약학회지 제40권 제 4 호 428~437(1996)
Yakhak Hoeji Vol. 40, No. 4

C7-이환체 구조를 갖는 새로운 플루오르퀴놀론계 항생제의 *in vitro*와 *in vivo* 항균작용

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

(Received January 18, 1996)

In vitro and *In vivo* Antibacterial Activity of a New Fluoroquinolone Containing C7-bicyclic Structure

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

Abstract—The *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities of a new fluoroquinolone, DWP20364(1-cyclopropyl-5-amino-6,8-difluoro-7-(2,7-diazabicyclo[3.3.0]oto-4-ene-7-yl)-1,4-di-hydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid) were evaluated in comparison with those of ciprofloxacin(CPFX), sparfloxacin(SPFX) and ofloxacin(OFLX). DWP20364 was more potent than CPFX and OFLX aganist *Staphylococcus spp., Streptococcus spp.* and *Enterococcus faecium* MD8b and it was similarly or slightly less active than CPFX against *Escherichia spp.* and *Pseudomonas spp.*. For MRSA and OFLX resistant strains(*Staphylococcus spp.*(14), *Enterococcus spp.*(4), *Acinetobacter spp.*(2), *Pseudomonas spp.*(9), *Klebsiella spp.*(2) and *Serratia spp.*(6)), DWP20364(MICs for 90% of strains, 0.025 and 12.5 μg/ml, respectively) was 4 to 32 folds more potent than SPFX and CPFX. The activity of DWP20364 decreased moderately in the presence of 5 mM Mg^{2+}. However, various pHs and the concentrations of various serum had no effect on the activity of DWP 20364. DWP20364 possessed a bactericidal effect at the 1MIC against gram positive and gram negative strains. The protective effect of DWP20364 against systemic infections in mice caused by *S. aureus* Smith or *S. aureus* L2379 was superior to that of CPFX and SPFX but it was less active than that of CPFX against infection by *P. aeruginosa* E-2.

Keywords □ DWP20364, MIC, Effect of pH and serum, Bactericidal effect, Protective effect.

전통적인 항생제인 페니실린이나 세파로스포린 항생제등에 내성을 나타내는 미생물의 출현이 큰 문제가 되고 있다. 따라서 이러한 미생물의 감염에 새로운 항생제가 필요하게 되었으며 퀴놀론이 최근 큰 기여를 하게 되었다.[1] 퀴놀론 항생제는 박테리아의 염색체를 나선형상태로 유지하면서 DNA복제중에 생기는 DNA의 작은 단일가닥이 깨어지는 것을 복구시키는 DNA gyrase 작용을 억제하여[2,3] 급속히 박테리아의 DNA 복제와 전사를 방해하여 세포를 용해시키는 새로운 작용 기전[4]을 가지고 있으므로 기존 항생제를 보완하는 역할을 하며 반합성적으로 만들어지는 페니실린이나 세파로스포린 항생제와는 달리 전합성에 의해서 제조되며 경구투여가 가능하다는 중요 특징을 가지고 있다. 이러한 퀴놀론 항생제는 1962년 Nalidixic acid[5,6]가 처음 개발된 이후 항균력의 증강, 스펙트럼의 확대, 독성의 감소 및 대사

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0342-41-7700 (팩스) 0342-731-7554

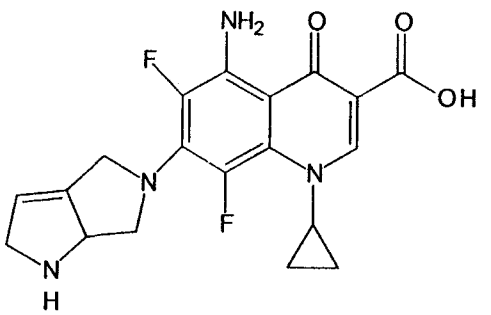

Fig. 1 — Chemical structure of DWP20364.

안정화 등의 약학적 특성을 달성하기 위해 많은 연구를 수행하여 Oxolinic acid, Cinoxacin, Piromidic acid 및 Pipemidic acid[7] 등이 개발되었으나 Nalidixic acid와 작용 혹은 용도에 큰 차이가 없었다. 80년대 초 불소가 6위치, Piperazinyl 잔기[8,9]가 7위치 그리고 새로운 잔기가 1위치의 퀴놀린 기본구조에 치환된 광범위한 약효를 지닌 프로르퀴놀론계[6,8-12]가 개발되었다. 이러한 구조 변화로 *Pseudomonas aeruginosa*와 같은 그람음성균 및 그람양성균에 대한 항생효과가 크게 개선되었다. 그러나 퀴놀론 항생제의 임상에서의 사용이 증가함에 따라 퀴놀론에 대한 내성균주도 발견되고 있으며, 최근에 이르러서는 methicillin resistant *staphylococcus aureus*(MRSA)균들이 퀴놀론 항생제에 대해서 내성화하는 경향을 보이고 있으며 *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* 및 *Serratia marcescens* 등에서도 내성균주가 발견되는등 퀴놀론에 대한 내성문제가 대두되고 있다.

