

## 카테콜 치환체를 가진 세파로스포린계 항생제 LB10522의 작용기전

김무용 · 오정인 · 백경숙 · 김인철 · 곽진환\*

LG화학 기술연구원 바이오텍연구소

(Received November 16, 1995)

### Action Mechanism of LB10522, a New Catechol-Substituted Cephalosporin

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

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

**Abstract**—LB10522 is a new parenteral broad spectrum cephalosporin with a catechol moiety at C-7 position of  $\beta$ -lactam ring. This compound can utilize *tonB*-dependent iron transport system in addition to porin proteins to enter bacterial periplasmic space and access to penicillin-binding proteins (PBPs) which are the lethal targets of  $\beta$ -lactam antibiotics. The chelating activity of LB10522 to metal iron was measured by spectrophotometrically scanning the absorbance from 200 to 900 nm. When  $FeCl_3$  was added, optical density was increased between 450 and 800 nm. LB10522 was more active against gram-negative strains in iron-depleted media than in iron-replete media. This is due to the increased expression of iron-transport channels in iron-depleted condition. LB10522 showed a similar activity against *E. coli* DC2 (permeability mutant) and *E. coli* DC0 (wild type strain) in both iron-depleted and iron-replete media, indicating a minimal permeability barrier for LB10522 uptake. LB10522 had high affinities to PBP 3 and PBP 1A, 1B of *E. coli*. By blocking these proteins, LB10522 caused inhibition of cell division and the eventual death of cells. This result was correlated well with the morphological changes in *E. coli* exposed to LB10522. Although the *in vitro* MIC of LB10522 against *P. aeruginosa* 1912E mutant (*tonB*) was 8-times higher than that of the *P. aeruginosa* 1912E parent strain, LB10522 showed a similar *in vivo* protection efficacy against both strains in the mouse systemic infection model. This result suggested that *tonB* mutant, which requires a high level of iron for normal growth, might have a difficulty in surviving in their host with an iron-limited environment.

**Keywords** □ Cephalosporin, Catechol, PBP (Penicillin Binding Protein), *tonB*, LB10522.

세파로스포린계 항생제는 광범위한 항균력과 우수한 인체내 안전성 때문에 호흡기감염, 요로감염 등 중증의 감염질환의 치료에 가장 많이 사용되고 있는 항생제이지만<sup>1)</sup>, 면역 기능이 저하된 환자에게 병원내 감염의 주원인이 되는 *Pseudomonas aeruginosa* (녹농균)에 대해서는 ceftazidime 이외에는 충분한 항균력을 갖지 못하고 있다.<sup>2), 3)</sup> 그러나 최근 내성균의 출현으로 이들 녹농균의 감염에 대해 ceftazidime의 치료 효과도 점차적으

로 나빠지고 있는 실정이다. 따라서 광범위한 항균작용과 함께 우수한 항녹농균 활성을 가진 새로운 항생제의 개발이 절실히 요청되고 있으며, 지금까지 *Pseudomonas*에 대한 항균력이 높은 베타락탐계 항생제를 개발하기 위해, 베타락탐 골격의 C-3나 C-7에 카테콜기를 도입하는 방법이 가장 많이 연구 되어 왔다.<sup>4-20)</sup> 베타락탐 구조에 카테콜기를 결합시킬 경우 이들 항생제는 세균의 *tonB*-dependent iron transport system에 의해 세포내로 능동수송이 될 수 있기 때문에<sup>21), 22)</sup>, 세포막의 구조가 복잡하고 porin 단백질의 크기가 작은 *Pseudomonas*와 같은 그람음성균에 대해서도 높은 항균

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 042-866-2105 (팩스) 042-862-0333

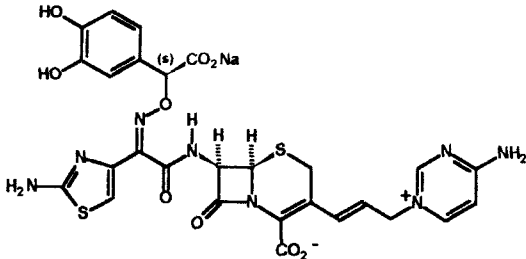


Fig. 1 - Chemical structure of LB10522.

력을 나타낼 수 있다.

미생물은 정상적인 성장을 위해서 최소한  $0.1 \mu\text{M}$  정도의 철 이온이 필요하며<sup>23)</sup>, 따라서 일반적으로 철 이온이 부족한 외부 환경으로부터 철 이온을 선택적으로 흡수하기 위해서 미생물은 철 이온과 강력한 킬레이트 화합물을 형성할 수 있는 siderophore라고 알려진 *tonB* 유전자 산물을 세포 밖으로 분비하게 된다.<sup>24)</sup> 이 물질은 세포 밖 주변의 철 이온과 결합하여 수용성 상태로 되어 세포막의 receptor 또는 channel (철 이온에 의해 조절되는 외막 단백질: 81-kDa FepA, ferric enterochelin; 80.5-FecA, ferric citrate; 78-kDa FhuA, ferrichrome; 76-kDa FhuE, coprogen and rhodotorulic acid)을 통해 능동수송으로 세포내로 재흡수됨에 따라, 미생물은 성장에 필요한 철 이온을 얻을 수 있게 된다.<sup>25)</sup> 유기화합물 중에서도 catechol류와 hydroxamate류 같은 물질도 미생물의 siderophore와 같은 역할을 할 수 있다는 것이 알려져 있다.<sup>26)</sup> 미생물의 siderophore 합성과 이용은 주변 철 이온의 농도와 *tonB* 유전자에 의해 조절 받는 것으로 알려져 있으며<sup>27)</sup>, 또 Watanabe 등과<sup>13)</sup> Curtis 등도<sup>21)</sup> 카테콜 치환체를 갖고 있는 세파로스포린 항생제의 *tonB* 의존성 세포내 투과는 *cir* 또는 *fiu*와 같은 철 이온의 존재에 의해 조절되는 외막 단백질의 발현과 관계가 있다는 것을 밝혔다.

