

새로운 β -lactam계 항생물질(YH-487)의 *in vitro* 항균활성

원유정* · 강희일 · 이종욱 · 정동호¹

(주)유한양행 중앙연구소, ¹중앙대학교 산업대학 식품공학과

초록 : 7-Aminocephalosporanic acid (7-ACA)로부터 새로운 구조의 β -lactam계 항생물질을 개발하기 위한 목적으로 7-ACA의 C₃ 위치에 thiol기를 도입하고 C₇ 위치 aminothiazole기를 결합시킨 신규 화합물 (YH-487)을 제조한 다음 이의 구조 확인과 항균활성, 작용기전, β -lactamase에 대한 안정성, 다른 항생물질과의 병용 효과 등을 검토한 결과 YH-487은 세균에 대한 항균활성과 살균력이 CTX보다 우수한 신규의 제3세대 cephem계 물질이었다. 또한 YH-487의 살균작용 메카니즘은 PBP-1A, PBP-1B와 PBP-3의 친화성에 의한 세균의 세포벽 합성저해에 의한 것이었다. β -Lactamase에 대한 안정성은 *E. coli*가 생성하는 TEM-1 type PCase에는 cefotiam 또는 cefotaxime과 동등한 수준이었으나 *Staphylococcus aureus*가 생성하는 PCase와 *Pseudomonas aeruginosa*가 생성하는 CSase와 *Proteus vulgaris* 생성의 CXase에는 cefotiam 또는 cefotaxime 보다 높은 안정성을 나타내어 β -lactamase에 대해 매우 안정한 약물임을 나타내었다. 한편 다른 항생물질과의 병용효과 실험결과는 gentamicin, tobramycin 그리고 amikacin과 병용시 녹농균에 대하여 상승효과가 인정되었고 *Enterobacter cloacae*에 대하여는 amikacin과 병용시 상승작용이 있었다.(1996년 8월 1일 접수, 1997년 1월 6일 수리)

서론

임상에서 사용되는 항생물질중 약 80%를 차지하고 있는 β -lactam계 항생제는 병원균에 대해 강력한 항균작용을 나타내는 반면 숙주에 대한 독성 등 부작용은 낮은 특성이 있어¹⁾ 이에 대한 새로운 의약품의 개발연구가 활발하게 진행되고 있다.

이들 의약품의 개발연구는 *Penicillium* sp.나 *Cephalosporium* sp. 또는 *Streptomyces* sp. 등 β -lactam계 물질의 생성균을 이용하여 발효에 의해 생산하는 생물학적 방법과 6-aminopenicillanic acid(6-APA)나 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA)를 출발물질로하여 C₃ 또는 C₇ 등의 위치에 여러가지 side chain들을 결합시키는 화학합성에 의한 제조방법^{2,3)} 등이 중요 수단으로 이용되고 있다.

이들 방법중 미생물에 의한 β -lactam의 생성은 Fawcett나 Demain 또는 Abraham 등^{4,5)}에 의하여 amino- adipic acid, cysteine과 valine을 출발물질로 하는 생합성 경로가 밝혀져 있으며 1950년대부터 시작된 화학합성에 의한 연구분야에서도 합성기술이나 structure-activity relation 등에 관한 연구가 괄목할 만큼 진행되었다.

즉, 7-ACA를 기본구조로하여 합성되는 cephalosporin계 항생물질의 경우 R₃위치의 치환기는 약물의 흡수와 대사를 결정하는 중요한 부위로서 경구용에 있어서는 비교적 작은 치환기인 methyl기, chloro기, vinyl기 등으로 한정되어 있으나 주사제에 있어서는 고분자 치환기인 acetoxymethyl기, heterocyclicthiomethyl기 그리고 quaternary ammonium salt가 주류를 이루고 있으며 R₃위치는 주로 흡수에 관계하는 부분으로서 긴 사슬의 에스테르구조를 만들어

신약을 얻으려는 연구⁶⁾가 수행되어 왔지만 penicillin과는 달리 cephalosporin에서 이러한 긴 사슬의 ester는 체내에서 불안정하게 되기 때문에 prodrug의 연구에도 한계가 있게 되었다.

R₃위치는 흡수와 대사외에도 주로 항균 spectrum을 좌우하는 치환기로서 현재 가장 많이 사용되는 aminothiazole (ATA) 유도체가 주종을 이루고 있으며 이들의 변형은 일반적으로 약효를 감소시키는 것으로 알려져 있다.

이상과 같은 cephem계 항생물질들의 구조와 활성을 볼 때 7-ACA의 기본골격에 새로운 R₃ 유도체를 결합시켜 새로운 구조의 cephalosporin유도체를 합성하고 이들의 약효와 생리활성을 측정함으로써 새로운 항생물질의 개발이 가능할 것으로 예상된다.

이에 본 연구에서는 7-ACA의 C₃ 위치에 치환이 가능한 신규 헤테로 고리 thiol들과 질소를 포함한 신규 화합물을 합성하고 이것을 7-ACA와 결합시킨 후 다시 acylation하여 새로운 구조의 cephem 화합물을 설계하였다.