이에 본 실험에서 기존 퀴놀론계 항생제의 그람음성균에 대한 활성을 유지하면서 그람양성균과 MRSA등 퀴놀론 내성균주에 항균력이 좋은 항생제를 합성하고자 하였다. 이러한 목적으로 퀴놀론 카르복실산 모핵[13]의 7번 위치에 1-시클로프로필-5-아미노-6,8-디플루오르-7-(2,7-디아자비시클로[3.3.0]옥트-4-엔-7-일-1,4-디하이드로-4-옥소퀴롤린-3-카르복실산을 도입한 DWP20364 (Fig. 1)을 합성하여 *in vitro* 및 *in vivo* 항균력을 평가한 결과를 보고하고자 한다.

실험 방법

1차 평가균주(28균주)와 ofloxacin 내성균주(37균주; *Staphylococcus spp.*(14), *Enterococcus spp.*(4), *Acinetobacter spp.*(2), *Pseudomonas spp.*(9), *Klebsiella spp.*(2)와 *Serratia spp.*(6)) 및 임상에서 분리한 Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*(28균주), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(48균주), *Pseudomonas aeruginosa*(14균주), *Escherichia coli*(39균주), *Streptococcus pneumoniae*(6균주)를 사용하였다.

시험물질

DWP20364, sparfloxacin(SPFX)은 본 연구소에서 합성한 것을 사용하였으며, ciprofloxacin(CPFX)은 대웅화학에서 공급받았으며, ofloxacin(OFLX)과 methicillin(DMPPC)은 제일약품과 대한약품에서 각각 구입하여 사용하였다.

시험배지

항균력 측정에는 Mueller-Hinton 한천배지(MHA; Difco Cat. NO. 0252-01-4)를 사용하였으며, Fleisch extract broth(FEB; beef extract 1%, peptone 1%, NaCl 0.3%, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.2%, pH 7.4~7.5)를 액체배지로 사용하였다. *Streptococcus spp.*는 MHA나 FEB에 5% defibrinated sheep blood를 첨가하여 배양하였다.

최소발육 저지농도(MIC)의 측정

최소발육 저지농도(Minimal inhibitory concentration; MIC)는 일본화학요법학회 표준법[14](일본화학요법학회, 1975)에 준하여 한천평판 희석법으로 측정하였다. 최고농도 100 μg/ml에서 최저농도 0.002 μg/ml가 되도록 2 단계씩 희석한 항생물질을 함유한 Mueller-Hinton 한천배지에 Fleisch extract broth에서 37°C에서 18시간 동안 전배양한 균액을 10^4 C.F.U./spot이 되도록 희석한 균희석액을 자동접종기(MIC-2000 system, Dynatech)를 이용하여 접종하고 37°C에서 18시간 동안 배양한 후, 균의 생장을 관찰할 수 없는 최소농도를 최소발육 저지농도를 측정하였다.

살균작용

Fleisch extract broth에서 37°C에서 18시간 동안 전배양한 *S. aureus* Smith, *E. coli* TEM 및 *P. aeruginosa* E-2 균액을 10^{-1} 희석하여 Muller-Hinton broth 9 ml에 100 μl씩 접종하여 37°C에서 1시간 동안

진탕배양한 후, ¼×MIC, ½×MIC, 1×MIC, 2×MIC, 4×MIC 농도의 DWP20364를 1 ml씩 각각 첨가하고 37°C에서 계속 진탕배양하면서 약제 작용 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 24시간 후의 생균수를 측정하였다.

금속이온이 항균력에 미치는 효과

시험균주를 37°C에서 18시간 동안 전배양한 후 DWP20364를 100 μg/ml에서 0.002 μg/ml까지 2단계씩 희석하여 첨가한 MHA 평판배지에 $CaCl_2$와 $MgSO_4$의 최종농도가 각각 5 mM이 되도록 첨가하여 10^4 C.F.U./spot로 희석한 균희석액을 접종한 다음 37°C에서 18시간 동안 배양한 후 각 균주의 MIC를 측정하였다.

배지 pH가 항균력에 미치는 효과

시험균주를 37°C에서 18시간 동안 전배양한 후 DWP20364를 100 μg/ml에서 0.002 μg/ml까지 2단계씩 희석하여 첨가한 MHA 평판배지의 pH를 1 N NaOH와 1 N HCl을 사용하여 각각 pH 6, pH 7, pH 8로 조정한 후 10^4 C.F.U./spot로 희석한 균희석액을 접종한 다음 37°C에서 18시간 동안 배양한 후 각 균주의 MIC를 측정하였다.

Horse serum이 항균력에 미치는 효과

시험균주를 37°C에서 18시간 동안 전배양한 후 DWP20364를 100 μg/ml에서 0.002 μg/ml까지 2단계씩 희석하여 첨가한 MHA 평판배지에 horse serum을 5%, 10%, 25%가 되도록 첨가하여 10^7 C.F.U./spot로 희석한 균희석액을 접종한 다음 37°C에서 18시간 동안 배양한 후 각 균주의 MIC를 측정하였다.

형태 변화 관찰

Fleisch-extract broth에서 37°C에서 18시간 동안 전배양한 *S. aureus* Smith, *E. coli* TEM 및 *P. aeruginosa* E-2 균액을 10^{-1} 희석하여 Muller-Hinton broth 9 ml에 100 μl씩 접종하여 37°C에서 1시간 동안 진탕배양한 후, ¼×MIC, ½×MIC, 1×MIC, 2×MIC, 4×MIC 농도의 DWP20364를 1 ml씩 각각 첨가하고 37°C에서 진탕배양하면서 약제 작용 2시간과 4시간째의 균액을 slide glass 위에 떨어뜨려 자연건조시킨 후, 열고정하여 crystal violet 염색액으로 30초 염색하여 광학현미경 ×1,000 배율로 균의 형태를 관찰하였다.