LB10522는 본 연구소에서 새로이 합성된 주사제용 세파계 항생제로서, 베타락탐 구조의 7번 위치에 카테콜기를 가지고 있으며(Fig. 1), 녹농균과 다른 그람 음성균에 대한 탁월한 효과 뿐만 아니라, 다른 카테콜 치환 세파계 항생제와는 달리 그람양성균에 대해서도 우수한 항균력을 지니고 있고, *in vivo*에서의 높은 항균력과 개선된 약물동력학적 특성을 가진 화합물이다.<sup>28), 29)</sup>

본 연구에서는 신규 세파로스포린계 항생제인 LB10522의 *in vitro* 항균력과 그 작용기전에 관한 연구 결과를 보고하고자 한다.

## 실험방법

**시약 및 기기** - Mueller-Hinton agar와 broth 그리고 Penassay broth는 Difco사에서 구입하였으며, [phenyl-4(n)-<sup>3</sup>H]benzylpenicillin은 Amersham에서 En<sup>3</sup>Hance는 NEN/DuPont사에서 구입하였으며, mucin은 Wako pure chemical industry의 것을 구입하여 사용하였다. 최소발육저지농도(MIC) 측정용 기기로는 Dynatech사의 MIC-2000 plus를 사용하였고, 균 배양용으로는 Lab-line사의 진탕배양기, Napco사의 세균배양기, Baker사의 Clean bench 등을 사용하였다. 또한 UV spectrophotometer는 Shimadzu사의 것을, 전기영동 장치와 gel dryer는 Hoefer사의 것을 사용하였다.

**항균력 시험** - 항생물질의 최소발육저지농도(Minimal Inhibitory Concentration: MIC)는 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)의 방법에<sup>15)</sup> 준하여 한천희석법으로 실시하였다. 최고농도 128  $\mu\text{g/ml}$ 에서 최저농도 0.008  $\mu\text{g/ml}$ 까지 2배 계단 희석된 항생물질이 함유된 Mueller-Hinton 한천배지에 MIC-2000 plus multipin inoculator를 이용하여  $10^4$  CFU의 농도로 균을 접종하고, 35°C에서 18시간 배양한 후 균의 성장을 관찰할 수 없는 최소농도를 MIC로 결정하였다.

한편, LB10522의 시험관내 항균력에 미치는 철 이온의 영향을 조사하기 위해, 100  $\mu\text{M}$ 의  $\text{FeCl}_3$ 를 첨가한 Mueller-Hinton 한천배지와 철 이온과 킬레이트를 형성할 수 있는 물질인  $\alpha, \alpha'$ -dipyridyl을 첨가하여 철 이온을 고갈시킨 Mueller-Hinton 한천배지를 이용하여 상기의 방법으로 MIC를 측정하였다.

**Cytoplasmic membrane의 준비**<sup>30)</sup> - Penassay broth에서 late log phase까지 배양한 *E. coli* 3190Y 균액을 10,000 g에서 10분간 원심분리한 후, 얼음으로 냉각시킨 10 mM sodium phosphate 완충액 (pH 7.0)에 현탁시켰다. 세균 현탁액에 2-mercaptoethanol을 140 mM 되게 가하고 1분씩 3회 sonication한 후, 8,000 g에서 10 분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 상층액을 100,000 g로 40분간 원심분리하여 membrane을 얻어 phosphate 완충액에 현탁시킨 후, 다시 100,000 g에서 40분간 원심분리하여 세척하고 같은 완충액에 단백질 농도가 10 mg/ml이 되도록 현탁시켜 사용하였다.

**Penicillin-Binding Protein (PBP) Assay**<sup>31)</sup> - 100  $\mu\text{g}$

의 membrane 단백질을 여러농도의 약물과 37°C에서 10분간 반응 시킨 후, 6  $\mu$ l의 [phenyl-4(n)-<sup>3</sup>H]benzylpenicillin (12.4 Ci/mmol, Amersham)을 가하고 10분간 더 반응을 시켰다. Sarkosyl을 최종농도가 2%가 되게 가하여 반응을 종결하고, 40,000 g에서 원심분리하여 상등액만을 취하고 10% SDS-PAGE running gel에서 전기영동을 하였다. Gel을 En<sup>3</sup>Hance (NEN/DuPont)에 1시간, 물에 30분 담가두었다가 gel dryer를 이용하여 건조시킨 후 X-ray film에 2주간 노출시켰다.

**세균의 형태 변화**<sup>32)</sup> - MHB에서 18시간 배양한 *E. coli* 3190Y, *P. aeruginosa* 1912E, *S. aureus* giorgio 균주를 새 배지에 1/100 만큼 다시 접종하였다. 37°C에서 3시간 진탕배양한 후 LB10522를 MIC의 1/4배, 1배, 4배에 해당하는 농도가 되게 넣어주고 추가로 3시간 동안 배양하였다. LB10522에 의한 세균의 형태 변화를 광학 현미경을 이용하여 1000배의 배율로 관찰하였다.

**내성발현빈도** - MHB에서 18시간 배양한 *E. coli* 3190Y, *P. aeruginosa* 1912E, *S. aureus* giorgio를 새 배

지에 1/100 만큼 접종한 후, 37°C에서 계속 진탕배양하여 mid-log phase의 균을 얻었다. 각각 MIC의 1배, 2배, 4배, 8배의 농도가 되는 항생제가 들어있는 Mueller-Hinton한천배지에 균을 도말하여 35°C에서 48시간 배양한 후 나타난 colony를 세었으며, 한편 여러단계로 희석한 균을 항생제를 넣지 않은 배지에도 도말하여 자란 생균수로 부터 내성발현빈도를 계산하였다.