또한 이의 합성을 시도하여 얻어진 화합물(YH-487)의 구조를 분석하여 동물질이 새로운 화합물임을 확인한 다음 β -lactam계의 분류상의 위치를 조사하였으며 나아가 신약으로의 개발 가능성과 활용방안을 검토코져 *in vitro* 항균활성 측정실험과 작용 메카니즘 분석실험 등을 실시하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

항균력 측정을 위한 Gram양성, Gram 음성 세균과 β -

*는말 : antibiotic, β -lactam, antibacterial activity, synergism, PBP
연락처자

lactamase생성 균주 그리고 임상분리균주는 (주)유한양행 중앙연구소에 보존중인 것으로 Gram 양성 호기성 세균 14 균주, 혐기성 세균 11 균주와 Gram 음성 호기성 세균 19 균주, 혐기성 세균 9 균주를 사용하였으며 임상분리균주는 *E. coli* 54 균주를 비롯한 131 균주를 사용하였다.

사용배지는 Gram 양성, Gram 음성 호기성 세균의 보존과 MIC측정 및 형태변화 실험용 배지는 Difco 회사의 Mueller Hinton agar와 Mueller Hinton broth를 사용하였으며 혐기성 세균의 계대보존과 MIC측정용 배지로는 Nissui 회사의 GAM agar를 사용하였다.

시약

시약은 유한양행 중앙연구소에서 제조한 신규 cephem계 화합물(제조코드번호: YH-487 Na 염)을 사용하였으며 대조약물로 1세대 cephem계 항생물질인 cefazolin 과 3세대 cephem계 항생물질인 cefotaxime은 Sigma Chemical Co.에서 2세대 cephem계인 cefotiam은 일본 Takeda제약(주)에서 각각 구입하여 사용하였다.

또한 β -lactamase 실험을 위한 penicillin G와 cephaloridine은 Sigma 회사제품을, penicillin binding protein 실험을 위한 14 C-benzylpenicillin은 Amersham회사 제품을 사용하였다. 기타 dimethylsulfoxide(DMSO), ethanol, sodium phosphate, sodium chloride 등은 특급시약을 사용하였다.

항균력 시험

새로운 항생물질의 개발에서 가장 기본이 되는 항균력 시험은 일본화학요법학회와 National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)의 표준방법⁶⁷⁾에 따라 agar dilution법으로 실시하였다. 이때 사용배지는 호기성 세균에는 Mueller Hinton agar를, 혐기성세균에는 GAM agar를 각각 사용하였다.

최소발육저지농도와 최소살균농도의 비교

시험약물에 의한 각균의 최소발육저지농도 (minimal inhibitory concentration: MIC)와 최소살균농도 (minimal bactericidal concentration: MBC)의 비교 실험은 NCCLS⁶⁾과 Yamaguchi의 방법⁸⁾에 따라 micro-dilution과 macro-dilution법으로 실시하여 그 결과를 비교하였으며 시험균주는 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 등 25종을 사용하였다.

임상분리균에 대한 감수성

상기 MIC실험에서와 같이 agar dilution법⁶⁾으로 각균에 대한 MIC test를 실시한후 MIC₅₀값과 MIC₉₀값을 구하여 비교하였으며 균주는 임상에서 분리된 *E. coli* 54균주, *Serratia marcescens* 22균주, *Staphylococcus aureus* 23균주 그리고 *Enterobacter cloacae* 22균주를 각각 사용하였다.

살균곡선과 형태변화

YH-487의 작용에 의한 세균의 형태변화와 살균과정을 관찰하기 위하여 *E. coli* NIHJ JC-2를 시험균으로 MHB배지

에 10⁵ CFU/ml로 접종한 다음 37°C에서 배양하면서 1시간, 2시간, 4시간 그리고 8시간에 각각 균액을 채취하여 염색검정과 생균수 측정을 하였다.

이때 생균수의 측정은 배양액을 살균된 생리식염수에 10배 희석법으로 희석한 후 Mueller Hinton agar에 pouring법¹¹⁾으로 하였으며 형태관찰은 1% crystal violet용액으로 simple stain한 후 1000배율로 검경 관찰하였다.

Penicillin binding protein과의 친화성

세균에 대한 YH-487의 항균작용 메커니즘을 확인하기 위하여 *E. coli* NIHJ JC-2 균을 시험균주로 하여 Spratt 등의 방법⁹⁾에 따라 막회분의 제조와 14 C-benzylpenicillin과의 결합반응, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 그리고 X-ray film 인화 과정 등을 거쳐 시험약물의 농도에 따른 각 penicillin binding protein (PBP)과의 경쟁적 친화성을 비교 검토하였다.

이때 대조약물로는 cefotiam을 사용하였으며 14 C-benzylpenicillin과의 반응 농도는 0.1 μ g/ml~25 μ g/ml에서 20초간 행한 후 반응액 10 μ l/well씩을 7.5% polyacrylamide gel에 45 mA로 전기영동하고 -80°C에서 3주간 Kodak X-omatic AM X-ray film상에 감광시킨 다음 band의 명암도를 비교하였다.

