

Discovery of a New DNA Gyrase A Inhibitor, 4-[(1-methyl-6-nitroquinolin-1-ium-4-yl)amino]-N-[4- [(1-methylpyridin-1-ium-4-yl)amino]phenyl]benzamide

Incheol Seo¹, Seong-II Suh², Min-Ho Suh² and Won-Ki Baek^{2*}

¹Public Health & Welfare Bureau, Daegu Metropolitan City, Daegu; ²Department of Microbiology, School of Medicine, Keimyung University, Daegu, Korea

Escherichia coli (*E. coli*) is a clinically important causative organism that can lead to urinary tract infections. Quinolone antibiotics are among the first-line treatments for urinary tract infections. However, the frequency of resistance to quinolone in *E. coli* has been increasing. Therefore, new antimicrobial agents that can be used for treatment in lieu of quinolone antibiotics are needed. In this study, thirty-six compounds with higher scores in a virtual screening based on the three-dimensional structure of *E. coli* DNA gyrase were selected for *in vitro* antimicrobial activity testing. An *in vitro* test confirmed the antimicrobial activity of 4-[(1-methyl-6-nitroquinolin-1-ium-4-yl)amino]-N-[4-[(1-methylpyridin-1-ium-4-yl)amino]phenyl]benzamide (ZINC18057104) against *E. coli* among the 36 compounds. The minimum inhibitory concentration (MIC) of ZINC18057104 against *E. coli* ATCC[®] 25922TM was 2 µg/ml, and the MIC₅₀ and MIC₉₀ for the 72 quinolone-resistant *E. coli* clinical isolates were 4 and 64 µg/ml, respectively. ZINC18057104, which has a quinoline structure which is similar to the quinolone antibiotics, is predicted to exhibit antimicrobial activity in quinolone-resistant *E. coli* because it has different molecular interactions with the DNA gyrase than that of existing quinolone antibiotics.

Key Words: *Escherichia coli*, DNA gyrase, Anti-bacterial agents, Drug discovery, ZINC18057104

INTRODUCTION

병원성 대장균(pathogenic *Escherichia coli*)은 위장관염, 요로감염 및 신생아 뇌수막염의 원인이 되며 식중독을 유발할 수 있다 (1). 대장균의 항균제 내성은 점차 증가하고 있으며 그에 따른 감염 치료 성공률의 저하, 재발의 증가가 문제가 되고 있다 (2, 3). 대장균의 일차 선택 약물은 국소이성화효소(topoisomerase)에 선택적으로 결합하여 항균력을 나타내는 퀴놀론(quinolone)계 약물이다 (4, 5). 그

러나 퀴놀론계 약물에 대한 대장균의 내성 역시 점차로 증가하고 있기 때문에 신규 항균 물질의 개발이 시급한 상황이다 (6).

컴퓨터를 이용한 가상 약물 탐색 기술(virtual screening)은 기존에 알려진 약물 표적 단백질의 삼차원 구조나 임상에서 널리 사용 중인 약물의 화학 구조를 기반으로 새로운 약물의 가능성이 있는 화합물을 컴퓨터를 통해서 계산해 내는 기술이다 (7). 이러한 컴퓨터를 활용한 약물 개발 기술은 기존의 약물 개발의 대표적인 기법인 표적 기반 화합물 대량 탐색 기술(high throughput screening)에 투

Received: September 25, 2017/ Revised: October 25, 2017/ Accepted: November 27, 2017

* Corresponding author: Won-Ki Baek, M.D., Ph.D. Department of Microbiology, Keimyung University School of Medicine, 1095 Dalgubeol-daero, Dalseo-Gu, Daegu, 42601, Korea.

Phone: +82-53-580-3843, Fax: +82-53-580-3788, e-mail: wonki@dsmc.or.kr

** We thank the Developmental Therapeutics Program, National Cancer Institute, USA, for providing us with vialled samples, and the Caenorhabditis Genetics Center for providing a *C. elegans* strain.

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

입될 화합물의 수를 비약적으로 줄여서 약물 개발의 비용과 시간을 획기적으로 단축시킬 수 있다 (8).