**전신 감염에 대한 치료효과** - 체중 19~21 g의 수컷 ICR계 생쥐 (LG화학 기술연구원)를 사용하였고, 감염 균주로는 *P. aeruginosa* 1912E wild-type 균주와 tonB에 돌연변이가 일어난 *P. aeruginosa* 1912E mutant를 사용하였다. 시험균주를 Tryptic Soy agar 배지에서 18시간 배양한 후, 균을 생리식염수로 희석한 다음 7.5%의 mucin액과 섞어 생쥐의 복강내에 투여하여 전신감염을 유도하였다. 감염 후 1시간과 4시간에 다양한 농도의 약물을 감염된 생쥐에게 주사하고 7 일간의 생존여부를 관찰하여 Probit 방법<sup>33)</sup>으로 50%의 생쥐를 치료하는데 필요한 농도 (ED<sub>50</sub>)를 산출하였다. 약물을 투여하지 않은 군의 생쥐는 감염 후 이틀 내에 모두 사망하였다.

**Table 1** — Comparative *in vitro* activity of LB10522 against standard strains

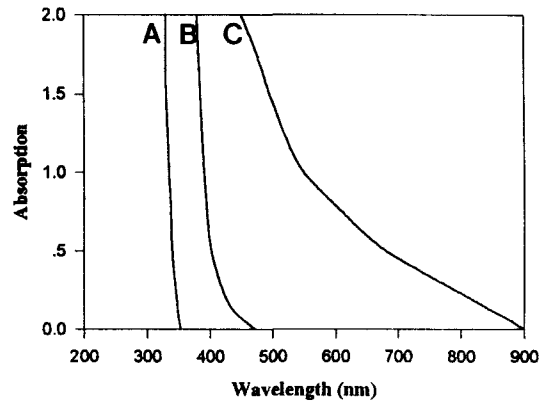
Strains	MIC( $\mu$ g/ml)				
	LB10522	Cefpirome	Cefazidime	Cefotaxine	Ceftriaxone
<i>S. aureus</i> 6538 p	0.5	1	16	4	8
<i>S. aureus</i> giorgio	0.5	0.25	4	1	2
<i>S. aureus</i> 77	4	2	32	8	32
<i>S. aureus</i> 241	64	64	>128	>128	>128
<i>S. epidermidis</i> 887 E	64	64	>128	>128	>128
<i>E. faecalis</i> 29212 A	4	32	>128	>128	>128
<i>E. coli</i> 10536	$\leq 0.008$	0.031	0.13	0.031	0.031
<i>E. coli</i> 3190 Y	0.063	0.016	0.063	$\leq 0.008$	0.016
<i>E. coli</i> 851 E	0.031	0.016	0.063	0.031	0.031
<i>E. coli</i> TEM1	1193 E	0.031	0.063	0.25	0.063
<i>E. coli</i> TEM3	3455 E	0.13	2	8	4
<i>E. coli</i> TEM5	3739 E	0.5	0.5	8	0.5
<i>E. coli</i> TEM7	3457 E	0.13	4	16	0.13
<i>E. coli</i> TEM9	2639 E	2	8	>128	2
<i>P. aeruginosa</i> 1912 E	0.5	4	1	32	128
<i>P. aeruginosa</i> 10145	0.25	4	2	32	16
<i>P. aeruginosa</i> 6065 Y	1	32	16	32	64
<i>A. calcoaceticus</i> 15473 A	1	2	2	64	16
<i>C. diversus</i> 2046 E	0.13	1	0.5	8	64
<i>E. cloacae</i> IND+VE	1194 E	4	2	128	32
<i>E. cloacae</i> P99	32	4	64	64	64
<i>K. aerogenes</i> SHV	11976 E	0.13	0.25	0.25	0.063
<i>K. aerogenes</i> K1+	1082 E	0.063	1	0.5	1
<i>P. vulgaris</i> 6059 A	0.063	0.063	0.063	0.031	$\leq 0.008$
<i>S. marcescens</i> 1826 E	0.25	0.063	0.25	1	0.5
<i>S. typhimurium</i> 14028 A	0.016	0.063	0.25	0.25	0.063

**결과 및 고찰**

**표준균주에 대한 항균력** - LB10522의 표준균주에 대한 항균력을 측정하여 cefpirome, ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone과 비교하여 본 결과(Table I), LB10522는 그람양성균과 그람음성균 모두에 대하여 대조약물에 비하여 높은 항균력을 지닌 것으로 나타났다. 그람양성균에 대한 LB10522의 약효는 cefpirome과는 유사하고 다른 대조약제보다는 우수한 것으로 관찰되었다. *Enterobacter cloacae*를 제외한 모든 그람음성의 표준균주에 대하여 LB10522의 MIC는 4 µg/ml 이하로 대조약물보다 항균력이 높은 것으로 나타났다. 특히 LB10522는 3세대 세파계 항생제를 분해하는 효소인 TEM-type 베타락타메이저를 생성하는 균주에 대하여 높은 항균력을 보였다. 또한 LB10522는 대부분의 세파계 항생제에 대해 내성이 있는 *P. aeruginosa*에 대하여서도 1 µg/ml 이하의 좋은 항균력을 보였다.

**LB10522의 항균력에 미치는 철 이온의 영향** - LB10522가 주변의 철 이온과 결합하여 *tonB*-dependent iron transport system에 의해 세포 내로 능동

수송되는지를 확인하기 위해, 먼저 LB10522가 시험관 내에서 철 이온과 킬레이트 화합물을 형성할 수 있는지를 살펴보았다. 0.5 mM 농도의 LB10522 수용액에 10 mM의 FeCl<sub>3</sub>을 가하였을 때, LB10522 용액이 청록색으로 변화였고 UV 흡수는 450 nm에서 800 nm 파장 범위에서 증가하였으나, MgCl<sub>2</sub>나 CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 용



**Fig. 2**—Chelating activity of LB10522 to Fe<sup>3+</sup>.  
Curves: A, LB10522 (0.5 mM); B, FeCl<sub>3</sub> (10 mM); C, LB10522 plus FeCl<sub>3</sub>.