전신감염동물에 대한 치료 효과

ICR계 수컷 생쥐(Charles River, Japan), 체중은 22±2 g을 사용하였고, 감염균은 *S. aureus* Smith, *S. aureus* C2379 및 *P. aeuginosa* E-2를 사용하였다. Brain heart infusion broth에 시험균주를 20시간 진탕 배양 후, 집균하여 소정의 균량을 생리 식염수에 희석하여 각각 3.8×10^8/ml, 1.3×10^9/ml과 1.0×10^6/ml 농도로 5% mucin과 섞어 생쥐의 복강내에 접종하였다. 감염 1시간 후에 경구로 DWP20364, CPFX를 투여하여 7일간 생존유무를 관찰하여 Litchfield-Wilcoxon method로 PD_{50}치를 산출하였다.

결과 및 고찰

1차 평가균주에 대한 항균력

DWP20364의 1차 평가균주에 대한 항균력은 CPFX와 비교한 결과를 Table I에 나타내었다. DWP 20364는 Table I에서의 결과와 같이 그람음성균과 그람양성균에 대해서 광범위한 항균력을 가진 것으로 나타났다. DWP20364는 그람양성균에 대한 항균력이 0.007~0.098 μg/ml로 CPFX보다는 8배 이상, SPFX보다는 2배 정도, OFLX보다는 8배~16배 정도 우수한 항균력을 보였다. 특히 *S. pyogenes* A77, *E. faecium* MD86과 *S. pneumoniae*의 그람양성균에 대해서는 CPFX보다 8배 SPFX보다는 4배, OFLX보다는 8배 이상의 높은 항균력을 보였다. 그람 음성균에 대한 DWP20364의 MIC치는 0.002~12.5 μg/ml로 SPFX와 OFLX처럼 유사한 항균력을 보였으나 CPFX보다는 유사하거나, 2~4배의 항균력이 감소하는 결과를 나타냈다.

내성균주에 대한 항균력

내성균주에 대한 DWP20364의 항균력을 Table II에 나타내었다. DWP20364의 H-MRSA균주에 대한 항균력은 0.004~1.563 μg/ml로 CPFX(0.195~100 μg/ml)보다는 50배 이상(MIC_{90}), SPFX(0.025~12.5 μg/ml)보다는 5~8배 이상 월등히 우수한 항균력을 나타내었으며, *Staphylococcus spp.*(14), *Enterococcus spp.*(4), *Acinetobacter spp.*(2), *Pseudomonas spp.*(9), *Klebsiella spp.*(2)와 *Serratia spp.*(6)을 포함하는 총

Table I — Antibacterial activities of DWP20364, ciprofloxacin, sparfloxacin and ofloxacin against primary screening strains (Inoculum size: 10^4 cfu/spot)

Strains	MIC[1] (μg/ml)			
	DWP20364	Ciprofloxacin	Sparfloxacin	Ofloxacin
S. pyogenes A77	0.049	0.391	0.195	0.781
E. faecium MD8b	0.098	0.781	0.391	0.781
S. pneumoniae type I	0.049	0.391	0.098	0.781
S. pneumoniae type II	0.049	0.781	0.195	0.781
S. aureus SG511	0.013	0.195	0.049	0.195
S. aureus FDA209P	0.007	0.195	0.025	0.098
S. aureus Smith	0.007	0.098	0.013	0.098
S. aureus C2379(L-MRSA)[2]	0.013	0.781	0.025	0.195
S. aureus C5740(H-MRSA)[3]	0.013	0.391	0.049	0.195
E. coli DC0	0.195	0.195	0.195	0.391
E. coli DC2	0.098	0.098	0.025	0.391
E. coli TEM	0.007	0.025	0.007	0.025
C. freundii ATCC6750	0.195	0.098	0.391	0.195
S. marcescens 421-094(OR)[4]	0.781	3.125	1.563	3.125
S. marcescens IFO12648	0.098	0.098	0.195	0.195
P. aeruginosa 9027	0.391	0.391	0.781	0.781
P. aeruginosa 1592E	0.391	0.195	0.781	0.781
P. aeruginosa 1771	0.391	0.391	0.391	0.781
P. aeruginosa 1771m	0.098	0.391	0.195	0.098
P. aeruginosa E-2	0.391	0.391	0.781	0.781
P. aeruginosa C-1198	0.391	0.391	0.781	1.563
P. aeruginosa 101-181(OR)	12.5	6.25	25	12.5
E. cloacae P99	0.004	0.013	0.007	0.025
E. cloacae 1321E	0.004	0.013	0.004	0.025
K. oxytoca 1082E	0.002	0.007	0.002	0.007
K. aerogenes 1522E	0.013	0.025	0.025	0.049
P. vulgaris GN76	0.013	0.025	0.049	0.049

1) M.I.C. : Minimal Inhibitory Concentration
2) L-MRSA : Low Methicillin Resistant *S. auresus* (6.25 μg/ml≤MIC of methicillin〈100 μg/ml)
3) H-MRSA : High Methicillin Resistant *S. auresus* (MIC of methicillin≥100 μg/ml)
4) OR : Ofloxacin Resistant strain

