

## 시프로플록사신 내성 황색 포도상 구균에서 MIC의 하향 분포로 입증된 DW-224a의 *in vitro* 항균 활성의 비교 우수성

윤은정<sup>1</sup> · 이춘영<sup>2</sup> · 이종서<sup>1</sup> · 최응철<sup>1</sup> · 심미자<sup>2†</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 약학대학종합 약학 연구소, <sup>2</sup>서울시립대학교 생명과학과  
(2009년 11월 2일 접수 · 2009년 11월 24일 수정 · 2009년 11월 30일 승인)

### Comparative Superiority of *in vitro* Activity of DW-224a Supported by the Downward MIC Distribution in Ciprofloxacin-resistant *Staphylococcus aureus*

Eun-Jeong Yoon<sup>1</sup>, Chun-Yeong Lee<sup>2</sup>, Jong-Seo Lee<sup>1</sup>, Eung-Chil Choi<sup>1</sup> and Mi-Ja Shim<sup>2†</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

<sup>2</sup>Department of Life Science, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

(Received November 2, 2009 · Revised November 24, 2009 · Accepted November 30, 2009)

**ABSTRACT** – The comparative superior *in vitro* activity of DW-224a was supported by the downward MIC distribution due to the weakened influence of alterations within target enzymes in ciprofloxacin-resistant *Staphylococcus aureus*. The MIC<sub>50</sub> for DW-224a was 4 µg/mL, similar to that of gemifloxacin, 8-fold less than that of sparfloxacin and 16-over-fold less than that of ciprofloxacin. We constructed combinations of amino acid changes, located at codon 80, 83 or 84 within GrlA and 84, 85 or 88 within GyrA, which were associated with MIC increase. The amino acid changes were less influential to the MIC of DW-224a compared to those of other fluoroquinolones, and it was verified from the requirement of a total of two GrlA- and two GyrA-alterations to reach the MIC of DW-224a over 32 µg/mL.

**Key words** – DW-224a, DNA gyrase, Topoisomerase IV, Quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* (QRSA)

DW-224a는 1-cyclopropyl-6-fluoro-7-[8-(methoxyimino)-2,6 diazaspiro[3,4]oct-6-yl]-4-oxo-1,4-dihydro[1,8]naphthyridine-3-carboxylic acid hydrochloride (Figure 1)의 구조식을 갖는 회합물로 동화약품 주식회사에서 합성하여 미국 Pacific Beach BioSciences사 (San Diego, CA, USA)로 기술 이전된 플루오로퀴놀론 계열 항균제로,<sup>1,3</sup> 페렴쌍구균 및 메치실린 내성 황색 포도상구균 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), 퀴놀론 내성 황색 포도상구균 (quinolone-resistant *S. aureus*, QRSA)을 포함한 그람 양성 구균 전반에 효과적인 *in vitro* 활성을 보였을 뿐 아니라,<sup>1</sup> 그람 양성 구균에 의한 마우스의 전신 감염증에도 좋은 효과를 보인 바 있다.<sup>2</sup> 신규 플루오로퀴놀론 항균제는 원내감염의 대표적 원인균인 MRSA, QRSA를 포함하는 다약제 내성 그람 양성균에 보다 강한 항균력을 가지도록 개발되고 있으며,<sup>4</sup> DW-224a는 이러한 목적에 부합하는 강한 항균력을 가지면서도 충분한 안정성을 갖추고 있는 신규 항균제로 기대되고 있다.<sup>3,5</sup>

기존에 사용되고 있던 플루오로퀴놀론 항균제는 광범위한 사용으로 인하여 내성율이 높아져 문제가 되고 있다.<sup>4</sup> 새로이 개발된 플루오로퀴놀론 항균제는 작용 부위와의 결합력이 기존의 항균제보다 강하여 보다 강한 항균력을 가지는 것으로 알려져 있으나, 기존의 플루오로퀴놀론 항균제에 내성인 임상 균주의 경우에 대하여, 향상된 활성의 신규 플루오로퀴놀론 항균제에 대한 최소 저지 농도마저 높아지고 있어 문제가 되고 있다.<sup>4</sup> 플루오로퀴놀론 항균제의 주요한 내성 기전은 작용부위 상의 변이로 인한 항균제의 결합력 약화이며,<sup>6</sup> topoisomerase IV의 일부인 GrlA와 GrlB, DNA gyrase의 일부인 GyrA와 GyrB가 내성을 결정 짓는 주요 부위인 것으로 확인되어, 이 부분을 퀴놀론 내성 결정 부위라고 부른다.<sup>6,7</sup> DW-224a 또한 이 퀴놀론 내성 결정 부위 상에 일어난 변이가, 최소 저지 농도의 상승, 또는 내성의 주요한 원인일 것으로 예상하고 있다.