**Table II**—Iron effects on antibacterial activities of LB10522 and cefpirome

Strains	MIC(µg/ml)			
	LB10522 + Dipyridyl <sup>a</sup>	LB10522 + FeCl <sub>3</sub> <sup>b</sup>	Cefpirome + Dipyridyl	Cefpirome + FeCl <sub>3</sub>
<i>S. aureus</i> 6538 p	0.5	0.5	1	2
<i>S. aureus</i> giorgio	0.5	0.25	0.5	0.5
<i>S. aureus</i> 77	2	1	1	2
<i>S. aureus</i> 241	16	64	64	64
<i>S. epidermidis</i> 887 E	16	64	64	64
<i>E. faecalis</i> 29212 A	8	8	16	32
<i>E. coli</i> 10536	0.016	0.13	0.031	0.031
<i>E. coli</i> 3190 Y	0.063	0.13	0.031	0.031
<i>E. coli</i> 851 E	0.063	0.13	0.031	0.031
<i>E. coli</i> TEM3 3455 E	0.25	2	2	2
<i>E. coli</i> TEM5 3739 E	0.5	2	0.5	0.5
<i>E. coli</i> TEM9 2639 E	0.5	0.5	4	4
<i>P. aeruginosa</i> 1912 E	1	64	8	8
<i>P. aeruginosa</i> 10145	1	64	8	8
<i>P. aeruginosa</i> 6065 Y	2	64	32	32
<i>A. calcoaceticus</i> 15473 A	1	64	4	4
<i>C. diversus</i> 2046 E	0.5	32	1	1
<i>E. cloacae</i> IND+VE 1194 E	4	64	1	1
<i>E. cloacae</i> P99	16	64	2	2
<i>K. aerogenes</i> SHV-1 1976 E	0.5	1	0.5	0.5
<i>K. aerogenes</i> K1+ 1082 E	0.5	32	2	2
<i>P. vulgaris</i> 6059 A	0.25	0.5	0.13	0.013
<i>S. marcescens</i> 1826 E	0.5	1	0.13	0.013
<i>S. typhimurium</i> 14028 A	0.063	0.25	0.13	0.013

<sup>a</sup> α, α'-Dipyridyl, 200 µM

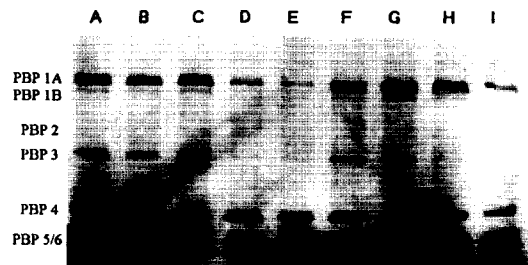
<sup>b</sup> FeCl<sub>3</sub>, 100 µM

액에서는 별 다른 변화가 없었다. 이 결과는 LB 10522가 철 이온과 선택적으로 결합하여 킬레이트를 형성하는 것을 보여주었다(Fig. 2). 한편 시험관 내에서 철 이온이 LB10522의 항균력에 미치는 영향을 알아보기 위해, MHA 배지에 100  $\mu\text{M}$ 의  $\text{FeCl}_3$ 를 가하여 철 이온을 증가 시킨 배지와 반대로 MHA 배지에 200  $\mu\text{M}$ 의  $\alpha, \alpha'$ -dipyridyl을 가하여 철 이온을 고갈 시킨 배지를 이용하여 항균력을 측정하였다. 카테콜기를 갖고 있지 않은 세포계 항생제인 cefpirome의 시험관내 항균력은  $\text{FeCl}_3$ 에 의해 별 다른 영향을 받지 않는데 비하여, LB10522의 항균력은 그람음성균에서 철 이온의 존재에 의해 크게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Table II). 이는 고농도의 철 이온이 존재할 때에는 세균내에서 siderophore 합성과 관련된 유전자, 또는 siderophore와 킬레이트를 형성한 철 이온이 투과하는 channel이 되는 외막 단백질의 합성과 관련된 유전자들의 발현이 억제되어<sup>13, 21, 27)</sup> LB10522가 iron-transport system을 이용할 수 없게 되기 때문이다. 반면에 permeability barrier가 없는 그람양성 세균에서는 LB10522도 철 이온의 존재에 의해 크게 영향을 받지 않았다. 즉 iron transport system을 이용할 필요가 없을 정도로 과량의 철이온이 존재할 때에는 cefpirome의 항균력은 크게 변하지 않는 반면 LB 10522의 그람음성균에 대한 항균력은 급격히 감소함을 관찰할 수 있었다. 그러나 실험에 사용되는 인공배지보다 철 이온 농도가 낮고 또 대부분의 철이온이 transferrin이나 lactoferrin과 결합한 상태로 존재하는 *in vivo* 상태에서는<sup>34)</sup> LB10522의 항균력이 *in vitro*에서 예상되는 결과보다 오히려 우수한 것으로 나타났다.<sup>28)</sup>

LB10522의 세포내 투과에 대한 보다 자세한 기전을 연구하기 위해, *E. coli* DC0, DC2의 두 균주를 이용하였다. *E. coli* DC2는 permeability barrier가 없어서 대부분의 세포계 항생제가 투과할 수 있는 mutant이기 때문에, permeability barrier가 있는 wild-type

*E. coli* DC0와의 비교 실험에 의해서 항생제의 세포내 투과기전을 연구할 수 있게 된다. Table III에서 cefuroxime의 MIC는 *E. coli* DC2에 비해 wild-type *E. coli* DC0균주에서 높은 것으로 보아 cefuroxime의 세포내 투과는 그람음성 세균의 porin 단백질을 이용하는 것을 알 수 있으며, 반면에 LB10522는 두 균주 모두에서 MIC의 차이가 없는 것을 보아 LB10522의 세포내 투과는 porin 단백질 뿐만 아니라 철 이온의 흡수와 관계 있는 active transport system을 이용하는 것을 알 수 있었다. 즉 고농도의 철 이온이 존재할 때 LB 10522의 MIC는 두 균주 모두에서 상승하는 것을 볼 수 있으며, 이로부터 LB10522의 세포내 투과는 철 이온에 의해 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다.

