

플루오로퀴놀론계 항생제인 DWP20373의 *in vitro* 항균작용

김지연* · 최문정 · 한승희 · 김병오 · 심점순 · 정연의 · 이재욱 · 유명효 · 박명환

(주) 대웅제약 중앙연구소

(Received February 15, 1996)

Evaluation of *in vitro* Antibacterial Activity of DWP20373, a Novel Fluoroquinolone

Ji Yeon Kim^{*}, Moon Jung Choi, Seung Hee Han, Byung O Kim, Jeom Soon Shim, Yeon Eui Jung, Jae Wook Lee, Young Hyo Yu and Myung Hwan Park
R & D Center, Daewoong Pharmaceutical Co., Ltd., Kyunggi 462-120, Korea

Abstract—The *in vitro* antibacterial activity of a novel fluoroquinolone, DWP20373(1-Cyclopropyl-6-fluoro-8-methoxy-7-(2,7-diazabicyclo[3.3.0]oct-4-ene-7-yl)-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid) was compared with those of ciprofloxacin (CPFX), sparfloxacin (SPFX) and ofloxacin (OFLX). DWP20373 was more active than SPFX and OFLX but was less potent than CPFX against gram-negative bacteria. DWP20373 showed an excellent activity against L-MRSA and H-MRSA (MIC₅₀=0.781~1.563 µg/ml). The activity of DWP20373 decreased moderately in the presence of 5 mM Mg²⁺. However, pH and serum had no effect on the activity of DWP20373. DWP20373 possessed a rapid bactericidal activity against gram-positive and gram-negative strains.

Keywords □ DWP20373, MIC, Killing curve, pH effect, Serum effect.

1960년대 초반에 nalidixic acid¹⁻²⁾가 항생제로 쓰이기 시작한 후, 1978년 Koga 등이 정량적 구조활성 상관관계 (QRSA)에 기초하여 norfloxacin을 개발하면서 모핵의 6번 위치에 불소 원자가 도입된 6-fluorinated quinolone의 장이 열렸으며, 그 후 enoxacin, perfloxacin, ciprofloxacin³⁻⁴⁾, temafloxacin, lomefloxacin, tosufloxacin, ofloxacin, levofloxacin, sparfloxacin, danofloxacin, CI-960, DU-6859⁵⁾ 등이 이미 시장에 나와 있거나 개발 중에 있다. 이외에도 1980년대 초 퀴놀론 기본구조에서 7번 위치에 piperazinyl 잔기⁶⁻⁷⁾를, 1번 위치에 새로운 잔기를 치환시켜 *P. aeruginosa*와 같이 약제내성이 있는 그람음성균 및 그람양성균에 대한 항균력이 크게 개선되고 광범위한 항균력을 지닌 퀴놀론⁸⁾이 중요한 항생

제로 부각되고 있다. 그러나, 퀴놀론의 임상에서의 이용이 증가함에 따라 퀴놀론에 대한 내성을 나타내는 균이 출현하게 되어 퀴놀론에 대한 균의 내성발현 기작 및 발현빈도에 따른 연구가 활발히 진행 중에 있으며, 항균력의 증강, 항균범위의 확대, 독성의 감소, 대사 안정화 등의 약학적 특성을 달성하기 위하여 많은 유도체가 합성되고 있다. 퀴놀론은 전통적인 항생제인 penicillins, cephalosporins, aminoglycosides, tetracyclines 등과는 다른 작용 기전을 가지고 있는데, 퀴놀론은 염색체성 DNA supercoiling의 촉매작용을 하는 필수효소인 DNA gyrase를 억제하여 급속히 세균의 DNA 복제와 전사를 방해하므로 세포를 용해시킨다. 그러므로, 본 실험에서는 기존 퀴놀론계 항생제의 그람음성균에 대한 활성을 유지하면서 그람양성균, 특히 MRSA에 항균력이 우수한 항생제를 합성하고자 하였다. 이러한 목적으로 퀴놀론 카르복실산 모핵의 6번 위치에 불소를 도입하여 DNA gyrase의

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

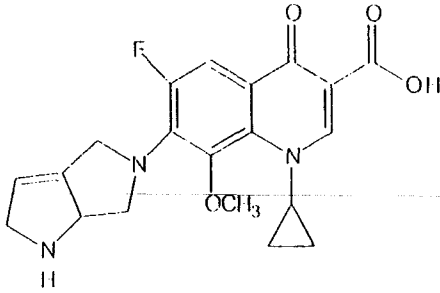


Fig. 1— Chemical structure of DWP20373.

저해를 감소시키고 *in vitro* 항균력을 증가시켰으며, 퀴놀론의 입체효과와 전자효과, 약제의 물리화학적 특성을 결정하는 7번 위치에 2,7-디아자비 시클로[3,3,0]옥트-4-엔-7-일기를, 8번 위치에 메톡시기를 도입하여 광선조사에 안정성을 증가시킨 DWP20373 (fig. 1)을 합성하여 그 *in vitro* 항균력 평가 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

시험균주

1차 평가균주 28균주와 ofloxacin 내성균주(37균주) 및 임상에서 분리한 *Staphylococcus aureus*(28균주), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA, 48균주), *Pseudomonas aeruginosa*(27균주), *Escherichia coli*(45균주), *Streptococcus pneumoniae*(6균주)를 사용하였다.

시험물집

DWP20373, 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)를 사용하였으며, Fleisch extract broth (FEB; beef extract 1%, peptone 1%, NaCl 0.3%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, pH 7.4~7.5)를 액체배지로 사용하였다. *Streptococcus* sp.는 MHA나 FEB에 5% defibrinated sheep blood를 첨가하여 배양하였다.

최소발육 저지농도(MIC)의 측정

최소발육 저지농도 (Minimum inhibitory concentration: MIC)는 일본화학요법학회 표준법⁹⁾(일본화학요법학회, 1975)에 준하여 한천평판 회석법으로 측정하였다. 최고농도 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 최저농도 0.002 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 2단계씩 회석한 항생물질을 함유한 MHA 한천배지에 FEB에서 37°C에서 18시간 동안 전배양한 균액을 10⁷ cfu/ml이 되도록 회석한 균회석액을 자동점종기 (MIC-2000 system, Dynatech)를 이용하여 점종하고(최종농도 10⁴ cfu/ml) 37°C에서 18시간 동안 배양한 후, 균의 생장을 관찰할 수 없는 최소농도를 최소발육 저지농도(MIC)를 측정하였다.