Table II — *In vitro* antibacterial activities of DWP20364, ciprofloxacin, sparfloxacin and ofloxacin against resistant strains (Inoculum size: 10^4 cfu/spot)

Strains (NO. of strains)	Antibiotic	MIC (μg/ml)		
		MIC_{50}	MIC_{90}	Range
L-MRSA(18)	DWP20364	0.049	1.563	0.013~1.563
	Ciprofloxacin	0.391	50	0.195~50
	Sparfloxacin	0.049	6.25	0.025~6.25
	Ofloxacin	0.391	6.25	0.195~6.25
H-MRSA(30)	DWP20364	0.049	0.781	0.004~1.563
	Ciprofloxacin	0.781	50	0.195~100
	Sparfloxacin	0.098	6.25	0.025~12.5
	Ofloxacin	0.781	12.5	0.195~25
OFLX-R(37)1)	DWP20364	1.563	12.5	0.013~12.5
	Ciprofloxacin	6.25	100	0.049〉100
	Ofloxacin	6.25	50	1.563~50

1) OFLX-R: Ofloxacin resistant strains(*Staphylococcus spp.*(14), *Enterococcus spp.*(4), *Acinetobacter spp.*(2), *Pseudomonas spp.*(9), *Klebsiella spp.*(2) and *Serratia spp.*(6))

37균주의 OFLX 내성균주에 대한 DWP20364의 항균력 범위는 0.013~12.5 μg/ml로 CPFX(0.049~〉100 μg/ml)보다 4~8배 이상, OFLX보다는 4배 이상의 높은 항균력을 나타내어 내성균주에 대한 DWP20364의

Table III — *In vitro* antibacterial activities of DWP20364, ciprofloxacin, sparfloxacin and ofloxacin against clinical isolates (Inoculum size: 10^4 cfu/spot)

Strains (NO. of strains)	Antibiotic	MIC (μg/ml)		
		MIC_{50}	MIC_{90}	Range
Methcilllin-susceptible *S.aureus*[1](28)	DWP20364	0.013	0.025	0.004~0.781
	Ciprofloxacin	0.391	0.781	0.195~12.5
	Sparfloxacin	0.049	0.098	0.013~6.25
	Ofloxacin	0.391	0.391	0.195~6.25
S. pneumoniae(6)	DWP20364	0.049	-	0.049~0.098
	Ciprofloxacin	0.781	-	0.391~1.563
P. aeruginosa(14)	DWP20364	0.391	1.563	0.195~1.563
	Ciprofloxacin	0.195	0.781	0.098~0.781
	Sparfloxacin	0.781	1.563	0.195~3.125
	Ofloxacin	1.563	3.125	0.391~3.125
E. coli(39)	DWP20364	0.025	12.5	0.013~50
	Ciprofloxacin	0.013	6.25	0.002~6.25
	Sparfloxacin	0.013	12.5	0.007~25
	Ofloxacin	0.098	12.5	0.025~12.5

1) Methicillin susceptible *S. aureus* (MIC of methicillin≤3.125 μg/ml)

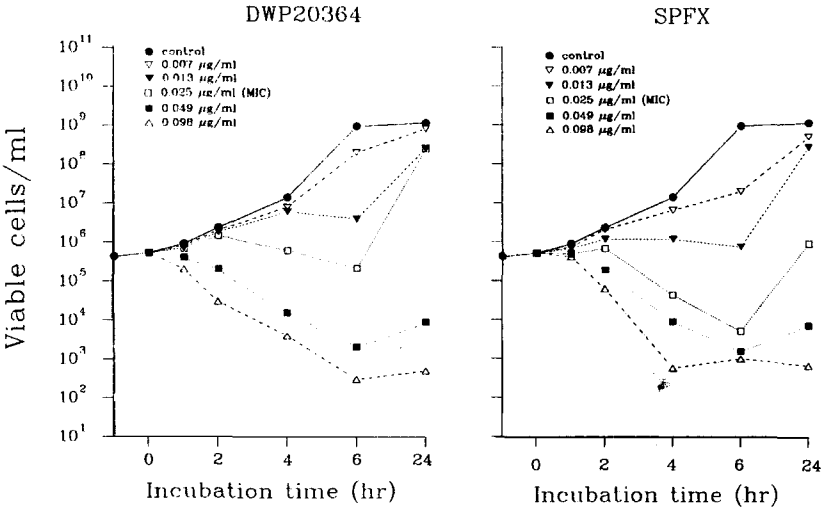

Fig. 2 — Effect of DWP20364 and sparfloxacin on viability of *S. aureus* Smith.

항균력이 다른 대조약물보다 우수한 것으로 나타났다.

임상분리균주에 대한 감수성 분포

임상분리균주에 대한 MIC_{50}과 MIC_{90}은 Talbe III에 나타내었으며, DWP20364의 methicillin-susceptible *S. aureus*와 methicillin-resistant *S. aureus*의 항균력은 MIC_{90}치를 기준으로 볼때 CPFX, SPFX와 OFLX에 비해 각각 32배, 8배, 16배 이상의 항균력이 우수하였으며, *S. pneumoniae*에 대해서는 DWP20364(0.049~0.098 μg/ml)가 CPFX보다 16배 우수한 반면, *P. aeruginosa*와 *E. coli*에 대해서는 CPFX에 비해 2~4배 정도 항균력이 낮으나, OFLX보다는 2배 이상 우수하였고, SPFX과 동등한 항균력을 나타내었다.