**PBP binding assay** - LB10522와 cefpirome에 대해 이들 항생제의 작용점(target site)인 PBPs에 대한 친화도를 *E. coli* 3190Y에서 분리한 membrane을 이용하여 관찰하였다. Fig. 3에서 LB10522는 cefpirome과 마찬가지로 *E. coli*의 PBP 3과 PBP 1A 및 1B에 주로 강하게 결합하는 것을 관찰할 수 있었다. *E. coli*의 PBP 1A와 PBP 1B는 peptidoglycan polymerase와 tran-



**Fig. 3**— Competition of LB10522 and cefpirome for [<sup>3</sup>H]-benzylpenicillin binding to the PBPs of *E. coli* 3190Y. Lane A, control (no antibiotic); lane B to E, LB10522 at concentrations of 0.01, 0.1, 1, and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively; lane F to I, cefpirome at concentrations of 0.01, 0.1, 1 and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively.

**Table III**— *In vitro* activities of LB10522 and cefuroxime against wild-type and permeability mutant strains under iron-depleted and iron-replete conditions

Strains	Characteristic	LB10522		Cefuroxime	
		iron-depleted	iron-replete	iron-depleted	iron-replete
<i>E. coli</i> DC0	Wild type	0.008 <sup>a</sup>	0.25	4	4
<i>E. coli</i> DC2	PM <sup>b</sup>	≤0.008	0.25	0.13	0.13

<sup>a</sup> MIC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

<sup>b</sup> PM, permeability mutant.

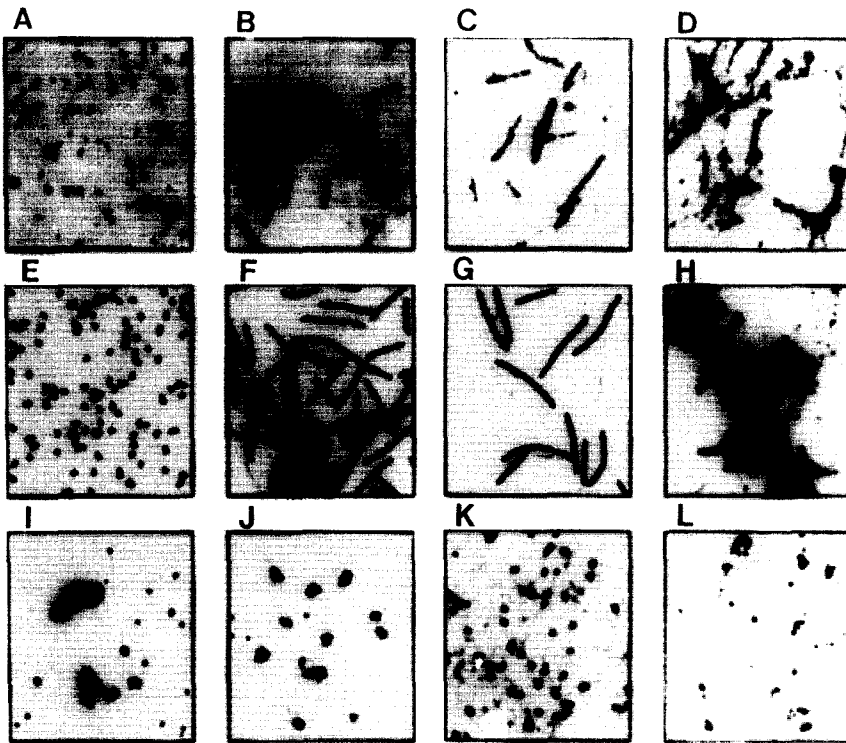


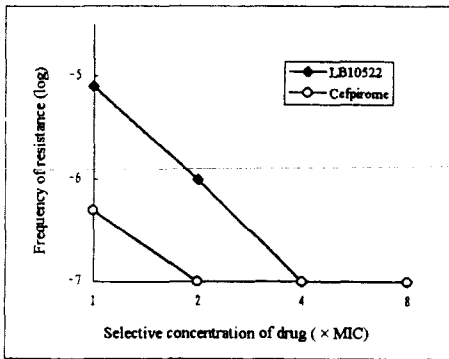
Fig. 4—Morphological changes of *E. coli* 3190Y, *P. aeruginosa* 1912E, and *S. aureus* giorgio grown in Mueller-Hinton broth containing LB10522 for 3 h at 37°C. Lanes : A through D, *E. coli* 3190Y; A, no addition; B, 0.016 µg/ml (1/4×MIC); C, 0.063 µg/ml(1×MIC); D, 0.25 µg/ml(4×MIC); E through H, *P. aeruginosa* 1912E; E, no addition; F, 0.13 µg/ml(1/4×MIC); G, 0.5 µg/ml(1×MIC); H, 2 µg/ml(4×MIC); I through L, *S. aureus* giorgio; I, no addition; J, 0.13 µg/ml(1/4×MIC); K, 0.5 µg/ml(1×MIC); L, 2 µg/ml(4×MIC). Magnification, ×1,000.

septidase의 성격을 모두 갖고 있는 복합효소로 알려져 있으며, PBP 3는 세포의 격막 형성과 관련이 있다고 알려져 있다.<sup>35), 36)</sup> 따라서 LB10522는 이들 효소들을 저해함으로써 세포 분열을 억제하고 궁극적으로 세포를 용해시켜 살균작용을 하게 된다.