본 실험에서는, 임상 균주를 대상으로 DW-224a의 *in vitro* 활성을 확인하고 활성 변화의 원인으로 예상되는 퀴놀론 내성 결정 부위 상의 변이를 확인하여, 임상분리주에 대한 활성의 비교 우수성을 확인하여 임상적 유용성을 확보하고, 내성 발생 가능성 및 그 분자적 원인을 예측해 보고자

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 02)2210-2490, E-mail : mjshim@uos.ac.kr  
DOI : 10.4333/KPS.2009.39.6.431

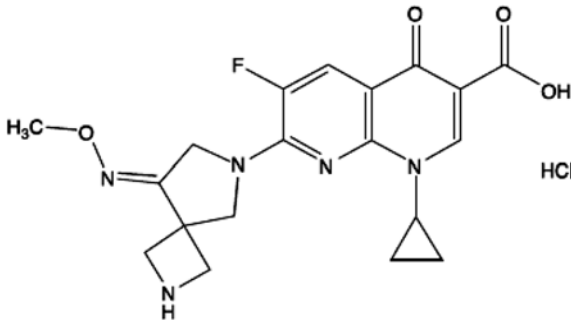


Figure 1—The chemical structure of DW-224a.

하였다. 이에, 퀴놀론 내성 결정 부위에 변이가 있을 것으로 예상되는, 국내 3차 병원에서 임상적으로 분리한 시프로플록사신 내성 황색 포도상구균 균주를 대상으로 최소 저지 농도를 확인하고, PCR로 증폭한 퀴놀론 내성 결정 부위상 변이를 확인하여 최소 저지 농도의 상승 원인을 분석하였다.

## 실험 방법

### 세균 균주와 항균제

세균 균주는, 서울 및 부산의 3차 의료기관에서 1999년에서 2007년에 걸쳐 임상적으로 분리하여 보관하고 있던 황색 포도상구균 중 시프로플록사신에 내성 (MIC  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ )인 207 주의 황색 포도상구균을 선발하여 이용하였다. 항균제는 DW-224a, 시프로플록사신, 스파플록사신과 제미플록사신 등 4종류의 플루오로퀴놀론을 사용하였다. DW-224a와 비교 플루오로퀴놀론 항균제인 시프로플록사신, 스파플록사신은 동화약품 주식회사 중앙연구소 (An-Yang, Korea)에서 합성한 것을 사용하였으며, 제미플록사신은 LG 생명과학 (Seoul, Korea)에서 합성한 것을 이용하였다. 각 항균제는 증류수 또는 약간의 NaOH를 포함하는 증류수에 녹인 후 배지로 희석하여 사용하였다.

### 최소 저지 농도의 결정

실험 대상 균종의 항균제에 대한 최소 억제 농도 (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) 측정은, Clinical Laboratory Standard Institutes (CLSI, formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS)의 고체 배지 희석법에 의거하여 실시하였다.<sup>8)</sup> 각 항균제는, 최고 농도가  $64 \mu\text{g/mL}$ 가 되도록 하여, 이 농도에서부터 2배 계열 희석하여 최저농도가  $0.0625 \mu\text{g/mL}$ 이 되도록 항균제 희석계열을 만들었으며, 계열 희석된 항균제의 농도는 CLSI에서 권장하는 *S. aureus* ATCC 25923 균주를 이용하여 품

질 관리하였다. 전배양한 균액을 희석하여 최종 균액 농도가  $10^6$  CFU/mL가 되도록 한 뒤, microinoculator (Sakuma Co., Ltd, Tokyo, Japan)를 이용하여 각 균액을  $5 \mu\text{L}$ 씩 접종하였다.  $37^\circ\text{C}$ 에서 18시간 동안 배양한 뒤, 균의 성장을 관찰할 수 없는 최소 농도를 최소 저지 농도로 결정하였다.