β -Lactamase에 대한 가수분해율

Penicillinase (PCase)를 생성하는 *E. coli* 901/Rms212과 *Staphylococcus aureus* MS15009 그리고 cephalosporinase (CSase)를 생성하는 *Enterobacter cloacae* GN7471 균주와 *Pseudomonas aeruginosa* GN918 그리고 oxyiminoccephalosporinase (CXase)생성의 *Proteus vulgaris* GN76의 균액을 각각 sonication과 ultracentrifuge로 조효소액을 제조한 다음 0.15M phosphate buffer(pH 7.0)에 각 약물을 100 μ mole이 되게 희석하여 37°C에서 제조한 조효소액과 함께 5분간 반응시킨 후 50% methanol용액으로 반응을 중지시키고 HPLC로 기질 과 약물의 잔존량을 측정하여 각 효소에 대한 사용약물들의 상대적인 가수분해율을 비교하였다.¹⁰⁾

이때 사용 약물로는 YH-487, cefotiam과 cefotaxime을 사용하였으며 표준 기질로 PCase에는 penicillin G를, CSase에는 cephaloridine을 그리고 CXase에는 cefotaxime을 각각 사용하였다.

병용효과시험

YH-487을 다른 항생물질과의 병용시 항균작용에 미치는 효과를 검토코저 *Staphylococcus aureus*를 비롯하여 *Pseudomonas aeruginosa*과 *Enterobacter cloacae*를 대상으로 aminoglycoside계 항생물질인 gentamicin, tobramycin, vancomycin 그리고 β -lactam계의 amikacin과의 병용효과 실험을 American Society of Microbiology (ASM)의 방법¹¹⁾에 따라 96well을 사용한 checker board 법으로 실시한 후 fractional inhibitory concentration (FIC) Index를 계산하여 그 결과를 비교하였다.

이때 FIC Index 값 0.5이하 일때는 상승작용으로, 0.5에서 2.0까지는 상가적 작용으로, 2.0 이상은 길항적작용으로 각각 판정하였다.

결과 및 고찰

YH-487 Na염의 합성과 분석

본 연구의 시료인 YH-487 Na염은 7-ACA와 8-mercapto-(S)-triazole pyrazine 그리고 2-aminothiazol-4-yl-(z)-methoxyiminoacetic acid를 출발물질로하여 합성, 정제 하였으며 이를 중간물질의 제조단계별로 요약하면 Fig. 1과 같다. 한편, 최종적으로 얻어진 물질의 ¹H-NMR spectra 분석결과 Fig. 2에 나타난 바와같이 7-ACA의 R₃위치에 새로이

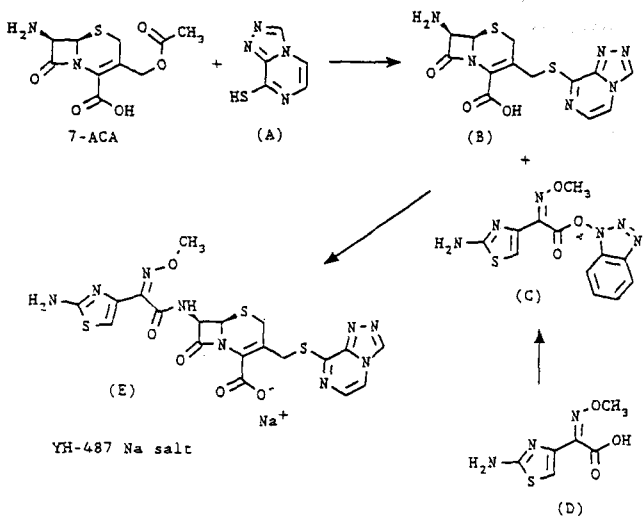


Fig. 1. Synthetic pathway of YH-487. 7-ACA : 7-Aminocephalosporanic acid, (A) : 8-Mercapto-(S)-triazole[4,3-a]pyrazine, (B) : 7-Amino-3-[(s)-triazolo[4,3-a]pyrazin-8-yl]-thiomethyl]-ceph-3-em-4-carboxylic acid, (C) : 2-Aminothiazol-4-yl-2-(z)-methoxyiminoacetic acid active ester, (D) : 2-Aminothiazol-4-yl-z-(z)-methoxyiminoacetic acid, (E) : YH-487.

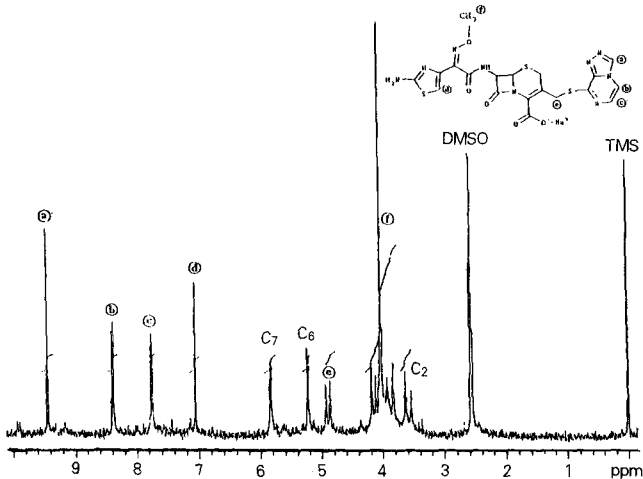


Fig. 2. ¹H-NMR spectra of YH-487 sodium salt.