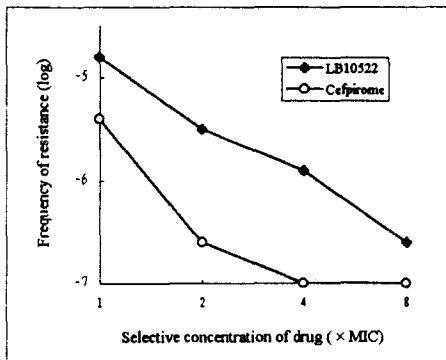
**세균의 형태 변화** - 다양한 농도의 LB10522를 *E. coli* 3190Y, *P. aeruginosa* 1912E, *S. aureus* giorgio 균주에 각각 3 시간 동안 처리하였을 때, *E. coli* 3190Y와 *P. aeruginosa* 1912E의 경우에는 1/4×MIC 에서도 세균의 형태가 filament 모양으로 길게 변화하였으며, 1×MIC에서는 세균이 서서히 용해되기 시작하여 4×MIC에서는 세균이 완전히 용해되어 사멸하는 것을 관찰할 수 있었다. *S. aureus* giorgio의 경우에는 약물의 농도가 증가함에 따라 세균이 용해되어 세균의 숫자가 점차로 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). *E. coli*의 PBP 1은 세균의 peripheral wall extension에 관여하며, PBP 3는 세균의 격막 형성에 관여하는 단백질이

기 때문에 이들의 작용을 억제하면 세포는 filament 형태로 길게 변하면서 점차 용해가 일어나게 된다. LB 10522에 의한 세균의 형태학적 변화는 앞에서 살펴본 PBP binding 결과와도 잘 일치함을 알 수 있었다.

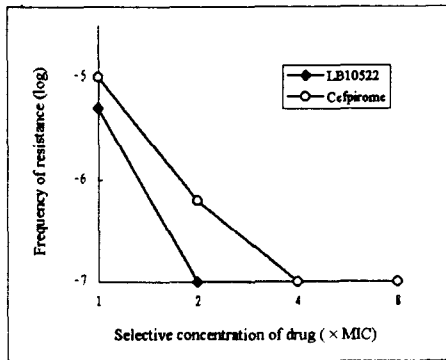
**내성발현빈도** - *E. coli* 3190Y, *P. aeruginosa* 1912E, *S. aureus* giorgio 균주를 이용하여 LB10522와 cefpirome에 대한 자연돌연변이 실험을 진행한 결과, 그람 양성균인 *S. aureus* giorgio에 대해서는 LB10522의 내성발현율이 cefpirome보다 낮았으나, *E. coli* 3190Y와 *P. aeruginosa* 1912E에서는 LB10522에 의한 내성발현율은 cefpirome보다 높은 것으로 나타났다(Fig. 5). *S. aureus*와 *E. coli*의 경우에는 4×MIC 농도 이상에서는 LB10522에 대한 내성균이 출현하지 않았으나, *P. aeruginosa*에서는 8×MIC 이상의 농도에서도 LB10522에 대한 내성균이 관찰되었다. LB10522에 대해 특히 그람 음성균에서 내성발현율이 높은 것은 다른 카테콜 치환체 세파계 항생제에서도 보고된 현상으로서,<sup>13), 21), 37)</sup> 이들



*E. coli* 3190Y



*P. aeruginosa* 1912E



*S. aureus* giorgio

Fig. 5 — Frequency of resistant cells to LB10522 and cefpirome.

내성균들은 세포계 항생제에 있어서 내성의 주원인이 되며 고도의 내성을 일으키는, 베타락타메이즈 생성이나 작용점인 PBP의 변화에 의한 내성균이 아니라, 주로 *tonB* 유전자에 돌연변이가 일어난 permeability에 관련된 내성균임이 알려져 있다.<sup>13), 25)</sup>

전신감염동물에 대한 치료효과 - 베타락탐 구조의

3번 또는 7번 위치에 카테콜기를 치환체로 가진 세포계 항생제들은 *tonB* dependent iron transport system을 이용함으로써, 녹농균과 같이 항생제의 세포막 투과가 매우 어려운 난치성의 세균에도 높은 항균력을 지니고 있으나, *in vitro*에서는 *tonB* 유전자에 높은 비율로 돌연변이가 일어나 내성균들이 많이 발생한다는 단점이 보고 되었다. 그러나 철 이온이 인공배지에 비해 매우 낮은 농도로 존재하고 또 대부분의 철 이온이 transferrin이나 lactoferrin과 결합한 상태로 존재하는 *in vivo*에서는, 특히 세균의 감염에 의해 염증이 발생한 부위에서는 생체가 철 이온의 농도를 떨어뜨려 세균의 성장에 불리하게 만드는 방어기전 (hypoferric response)이 존재하는 *in vivo* 상태에서는,<sup>34), 38), 39), 40)</sup> 이들 내성균들은 *in vitro*에서 비록 높은 비율로 발생한다 하더라도 wild-type 균주와는 달리 iron transport system을 이용할 수 없기 때문에 생존에 필요한 철 이온을 충분히 얻을 수 없게 되고 따라서 항생제의 존재와 관계 없이 생체내에서는 생존이 매우 어려운 것으로 추측된다. 이러한 가설을 입증하기 위해, 카테콜기를 갖고 있지 않은 cefpirome, ceftazidime 등에 대해서는 MIC의 변화가 없지만 LB10522에 대해서는 MIC가 parent 균주에 비해 8 배 정도 증가한 *P. aeruginosa* mutant (*tonB*)를 이용하여 생쥐의 전신감염모델에 대한 항생제의 치료효과를 parent *P. aeruginosa*에 대한 것과 비교 실험하였다. Table IV에서와 같이 *in vitro*에서는 *tonB* mutant에 대한 LB10522의 항균력이 parent균주에 비해 8배 정도 낮았지만, *in vivo*에서는 *tonB* mutant에 대한 LB10522의 항균력이 parent *P. aeruginosa*에 대한 치료효과와 유의성 있는 차이가 없음을 볼 때, *tonB* 유전자의 돌연변이에 의한 내성균은 wild-type 균주에 비해 생체내에서는 생존에 불리한 조건을 갖고 있음을 알 수 있고 따라서 이들 내성균들은 실제 임상에서는 큰 문제가 되지않을 것으로 사료된다.