이 연구는 대장균에서 퀴놀론계 항균제의 표적으로 잘 알려진 DNA 선회효소(*gyrase*)의 삼차원 구조에 컴퓨터 가상 약물 탐색 기술을 적용하여 대량의 화합물 라이브러리로부터 소수의 신규 항균제 후보 물질을 발굴하고 시험관 내 검증을 통하여 실제 항균 효과를 확인하고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

균주, 세포주, 실험동물

대장균 ATCC[®] 25922[™]은 American Tissue Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA)에서 분양받았다. 퀴놀론 내성 대장균은 2014년 3월부터 2014년 12월까지의 기간 동안 계명대학교 동산의료원 진단검사의학과에서 소변 배양 등의 목적으로 수집된 검체로부터 검출된 대장균을 분양받은 후 Clinical and Laboratory Standards Institute[®] (CLSI)의 항균제 감수성 검사 시행 및 판정 기준에 따라 디스크 확산 검사에서 nalidixic acid, norfloxacin, ofloxacin, cinoxacin, levofloxacin, moxifloxacin의 퀴놀론 항균제에 하나 이상의 내성을 갖는 대장균 72주를 실험에 사용되었다(1종에 내성 21주, 2종에 내성 8주, 3종에 내성 3주, 4종에 내성 1주, 5종에 내성 4주, 6종 모두에 내성 35주 사용). 순수 배양된 임상분리 대장균은 인체 유래물에 해당하지 않아서 연구목적의 사용에서 생명윤리위원회의 승인이 필요하지 않았다. 인간 신경교종 세포주 U-87 MG, U-251 MG는 ATCC에서 분양받았다. 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*) N2와 예쁜꼬마선충의 먹이인 대장균 OP50은 *Caenorhabditis Genetics Center* (Saint Paul, MN, USA)에서 분양받았다. 예쁜꼬마선충의 연구목적의 사용은 동물윤리위원회의 승인이 필요하지 않았다.

시약 및 소모품

대장균의 일반적인 배양에는 tryptic soy 액체배지(Tryptic Soy Broth (Soybean-Casein Digest Medium), Beckton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, NJ, USA)가 사용되었다. 화합물의 항균 능력 평가를 위한 액체배지 미량희석법에(microdilution test)는 양이온이 보정된 Müller-Hinton 액체배지(Mueller Hinton II Broth [Cation-Adjusted], BD)를 사용하였다. 항균제 후보 물질은 미국국립암센터(Rockville, MD, USA)의 Developmental Therapeutics Program을 통하

여 분양받았다. 대장균의 생존 측정에는 resazurin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 사용되었다. 예쁜꼬마선충의 배양에 필요한 일반시약은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 항균제 후보 물질의 독성 평가에 사용된 예쁜꼬마선충의 번식 억제에는 5-fluoro-2'-deoxyuridine (AlfaAesar, Lancashire, England)을 사용하였다. 인간 신경교종 세포 배양에 필요한 penicillin과 streptomycin은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

대장균의 DNA 선회효소 삼차원 구조 분석 및 가공

대장균의 DNA 선회효소 A의 단백질 구조를 얻기 위해서 The Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB)에서 PDB ID 4CKL을 PDB 포맷으로 획득했다 (9). 4CKL은 대장균의 DNA 선회효소 A의 N-terminal에 국소이성화효소 억제제인 simocyclinone D8이 부착된 상태의 55 kDa의 단백질-화합물 결합체를 X선 회절법을 통해 2.05 Å 해상도로 삼차원 구조를 규명한 파일이다. 가상 약효 검색을 위해서 4CKL 구조에서 화합물 결합 가능 부위를 막고 있는 simocyclinone D8을 분자시각화 프로그램인 PyMOL (Schrodinger, New York, NY, USA)을 이용하여 제거하였다. PyMOL은 SourceForge 웹사이트로부터 Open-Source PyMOL 1.7.2.1 버전을 다운받은 후 Python 2.7 버전(Python Software Foundation, Beaverton, OR, USA)에서 컴파일하여 사용하였다. 가상 약효 검색에서 발굴된 항균제 후보 물질과 대장균의 DNA 선회효소의 화학 결합을 분석하기 위해서 PyMOL이 사용되었다.