치환된 pyrazine thiol기에 함유된 3개의 proton peak가 9.45 ppm과 8.40 ppm 그리고 7.75 ppm에서 각각 나타났으며 C₇ 위치에 치환 methoxyiminoacetic acid의 methoxy group proton peak가 3.7 ppm에서 그리고 aminothiazole기의 proton이 7.05 ppm에서 각각 peak를 보임으로서 Foloye 등¹⁷⁾에 의한 cefotaxime의 NMR spectra와 근본적 차이가 있다. 따라서 YH-487은 당초 설계하였던 계획대로 C₃ 위치에 thiol기가, C₇ 위치에는 aminothiazole이 결합되었다고 사료된다.

항균활성

YH-487을 몇가지 대조약물들과 함께 호기성과 혐기성 세균들에 대한 MIC값을 측정, 비교한 결과 Table 1, Table 2와 같았다.

Table에 나타난 바와같이 Gram 양성균 중, 화농균 (*Staphylococcus*)에 대한 YH-487의 항균활성은 cefotiam에 비하여 다소 낮고 cefotaxime보다는 2배 정도 높은 항균활성을 보이며 methicillin내성 *Staphylococcus aureus*

Table 1. Antibacterial activities of YH-487, cefotaxime and cefotiam against aerobes

Microorganisms	Minimal inhibitory concentration (μg/ml)		
	YH-487	Cefotiam	Cefotaxime
Gram positive bacteria			
<i>Enterococcus faecalis</i> IFO 12580	50.00	50.00	100.00
<i>Enterococcus faecium</i> CI	>100.00	>100.00	>100.00
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.20	0.20	0.39
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	0.78	0.39	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	1.56	0.39	3.13
<i>Staphylococcus aureus</i> C-5038	100.00	50.00	100.00
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	0.20	0.20	0.39
Gram negative bacteria			
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	12.50	50.00	12.50
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.05	0.10	0.05
<i>Escherichia coli</i> NO. 29	0.025	0.10	0.012
<i>Escherichia coli</i> KP strain	0.012	0.05	0.012
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	1.56	25.00	1.56
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO 12979	1.10	0.39	1.012
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	0.10	0.10	0.012
<i>Morganella morganii</i> IID Kono	0.05	0.20	0.05
<i>Proteus vulgaris</i> NCTC 8313	≤0.006	0.20	0.006
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	≤0.006	0.10	0.006
<i>Proteus stuartii</i> IFO 12930	0.012	0.012	0.006
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	12.50	>100.00	12.50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NTCC 10490	12.50	>100.00	12.50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E-2	50.00	>100.00	25.00
<i>Pseudomonas putida</i> IFO 12996	6.25	>100.00	12.50
<i>Salmonella typhi</i> NCTC 8393	0.05	0.05	0.20
<i>Serratia marcescens</i> IFO 12648	0.20	0.39	0.10
<i>Shigella flexnerii</i> Komagome	0.20	0.10	0.10
<i>Xantomonase maltophilia</i> IFO 12020	>100.00	>100.00	>100.00

Method : Agar dilution method, Inoculum size : 10⁶ CFU/ml

Table 2. Antibacterial activities of YH-487, cefotaxime and cefotiam against anaerobes

Microorganisms	Minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)		
	YH-487	Cefotiam	Cefotaxime
Gram positive bacteria			
<i>Clostridium difficile</i> ATCC 17859	12.50	>100.00	50.00
<i>Clostridium perfringens</i>	0.025	0.39	0.78
<i>Clostridium tetani</i>	0.78	0.78	1.56
<i>Clostridium botulium</i> type A	1.56	3.13	3.13
<i>Eubacterium limosum</i> ATCC 8486	0.05	25.00	0.05
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 2733	0.20	0.39	0.10
<i>Peptostreptococcus magnus</i> ATCC 29328	1.56	1.56	0.10
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	0.006	0.025	0.05
<i>Peptostreptococcus prevotii</i> ATCC 9321	1.56	6.25	0.39
<i>Propionibacterium ances</i> ATCC 11827	25.00	6.25	-
<i>Propionibacterium granulorum</i> ATCC 25564	0.20	0.78	0.20
Gram negative bacteria			
<i>Bacteroides fragilis</i> GM 7000	3.13	12.50	12.50
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	6.25	50.00	12.50
<i>Bacteroides distasonis</i> JU-11-1	12.50	50.00	-
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> WAL 3304	100.00	>100.00	50.00
<i>Capnocytophaga gingivalis</i> ATCC 33624	0.78	6.25	6.25
<i>Fusobacterium mortiferum</i> 2507	0.20	1.56	100.00
<i>Fusobacterium necrophorum</i> S-45	0.05	0.39	6.25
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25568	0.78	0.39	12.50
<i>Veillonella parvula</i> ATCC 10790	0.39	0.39	6.25

Method : Agar dilution method, Inoculum size : 10^6 CFU/ml

(MRSA)와 *Enterococcus*속에 대해서는 3가지 약물이 모두 비슷한 활성을 나타낸 반면 식품위생상 중요한 균주인 *Clostridium perfringens*나 *C1. botulinum*에 대한 YH-487의 항균력은 cefotiam이나 cefotaxime 보다 현저히 높은 항균활성을 보였다.

또한 Gram 음성균의 경우 대장균 (*E. coli*)에 대한 활성은 cefotaxime이 다소 높았으나 기타의 세균들에 대하여는 cefotiam과 비슷한 결과였다.