삼균작용

MHB에서 37°C에서 18시간 동안 전배양한 *S. aureus* Smith, *E. coli* TEM, *P. aeruginosa* E-2 균액을 10⁻¹ 회석하여 MHB 9 ml에 100 μl 씩 점종하여 37°C에서 1시간 동안 진탕배양한 후, 1/4 MIC, 1/2 MIC, MIC, 2MIC, 4MIC 농도의 DWP20373을 1 ml씩 각각 첨가하여 37°C에서 진탕배양하면서 약제 작용 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 24시간에 생균수를 측정하였다.

금속이온이 항균력에 미치는 효과

시험균주를 37°C에서 18시간 동안 전배양한 후 DWP20373이 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 0.002 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 2단계씩 회석하여 첨가한 MHA 평판배지에 CaCl_2 와 MgSO_4 의 최종농도가 각각 5 mM이 되도록 첨가하여 10⁷ cfu/ml로 회석한 균회석액을 점종한 다음 37°C에서 18시간 동안 배양한 후 각 균주의 MIC를 측정하였다.

배지 pH가 항균력에 미치는 효과

시험균주를 37°C에서 18시간 동안 전배양한 후 DWP20373이 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 0.002 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 2단계씩 회석하여 첨가한 MHA 평판배지의 pH를 1 N NaOH와 1 N HCl을 사용하여 각각 pH6, pH7, pH8로 조정된 후 10⁷ cfu/ml로 회석한 균회석액을 점종한 다음 37°C에서 18시간 동안 배양한 후 각 균주의 MIC를 측정하였다.

균점종량이 항균력에 미치는 효과

시험균주를 37°C에서 18시간 전배양한 후 DWP20373이 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 0.002 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 2단계씩

Table I—Antibacterial activities of DWP20373, ciprofloxacin, sparfloxacin and ofloxacin against standard strains used for primary screening

Strains ¹⁾	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	DWP20373	Ciprofloxacin	Sparfloxacin	Ofloxacin
<i>S. pyogenes</i> A77	0.049	0.391	0.195	0.781
<i>E. faecium</i> MD8b	0.098	0.391	0.391	0.781
<i>S. pneumoniae</i> type I	0.049	0.195	0.098	0.781
<i>S. pneumoniae</i> type II	0.098	0.391	0.195	0.781
<i>S. aureus</i> SG511	0.049	0.098	0.049	0.195
<i>S. aureus</i> FDA209P	0.013	0.098	0.025	0.098
<i>S. aureus</i> Smith	0.007	0.098	0.013	0.098
<i>S. aureus</i> C2379 (L-MRSA) ³⁾	0.025	0.195	0.025	0.195
<i>S. aureus</i> C5740 (H-MRSA) ⁴⁾	0.049	0.391	0.049	0.195
<i>E. coli</i> DC0	0.391	0.098	0.195	0.391
<i>E. coli</i> DC2	0.098	0.098	0.025	0.391
<i>E. coli</i> TEM	0.049	0.007	0.007	0.025
<i>C. freundii</i> ATCC6750	0.391	0.049	0.391	0.195
<i>K. pneumoniae</i> NCTC9632	0.049	0.007	0.013	0.025
<i>S. marcescens</i> 421-094 (OR) ²⁾	1.563	3.125	1.563	3.125
<i>S. marcescens</i> IFO12648	0.195	0.049	0.195	0.195
<i>P. aeruginosa</i> 9027	1.563	0.195	0.781	0.781
<i>P. aeruginosa</i> 1592E	0.781	0.098	0.781	0.781
<i>P. aeruginosa</i> 1771	0.781	0.098	0.391	0.781
<i>P. aeruginosa</i> 1771 m	0.391	0.049	0.195	0.098
<i>P. aeruginosa</i> E-2	0.781	0.195	0.781	0.781
<i>P. aeruginosa</i> C-1198	1.563	0.195	0.781	1.563
<i>P. aeruginosa</i> 101-181 (OR)	25	6.25	25	12.5
<i>E. cloacae</i> P99	0.007	0.007	0.007	0.025
<i>E. cloacae</i> 1321E	0.007	0.004	0.004	0.025
<i>K. oxytoca</i> 1082E	0.004	0.002	0.002	0.007
<i>K. aerogenes</i> 1522E	0.049	0.013	0.025	0.049
<i>P. vulgaris</i> GN76	0.049	0.013	0.049	0.049

1) Inoculum size : 10^7 cfu/ml

2) OR : Ofloxacin-resistant strains

3) L-MRSA : Low-methicillin resistant *S. aureus* ($6.25 \mu\text{g/ml} \leq \text{MIC of L-MRSA} < 100 \mu\text{g/ml}$)

4) H-MRSA : high-methicillin resistant *S. aureus* ($\text{MIC of H-MRSA} \geq 100 \mu\text{g/ml}$)

회석하여 첨가한 MHA 평판배지에 10^5 cfu/ml, 10^6 cfu/ml, 10^7 cfu/ml, 10^8 cfu/ml로 각각 회석한 균회석액을 접종한 다음 37°C에서 18시간 동안 배양한 후 각 균주의 MIC를 측정하였다.

마혈청이 항균력에 미치는 효과

시험균주를 37°C에서 18시간 동안 전배양한 후 DWP20373이 $100 \mu\text{g/ml}$ 에서 $0.002 \mu\text{g/ml}$ 까지 2단 계씩 회석하여 첨가한 MHA 평판배지에 마혈청을 5%, 10%, 25%가 되도록 첨가하여 10^7 cfu/ml로 회석한 균회석액을 접종한 다음 37°C에서 18시간 동안 배양한 후 각 균주의 MIC를 측정하였다.