가상 약효 검색

가상 약효 검색(virtual drug screening)을 위해 불필요한 화합물이 제거된 4CKL 구조의 DNA gate 부위에 AutoDockTools (1.5.7rc1 버전, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA)를 이용하여 극성 수소 원자(polar hydrogens)를 부착하고 가상 약효 검색을 위한 격자상자(grid box)의 좌표를 설정하였다 (10). 대장균의 DNA 선회효소의 DNA gate 부위에 선택적으로 결합할 수 있는 약물을 탐색하기 위한 화합물 라이브러리로 전체 1,597개의 화합물로 구성된 NCI diversity set III (NCI Developmental Therapeutics Program, Bethesda, MD, USA)를 mol2 포맷으로 ZINC 데이터베이스(A Bioinformatics and Chemical Informatics Research Center, San Francisco, CA, USA)로부터 다운 받았다 (11). 얻어진 NCI diversity set III를 AutoDockTools의 Python 스

크립트인 `prepare_ligand4.py`를 이용해서 극성을 띠고 있는 원자를 표기하고, torsion root와 회전 가능한 결합을 지정하여 분석이 가능한 형태로 전환시켰다. 최종적으로 가상 약효 검색을 실시하기 위해서 AutoDock Vina 1.1.2 버전을 이용하여 앞에서 가공된 대장균의 DNA 선회효소 A의 DNA gate의 지정된 좌표에 X, Y, Z 축으로 한 번의 길이가 40 Å인 정육면체 격자상자를 설정하여 앞서 가공한 NCI diversity set III 화합물 라이브러리와 결합 에너지를 계산했다 (12).

항균제 후보 물질의 시험관 내 항균 효과 검증

항균제 후보 물질의 대장균 ATCC[®] 25922TM와 임상 유래 퀴놀론 내성 대장균에 대한 항균 능력을 시험하고 최소 억제 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 알아내기 위해서 액체배지 미량희석법을 CLSI의 M07-A9, M100-S24 권고에 따라 시행하였다 (13). 액체배지 미량희석법을 시행하기 위해서 tryptic soy 액체배지에서 배양 중인 대장균 ATCC[®] 25922TM 또는 임상 유래 퀴놀론 내성 대장균을 0.5 McFarland 표준의 탁도로 양이온이 보정된 Müller-Hinton 액체배지에 희석하여 약 $1\sim 2 \times 10^8$ CFU/ml의 대장균 액체배지 희석액을 준비하였다. 대장균 희석액을 다시 양이온이 보정된 Müller-Hinton 액체배지와 희석하여 96 well 미소판에서 각 well 마다 100 µl의 부피로 최종 대장균의 농도가 5×10^5 CFU/ml의 농도가 될 수 있도록 희석하여 분주하였다. 이후 각 well 마다 항균 효과를 검증하고자 하는 항균제 후보 물질을 최종 농도에 맞게 처리하였다. 이 때 화합물 용액의 전체 부피는 10 µl를 초과하지 않도록 하였다. 대조군으로 dimethyl sulfoxide (DMSO, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA)를 사용하였고 전체 well 내에서 0.5% (v/v)를 초과하지 않도록 하였다. 이후 35 ± 2°C로 유지되는 배양기에서 20시간을 배양하고 육안으로 배지의 혼탁도를 확인하거나 인산완충 식염수에 0.2 mg/ml로 용해시킨 resazurin sodium salt를 전체 well의 10% (v/v)로 처리하여 1시간 후 Victor³ 형광광도계(PerkinElmer, Waltham, USA)로 530 nm의 빛으로 여기(excitation)시켜 590 nm에서 발광(emission)을 측정함으로써 resorufin의 생성량을 확인하였다.