한편 *Pseudomonas*균에 대한 항균력은 cefotiam보다는 높았으나 cefotaxime과는 동등한 수준이었으며 혐기성 세균들에 대해서는 YH-487이 cefotiam이나 cefotaxime 보다 우수한 항균력을 나타내었다.

또 각균에 대한 MIC값과 MBC값을 비교한 결과는 Table 3에 나타난 바와같이 대부분의 균주에 대한 MIC값이 MBC값과 같거나 1단계 차이로 나타나 살균 농도와 최소발육 저지농도가 큰 차이가 없는 살균작용이 우수한 약물임을 보였다.

따라서 전체적인 항균활성의 경향을 보면 YH-487의 항

Table 3. Minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration value of YH-487 (Unit : $\mu\text{g/ml}$)

Tester strains	MIC	MBC
Gram positive bacteria		
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.39	0.78
<i>Enterococcus faecalis</i> IFO 12580	50.00	100.00
<i>Enterococcus faecium</i> NCTC 7171	12.50	25.00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	0.39	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	0.78	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i> C-5216	0.78	0.78
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	0.20	0.20
<i>Acinetobacter baumannii</i> DY-54	12.50	25.00
Gram negative bacteria		
<i>Citrobacter freundii</i> IFO 12681	0.78	0.78
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO 12979	0.10	0.20
<i>Enterobacter cloacae</i> IFO 13535	12.50	12.50
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.10	0.20
<i>Escherichia coli</i> No. 29	0.025	0.05
<i>Escherichia coli</i> DY-1	0.012	0.025
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	12.50	25.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10490	25.00	50.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DY-2	6.25	6.25
<i>Proteus putida</i> IFO 12996	0.012	0.012
<i>Proteus vulgaris</i> NCTC 8313	0.006	0.006
<i>Serratia marcescens</i> IFO 12648	0.20	0.39
<i>Salmonella typhi</i> NCTC 8393	0.05	0.05

균활성은 3세대 약물인 cefotaxime과 동일한 경향이고 *Pseudomonas*속에 대한 활성이 2세대 약물인 cefotiam 보다 높고 methicillin내성 *Staphylococcus aureus*(MRSA)와 *Enterococcus*속에 대한 활성이 낮은성질을 보였으며 이러한 특성을 Richmond¹³⁾와 Matsumoto 등¹⁴⁾의 분류방법에 비추어 볼 때 YH-487은 cefotaxime과 같은 3세대의 β -lactam계 약물임을 알 수 있었다.

임상분리균에 대한 감수성 분포

E. coli 등 수종의 임상분리균에 대한 YH-487 과 대조약물들의 감수성 분포를 검토한 결과는 Fig. 3과 Fig. 4에서와 같이 각균에 대한 YH-487의 항균력 (MIC₅₀)이 *E. coli*와 *Serratia marcescens*에 대해서는 cefazolin보다 높고 cefotaxime 보다는 낮은 경향이였으며 *Staphylococcus aureus*와 *Enterobacter cloacae*에 있어서는 cefotaxime과 YH-487이 동일한 항균력을 나타내었다.

또한 MIC₁₀₀값을 보면 YH-487이 cefazolin보다는 높고 cefotaxime과는 같은 값을 보여 전술한 호기성과 혐기성 세균들에 대한 항균활성 실험에서와 동일한 결과를 나타내었다.

살균곡선과 형태변화

E. coli NIHJ JC-2균에 대한 YH-487의 농도에 따른 killing kinetics와 형태의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 5와 Fig. 6과 같았다.

YH-487이 4분의 1 MIC 농도에서는 항균력이 저조하여 대조군과 거의 같은 수준으로 시험균이 증식하였으며 2분

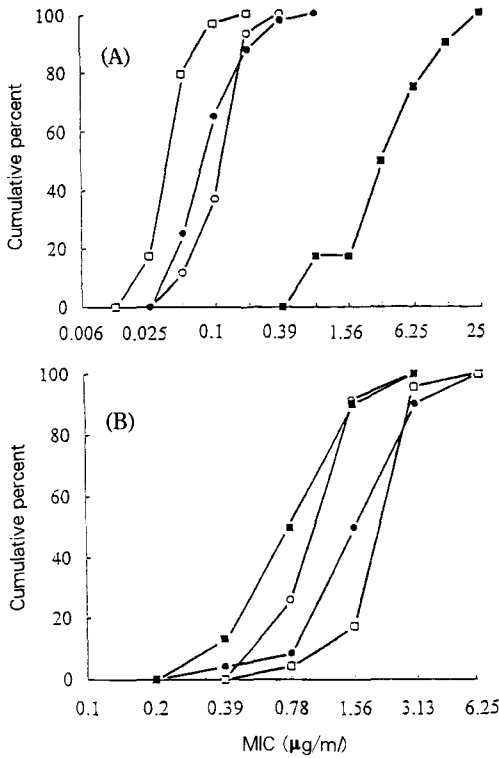


Fig. 3. Susceptibility distribution of YH-487 and other cephem. A : *Escherichia coli* (n=54), B : *Staphylococcus aureus* (n=33). ○—○, YH-487 ; □—□, Cefotaxime ; ●—●, Cefotiam ; ■—■, Cefazolin.