### 퀴놀론 내성 결정 부위의 변이 분석

실험 대상 균주의 퀴놀론 내성 결정 부위에 어떤 변이가 있는지를 확인하기 위하여 *GrlA*와 *GrlB*를 인코딩하는 유전자인 *grlA*와 *grlB*의 유전자 단편을 PCR 법으로 증폭하였다. 반응의 주형으로 사용한 genomic DNA는, G-Spin™ (INtRON Biotechnology Inc., Seongnam-Si, Korea)을 이용하여 추출하였으며, *grlB-grlA*의 5' primer, CGATTAAAGCACAAAGCAAG 와 3' primer, CTTGATGGCAATACCAATTGGTTC로 1332 bp의 PCR 증폭산물을, *gyrB-gyrA*의 5' primer, CAGCGTTAGATGTAGCAAGC 와 3' primer, CAGGACCTTCAATATCCTCC로 1401 bp의 PCR 증폭산물을 얻었다. PCR 반응은  $95^\circ\text{C}$ 에서 5분간 초기 변성 후,  $97^\circ\text{C}$ 에서 30초간 변성, *gyrB-gyrA*의 경우는  $50^\circ\text{C}$ , *grlB-grlA*의 경우는  $54^\circ\text{C}$ 에서 30초간 냉각 후,  $74^\circ\text{C}$ 에서 1분간 신장하는 반응을 30회 반복한 뒤,  $74^\circ\text{C}$ 에서 10분간 최종 신장 및 마무리 하였다. 이렇게 얻어진 반응 산물을 PCR product purification kit (INtRON Biotechnology Inc.)를 이용하여 정제하였고, 그 정제물은 Applied Biosystems automatic DNA sequencer로 염기서열을 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 최소 저지 농도의 분포에 의한 DW-224a 활성의 비교 우수성

총 207주의 황색포도상구균에 대한 플루오로퀴놀론 항균제 4 종류의 최소 저지 농도 분포를 Table I에 나타내었다. 시프로플록사신에 내성인 임상 균주에 대한 플루오로퀴놀론 항균제의 최소 저지 농도는 대체로 높은 편으로, MIC<sub>90</sub>이 4가지 항균제 모두에  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ 이었다. 그 중에서도 시프로플록사신의 경우는 MIC<sub>50</sub>도  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ 로 그 최소 저지 농도 분포 범위가 실험에 사용한 플루오로퀴놀론 항균제중 가장 높았다. 스파플록사신 또한 MIC<sub>50</sub>이  $32 \mu\text{g/mL}$ 로 높은 편이었으며, 제미플록사신의 MIC<sub>50</sub>은  $4 \mu\text{g/mL}$ 이었다. DW-224a의 MIC<sub>50</sub>은  $4 \mu\text{g/mL}$ 로, 제미플록사신과 같았으며 스파플록사신보다는 8배, 시프로플록사신보다는 16배 이상 낮아 이들보다 전반적으로 강한 항균활성을 기대할 수 있었다. 최

**Table I**—MIC distribution of tested strains to fluoroquinolones

Agents	No. of strains with the following MICs ( $\mu\text{g/mL}$ )							Total	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
	1	2	4	8	16	32	$\geq 64$			
DW-224a	49	45	34	5	7	12	55	207	4	$\geq 64$
Gemifloxacin	17	63	33	14	11	4	65	207	4	$\geq 64$
Sparfloxacin	1		4	31	59	26	86	207	32	$\geq 64$
Ciprofloxacin				4	24	33	146	207	$\geq 64$	$\geq 64$

**Table II**—Amino acid changes encoded by mutations within the *gyrA*, *gyrB*, *grlA* and *grlB* gene loci and corresponding fluoroquinolone MICs

Group (no. of each changes <sup>a</sup> )	Amino acid changes			Total no. of strains	Agents	MIC distribution						
	Topoisomerase IV		DNA gyrase <sup>b</sup>			No. of strains with the following MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	GrlA	GrlB	GyrA			1	2	4	8	16	32	$\geq 64$
4 changes (2/2)	Ser80Phe, Glu84Lys		Ser84Leu, Ser85Pro	63	DW-224a						12	55
	Ser80Phe, Glu84Lys		Ser84Leu, Glu88Gly	4	Gemifloxacin						3	64
					Sparfloxacin							67
					Ciprofloxacin							67
3 changes (2/1 or 1/2)	Ser80Phe, Glu84Lys		Ser84Leu	5	DW-224a	5	19	19	3	2		
	Ser80Phe, Glu84Val		Ser84Leu	22	Gemifloxacin	14	21	9	4			
	Ser80Phe, Tyr83Asn		Ser84Leu	18	Sparfloxacin			3	20	15	10	
	Ser80Phe		Ser84Leu, Ser85Pro	2	Ciprofloxacin						1	47
	Ser80Phe Asp432Val		Ser84Leu, Ser85Pro	1								
2 changes (1/1)	Ser80Phe		Ser84Leu	89	DW-224a	44	26	15	2	5		
	Ser80Phe Pro451Ser		Ser84Leu	1	Gemifloxacin	17	49	12	5	6	2	1
	Ser80Phe Pro585Ser		Ser84Leu	2	Sparfloxacin	1		4	28	39	11	9
					Ciprofloxacin				4	24	32	32

<sup>a</sup>no. of amino acid changes within GrlA/no. of amino acid changes within GyrA

<sup>b</sup>No amino acid changes were identified within GyrB.

