

새로운 퀴놀론 항생제 LB20304의 Post-Antibiotic Effect

안미정 · 백경숙 · 김무용 · 김인철 · 박진환*

LG화학 기술연구원, 바이오텍연구소

(Received February 9, 1996)

Post-Antibiotic Effect of LB20304, A New Quinolone Antibiotic

Mi-Jeong Ahn, Kyoung-Sook Paek, Mu-Yong Kim, In-Chull Kim, and Jin-Hwan Kwak*

Biotech Research Institute, LG Chem Research Park, LG Chemical Ltd., Taejon 305-380, Korea

Abstract—The post-antibiotic effect (PAE), which is defined as the period of time lag that the target organisms resume normal growth rate after complete removal of the antibiotics, of LB20304 and ciprofloxacin was evaluated against *Staphylococcus aureus* 6538p and *Escherichia coli* 3190Y, respectively. The PAE was estimated by adding each antibiotic to a log phase of growth and incubating at 37°C for 1 h. Antibiotic was removed by centrifugation, and total viable cell counts were determined hourly for a further 10 h. The PAEs of LB20304 against *S. aureus* at concentrations of 1×MIC and 2 µg/ml were 10 min and 93 min, respectively. LB20304 showed a comparable PAE to ciprofloxacin. Against *E. coli*, the PAE of LB20304 was also similar to that of ciprofloxacin at concentration of 4×MIC but it was much longer than that of ciprofloxacin at concentration of 2 µg/ml. LB20304 showed higher lethality than ciprofloxacin against both *S. aureus* and *E. coli* strains.

Keywords □ Post-Antibiotic Effect (PAE), LB20304, Quinolone, Lethality.

어떤 종류의 항생제에 노출된 세균은 배지 중의 항생제를 제거한 후에도 성장에 저해를 받게 되어 일정시간 또는 영구적으로 성장을 회복하지 못하게 된다. 이러한 현상을 Post-Antibiotic Effect (PAE)라고 하는데¹⁾, 이것은 1944년 Bigger에²⁾ 의해 penicillin G에 노출된 staphylococci에서 처음 보고되었다. 이 PAE는 약동력학적 특성과 함께 항생제의 용량, 투여 간격의 결정에 중요한 요인이 된다. 즉, 투여 간격 사이에 혈중농도 (또는 조직내 농도)가 MIC이하로 떨어질 수 있으므로 PAE가 클수록 이 기간 중에 세균이 다시 자랄 확률이 낮으므로 투여간격을 늘일 수 있는 것이다.³⁾

PAE의 측정방법은 크게 *in vitro*와 *in vivo*로 나뉘어

지고, 전자는 항생물질을 제거하는 몇 가지 방법에⁴⁻⁵⁾ 의해 후자는 몇 가지의 animal model로⁶⁻⁸⁾ 구분될 수 있다. PAE에 영향을 주는 요인으로는 미생물의 종류와 농도, 항생물질의 종류, 농도, 성장상태, 미생물이 항생물질에 노출되는 시간, 그 외에 물리적인 요인, 배지의 종류, pH 등⁹⁻¹⁰⁾이 있다.

본 연구에서는 원심분리로 항생물질을 제거하는 *in vitro* PAE 측정 방법 (Broth Technique)을 이용하여, 새로운 퀴놀론 항생제인 LB20304의 PAE를 대조약제인 ciprofloxacin과 비교 실험하였다.

실험방법

시약 및 균주 - LB20304는 본 연구소에서 합성한 것을 사용하였으며 ciprofloxacin은 Sigma사(St.

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-866-2205 (팩스) 042-862-0333

Louis, Missouri)의 것을 구입하여 사용하였다. PAE 측정을 위한 균주는 ATCC 균주인 *Staphylococcus aureus* 6538p와 임상분리 균주인 *Escherichia coli* 3190Y를 사용하였으며, 시험 균주의 배양은 Difco사의 Mueller-Hinton 배지 (Detroit, Michigan)를 이용하였다.

MIC 측정 - 두 균주에 대한 항생물질의 최소발육저지농도 (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)는 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)의 방법¹¹⁾ 준하여 한천회석법으로 실시하였다. 최고농도 128 µg/ml에서 최저농도 0.008 µg/ml가 되도록 2배 계단 회석된 항생물질이 함유된 배지에 10⁴ CFU/spot의 균을 접종하여, 35°C에서 18시간 배양한 후, 균의 성장을 관찰할 수 없는 최소농도를 MIC로 결정하였다.