살균작용

S. aureus Smith, *E. coli* TEM, *P. aeruginosa* E-2를 사용하여 증식곡선에 대한 DWP20364의 효과를 조사하였다(Fig. 2~4). DWP20364의 *S. aureus* Smith에 대한 살균작용을 검토한 결과, 약제 투여 60분부터 MIC(0.025 μg/ml)이상 농도에서 살균작용이 관찰되

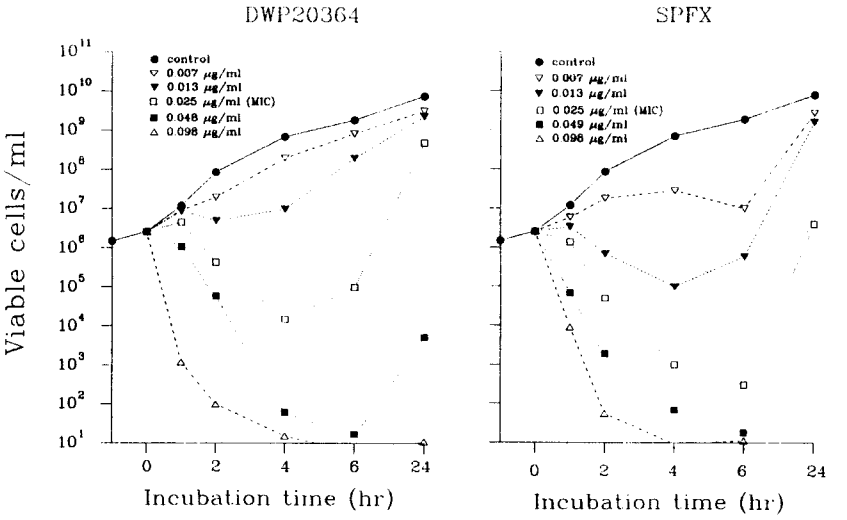

Fig. 3 — Effect of DWP20364 and sparfloxacin on viability of E. coli TEM.

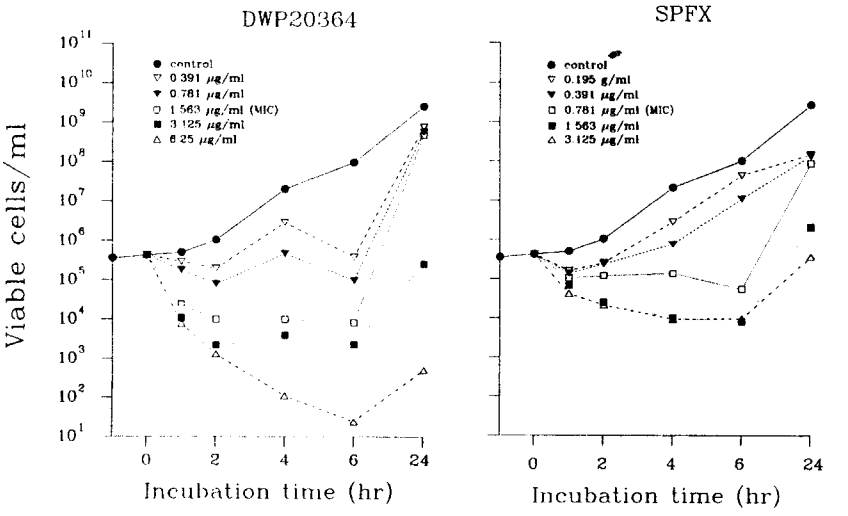

Fig. 4 — Effect of DWP20364 and sparfloxacin on viability of *P. aeruginosa* E-2.

었으며, 24시간 후에는 균의 재성장이 확인되었다. *E. coli* TEM에 대한 DWP20364의 살균작용도 MIC (0.025 μg/ml) 이상에서 관찰되었으며, 2×MIC에서는 6시간까지 생균수가 감소되다가 24시간부터 생균수가 증가되었으나 4×MIC에서는 24시간후에도 재성장되지 않았다. 또한 *P. aeruginosa* E-2에 대해서는 약제농도가 MIC(1.563 μg/ml)이상에서 강한 정균작용을 보였으나 4MIC 농도에서도 강한 살균작용이 관찰되지 않았다.

금속이온이 항균력에 미치는 효과

5 mM $CaCl_2$와 5 mM $MgSO_4$ 첨가된 MHA배지에서 DWP20364, CPFX와 SPFX의 MIC에 대한 효과를 Table IV에 나타내었다. $CaCl_2$를 첨가한 배지에서 DWP20364는 *E. cloace* P99를 제외한 모든 시험균주에서 MIC에 대한 변화가 거의 없었고 CPFX와 SPFX에서는 2배 미만으로 낮았으나 $MgSO_4$를 첨가한 배지에서 DWP20364는 CPFX와 SPFX처럼 MIC에 대한 변화가 2배 이상 높게 나타났다.