형태 변화 관찰

MHB에서 37°C에서 18시간 동안 전배양한 *S. aureus* Smith, *E. coli* TEM, *P. aeruginosa* E-2 균액을

10^{-1} 회석하여 MHB 9 ml에 $100 \mu\text{l}$ 씩 접종하여 37°C에서 1시간 동안 진탕배양한 후, $\frac{1}{4}$ MIC, $\frac{1}{2}$ MIC, MIC, 2MIC, 4MIC 농도의 DWP20373을 1 ml 씩 각각 첨가하고 37°C에서 진탕배양하면서 약제 작용 2시간에 균액을 slide glass 위에 떨어뜨려 자연 건조시킨 후, 열고정하여 crystal violet 염색액으로 30초 염색하여 광학현미경 (1,000 배율)으로 균의 형태를 관찰하였다.

결과 및 고찰

1차 항균력 평가균주에 대한 항균력

DWP20373의 1차 항균력 평가 균주에 대한 항균력을 CPF, SPFX, OFLX과 비교한 결과를 Table I에 나타내었으며, 그람양성균과 그람음성균에 대해서 광범위한 항균력을 가진 것으로 나타났다. 특히, DWP

Table II— *In vitro* antibacterial activities of DWP20373, ciprofloxacin, sparfloxacin and ofloxacin against clinical isolates

Strains ¹⁾ (NO. of strains)	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range
Methicillin-susceptible <i>S. aureus</i> ²⁾ (28)	DWP20373	0.025	0.049	0.013~0.781
	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
Low methicillin-resistant <i>S. aureus</i> ³⁾ (12)	DWP20373	0.025	0.781	0.007~0.781
	Ciprofloxacin	0.391	12.5	0.195~50
	Sparfloxacin	0.049	3.125	0.013~6.25
	Ofloxacin	0.391	6.25	0.049~6.25
High methicillin-resistant <i>S. aureus</i> ⁴⁾ (36)	DWP20373	0.049	1.563	0.013~1.563
	Ciprofloxacin	0.781	100	0.195~100
	Sparfloxacin	0.098	6.25	0.025~12.5
	Ofloxacin	0.781	12.5	0.195~25
OFLX-resistant strains (37)	DWP20373	1.563	25	0.195~25
	Ciprofloxacin	6.25	100	0.391~>100
	Sparfloxacin	6.25	25	0.098~25
	Ofloxacin	6.25	50	0.391~50
<i>S. pneumoniae</i> (6)	DWP20373	0.195	0.195	0.098~0.195
	Ciprofloxacin	0.781	1.563	0.391~1.563
<i>P. aeruginosa</i> (27)	DWP20373	3.125	50	0.781~100
	Ciprofloxacin	0.781	50	0.195~50
	Sparfloxacin	3.125	100	0.391~>100
	Ofloxacin	6.25	100	0.781~100
<i>E. coli</i> (45)	DWP20373	0.049	12.5	0.013~25
	Ciprofloxacin	0.025	6.25	0.013~6.25
	Sparfloxacin	0.025	12.5	0.004~25
	Ofloxacin	0.049	12.5	0.004~25

1) Inoculum size : 10^7 cfu/ml2) MIC of MSSA ≤ 3.125 $\mu\text{g/ml}$ 3) 6.25 $\mu\text{g/ml} \leq$ MIC of L-MRSA < 100 $\mu\text{g/ml}$ 4) MIC of H-MRSA ≥ 100 $\mu\text{g/ml}$

20373은 그람양성균에 대해 0.007~0.098 $\mu\text{g/ml}$ 로 CPFX보다는 2~16배, SPFX보다 2~4배, OFLX보다 4~16배까지 우수한 항균력을 보였다. 한편 그람음성균 중 *E. coli*, *Enterobacter* sp., *Serratia* sp. 등 각종 세균에 대하여 CPFX보다 2~8배 항균력이 떨어졌으나 SPFX와 OFLX에 대해서는 유사하거나 2~8배 우수한 항균력을 보였다. *P. aeruginosa*에 대한 DWP 20373의 항균력 범위는 0.391~25 $\mu\text{g/ml}$ 로 SPFX와 OFLX와는 유사하거나 2~4배 떨어지는 항균력을 보였으며 CPFX보다 4~8배까지 항균력이 떨어졌다.

내성균주 및 임상분리균주에 대한 항균력

Methicillin과 ofloxacin 내성균주에 대한 DWP 20373의 MIC₅₀, MIC₉₀을 Table II에 나타내었다. DWP20373의 MRSA 균주에 대한 항균력은 L-

MRSA와 H-MRSA의 경우 0.007~0.781 $\mu\text{g/ml}$, 0.013~1.563 $\mu\text{g/ml}$ 로서 CPFX (0.195~50 $\mu\text{g/ml}$, 0.195~100 $\mu\text{g/ml}$), SPFX (0.013~6.25 $\mu\text{g/ml}$, 0.025~12.5 $\mu\text{g/ml}$), OFLX (0.049~6.25 $\mu\text{g/ml}$, 0.195~25 $\mu\text{g/ml}$)보다 월등히 우수한 항균력을 나타내었다. 또한, DWP20373의 OFLX 내성균주인 *S. aureus*(9균주), *S. epidermidis*(4균주), *P. aeruginosa*(10균주), *Serratia* sp.(6균주), *Klebsiella* sp.(2균주) 및 *Enterococcus* sp.(3균주) 등에 대한 감수성 분포에서, *S. aureus*에 대한 DWP20373의 MIC₉₀은 1.563 $\mu\text{g/ml}$ 로 CPFX보다 16배(25 $\mu\text{g/ml}$), SPFX보다 8배, OFLX보다 16배 우수하였으며, *S. epidermidis*에 대한 DWP20373의 MIC₉₀은 1.563 $\mu\text{g/ml}$ 로 CPFX보다 128배, SPFX보다 8배, OFLX보다 32배 우수하였다. 한편, *P. aeruginosa*와 *Serratia* sp.에 대해서는

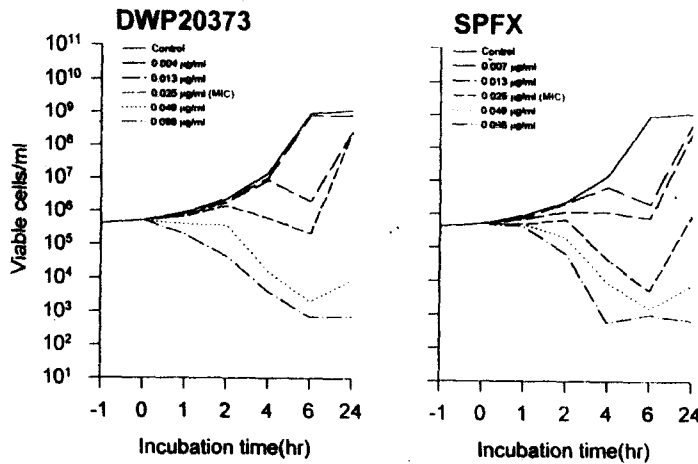


Fig. 2 — Effect of DWP20373 and sparfloxacin on viability of *S. aureus* Smith.