결 론

LB10522의 표준균주에 대한 항균력을 측정하여 cefpirome, ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone과 비교하여 본 결과, 그람양성균에 대한 LB10522의 약효는 cefpirome과 유사하고 다른 대조약제보다는 우수한 것으로 관찰되었다.

**Table IV** — Protective effects of LB1022 against systemic infection in mice

Microorganism	Compounds	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	Challenge (cells/mouse)	ED <sub>50</sub> (mg/kg) (95% confidence limit)
<i>P. aeruginosa</i> 1912E (Wild type)	LB10522	0.5	$2 \times 10^6$	2.69(0.86~ 5.94)
	Cefpirome	2		10.9 (6.48~17.00)
	Ceftazidime	1		8.42(2.28~21.00)
<i>P. aeruginosa</i> 1912E ( <i>tonB</i> mutant)	LB10522	4	$2 \times 10^6$	6.16(2.88~13.60)
	Cefpirome	2		13.5(____ <sup>a</sup> )
	Ceftazidime	1		13.0(____ <sup>a</sup> )

<sup>a</sup> Confidence limits could not be calculated.

LB10522는 카테콜기를 가진 세파계 항생제로서, 세균의 porin 단백질 뿐만 아니라 *tonB*-dependent iron transport system을 이용함으로써 다른 항생제에 비해 쉽게 그람 음성 세균의 세포막을 투과하는 성질을 가지고 있다. LB10522의 시험관내 약효는 고농도의 철 이온의 존재에 의해 큰 영향을 받지만, 철 이온이 인공배지에 비해 낮은 농도로 존재하는 *in vivo*에서는 오히려 더 큰 항균력을 가질 것으로 예상된다.

LB10522의 세균에 대한 작용은 이 화합물이 세균의 PBPs에 강하게 결합하여 PBPs가 갖고 있는 세포벽 합성과 관련 있는 효소 작용을 억제함으로써 세포분열을 막고 세포를 용해시킴으로 살균작용을 갖게된다.

LB10522에 대한 세균의 내성발현율은 그람 양성균인 *S. aureus*에서는 cefpirome보다 낮았으나, *E. coli*, *P. aeruginosa*와 같은 그람 음성균에서는 cefpirome 보다 돌연변이에 의한 내성율이 높은 것으로 나타났다. LB10522의 그람 음성균에 대한 높은 내성발현 현상은 카테콜기를 갖고 있는 세파계 항생제의 공통된 특성이지만, 이들 내성균들의 대부분은 iron transport system에 관련된 유전자의 돌연변이에 의해 내성을 획득한 것이기 때문에 철 이온이 결핍된 *in vivo*에서는 생존이 매우 어려울 것으로 사료된다. 실제로 *in vitro*에서는 LB10522에 대한 감수성이 8 배 차이가 있는 *P. aeruginosa* 1912E의 wild type과 *tonB* mutant에 대해서, LB10522의 *in vivo* 항균력은 서로 유의성 있는 차이가 없었다.

## 문 헌

- Neu, H. C.: Third generation cephalosporins, safety profiles after 10 years of clinical use. *J. Clin. Pharmacol.* **30**, 396 (1990).
- Rolston, K. V. I, Chandrasekar, P. H., LeFrock, J. L. and Shell R. F.: The activity of ceftazidime, other  $\beta$ -lactams, and aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy (Basel)* **30**, 31 (1984).
- Prince, A: Antibiotic resistance of *Pseudomonas* species. *J. Pediatr.* **108**, 830 (1986).
- Erwin, M. E., Jones, R. N., Barrett, B. M. and Johnson, D. M.: *In vitro* evaluation of GR69153, a novel catechol-substituted cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 929 (1991).
- Ogino, H., Iwamatsu, K., Katano, K., Nakabayashi, Yoshida T., Tsuruoka, T., Inouye, S. and Kondo S.: New aminothiazolylglycylcephalosporins with a 1,5-dihydroxy-4-pyridone-2-carbonyl group, I. Synthesis and biological activity of cephalosporin derivatives leading to M 0703. *J. Antibiotics* **43**, 174 (1990).
- Jones, R. N. and Erwin, M. E.: *In vitro* evaluation of Ro 09-1227, a novel catechol-substituted cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 233 (1992).
- Maejima, T., Inoue, M. and Mitsuhashi, S.: *In vitro* antibacterial activity of KP-736, a new cephem antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 104 (1991).
- Mochida, K., Shiraki, G., Yamasaki, M. and Hirata, T.: Aminothiazolylglycyl derivatives of carbapenems, I. Synthesis and antibacterial activity of novel carbacephems with substituted aminothiazolyl groups. *J. Antibiotics* **40**, 14 (1987).
- Mochizuki, H., Yamada, H., Oikawa, Y., Murakami, K., Ishiguro, J., Kosuzume, H., Arizawa, N. and Mochida, E.: Bactericidal activity of M 14659 enhanced in low-iron environments. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32** (11), 1648 (1988).