수소이온 농도가 항균력에 미치는 영향

DWP20364의 *in vitro* 활성에서 pH에 대한 효과는

Table IV — Metal ion effects of DWP20364, Ciprofloxacin and Sparfloxacin

Strains	MIC (μg/ml)			
	Antibiotics	$CaCl_2$	$MgSO_4$	Control
S. pneumoniae typeI	DWP20364	0.049	0.195	0.049
	Ciprofloxacin	0.391	0.781	0.195
	Sparfloxacin	0.195	0.195	0.195
S. aureus Smith	DWP20364	0.007	0.025	0.007
	Ciprofloxacin	0.098	0.195	0.098
	Sparfloxacin	0.049	0.098	0.049
S. aureus C2379(L-MRSA)	DWP20364	0.013	0.098	0.025
	Ciprofloxacin	0.391	0.391	0.195
	Sparfloxacin	0.049	0.098	0.049
E. coli TEM	DWP20364	0.013	0.098	0.025
	Ciprofloxacin	0.013	0.025	0.013
	Sparfloxacin	0.013	0.025	0.013
P. aeruginosa 1771m	DWP20364	0.098	0.195	0.098
	Ciprofloxacin	0.025	0.025	0.025
	Sparfloxacin	0.195	0.098	0.049
P. aeruginosa E-2	DWP20364	0.391	1.563	0.391
	Ciprofloxacin	0.195	0.391	0.098
	Sparfloxacin	0.781	1.563	0.391
E. cloacae P99	DWP20364	0.025	0.049	0.004
	Ciprofloxacin	0.013	0.025	0.007
	Sparfloxacin	0.025	0.025	0.007

(Inoculum size: 10^4 cfu/spot)

Table V — pH effects of DWP20364, Ciprofloxacin and Sparfloxacin (Inoculum size: 10^4 cfu/spot)

Strains	MIC (μg/ml)								
	DWP20364			Ciprofloxacin			Sparfloxacin		
	pH6	pH7	pH8	pH6	pH7	pH8	pH6	pH7	pH8
S. pneumoniae typeI	0.195	0.098	0.195	0.781	0.391	0.781	0.195	0.195	0.391
S. aureus C2379	0.025	0.013	0.025	0.391	0.391	0.391	0.049	0.098	0.098
E. coli TEM	0.013	0.013	0.013	0.049	0.013	0.004	0.025	0.013	0.098
P. aeruginosa 1771 m	0.098	0.049	0.098	0.049	0.025	0.013	0.049	0.025	0.049
P. aeruginosa E-2	0.195	0.195	0.195	0.195	0.098	0.049	0.195	0.195	0.391

Table V에 나타냈으며, DWP20364와 SPFX는 pH 6~8사이에서 항균력이 거의 변화가 없었으며, CPFX는 *E.coli* TEM, *P.aeruginosa* 1771m과 *P. aeruginosa* E-2에서 pH가 증가할수록 항균력이 4배 이상 우수한 것으로 나타났다.

Horse serum이 항균력에 미치는 영향

DWP20364의 horse serum에 대한 항균력을 Table VI에 나타내었다. 5%, 10%, 25% 마혈청을 넣은 배지에서 DWP20364와 CPFX의 활성에는 영향이 없었으며, SPFX는 25% horse serum을 넣은 배지에서 2배 정도 높은 항균활성을 보여 마혈청의 농도에 따라 항균력에 영향을 주는것으로 나타났다.

전신감염에 대한 감염방어 효과

생쥐 감염방어 실험으로 PD50을 산출하기 위하여 DWP20364의 *in vivo* 항균력을 대조약물과 비교하였다(Table VII). 경구투여시 *S. aureus* Smith, *S. aureus* C2379(L-MRSA)에 대한 DWP20364는 대조물질인 CPFX보다 PD_{50}치가 4~5배, SPFX보다 2~4배 이상 우수하였으나 *P. aeruginosa* E-2에 대한 PD_{50}치가 CPFX보다 2~4배 정도 효과가 감소하였다.

형태 변화 관찰

S. aureus Smith에 대한 형태 관찰은 Fig. 5에 나타내었다. DWP20364의 MIC(0.025 μg/ml)이상의 농도에서 세포가 약간 부풀어 오른 것이 관찰되었다. 또한

Table VI — Horse serum effects of DWP20364, Ciprofloxacin and Sparfloxacin

Antibiotics	Serum (%)	MIC (μg/ml)							
		S. pneumoniae		*S. aureus*		*E. coli*		*P. aeruginosa*	
		type I	type II	Smith	C2379	DC 0	TEM	1771	E-2
DWP20364	0	0.049	0.049	0.007	0.013	0.195	0.007	0.391	0.391
	5	0.098	0.049	0.007	0.007	0.391	0.007	0.391	0.391
	10	0.049	0.049	0.007	0.007	0.391	0.007	0.391	0.391
	25	0.098	0.049	0.013	0.007	0.391	0.007	0.195	0.391
Ciprofloxacin	0	0.391	0.781	0.098	0.781	0.195	0.025	0.391	0.391
	5	0.781	1.563	0.049	0.781	0.195	0.049	0.195	0.391
	10	0.391	0.781	0.098	0.781	0.195	0.025	0.391	0.391
	25	0.391	0.781	0.098	0.781	0.195	0.025	0.391	0.391
Sparfloxacin	0	0.098	0.195	0.013	0.025	0.195	0.007	0.391	0.781
	5	0.049	0.195	0.007	0.025	0.195	0.007	0.391	0.781
	10	0.098	0.391	0.013	0.049	0.098	0.007	0.195	0.391
	25	0.049	0.098	0.013	0.025	0.098	0.004	0.195	0.391

(Inoculum size: 10^4 cfu/spot)

Table VII — Protective effects of DWP20364 and Ciprofloxacin on systemic infections in mice