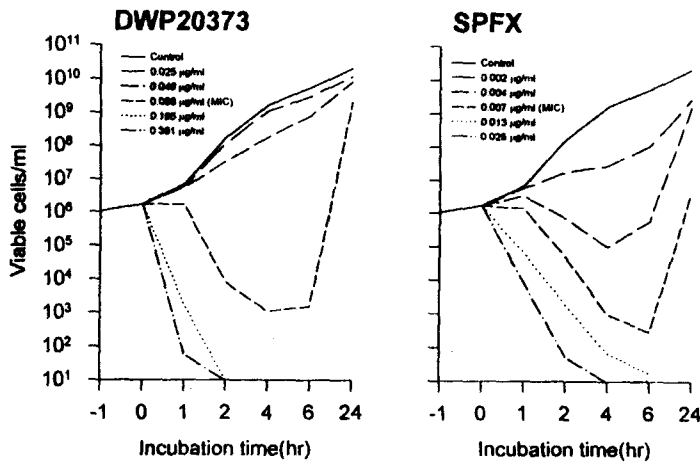


Fig. 3 — Effect of DWP20373 and sparfloxacin on viability of *E. coli* TEM.

DWP20373과 SPFX, OFLX의 MIC₉₀이 유사하였으나, CPFX보다는 2배 항균력이 감소하는 것으로 나타났다. 한편, 임상에서 분리한 *S. pneumoniae* sp.(6 균주)는 0.098~0.195 µg/ml의 항균력을 보였으며, CPFX보다 2~8배 우수한 효과를 나타내었다. *P. aeruginosa* 임상분리균주(27균주)와 *E. coli* 임상분리균주(45 균주)에 대한 DWP20373의 항균력 범위는 0.781~100 µg/ml, 0.013~25 µg/ml로 대조약물과 동등하거나 다소 떨어지는 항균력을 보였다.

살균작용

S. aureus Smith, *E. coli* TEM, *P. aeruginosa* E-2를 사용하여 증식곡선에 대한 DWP20373의 살균효과를

조사하였다(Fig. 2-4). DWP20373의 *S. aureus* Smith에 대한 살균작용은 약제 투여 60분부터 2×MIC (0.013 µg/ml) 농도 이상에서 살균작용이 관찰되었으나, 24시간 후에는 균의 재성장이 확인되었고, SPFX 역시 1×MIC (0.013 µg/ml) 농도 이상에서 살균작용을 보이다가 24시간 후에 균의 재성장이 관찰되었다. *E. coli* TEM에 대한 DWP20373의 살균작용은 0.098 µg/ml 이하 농도에서 발견하지 못했으나 2MIC (0.098 g/ml)에서 완전히 살균되었으며, SPFX도 유사한 양상을 보였다. *P. aeruginosa* E-2에 대한 살균작용은 약제농도가 3.125 µg/ml 이상에서 살균작용을 보이다가 24시간 후에 균이 재성장하였으며, SPFX의 경우 초기 초기 접종농도 수준으로 균 성장을

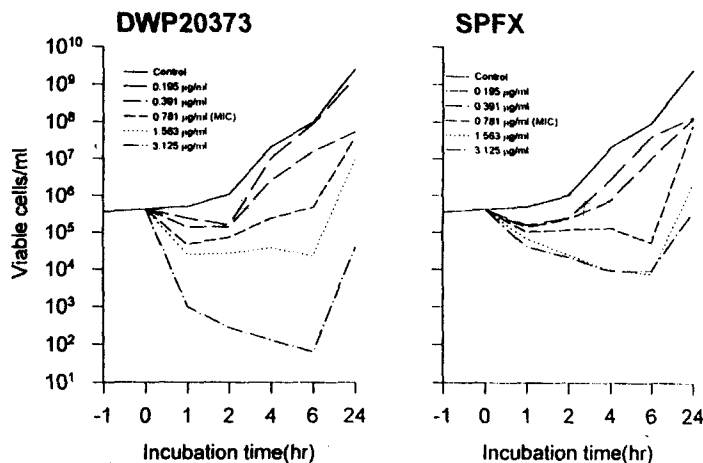


Fig. 4 — Effect of DWP20373 and sparfloxacin on viability of *P. aeruginosa* E-2.

Table III — Effect metal ions on antibacterial activities of DWP20373, ciprofloxacin and sparfloxacin

Strains ¹⁾	MiC ($\mu\text{g/ml}$)			
	Antibiotics	CaCl ₂	MgSO ₄	Control
<i>E. faecium</i> MD8b	DWP20373	0.098	0.391	0.098
	Ciprofloxacin	0.391	1.563	0.391
	Sparfloxacin	0.391	1.563	0.391
<i>S. pneumoniae</i> type I	DWP20373	0.049	0.195	0.049
	Ciprofloxacin	0.391	0.781	0.195
	Sparfloxacin	0.195	0.195	0.195
<i>S. pneumoniae</i> type II	DWP20373	0.098	0.391	0.098
	Ciprofloxacin	0.391	1.563	0.391
	Sparfloxacin	0.195	0.391	0.195
<i>S. aureus</i> Smith	DWP20373	0.013	0.025	0.007
	Ciprofloxacin	0.098	0.195	0.098
	Sparfloxacin	0.049	0.098	0.049
<i>S. aureus</i> C2379 (L-MRSA)	DWP20373	0.025	0.098	0.025
	Ciprofloxacin	0.391	0.391	0.195
	Sparfloxacin	0.040	0.098	0.049
<i>S. aureus</i> C5740 (H-MRSA)	DWP20373	0.049	0.098	0.025
	Ciprofloxacin	0.391	0.781	0.195
	Sparfloxacin	0.049	0.098	0.049
<i>E. coli</i> DC0	DWP20373	1.563	0.781	0.195
	Ciprofloxacin	0.195	0.195	0.195
	Sparfloxacin	0.391	0.391	0.195
<i>E. coli</i> TEM	DWP20373	0.049	0.098	0.025
	Ciprofloxacin	0.013	0.025	0.013
	Sparfloxacin	0.013	0.025	0.013
<i>K. pneumoniae</i> NCTC9632	DWP20373	0.049	0.098	0.025
	Ciprofloxacin	0.013	0.025	0.007
	Sparfloxacin	0.025	0.025	0.013
<i>P. aeruginosa</i> 1771	DWP20373	1.563	1.563	0.391
	Ciprofloxacin	0.195	0.391	0.098
	Sparfloxacin	0.781	1.563	0.195
<i>P. aeruginosa</i> 1771 m	DWP20373	0.195	0.195	0.098
	Ciprofloxacin	0.025	0.025	0.025
	Sparfloxacin	0.195	0.098	0.049