- 10) Arisawa, M., Sekine, Y., Shimizu, S., Takano, H., Angehrn, P. and Then, R. L.: *In vitro* and *in vivo* evaluation of Ro 09-1428, a new parenteral cephalosporin with high antipseudomonal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 653 (1991).
- 11) Arnould, J. C., Bertrandie, A., Bird, T. G. C., Boucherot, D., Jung, F., Lohmann, J. J. and Olivier, A.: Synthesis and structure-activity relationship of cephalosporins with C-3' catechol-containing residues. *J. Med. Chem.* **35**, 2631 (1992).
- 12) Wise, R., Andrews, J. P., Ashby, J. P. and Thornber, D.: *In vitro* activity of a catechol-substituted cephalosporin, GR69153. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 329 (1991).
- 13) Watanabe, N. A., Nagasu, T., Katsu, K. and Kitoh, K.: E-0702, a new cephalosporin, is incorporated into *E. coli* cells via the *tonB*-dependent iron transport system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 497 (1987).
- 14) Aszodi, J., Humbert, D., Bonnefoy, A., Collette, P., Mauvais, P. and Chantot, J. F.: RU59863, A novel catechol-substituted vinyllogous cephalosporin: *In vitro* antibacterial activity. In *Abstracts of the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Orlando, FL, 1994*. Abstract F99, p. 161. American Society for Microbiology, Washington, DC. (1994).
- 15) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Document M7-A3: Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Villanova, Pa., (1993).
- 16) Kolek, B., Fung-Tomc, J., Minassian, B., Flamm, R., Kessler, R. E. and Bonner, D. P.: *In vitro* activity of a novel catechol-containing monobactam, BMS-180680. In *Abstracts of the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Orlando, FL, 1994*. Abstract F143, p. 202. American Society for Microbiology, Washington, DC. (1994).
- 17) Ohi, N., Aoki, B., Shinozaki, T., Moro, K., Noto, K., Nehashi, T., Okazaki, H. and Matsunaga, I.: Semisynthetic  $\beta$ -lactam antibiotics: I. Synthesis and antibacterial activity of new ureidopenicillin derivatives having catechol moieties. *J. Antibiotics* **39**, 230 (1986).
- 18) Ohi, N., Aoki, B., Kuroki, T., Matsumoto, M., Kojima, K. and Nehashi, T.: Semisynthetic  $\beta$ -lactam antibiotics: III. Effect on antibacterial activity and COMT-susceptibility of chlorine-introduction into the catechol nucleus. *J. Antibiotics* **40**, 22 (1987).
- 19) Nakagawa, S., Sanada, M., Matsuda, K., Hazumi, N. and Tanaka N.: Biological activity of BO-1236, a new antipseudomonal cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 1100 (1987).
- 20) Nakagawa, S., Sanada, M., Matsuda, K., Hashizume, T., Asahi, Y., Ushijima R., Ohtake, N. and Tanaka N.: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of BO-1341, a new antipseudomonal cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33** (9), 1423 (1989).
- 21) Curtis, N. A. C., Eisenstadt, R. L., East, S. J., Cornford, R. J., Walker, L. A. and White, A. J.: Iron-regulated outer membrane proteins of *E. coli* K-12 and mechanism of action of catechol-substituted cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**, 1879 (1988).
- 22) Silley, P., Griffiths, J. W., Monsey, D. and Harris A. M.: Mode of action of GR69153, a novel catechol-substituted cephalosporin, and its interaction with the *tonB*-dependent iron transport system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1806 (1990).
- 23) Martinosi, A.: *The enzymes of biological membranes*, vol.3. Plenum Publishing Corp., New York, p. 617 (1984).
- 24) Ichihara, S. and Mizushima, M.: Involvement of outer membrane proteins in enterochelin-mediated iron uptake in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **81**, 749 (1977).
- 25) Tatsumi, Y., Maejima, T. and Mitsuhashi, S.: Mechanism of *tonB*-dependent transport of KP-736, a 1,5-dihydroxy-4-pyridone-substituted cephalosporin, into *Escherichia coli* K-12 cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 613 (1995).
- 26) Neilands, J. B.: Microbial iron compounds.

- Annu. Rev. Biochem.* **50**, 715 (1981).
- 27) Hantke, K.: Regulation of ferric ion transport in *Escherichia coli* K-12. Isolation of a constitutive mutant. *Mol. Genet.* **182**, 288 (1981).
- 28) Oh, J. I., Paek, K. S., Song, H. K., Kim, M. Y., Kim, Y. Z., Kim, I. C. and Kwak, J. H.: LB 10522, a new catechol-substituted cephalosporin: I. *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities. In *Abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobial agents and Chemotherapy, San Francisco, CA, 1995*. Abstract F41, p. 120. American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1995).
- 29) Kim, M. Y., Song, H. K., Oh, J. I., Seo, M. K., Lee, Y. H., Kim, I. C. and Kwak, J. H.: LB 10522, a new catechol-substituted cephalosporin: II.  $\beta$ -lactamase stabilities and biological activities. In *Abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobial agents and Chemotherapy, San Francisco, CA, 1995*. Abstract F42, p. 120. American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1995).
- 30) Lorian, V.: *Antibiotics in laboratory medicine* 3rd ed., Williams & Wilkins, Baltimore, p. 616 (1991).
- 31) Pucci, M. J., Kessler, R. E. and Dougherty, T. J.: Comparison of cefepime, cefpirome, and cefaclidine binding affinities for penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* K-12 and *Pseudomonas aeruginosa* SC8329. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 2312 (1991).
- 32) Hata, K., Otsuki, M. and Nishino, T.: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of E-1077, a novel parenteral cephalosporin with a broad antibacterial spectrum. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 1894 (1992).
- 33) Bliss, C. I.: *The statistics of bioassay*. Academic Press, Inc., New York (1952).
- 34) Aisen, P.: Iron transport and storage proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 357 (1980).
- 35) Suzuki, H., Heijenoort, Y. V., Tamura, T., Mizoguchi, J., Hirota, Y. Heijenoort, J. V.: *In vitro* peptidoglycan polymerization catalysed penicillin-binding protein 1b of *Escherichia coli* K-12. *FEBS Lett.* **110**, 245 (1980).
- 36) Botta, G. A. and Park, J. T.: Evidence for the involvement of penicillin-binding protein 3 in murein synthesis during septation but not during cell elongation. *J. Bacteriol.* **145**, 333 (1981).
- 37) Hartmann, A. and Braun, V.: Iron transport in *E. coli*: Uptake and modification of ferrichrome. *J. Bacteriol.* **143**, 246 (1980).
- 38) Barclay, R.: The role of iron in infection. *Med. Lab. Sci.* **42**, 166 (1985).
- 39) Finkelstein, R. A., Sciortino, C. V. and McIntosh, M. A.: Role of iron in microbe-host interaction. *Rev. Infect. Dis.* **5** (Suppl. 4), 759 (1983).
- 40) Weinberg, E. D.: Iron and infection. *Microbiol. Rev.* **42**, 45 (1978).