Post-Antibiotic Effect의 측정 - 시험 균주를 Mueller Hinton Broth (MHB) 배지에서 하룻밤 배양한 다음, 같은 배지로 희석하여 580 nm에서의 OD값이 0.3이 되도록 희석하였다. 이 균액 1 ml에 8.9 ml의 MHB와 0.1 ml의 항생제 용액을 가하여, 최종 항생제 농도가 각각 4×MIC, 2 µg/ml가 되게 만들었다. 실험 균주를 37°C에서 1시간 동안 항생제에 노출시킨 뒤, 14,000 g에서 3분간 원심분리하였다. 항생물질이 함유되어 있는 상정액을 버린 후 다시 10 ml의 MHB 배지로 현탁시켜 같은 조건에서 두 번의 원심분리를 더 실시하여 배양액 중의 항생물질을 제거하였다. 다시 균액을 미리 37°C로 맞추어 놓은 10 ml의 MHB배지에 현탁시켜 37°C 수조에서 120 rpm으로 교반 배양하였다. 항생물질에 노출시키기 직전과 항생물질에 1시간 노출시킨 다음 항생물질을 제거한 직후에 각각 0.1 ml씩의 균액을 취하였다. 그리고 계속 배양액의 현탁도가 현저하게 증가할 때까지 일정 간격으로 균액 0.1 ml씩을 취하여, 이들 균액을 연속적으로 희석한 후 Mueller Hinton Agar (MHA) 배지에 도말하여 총 생균수를 측정하였다. 항생물질을 넣지 않은 대조군에 대해서도 같은 조건으로 균액을 취하여 총 생균수를 측정하였다.

Post-Antibiotic Effect의 계산²⁾ - 배양 시간에 따른 총 생균수를 함수로 하여 그래프를 그린 다음 다음의 식에 의해 PAE 지속시간을 측정하였다.

$$PAE = T - C$$

여기에서 T는 항생물질을 처치한 군에서 항생물질을

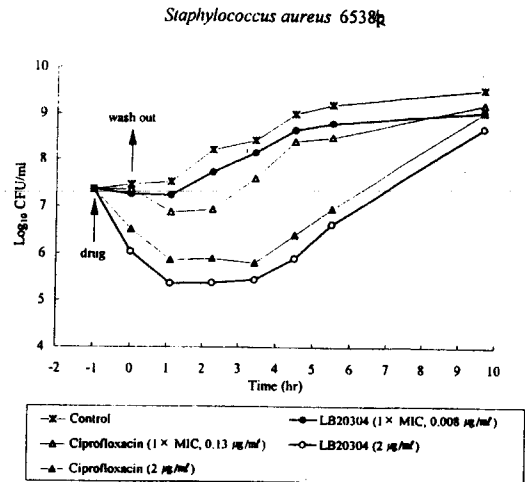


Fig. 1 - PAEs induced by 1 hr expose of *Staphylococcus aureus* 6538p to LB20304 and ciprofloxacin.

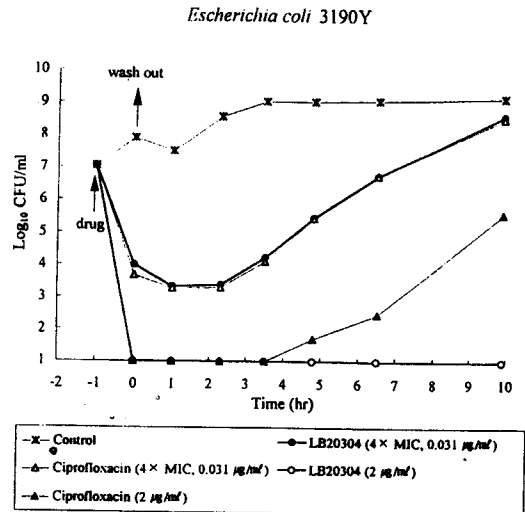


Fig. 2 - PAEs induced by 1 hr expose of *Escherichia coli* 3190Y to LB20304 and ciprofloxacin.