Table III—Continued

Strains ¹⁾	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	Antibiotics	CaCl ₂	MgSO ₄	Control
<i>P. aeruginosa</i> E-2	DWP20373	1.563	1.563	0.391
	Ciprofloxacin	0.195	0.391	0.098
	Sparfloxacin	0.781	1.563	0.391
<i>P. aeruginosa</i> 101-181 (OR) ²⁾	DWP20373	12.5	50	12.5
	Ciprofloxacin	5.25	12.5	3.125
	Sparfloxacin	25	50	12.5
<i>E. cloacae</i> P99	DWP20373	0.025	0.049	0.004
	Ciprofloxacin	0.013	0.025	0.007
	Sparfloxacin	0.025	0.025	0.007
<i>E. cloacae</i> 1321E	DWP2-373	0.013	0.025	0.013
	Ciprofloxacin	0.007	0.013	0.004
	Sparfloxacin	0.007	0.013	0.007
<i>K. oxytoca</i> 1082E	DWP20373	0.004	0.013	0.002
	Ciprofloxacin	0.002	0.007	0.002
	Sparfloxacin	0.002	0.007	0.002

1) Inoculum size : 10^7 cfu/ml

2) OR : Ofloxacin-resistant strains

Table IV—Effect of pH of antibacterial activities on DWP20373, ciprofloxacin and sparfloxacin.

Strains ¹⁾	MIC ($\mu\text{g/ml}$)								
	DWP20373			Ciprofloxacin			Sparfloxacin		
	pH6	pH7	pH8	pH6	pH7	pH8	pH6	pH7	pH8
<i>S. pneumoniae</i> typeI	0.195	0.195	0.195	0.781	0.391	0.781	0.195	0.195	0.391
<i>S. aureus</i> C2379	0.025	0.049	0.049	0.391	0.391	0.391	0.049	0.098	0.098
<i>E. coli</i> TEM	0.195	0.098	0.049	0.049	0.013	0.004	0.025	0.013	0.098
<i>P. aeruginosa</i> 1771 m	0.098	0.195	0.098	0.049	0.025	0.013	0.049	0.025	0.049
<i>P. aeruginosa</i> E-2	0.781	0.391	0.391	0.195	0.098	0.049	0.195	0.195	0.391

1) Inoculum size : 10^7 cfu/ml

유지하는 정균작용을 보였다.

금속이온이 항균력에 미치는 효과

DWP20373, CPF, SPFX 모두 그람양성균에 대하여 CaCl₂에 의한 항균력의 변화는 나타나지 않았으며, MgSO₄는 2~4배 항균력을 감소시켰다. 그람음성균에 대해 CaCl₂는 2~8배까지 항균력의 감소를 야기시켰으며, MgSO₄는 2~8배의 항균력 감소를 나타내었다(Table III).

배지 pH가 항균력에 미치는 효과

DWP20373의 배지 pH에 따른 항균력 변화를 Table IV에 나타내었다. DWP20373과 SPFX는 pH 6~8 사이에서 항균력 변화가 거의 없었으며, CPF는 *E. coli* TEM, *P. aeruginosa*에서 pH가 증가할수록 항

균력이 4배 이상 우수한 것으로 나타났다.

균 접종량이 항균력에 미치는 효과

그람양성균 중에서 MRSA와 *S. aureus* Smith는 비교적 균 접종량에 의한 항균력 변화가 적었으며, *S. pneumoniae* typeI과 *E. faecium* MD8b는 균 접종량 변화에 따라 DWP20373은 64배, CPF는 128~256배, SPFX는 64~128배까지 항균력의 차이를 나타내었다. 한편, 그람음성균에서는 균 접종량이 항균력에 별다른 영향을 주지 않는 것으로 조사되었으나, *P. aeruginosa* E-2만은 균 접종량에 따라 DWP20373은 4~512배, CPF는 4~48배, SPFX는 16~128배의 항균력 차이를 보였다(Table V-1, V-2).

마찰청이 항균력에 미치는 효과

Table V-1— Effect of inoculum size of antibacterial activities on DWP20373, ciprofloxacin and sparfloxacin against gram positive bacteria

Stradins	Inoculum size (cfu/ml)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		DWP20373	Ciprofloxacin	Sparfloxacin
<i>E. faecium</i> MD8b	10^5	0.004	0.002	0.004
	10^6	0.098	0.391	0.195
	10^7	0.098	0.391	0.391
	10^8	0.195	0.781	0.391
<i>S. pneumoniae</i> type II	10^5	0.002	0.002	0.002
	10^6	0.098	0.391	0.098
	10^7	0.098	0.391	0.195
	10^8	0.098	0.391	0.195
<i>S. aureus</i> Smith	10^5	0.004	0.049	0.007
	10^6	0.004	0.098	0.013
	10^7	0.004	0.098	0.013
	10^8	0.004	0.098	0.025
<i>S. aureus</i> C2379 (L-MRSA)	10^5	0.007	0.195	0.013
	10^6	0.025	0.195	0.025
	10^7	0.025	0.195	0.025
	10^8	0.049	0.195	0.049
<i>S. aureus</i> C5740 (H-MRSA)	10^5	0.025	0.195	0.007
	10^6	0.025	0.195	0.025
	10^7	0.049	0.391	0.049
	10^8	0.049	0.391	0.049