소 저지 농도가 기준에 사용되고 있던 플루오로퀴놀론 항균제들에 비해 비교적 낮은 쪽으로 치우쳐 분포하였으며, 제미플록사신과 MIC<sub>50</sub>은 같았으나, 최소 저지 농도의 분포는 약간 더 낮은 쪽으로 치우치는 것이 확인되었다. 이에, DW-224a는 시프로플록사신 내성 황색포도상구균에 대해 제미플록사신과 비슷하거나 조금 더 유효한, 전반적으로 우수한 항균활성을 가지고 있다고 판단하였다.

#### 퀴놀론 표적부위의 변이 분석

실험에 사용한 시프로플록사신 내성 균주에 대한 퀴놀론 표적부위의 변이 분석 결과를 Table II에 나타내었다. 비교를 위해, 플루오로퀴놀론 항균제에 감수성인 균주에 대해서도 표적부위의 증폭 및 분석을 실시하였으며, 참고 염기서열

(GenBank ID, 1777319 for topoisomerase IV and 540540 for DNA gyrase)과 비교하여 아무런 변이가 없음을 확인하였다. 대상 균주의 topoisomerase IV 및 DNA gyrase 상에 일어난 아미노산 코돈의 변이를 분석한 결과, GrlA 서브유닛의 80, 83, 84번 코돈, GrlB 서브유닛의 432, 451, 585 코돈, GyrA 서브유닛의 84, 85, 88 코돈의 변이로 이루어진 총 10가지의 조합이 확인되었다. 모든 조합에는 GrlA 서브유닛의 Ser84Leu 변이와 GyrA 서브유닛의 Ser80Phe 변이가 포함되어 있었고, DNA gyrase의 GyrB 서브유닛 상에서는 아무런 변이도 발견되지 않았다. 또한, topoisomerase IV의 GrlB 서브유닛 상에 일어난 변이는 Asp432Val과 Pro451Ser이 각 1가지 경우 (각 0.48%), Pro585Ser이 2가지 경우 (0.97%)로 해당 균주의 수가 매우 적었을 뿐 아니라

DW-224a를 포함한 플루오로퀴놀론 항균제의 최소 저지 농도의 상승에 미치는 영향도 거의 없는 것으로 추정되었다.<sup>9,10)</sup>

### 변이 정도와 최소 저지 농도 분포의 상관관계

GrlA 서브유닛과 GyrA 서브유닛에 일어난 변이만이 플루오로퀴놀론 항균제의 최소 저지 농도 분포와 긴밀한 상관관계를 가진다는 사실이 확인되었으므로, 이들 두가지 서브유닛에서 일어난 변이의 총 개수에 따라, 2개 변이 그룹, 3개 변이 그룹, 4개 변이 그룹의 3가지 그룹으로 분류하였다 (Table II). 그리고, 각 그룹에 해당하는 균주들의 최소 저지 농도를 표기하여 그 분포를 확인하였다. 예상대로, 총 변이 수가 많은 그룹일수록 플루오로퀴놀론 항균제의 최소 저지 농도가 높은 쪽으로 치우쳐 분포하였다.<sup>9,10)</sup> GrlA와 GyrA에 각 2개씩, 총 4개 변이를 가지는 균주 그룹의 경우, 시프로플록사신과 스파플록사신의 최소 저지 농도는 전부 64 µg/mL 이상에 분포하였고, 제미플록사신과 DW-224a는 모두 32 µg/mL 이상에 분포하였다. 시프로플록사신, 스파플록사신과 제미플록사신의 경우에, 총 2개 혹은 3개 변이를 가지는 그룹에서도 최소 저지 농도 32 µg/mL 이상에 분포하는 균주가 확인되었으나, DW-224a 만은 GrlA에 2개, GyrA에 2개씩, 총 4개의 변이가 한꺼번에 존재해야만 32 µg/mL 이상에 분포하게 됨이 확인되었다. 이들 변이 조합 중 하나만 누락되더라도 DW-224a의 최소 저지 농도는 4배 이상 낮아졌다. DW-224a의 최소 저지 농도가 32 µg/mL 이상이 되는, 총 4개 변이를 가지는 그룹에 해당하는 균주는 전체 207개의 실험 대상 중 67개 (32.4%) 에 불과하여 DW-224a에 대해 높은 최소 저지 농도를 가질 확률이 기존의 플루오로퀴놀론계 항균제에 비해 떨어짐을 알 수 있었다. 이러한 결과를 통해 DW-224a는 기존의 플루오로퀴놀론 항균제에 비해 타깃 효소 변이에 대한 영향을 훨씬 덜 받는다고 할 수 있었고, 이와 같이 영향을 덜 받는 것은 DW-224a의 topoisomerase IV 및 DNA gyrase에 대한 타깃 친화도가 기존의 플루오로퀴놀론계 항균제에 비해 강하다는 것에서 기인한다고 추정할 수 있다.

