 알아 보기 위하여 생쥐소핵실험을 행하였다. 생쥐에 DW-116을 복강내 및 경구투여 후 얻은 골수세포중 다염성 적혈구의 소핵생성 빈도에 대한 결과로부터 DW-116은 세포독성이나 세포분화의 저해를 일으키지 않으며, 염색체의 손상을 일으키지 않는 유전독성학적으로 안전성이 확보된 신약후보물질임을 제시하고자 하였다.

이번 실험에서의 실험물질의 투여용량은 급성독성실험을 통해서 얻은 LD₅₀치의 절반용량(복강내투여시에는 377 mg/kg, 경구투여시에는 1550 mg/kg을 설정하였다)을 최고 투여량으로 결정하였는데, 이는 국립보건 안전 연구원의 '의약품등의 독성시험 기준'(1994)에 따른 것이다. 본 소핵 시험을 위하여 LD₅₀을 최고용량으로하고 공비 2로하여 3농도에서 예비시험을 행한 결과 LD₅₀ 값을 투여한 군에서는 치사한 동물이 나타나 LD₅₀의 절반용량을 최고 농도로 결정하였다. 골수채취 시간은 투여후 30시간째에 동물을 도살하여 도말표본을 만들었는데 이것은 예비 실험에서 24, 30, 48시간에 골수세포를 취하여 소핵 생성 빈도를 알아 본 결과 유의성은 없었지만 30시간째에 소핵 생성 빈도가 가장 크게 나타난 결과에 따른 것이다(테이타를 따로 기재하지 않았다). 양성대조군인 cyclophosphamide 투여군은 Salamone 등(1980)의 보고를 참고로 70 mg/kg로 정하였으며 투여 후 30시간째에 골수세포를 취하였다. Cyclophos-

phamide는 경구투여 후 42-48시간에 소핵생성빈도가 가장 크므로(Salamone 등, 1980) 42-48시간제에 골수세포를 취하는 것이 적절하다고 생각되지만 24시간 이후에는 소핵생성빈도가 점점 증가함을 (Salamone 등, 1980) 고려하여 본 연구에서는 편의상 DW-116의 골수세포 채취 시간인 30시간제에 골수세포를 취하였다.

결과에서 본 바와 같이 DW-116을 복강내 투여한 모든 농도군에서 다염성 적혈구의 소핵생성빈도는 통계학적으로 유의성있게 증가하지 않았다, DW-116을 경구투여한 경우에도 다염성 적혈구의 소핵 생성 빈도는 통계학적으로 유의성있게 증가되지 않았다. 같은 퀴놀론계 항균제인 ciprofloxacin을 비교 약물로서 함께 실험하였는데, 본 실험 조건 하에서 DW-116과 유사한 양상을 보여주었다(데이터를 따로 기재하지 않았다). 이는 이전의 연구자들이 보고한 ciprofloxacin, cinoxacin, CP-67015 및 ofloxacin의 소핵 시험 결과가 음성이라는 것과(Carlin, 1975; Holden 등, 1989; Mayer, 1987; Schimada 등, 1984) 일치하는 것이다. 용매대조군(주사용 증류수)은 음성대조군의 일반적인 소핵 생성율을 나타내었는데, Hart와 Engberg-Peterson(1983)이 제시한 소핵생성의 정상범위(1.67±1.11)와 유사한 결과이다. 이와같은 결과로부터 DW-116은 복강내 및 경구로 투여하였을때 골수세포의 분화과정에서 염색체 손상을 일으키지 않는것으로 판단된다.

또한 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율에 있어서도 DW-116을 투여한 모든 실험군에서 통계학적으로 유의성 있는 변화는 관찰할 수 없었으며, 이와같은 결과는 복강내 투여 및 경구투여에 있어서 유사하게 나타났다. 이러한 사실로부터 DW-116은 세포독성유발이나 세포분화의 저해는 일으키지 않는것으로 판단할 수 있다.

한편, 양성대조군인 cyclophosphamide투여군에서 소핵생성빈도는 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있는 증가를 보였으며, 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율도 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있는 증가를 보였으므로 cyclophosphamide가 세포의 유전자에 대하여 독성이 있다는 이전의 연구자들의 결과와도 일치하는 것이며 (Dellarco 등, 1985; Dellarco와 Prival, 1989), DW-116의 유전독성을 알아 보기 위한 소핵실험이 적절한 실험조건하에 이루어졌음을 알 수 있었다.