Table V-2— Effect of inoculum size of antibacterial activities on DWP20373, ciprofloxacin and sparfloxacin against gram-negative bacteria

Strains	Inoculum size (cfu/ml)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		DWP20373	Ciprofloxacin	Sparfloxacin
<i>E. coli</i> DC0	10^5	0.391	0.098	0.195
	10^6	0.391	0.098	0.195
	10^7	0.391	0.098	0.195
	10^8	0.781	0.195	0.195
<i>E. coli</i> TEM	10^5	0.049	0.007	0.007
	10^6	0.049	0.007	0.007
	10^7	0.049	0.007	0.007
	10^8	0.049	0.007	0.007
<i>K. pneumoniae</i> NCTC9632	10^5	0.049	0.007	0.007
	10^6	0.049	0.007	0.007
	10^7	0.049	0.007	0.013
	10^8	0.049	0.013	0.013
<i>K. oxytoca</i> 1082E	10^5	0.002	0.002	0.002
	10^6	0.004	0.002	0.002
	10^7	0.004	0.002	0.002
	10^8	0.004	0.002	0.002
<i>P. aeruginosa</i> 1771 m	10^5	0.007	0.004	0.004
	10^6	0.098	0.013	0.025
	10^7	0.391	0.049	0.195
	10^8	1.563	0.391	0.781
<i>P. aeruginosa</i> E-2	10^5	0.002	0.004	0.002
	10^6	0.781	0.098	0.391
	10^7	0.781	0.195	0.781
	10^8	1.563	0.195	0.781

Table V-2 — Continued

Strains	Inoculum size (cfu/ml)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		DWP20373	Ciprofloxacin	Sparfloxacin
<i>P. aeruginosa</i> 101-181 (OR) ¹⁾	10 ⁵	6.25	1.563	1.563
	10 ⁶	12.5	3.125	12.5
	10 ⁷	25	6.25	25
	10 ⁸	25	6.25	25

1) OR : Ofloxacin-resistant strains

Table VI — Effect of horse serum on antibacterial activities of DWP20373, ciprofloxacin and sparfloxacin

Strains ¹⁾	MIC ($\mu\text{g/ml}$)											
	DWP20373				Ciprofloxacin				Sparfloxacin			
	0%	5%	10%	25%	0%	5%	10%	25%	0%	5%	10%	25%
<i>E. faecium</i> MD8b	0.195	0.195	0.195	0.195	0.781	0.781	0.781	0.781	0.781	0.781	0.781	0.391
<i>S. pneumoniae</i> type I	0.098	0.098	0.098	0.098	0.195	0.391	0.195	0.195	0.195	0.098	0.195	0.098
<i>S. pneumoniae</i> type II	0.195	0.195	0.195	0.195	0.781	1.563	0.781	0.781	0.391	0.391	0.781	0.195
<i>S. aureus</i> Smith	0.013	0.013	0.013	0.013	0.098	0.049	0.098	0.098	0.025	0.013	0.025	0.025
<i>S. aureus</i> C2379 (L-MRSA)	0.049	0.049	0.049	0.049	0.391	0.391	0.391	0.391	0.049	0.049	0.098	0.049
<i>S. aureus</i> C5740 (H-MRSA)	0.049	0.049	0.049	0.049	0.391	0.391	0.391	0.391	0.049	0.049	0.098	0.049
<i>E. coli</i> DC0	0.391	0.391	0.391	0.391	0.195	0.195	0.195	0.195	0.391	0.391	0.195	0.195
<i>E. coli</i> TEM	0.049	0.049	0.049	0.049	0.013	0.025	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.007
<i>S. marcescens</i> 421-094 (OR)	0.781	0.781	0.781	0.781	0.781	0.781	0.781	0.781	3.125	1.563	1.563	0.781
<i>P. aeruginosa</i> 1771	0.781	0.781	0.781	0.781	0.195	0.098	0.195	0.195	0.781	0.781	0.391	0.391
<i>P. aeruginosa</i> E-2	0.781	0.781	0.781	0.781	0.195	0.195	0.195	0.195	0.781	0.781	0.391	0.391
<i>P. aeruginosa</i> 101-181 (OR)	12.5	12.5	12.5	12.5	3.125	3.125	3.125	3.125	12.5	12.5	12.5	12.5
<i>E. cloacae</i> P99	0.025	0.025	0.025	0.049	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013
<i>E. cloacae</i> 1321E	0.025	0.025	0.025	0.049	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.007	0.007	0.007
<i>K. oxytoca</i> 1082E	0.007	0.004	0.007	0.007	0.004	0.004	0.004	0.004	0.002	0.002	0.002	0.002

1) Inoculum size : 10⁷ cfu/ml

5%, 10%, 25% 마혈청을 넣은 배지에서 DWP 20373과 CPFX의 항균력에는 거의 변화가 없었으나, SPFX는 25% 마혈청을 넣은 배지 상에서 2배 정도 높은 항균력을 보였다(Table VI).

형태 변화 관찰

S. aureus Smith에 대한 형태 관찰은 Fig. 5에 나타내었다. DWP20373의 MIC (0.007 $\mu\text{g/ml}$) 이상의 농도에서 세포의 신장을 관찰할 수 있었다. 또한, *E. coli* TEM 배양액에 DWP20373을 처리하여 현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 6에 나타내었으며, DWP20373의 MIC (0.049 $\mu\text{g/ml}$) 이상의 농도에서 filament 형상으로 관찰되었다. *P. aeruginosa* E-2는 세포의 모양이 filament 형상으로 변화하였으며 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다.