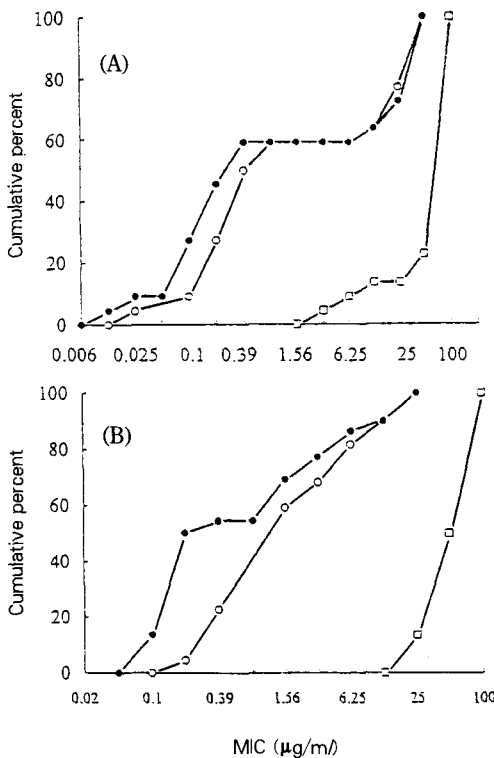


Fig. 4. Susceptibility distribution of YH-487 and other cephem. A : *Enterobacter cloacae* (n=22), B : *Serratia marcescens* (n=22). ○—○, YH-487 ; ●—●, Cefataxime ; ■—■, Cefazolin.

의 1 MIC 농도에서는 다소의 정균적 활성만 있었을 뿐 살균적 작용은 없었다. 그러나 MIC 농도와 4배 MIC 농도에

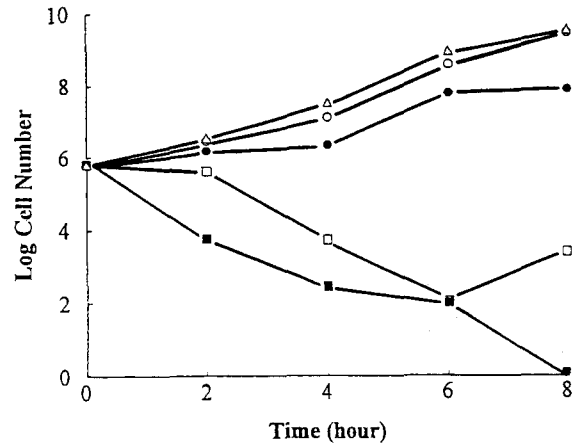


Fig. 5. Killing kinetics of YH-487 against *E. coli* NIHJ JC-2. ○—○, 1/4 MIC ; □—□, 1 MIC ; △—△, Control ; ●—●, 1/2 MIC ; ■—■, 4 MIC.

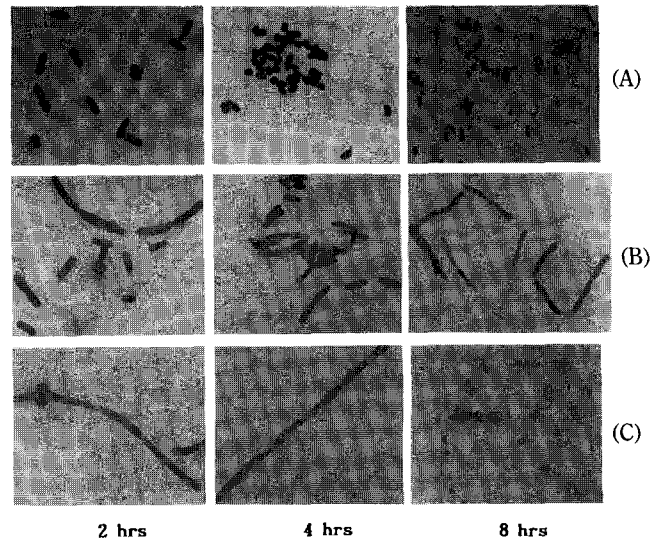


Fig. 6. Morphological changes of *E. coli* NIHJ JC-2 by YH-487. A : Control, B : 1/4 MIC, C : 1xMIC.

서는 살균적작용이 확인되어 Nishino 등¹⁸⁾이 밝힌 제4세대 cephem인 cefpirome과 유사한 살균작용이었고 이때의 균체형태는 YH-487에 의한 분열억제와 buldge형성을 거쳐 최종적으로 균체가 용균되는 결과를 보였다.

Penicillin binding protein과의 친화성

*E. coli*에 대한 PBP와의 친화성 시험을 실시한 결과 Fig. 7에서와 같이 YH-487을 반응시킨 경우 PBP-4와 PBP-5 그리고 PBP-6은 약물의 첨가농도에 관계없이 모든 well에서 일정량이 검출되었으나 PBP-1A와 PBP-1B 그리고 PBP-3는 약물의 첨가농도가 증가할수록 band가 점점 좁아져 Spratt 등⁹⁾이 밝힌대로 각 PBP들이 ¹⁴C-benzylpenicillin에서 분리되어 YH-487과 결합됨을 보였다.