제거하였을 때를 기점으로 하여 균수가 10배 증가하였을 때까지 걸리는 시간이며, C는 항생물질을 넣지 않은 대조군에서 위와 마찬가지로 항생물질을 제거하였을 때를 기점으로 하여 균수가 10배 증가하였을 때까지 걸리는 시간이다.

실험결과

Post-Antibiotic Effect - *S. aureus*에 대한 LB20304 및 ciprofloxacin의 MIC는 각각 0.008 µg/ml, 0.13

Table I—PAEs of LB20304 and ciprofloxacin

Microorganism	Inoculum (CFU/ml)	Drug	MIC($\mu\text{g/ml}$)	Concentration ^a	%Lethality	PAE
<i>S. aureus</i> 6538p	2.3×10^7	LB20304	0.008	1×MIC	21.7	< 10 min
		Ciprofloxacin	0.13	1×MIC	0	< 10 min
		LB20304	0.008	2 $\mu\text{g/ml}$	95.2	1 hr 33 min
		Ciprofloxacin	0.13	2 $\mu\text{g/ml}$	85.7	1 hr 32 min
<i>E. coli</i> 3190Y	1.1×10^7	LB20304	0.008	4×MIC	99.9	1 hr 25 min
		Ciprofloxacin	0.008	4×MIC	≈100	1 hr 31 min
		LB20304	0.008	2 $\mu\text{g/ml}$	≈100	≈19 hr
		Ciprofloxacin	0.008	2 $\mu\text{g/ml}$	≈100	3 hr 15 min

^a Exposure time : 60 min

$\mu\text{g/ml}$ 이었으며, *E. coli*에 대한 LB20304 및 ciprofloxacin의 MIC는 모두 0.008 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. Fig. 1은 *S. aureus*에 대한 LB20304 및 ciprofloxacin의 PAE 패턴을 보여 주며, Fig. 2는 *E. coli*에 대한 LB20304 및 ciprofloxacin의 PAE 패턴을 보여준다. Table I은 이들 PAE의 결과를 요약한 것이다. 2 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 *S. aureus*에 대한 LB20304의 PAE 지속 시간은 93분으로서 ciprofloxacin의 92분과 비슷하였지만, 살균작용과 살균력(Lethality)면에서는 LB20304는 ciprofloxacin보다 우수한 특성을 보여주었다. *E. coli*에 대해서는 LB20304는 4×MIC 농도에서는 PAE 지속시간이 85분으로서 ciprofloxacin의 91분에 비해 약간 짧았지만, 2 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 PAE 지속시간이 약 19시간으로서 ciprofloxacin의 3시간 15분에 비해 훨씬 길었다.

고 찰

Post-antibiotic effect는 아직까지 그 자세한 작용 기전이 밝혀지지 않았지만, 항생제의 약동력학적 특성과 함께 약물의 투여 횟수 및 투여 간격을 결정하는데 중요한 변수가 되고 있고 또 새로운 항생제의 경우에는 약물의 작용 기전과 특성을 규명하는데 필수적이기 때문에 많은 연구가 되고 있는 분야이다. 만일 어떤 항생제가 목표로 하고 있는 세균에 대해 PAE를 보여주지 못하면 이 약물은 생체내 약물 농도가 MIC 이하로 떨어지지 않도록 약물 투여 간격을 좁혀야 할 것이다. 또 한 어떤 약물에 대한 PAE의 연구는 일반적인 *in vitro* 또는 *in vivo* 감수성 시험만으로는 예측할 수 없는 약물의 작용 기전들을 보여주기 때문에 새로운 항생제의 경우에는 실제 임상에서의 적용을 위해서는 이 약물과 여러 세균간의 PAE에 대한 연구가 필수적으로 요구된다.