결론

1차 항균력 평가 결과 그람양성균에 대한 DWP 20373의 MIC는 0.098 $\mu\text{g/ml}$ 이하로 나타나 0.391 $\mu\text{g/ml}$ 이하인 CPFX과 SPFX보다, 0.781 $\mu\text{g/ml}$ 이하인 OFLX보다 우수하였다. 특히 *S. aureus*에 대해 DWP20373의 MIC는 0.049 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도로서 CPFX의 0.391 $\mu\text{g/ml}$, OFLX의 0.195 $\mu\text{g/ml}$ 에 비하여 월등한 저해효과를 관찰할 수 있었다. 한편, 그람음성균에 대해서는 DWP20373의 MIC치가 SPFX과 OFLX과 유사하거나 2~8배 우수한 항균력을 보인 반면, CPFX에 비해서는 항균력이 떨어지는 것으로 나타났다. MRSA와 OFLX-내성균주에 대한 DWP 20373의 항균력은 CPFX, SPFX, OFLX보다는 항균력이 월등하게 우수하였으나, 그람음성균에 대해서는 CPFX보다는 항균력이 약간 떨어졌다. 임상분리 그람양성균에 대해서는 대조약물보다 우수한 항균력을 보였으나, 그람음성균인 *E. coli*와 *P. aeruginosa*에 대하여는 대조약물과 유사하거나 다소 떨어지는 항균력을 보였다. 중식곡선에 대한 DWP20373의 효과는 *S. aureus*

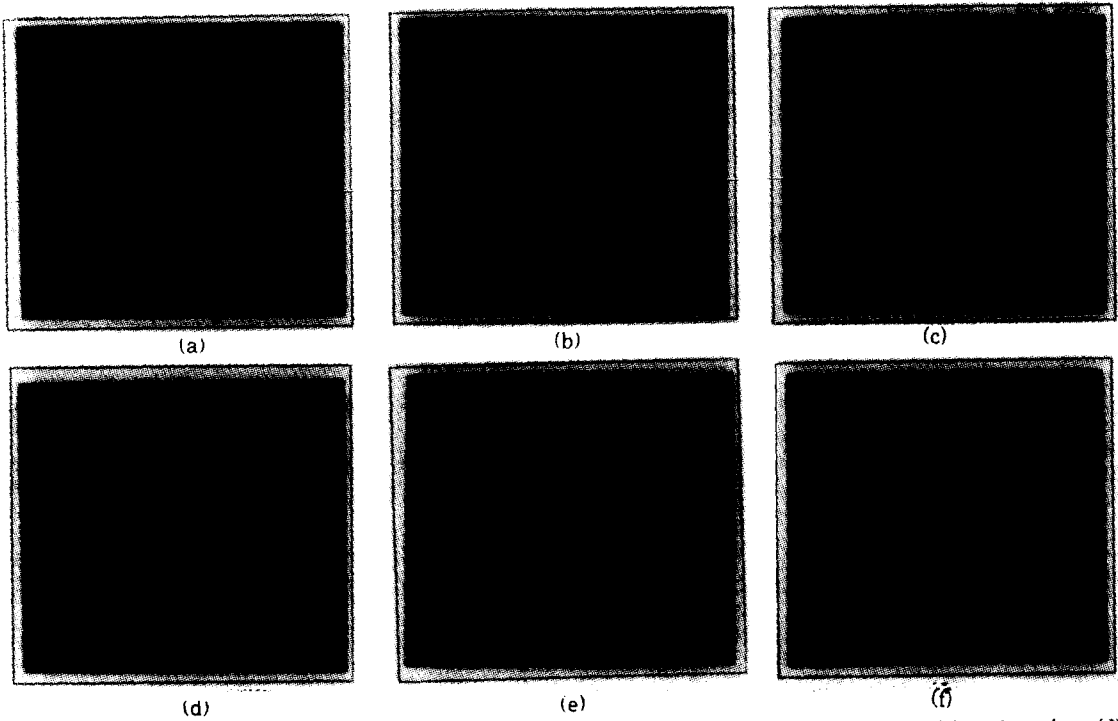


Fig. 5 — Microscopic observation of *S. aureus* Smith exposed to DWP20373 ($\times 1,000$) (a) control, (b) $0.004 \mu\text{g/ml}$, (d) $0.013 \mu\text{g/ml}$, (e) $0.025 \mu\text{g/ml}$ and (f) $0.049 \mu\text{g/ml}$.

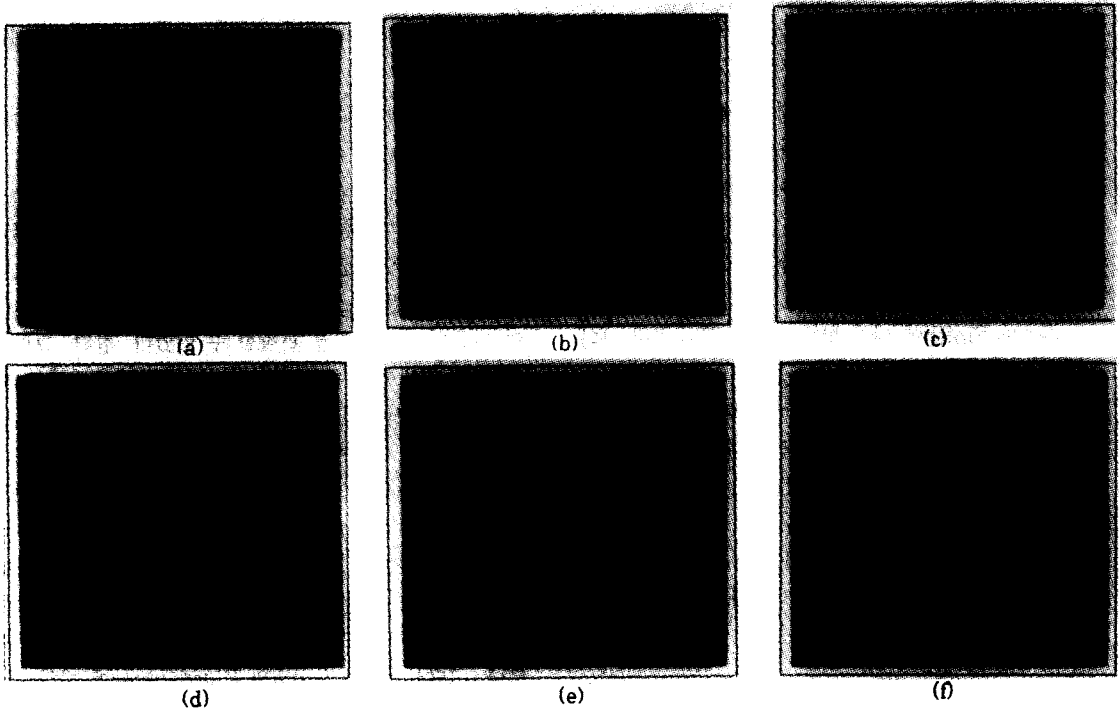


Fig. 6 — Microscopic observation of *E. coli* TEM exposed to DWP20373 ($\times 1,000$) (a) control, (b) $0.025 \mu\text{g/ml}$, (d) $0.098 \mu\text{g/ml}$, (e) $0.1195 \mu\text{g/ml}$ and (f) $0.391 \mu\text{g/ml}$.