결론적으로, 새로운 퀴놀론계 항균제인 DW-116의 투여 경로에따른 *in vivo* 유전독성을 생쥐소핵 실험을 통하여 평가해 본 결과, 복강내 및 경구투여시의 모든 용량군에서 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있는 증가가 관찰되지 않았고, 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율에 있어서도 통계학적으로 유의성있는 변화를 보이지 않았다. 특히, 예상되는 임상 투여 경로인 경구투여시의 소핵실험 결과를 생각할때 DW-116은 체내에 투여시 안전성이 높은 신

약후보물질로서의 가능성을 가진 것으로 사료된다.

참고문헌

- Han, K. O., Chung, Y. H., Yoon, S. J., Lee, D. K., Choi, K. H., Choi, E. C., Yang, S. I. and Gong, J. Y. (1995). Efficacy of DW-116, a novel synthesized quinolone, for treatment of respiratory tract infections(RTI) and urinary tract infection(UTI). 35th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. (Sept. 17-20, San Francisco) Abst. F 194.
- Carlin, H. (1975). Pharmacology review of cinoxacin. Obtained from the FDA via Freedom of information Act.
- Dellarco, V. L. and Prival, M. J. (1989). Mutagenicity of nitro compounds in *Salmonella typhimurium* in the presence of flavin mononucleotide in a preincubation assay. *Environ. Mol. Mutagen* 13, 116-127.
- Dellarco, V. L., Voytek, P. E. and Hollaender, A. (1985). Aneuploidy: *Etiology and Mechanisms*, Plenum Press, New York.
- Gwon, H. J. Moon, E. Y., Hwang, H. S., Chung, Y. H., Yoon, S. J., Lee, D. K., Cho, D. H., Han, H. M., Sunwoo, Y., Ha, G. W. and Oh, H. Y. (1995). DW-116, a novel antibacterial quinolone: Toxicological studies. 35th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. (Sept. 17-20, San Francisco) Abst. F197.
- Hart, J. W. and Engberg Pedersen, H. (1983). Statistics of mouse bone-marrow micronucleus test : counting, distribution and evaluation of results. *Mutation Res.* 111, 195-207.
- Han, K. O., Hwang, Y. H., Lee, W. Y., Chung, Y. H., Yoon, S. J. and Lee, D. K. (1995a). *In vitro* and *in vivo* activity of DW-116, a new quinolone antibiotic. 35th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. (Sept. 17-20, San Francisco) Abst. F193.
- Han, K. O., Hwang, Y. H., Lee, W. Y., Chung, Y. H., Yoon, S. J. and Lee, D. K. (1995b). Efficacy of DW-116, a new fluoroquinolone, for therapy of experimental thigh infection. 35th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. (Sept. 17-20, San Francisco) Abst. F195.
- Hayashi, M. (1983). An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Res.* 120, 241-247.
- Holden, H. E., Barrett, J. F., Huntington, C. M., Muchlbauer, P. A. and Wahrenburg, M. G. (1989). Genetic profile of a nalidixic acid analog: a model for the mechanism of sister chromatid exchange induction. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 13, 238-252.
- Lee, D. K. (1995). Pharmacokinetic Study of New Quinolone, DW-116. *Drugs* 49(S2), 323-325.
- Lee, W. Y., Hwang, Y. H., Sung, S. K., Moon, E. Y., Chung, Y. H., Yoon, S. J. and Lee, D. K. (1995). The pharmacokinetic studies of DW-116. 35th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. (Sept. 17-20, San Francisco) Abst. F196.
- Mayer, D. G. (1987). Overview of toxicological studies.

- Drugs* **34**(Suppl. 1), 150-153.
- Schimada, H., Yutaka, E., Kurasawa, Y. and Arauchi, T. (1984). Mutagenicity studies of DL-8280. a new antibacterial drug. *Chemotherapy*(Tokyo) **32**(Suppl. 1), 1162-1170
- Schimid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutat. Res.* **31**, 9-15
- Schimid, W. (1976). The micronucleus test for cytogenetic analysis, in: *Chemical Mutagens: Principle Methods for their Detection* (Hollaender, A. ed.), pp. 31-53, Plenum, New York.
- Salamone, M. F., Heddle, J. A., Stuart, E. and Katz, M. (1980). Towards an improved micronucleus test: Studies on three model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutat.Res.* **74**, 347-356.
- 국립보건안전연구원 (1994). 의약품등의 독성시험 기준, 국립보건 안전 연구원 고시 94-3호.