Strains	Challenge dose	Route	Antibiotics	PD_{50} (mg/kg) (95% confidence limit)
S. aureus Smith	3.8×10^8 (5% mucin)	p.o.	DWP20364	1.02 (0.65~1.59)
			Ciprofloxacin	3.88 (1.28~11.71)
			Sparfloxacin	2.09 (1.24~3.52)
S. aureus C2379 (L-MRSA)	1.3×10^9 (5% mucin)	p.o.	DWP20364	5.13 (2.96~8.92)
			Ciprofloxacin	>25
			Sparfloxacin	21.76 (10.15~46.63)
P. aeruginosa E-2	1.0×10^6 (5% mucin)	p.o.	DWP20364	5.80 (3.22~10.4)
			Ciprofloxacin	1.44 (0.80~2.61)

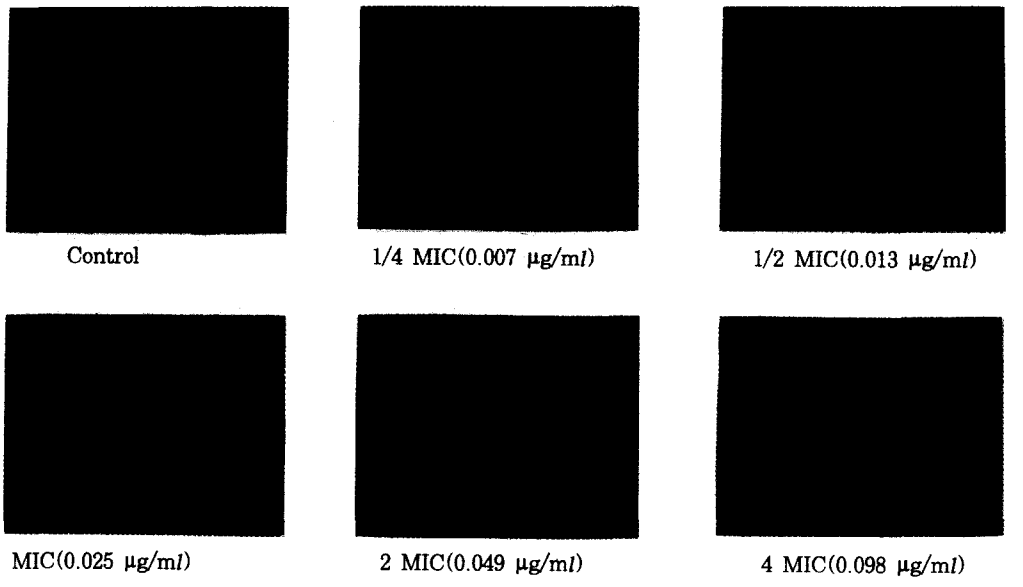

Fig. 5 — Microscopic observation of *Staphylococcus aureus* Smith exposed to DWP20364(× 1,000).

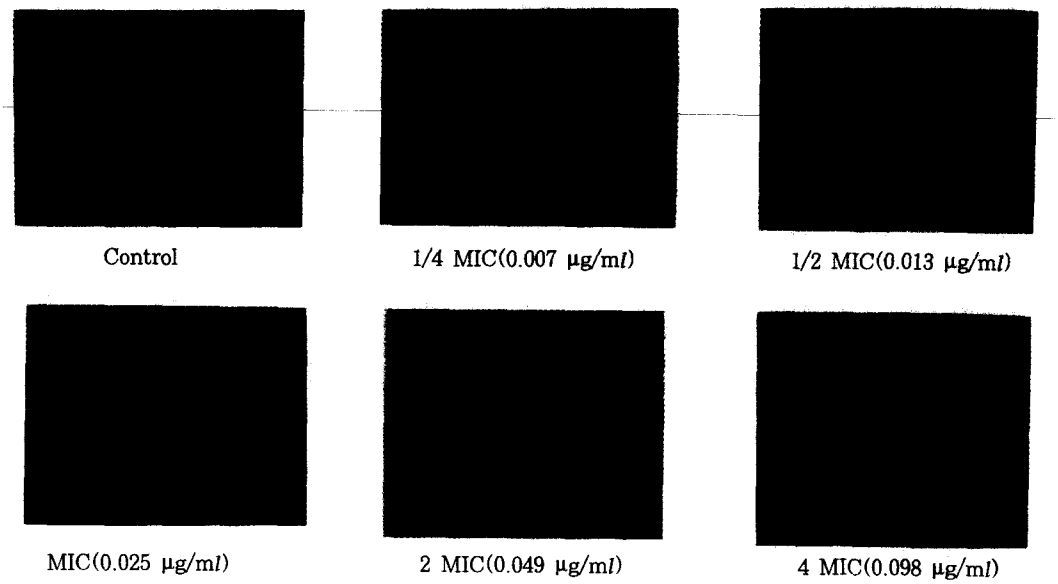

Fig. 6 — Microscopic observation of *Escherichia coli* TEM exposed to DWP20364(× 1,000).

E. coli TEM에 대해서 DWP20364을 처리하여 현미경으로 관찰한 결과를 Fig. 6에 나타내었으며, DWP 20364의 MIC(0.025 μg/ml)값 이상의 농도에서 약제 투여 4시간 후에 filament 형상으로 길게 신장된 것이 관찰되었다. 이러한 균종간의 형태변화의 다양성은 OFLX와 CPFX 등에서도 관찰되었으며, 퀴놀론 약제의 공통적 현상[15]이라 생각되어 진다.