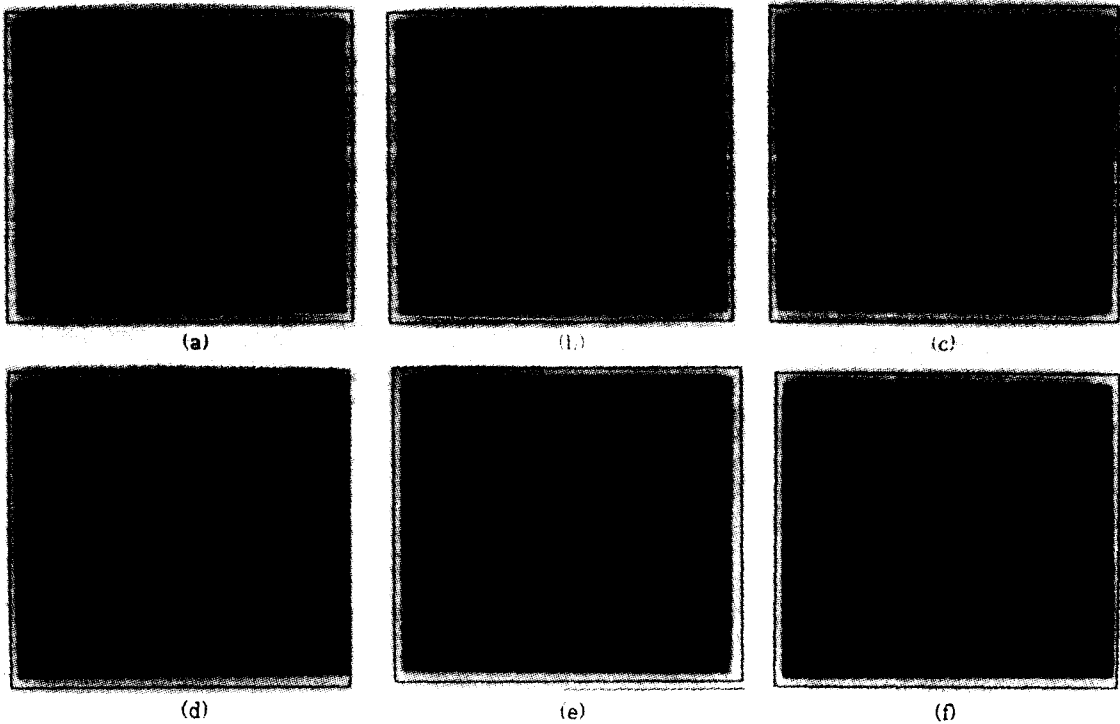


Fig. 7—Microscopic observation of *P. aeruginosa* E-2 exposed to DWP20373 ($\times 1,000$) (a) control, (b) 0.195 mg/ml, (c) 0.391 μ g/ml, (d) 0.781 μ g/ml, (e) 1.563 μ g/ml and (f) 3.125 μ g/ml.

Smith, *E. coli* TEM. *P. aeruginosa* E-2에 대해 MIC 이상의 약제농도에서 살균작용을 보이다가 24시간 후에 균이 재성장하는 경향을 보였다. DWP20373, CPFX, SPFX 모두 그람양성균에 대하여 CaCl_2 가 의한 항균력에 미치는 변화는 나타나지 않았으며, MgSO_4 는 2~4배 항균력을 감소시켰고, 그람음성균에 대해 CaCl_2 는 2~8배, MgSO_4 가 2~8배의 항균력 감소를 나타내었다. DWP20373과 SPFX는 배지 pH에 따라 pH 6~8 사이에서 항균력 변화가 거의 없었으며, CPFX는 *E. coli* TEM, *P. aeruginosa* sp.에서 pH가 증가할수록 항균력이 4배 이상 우수한 것으로 나타났다. 또한, 그람양성균 중에서 MRSA와 *S. aureus* Smith는 비교적 균 접종량에 의한 항균력 변화가 적었으며, *S. pneumoniae* type I과 *E. faecium* MD8b는 균 접종량 변화에 따라 DWP20373은 64배, CPFX는 128~256배, SPFX는 64~128배까지 항균력의 차이를 나타내었다. 한편, 그람음성균에서는 균 접종량이 항균력에 별다른 영향을 주지 않는 것으로 조사되었으나, *P. aeruginosa* E-2만은 균 접종량에 따라 DWP20373은 4~512배, CPFX는 4~48배, SPFX는 16~128배의 항균력 차이

를 보였다. 5%, 10%, 25% 마혈청을 넣은 배지에서 DWP20373과 CPFX의 항균력에는 거의 변화가 없었으나, SPFX는 25% 마혈청을 넣은 배지 상에서 2배 정도 높은 항균력을 보였다.

문 헌

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) Chin, N. and Neu, H. C. : Ciprofloxacin, a quinolone carboxylic acid compound active against aerobic and anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **25**, 319 (1991).
- 4) Burine, J. and Burine, R. : Ciprofloxacin. *Drugs*

- Future* **9**, 179 (1984).
- 5) Steven, A. M., Ronald, N. J., Partrick, R. M., John, A. W., Stephen, D. A., E. Hugh Gerlach and Meridith, E. Erwin. : *In vitro* comparison of DU-6859a, a novel fluoroquinolone, with other quinolones and oral cephalosporins tested against 5086 recent clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **32**, 877 (1993).
 - 6) Caekengergh, 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).
 - 7) 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).
 - 8) Sato, K., Matsura, Y., Inoue, M., Une, T., Osada, Y., Ogawa, H., and Mitsuhashi, S. *In vitro* activity of DL-8280, a new oxazine derivative. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**, 548 (1982).
 - 9) Japan Society of chemotherapy (日本化学療法学会) : 最小發育阻止濃度 (MIC) 測定法. *Chemotherapy* **23**, 1 (1975).