LB20304는 본연구소에서 합성된 새로운 퀴놀론 항생제로서, *in vitro*와 *in vivo*에서 ciprofloxacin, sparfloxacin 등의 다른 퀴놀론 항생제보다 우수한 약효를 가지고 있을 뿐만 아니라 실험 동물에서 이들 약제들보다 개선된 약동력학적 특성을 갖고 있는 화합물이다.¹³⁻¹⁶⁾ LB20304의 임상에서의 유효성과 약물 투여 횟수 등에 대해 기초적인 정보들을 얻기 위해, ciprofloxacin을 대조 약제로 하여 PAE 연구를 한 결과, LB20304는 *S. aureus*에 대해서는 ciprofloxacin과 비슷한 결과를 보여 주었지만, *E. coli*에 대해서는 ciprofloxacin보다 우수한 PAE를 보여주었다. 그리고 이들 두 균주에 대해서 LB20304는 ciprofloxacin보다 훨씬 높은 치사율을 보여줌으로써, 신속한 살균 작용(bactericidal activity)을 보여주었다. 그러나 LB20304가 갖고 있는 PAE의 임상적 중요성을 정확하게 이해할 수 있기 위해서는, 보다 자세한 실험 동물에서의 연구와 실제 임상에서의 연구 결과가 뒷받침 되어야 할 것으로 사료된다.

문 헌

- 1) McDonald, P. J., Craig, W. A. and Kunin, C. M. : Persistent effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* after exposure for limited periods of time. *J. Infect. Dis.* **135**, 217 (1977).
- 2) Bigger, J. W. : The bactericidal action of penicillin on *Staphylococcus pyogenes*. *Irish. J. Med. Sci.* **227**, 533 (1944).
- 3) Ebert, S. C. and Craig, W. A. : Pharmacodynamic properties of antibiotics, application to drug monitoring and dosage regimen design. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **11**, 319 (1990).

- 4) Rescott, D. L., Nix, D. E., Holden, P. and Schentag, J. J. : Comparison of two methods for determining *in vitro* postantibiotic effects of three antibiotics on *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **32**, 450 (1988).
- 5) Lowdin, E., Odenholt-Tornqvist, I., Bengtsson, S. and Cars, O. : A new method to determine postantibiotic effect and effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **37**, 2200 (1993).
- 6) Gudmundsson, S., Vogelmann, B. and Craig, W. A. : The *in vivo* postantibiotic effect of imipenem and other new antimicrobials. *J. Antimicrob. Chemother.* **18** (Suppl E), 67 (1986).
- 7) Odenholt, I., Holm, S. E. and Cars, O. : An *in vivo* model for evaluation of the postantibiotic effect. *Scand. J. Infect. Dis.* **20**, 97 (1988).
- 8) Tauber, M. G., Zak, O., Scheld, W. M., Hengstler, B. and Sande, M. A. : The post-antibiotic effect in the treatment of experimental meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* in rabbits. *J. Infect. Dis.* **149**, 575 (1984).
- 9) Gudmunsson, A., Erlendsdottir, H., Gottfredsson, M. and Gudmunsson, S. : Impact of pH and cation supplement on *in vitro* postantibiotic effect. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **35**, 2617 (1991).
- 10) Fantin, B., Ebert, S., Leggett, J., Vogelmann, B. and Craig, W. A. : Factors affecting duration of *in vivo* postantibiotic effect for aminoglycosides against gram-negative bacilli. *J. Antimicrob. Chemother.* **27**, 829 (1990).
- 11) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Document M7-A3 : Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Villanova, Pa., (1993).
- 12) Craig, W. A. and Gudmundsson, S. : Postantibiotic effect, p.403-431. In V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*, 3rd ed. Baltimore, The Williams & Wilkins Co. (1991).
- 13) Oh, J. I., Paek, K. S., Kim, M. Y., Seo, M. K., Lee, Y. H., Hong, C. Y., Nam, D. H., Kim, Y. Z., Kim, I. C. and Kwak, J. H. : *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of LB20304, a new fluoronaphthyridone. In *Abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, CA, 1995*. Abstract F205, p. 148. American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1995).
- 14) Oh, J. I., Paek, K. S., Ahn, M. J., Kim, M. Y., Hong, C. Y., Kim, I. C. and Kwak, J. H. : *In vitro* and *in vivo* evaluations of LB20304, a new fluoronaphthyridone. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **40**, 1564 (1996).
- 15) Kim, M. Y., Oh, J. I., Paek, K. S., Hong, C. Y., Kim, I. C. and Kwak, J. H. : *In vitro* activities of LB20304, a new fluoroquinolone. *Arch. Pharm. Res.* **19**, 52 (1996).
- 16) Paek, K. S., Ahn, M. J., Kim, M. Y., Kim, I. C. and Kwak, J. H. : Factors affecting *in vitro* activity of LB20304, a new fluoroquinolone. *Arch. Pharm. Res.* **19**, 143 (1996).