결 론

새로운 퀴놀론계 항생제인 DWP20364는 그람양성균과 그람음성균에 대해 광범위한 항균력을 지녔으며 특히 *Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae* 와 *Enterococcus faecium* MD8b에 대해서 DWP 20364가 CPFX보다 8배 이상, SPFX보다는 2배 정도, OFLX보다는 8~16배 이상 항균력이 탁월하였다. 또한, 원내 감염의 원인균이며 β-lactam계 항생제에 저항성을 보이는 MRSA와 OFLX 내성균주 (*Staphylococcus spp.*(14), *Enterococcus spp.*(4), *Acinetobacter spp.*(2), *Pseudomonas spp.*(9), *Klebsiella spp.*(2)와 *Serratia spp.*(6))에 대해서도 CPFX보다 각각 50배, 8배 이상, SPFX보다는 5배 이상 항균력이 우수하였으나 그람음성균에 대해서는 CPFX보다 항균력이 2~4배 떨어졌고 SPFX와 OFLX에 비해 우수하였다. 살균작용에 대한 효과는 DWP20364가 MIC이상 농도에서 급속한 살균효과를 나타내었다. 금속이온농도에 대한 DWP20364의 효과는 Ca^{2+}이온을 첨가한 배지에서는 항균력에 대한 변화가 거의 없었으나 Mg^{2+}이온을 첨가한 배지에서는 CPFX와 SPFX처럼 항균력이 2배 이상 감소 되었으며 5~25% horse serum을 첨가한 배지와 배지 pH 변화에 대한 DWP20364의 항균활성은 아무런 영향을 받지 않았다. 전신 감염동물에 대한 치료효과는 *in vitro* 항균력 측정 결과와 마찬가지로 그람 양성균에 대해서는 CPFX보다 4~5배, SPFX보다 2~4배 가량 항균력이 우수하였으나, 그람 음성균에 대해서는 감염방어효과가 CPFX보다는 2~4배 정도 떨어지는 것으로 나타났다. 위 실험결과로 보아 DWP 20364는 마우스 전신감염방어효과뿐만 아니라 *in vitro* 항균활성평가에서 그람양성균과 그람음성균에 광범위한 항균활성을 지녔으며, 특히 호흡기 감염의 원인균인 그람양성균과 MRSA균주 그리고 OFLX 내성균주에 대해 다른 어떠한 항생제보다 우수한 항균력을 가지므로 임상적으로 중요한 역할을 수행하리라 기대된다.

감사의 말씀

이 연구는 1992년도 과기처 G-7 프로젝트 연구비로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1) 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).

2) Wise, R., Ashby, J. D. and Andrew, J. M. : *In vitro* activity of PD127,391, and enhanced-spectrum quinolone. *Antimicrob. Agents Chemother*. **32**, 1251 (1988).

3) Mitscher, L. A., Sharma, P. N., Chu, D. T. W., Shen, L. L. and Pernet, A. G. : Chiral DNA gyrase inhibitors. 2. Asymmetric synthesis and biological activity of enantiomers of 9-fluoro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de]-1,4-benzoxazine-6-carboxylic acid (Ofloxacin). *J. Med. Chem*. **30**, 2283 (1987).

4) Shen, L. L., Mitscher, L. A., Sharma, P. N., O Donnell, T. T., Chu D. T. W., Cooper, C. S., Terry and Pernet, A. G. : Mechanism of Inhibition of DNA Gyrase by Quinolone Antibacterials: A cooperative Drug-DNA Binding Model *Biochemistry* **28**, 3886 (1989).

5) 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).

6) Hirai, K., Ito, A., Suzue, S., Irikura, T., Inoue, M., and Mitshashi, M. : Mode of action of AM-715, a new nalidixic acid analog. *Gunma Reports on Medical Science* **19**, 37 (1982).

7) Shimizu, M., Takase, Y., Nakamura, S., Katae, H. and Minami, A. : Pipemidic acid: Its activites against various experimental infections. *Antimicrob. Agents Chemother*. **9**, 569 (1976).

8) Caekengerghe, D. L. and Pattyn, S. : *In vitro* activity of ciprofloxacin compared with those of other new fluorinated piperazinyl-substituted quinolone derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother*. **25**, 518 (1984).

9) Fujimaki, K., Noumi, T. and Mitsuhashi, S.: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of T-3262, a new fluoroquinolone. *Antimicrob. Agents Chemother*. **32**, 827 (1988).

10) Hardy, D. J. : *In vitro* activity of temafloxacin against gram-negartive bacteria.: an overview. *Am. J. Med*. **91**, 19 (1991).

11) Espinoza, A. M., Chin, N. X. and Neu, H. C. : Comparative *In vitro* activity of a new fluorinated 4-quinolone, T-3262 (A-60969). *Antimicrob. Agents Chemother*. **32**, 663 (1988).

12) Kojima, T., Inoue, M. and Mitsuhashi, S. : *In vitro* activity of AT-4140 against clinical bacterial isolates. *Antimicrob. Agents Chemother*. **33**, 1980 (1989).

13) 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).

14) 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).

15) Nishinoi, T., Tomii, Y., Shibata, K., Kawai, M., Shiotsuki N. and Otsuki, M. : *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of NM441. *Jpn. J. Chemother*. **44**, 56 (1966).