본 연구에서 확인된 DW-224a의 *in vitro* 항균 활성의 비교 우수성은, 기존에 밝혀진 높은 약동학적 효율 및 낮은 독성과 함께,<sup>5)</sup> 넓은 작용 스펙트럼을 가지는 DW-224a의 우수한 임상적 유효성을 예견케 하는 것으로 사료된다.

## 결론

본 연구에서는, DW-224a의 *in vitro* 항균활성의 비교 우수성을 타깃 효소의 변이 영향력 약화에서 기인한 최소 저

지 농도 하향 분포를 통해 입증하였다. DW-224a의 항균력은 3세대 플루오로퀴놀론 항균제인 제미플록사신과 견주어 비슷하거나 조금 나은 정도를 기대할 수 있었고, 최소 저지 농도가 32 µg/mL 이상이 되기 위해서는 GrlA, GyrA 서브유닛에 각 2개씩, 총 4개의 변이가 필요하여 타깃 효소 변이의 영향을 훨씬 덜 받는다는 것을 확인할 수 있었다.

## 감사의 말씀

이 논문은 서울시립대학교의 2008년도 학술연구비에 의하여 연구되었습니다. 이에 서울시립대학교에 감사하는 바입니다.

## 참고문헌

- 1) H.S. Park, H.J. Kim, M.J. Seol, D.R. Choi, E.C. Choi and J.H. Kwak, In vitro and in vivo antibacterial activities of DW-224a, a new fluoronaphthyridone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2261-2264 (2006).
- 2) A.R. Kwon, Y.H. Min, J.M. Ryu, D.R. Choi, M.J. Shim and E.C. Choi, In vitro and in vivo activities of DW-224a a novel fluoroquinolone antibiotic agent. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**, 684-688 (2006).
- 3) R.N. Jones, D.J. Biedenbach, P.G. Ambrose and M.A. Wikler, Zafloxacin (DW-224a) activity against *Neisseria gonorrhoeae* including quinolone-resistant strains. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **62**, 110-112 (2008).
- 4) J.M. Entenza, Y.A. Que, J. Vouillamoz, M.P. Glauser and P. Moreillon, Efficacies of moxifloxacin, ciprofloxacin and vancomycin against experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing various degrees of ciprofloxacin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3076-3083 (2001).
- 5) J. Han, J.C. Kim, M.K. Chung, B. Kim and D.R. Choi, Subacute toxicity and toxicokinetics of a new antibiotic, DW-224a, after single and 4-week repeated oral administration in dogs. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 832-839 (2003)
- 6) D.C. Hooper, Mechanisms of action and resistance of older and newer quinolones. *Clin. Infect. Dis.* **31**, S24-S28 (2000).
- 7) M. Tanaka, T. Wang, Y. Onodera, Y. Uchida and K. Sato, Mechanisms of quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Chemother.* **6**, 131-139 (2000).
- 8) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard - Fifth Edition*. Document M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. 11. (2000).
- 9) F.J. Schmitz, M.E. Jones, B. Hofmann, B. Hansen, S. Scheuring, M. Luckefahr, A. Fluit, J. Verihoef, U. Hadding,

H.P. Heinz and K. Kohrer, Characterization of *grlA*, *grlB*, *gyrA* and *gyrB* mutations in 116 unrelated isolates of *Staphylococcus aureus* and effects of mutations on ciprofloxacin MIC. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1249-1252 (1998)

10) H.J. Yun, Y.H. Min, Y.W. Jo, M.J. Shim and E.C. Choi,

Increased antibacterial activity of DW286, a novel fluoronaphthyridone antibiotic, against *Staphylococcus aureus* strains with defined mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV. *Int. J. Antimicrob. Agents* **25**:334-337 (2005)