또한 PBP-2는 YH-487과 저농도로 반응시킬때에는 친화성이 없으나, 고농도의 첨가반응에서는 YH-487과 결합된 결과로서 어느정도의 친화성이 있음을 나타내었다. 한편 대

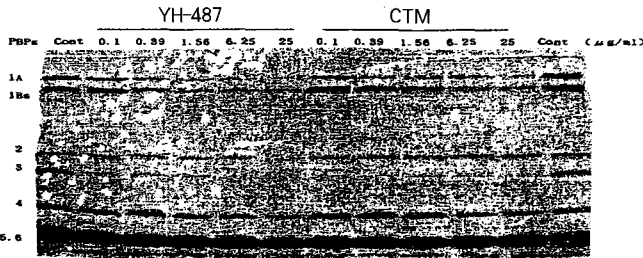


Fig. 7. Affinity of penicillin binding protein of *E. coli* NIHJ JC-2 reacted with YH-487 and cefotiam.

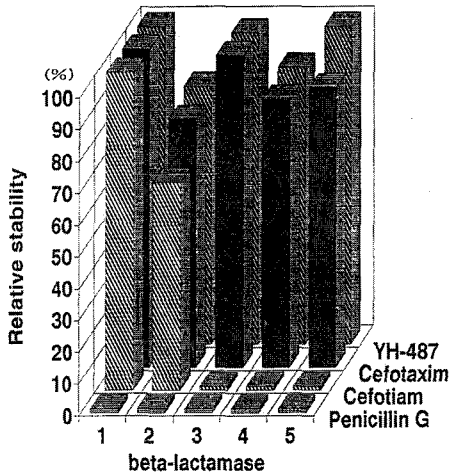


Fig. 8. Relative stability of YH-487 against various β -lactamases. 1. PCase TEM-1 (*E. coli*), 2. PCase V (*S. aureus*), 3. CSase Ia (*E. cloacae*), 4. CSase Id (*Ps. aeruginosa*), 5. CXase Ic (*P. vulgaris*).

조약물인 cefotiam의 경우 YH-487과 달리 PBP-2와는 전혀 반응하지 않고 PBP-1A와 PBP-1B와는 반응을 보였으나, 반응정도는 YH-487보다는 미약하였다. 이상의 결과를 볼 때 YH-487은 항균작용 기전은 PBP-1A, PBP-1B와 PB-3의 작용억제에 의한 것임을 알 수 있으며, 세균과 고농도로 접촉할 경우 PBP-2와도 친화성을 나타내어 약물로서 Matsumoto 등¹⁴⁾이 밝힌 우수한 살균력의 요건을 갖춘 약물임을 알 수 있었다.

β -Lactamase 에 대한 안정성

*E. coli*가 생성하는 TEM-1 type 등 몇가지 β -lactamase에 대한 YH-487의 안정성을 시판약물과 비교한 결과는 Fig. 8과 같이 TEM-1에 대해서는 YH-487과 cefotiam과 cefotaxime이 유사한 안정성을 보였으나, *Enterobacter cloacae*와 *Pseudomonas aeruginosa*가 생성하는 CSase 그리고 *Proteus vulgaris*가 생성하는 CXase에 대한 안정성은 cefotiam이 대조약물인 Penicillin-G와 같은 낮은 수준인 반면 YH-487과 cefotaxime은 매우 안정한 결과를 보였고 각 효소에서 cefotaxime보다 YH-487의 안정도가 높게 나타나 YH-487는 Mitsuhashi 등¹⁵⁾이 주장한 바와 같이 β -lactamase에 대한 stability가 매우 좋은 화합물임을 보였다.

병용효과

Table 4. Combination effect of YH-487 and other antibiotics

Tester strains	Combinated Drug	FIC Index*	Interpretation
<i>S. aureus</i> Smith	Gentamicin	0.625	Indifference
	Tobramycin	1.000	Indifference
	Amikacin	1.000	Indifference
	Vancomycin	0.750	Indifference
<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 10145	Gentamicin	0.375	Synergism
	Tobramycin	0.375	Synergism
	Amikacin	0.375	Synergism
	Vancomycin	1.000	Indifference
<i>E. cloacae</i> IFO 13047	Gentamicin	0.602	Indifference
	Tobramycin	0.650	Indifference
	Amikacin	0.375	Synergism
	Vancomycin	1.000	Indifference

*Fractional Inhibitory Concentration Index. FIC Index ≤ 0.5 : Synergism, $0.5 \sim 2.9$: Indifference, ≥ 2.0 : Antagonism.

YH-487을 gentamicin 등 몇가지 항생물질들과 병용시 세균들에 대하여 상승적 항균활성을 발휘하는지 아니면 길항작용을 나타내는지를 검토하고자 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 그리고 *Staphylococcus aureus* Smith에 대한 병용효과를 실험하였다. 그 결과 Table 4에서와 같이 *Staphylococcus aureus* Smith에서는 gentamicin을 비롯한 모든 대조약물에서 fractional inhibitory concentration(FIC) index값이 0.625 이상으로 나타나 YH-487과 병용시 상승작용이나 길항작용 없이 각 항생물질이 독립적인 항균력을 나타내었다.

그러나 *Pseudomonas aeruginosa*균에 대하여 YH-487은 vancomycin을 제외한 gentamicin과 tobramycin 그리고 amikacin과는 FIC index 값이 0.5 이하로서 상승적으로 항균활성을 보였는데 이와같은 결과는 Masuda 등¹⁶⁾이 보고한 ceftzidime과 여러 가지 aminoglycoside계 항생물질과의 병용효과실험에서와 같은 결과였고 *Enterobacter cloacae*에 대하여는 amikacin과 병용시 상승작용을 보였으며 기타의 항생물질과 YH-487과는 상승적 항균작용이나 길항적 작용이 없었다.

감사의 글

이 논문은 1995년도 중앙대학교 교내학술연구비 지원의 일부에 의한 것입니다.

참고 문헌

- Richmond, M. H. (1981) β -Lactam Antibiotics -The Background to Their Use as Therapeutic Agents, pp.5-22, Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt, West Germany.
- Demain, A. L. and N. A. Solomon (1983) Antibiotics, Containing the Beta-Lactam Structure Part I, Springer-Verlag, Berlin, West Germany.
- Silver, L. L. and K. A. Bostian (1993) Discovery and De-

- velopment of New Antibiotics, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **37**(3), 377-383.
4. Bost, P. E. and A. L. Demain (1977) Studies on the Cell-free Bio synthesis of Beta-Lactam Antibiotics, *J. Biochem.*, **162**, 618-687.
 5. Abraham, E. P. (1987) Developments in the Chemistry and Biochemistry of β -Lactam Antibiotics, pp. 5-12, In R. Hutter (ed), *Antibiotics and Other Secondary Metabolites*, Academic Press, New York, U.S.A..
 6. NCCLS. (1990) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 2nd ed. ,Approved Standard M7-A2, NCCLS, Villanova, PA, U.S.A..
 7. Gavan, T. L., R. N. Jones and A. L. Barry (1978) Evaluation of the Micromedia System for Quantitative Antimicrobial Drug Susceptibility, *Antimicrobe Agents Chemotherapy*, **13**, 61-69.
 8. Yamaguchi, T. (1988) The Significans of Minimal Inhibitory Concentration, *Antimicrobe Agents Chemotherapy*, **4**(4), 743-748.
 9. Spratt, B. G. 1977. Properties of the Penicillin-binding Proteins of *Escherichia coli*, *European J. Biochem.*, **72**, 341-352.
 10. Ross, G. W. and C. H. O'Callaghan. (1975) β -Lactamases assay, pp. 69-85, In J. H. Hash (ed), *Method in Enzymology*. Vol. XL111, Academic Press, New York, U.S.A..
 11. Isenberg, H.D. (1992) *Microbiology Procedures Handbook*, Section 5, Part I, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 12. Takahashi, K. (1990) Combined Effect of Sisomicin and Cephems against Clinically Isolated *Escherichia coli*, *Chemotherrapy*, **38**(11), 1077-1083.
 13. Moellering, R.C. (1993) Antimicrobial Combinations, *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **24**(1), 293-300.
 14. Matsumoto, K. (1990) The Cephem Antibiotics, pp. 27-87, Medical Journal Publishing Co., Tokyo, Japan.
 15. Mitsuhashi, S. and M. Inoue (1982) Mechanisms of Resistance to Beta-Lactam Antibiotics, pp.45-90, In S. Misuhashi(ed.), *Microbial Drug Resistancs*, Tokyo University Press, Tokyo, Japan.
 16. Masuda, J.. 1990. *in vitro* Synergistic Effect of Cef-tazidime, *Antibiotics and Chemotherapy*, **6**(6), 156-164.
 17. Florey, K. (1982) *Analytical Profiles of Drug Substances*. Vol. 11, p. 139-168, Academic Press, New York, U.S.A.
 18. Nishino, T., K. Nunomura, M. Otsuki, S. Shimizu and A. Shiraiishi (1991) *in vitro* and *in vivo* Antibacterial Activity of Cefprirome, *Chemotherapy*, **39** (suppl-1), 46-58.

In vitro, anti-Microbial Activity of a Novel Beta-lactam Antibiotics, YH-487

Yu-Jung Won*, Heui-Il Kang, Jong-Wook Lee and Dong-Hyo Chung¹(*Laboratory of Biotechnology, Yuhan Research Center, Kunpo-Shi, 435-030 Korea.* ¹*Department of Food Technology, ChungAng University, Ansung, 456-756 Korea*)

Abstract : To develop novel cephem antibiotics, We have synthesized a new compound, named YH-487, by attaching the thiol and aminothiazole residue to C₃ and C₇ position of 7-ACA, respectively. Several characteristics such as structure, antibiotic spectrum, action mechanism, stability against β -lactamase and synergistic effect were investigated. Anti-bactericidal activity of YH-487 against gram-positive and gram-negative bacteria were superior to that of the other cephem antibiotics. We have examined the action mechanisms of YH-487 using penicillin binding protein (PBP) assay, and found that the bactericidal activity was obtained by inhibiting PBP-1A, PBP-1B and PBP-3. YH-487 showed synergistic effect with gentamicin, tobramycin, and amikacin against *Pseudomonas aeruginosa*. In addition, YH-487 was effective against *Enterobacter cloacae* in combination with amikacin. Based on the above observations, YH-487 was classified as a novel third-generation β -lactam antibiotics.

Key words : antibiotic, β -lactam, antibacterial activity, synergism, PBP

*Corresponding author