항균제 후보 물질의 독성 시험

예쁜꼬마선충을 미소판에서 배양하며 화합물의 독성을 평가하는 실험방법은 Solis 등의 방법을 변형하여 시행했

다 (14). 항균제 후보 물질의 독성을 확인하기 위하여 예쁜꼬마선충을 96 well 미소판에서 액체배지로 배양하였다. 각 well의 DMSO의 농도가 0.6% (v/v)를 초과하지 않도록 독성 시험을 위한 화합물의 최대 농도를 32 µg/ml로 설정하였다. 각 화합물의 농도마다 181~285마리의 예쁜꼬마선충이 사용되었다. 예쁜꼬마선충의 생존여부는 매주 월, 수, 금요일에 Solis의 방법에 따라 광학현미경을 통해서 확인하였다. 얻어진 실험 결과로 생존함수를 구하고 Cox의 비례위험모형으로 항균제 후보 물질의 처리가 예쁜꼬마선충의 생존에 미치는 영향을 평가하였다.

인간 신경교종 유래 세포주 U-87 MG, U-251 MG는 10% 소태아혈청 및 50 U/ml penicillin과 0.1 mg/ml의 streptomycin 항균제가 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (LM 001-05, (주)웰진, Gyeongsan, Korea) 배지로 5% 이산화탄소, 37°C의 습식 배양기에서 유지하였다. 바닥면이 투명한 미소판에 각 세포주를 well 마다 8천개의 세포가 100 µl의 부피로 분주되도록 하였다. 이후 세포를 분주한 미소판을 24시간 동안 배양기에 두어 세포가 미소판 바닥에 부착될 수 있게 하였다. 세포가 미소판 바닥에 부착된 이후 각 well의 배지를 각기 다른 농도의 항균제 후보 물질이 포함된 100 µl의 배양액으로 교체하였다. 다시 미소판을 24시간 동안 배양기에 두었다. 이후 각 well에 인산완충식염수에 0.2 mg/ml로 용해된 resazurin을 10 µl씩 처리하여 3시간을 더 배양기에서 배양한 후 Victor³ 형광광도계로 resorufin의 생성량을 확인하였다.

통계분석

화합물의 인체 유래 세포에 대한 독성 실험에서 50%의 세포의 생존에 영향을 주는 화합물의 농도(cytotoxic concentration 50, CC50)를 CompuSyn 프로그램 버전 1.0 (ComboSyn, Inc., Paramus, USA)을 사용해서 Median effect equation으로부터 도출하였다 (15). Cox의 비례위험모형을 통한 생존 분석에는 IBM SPSS Statistics 23 (Armonk, NY, USA)를 사용하였다.

RESULTS

대장균의 DNA 선회효소에 대한 가상 약효 검색

퀴놀론계 항균제의 표적으로 잘 알려진 DNA 선회효소의 구조를 RCSB PDB로부터 획득하여 삼차원 구조를 확인하였을 때 대장균의 DNA 선회효소의 구조는 동종이량

체이며 DNA와 결합하는 부위가 이량체의 결합 부위에서 가까운 곳에 위치해 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1A, B). 대장균의 DNA 선회효소에서 항균제 후보 물질이 부착될 수 있는 부위를 확인하기 위해서 대장균의 DNA 선회효소의 삼차원 구조에서 불필요한 화합물 및 물 분자 등을 제거하고 대장균의 DNA 선회효소의 단량체만을 분리해 낸 후 DNA gate로 알려진 부위의 소수성(hydrophobicity)을 평가하였다(Fig. 1C). 대장균의 DNA 선회효소에 대한 가상 약효 검색을 시행하기 위해서 DNA 선회효소에 극성 수소

원자를 부착하고 DNA gate 부위를 중심으로 한 변의 길이가 40 Å인 $6.4 \mu\text{m}^3$ 의 정육면체 격자상자를 지정하였다(Fig. 1D). 가상 약효 검색을 위한 화합물 라이브러리는 NCI diversity set III로 선택되었으며 화합물의 극성 원자 및 회전 가능한 원자 간의 결합을 지정하는 전 처리를 마친 후 Autodock Vina 프로그램을 사용하여 화합물 라이브러리가 대장균의 DNA 선회효소의 DNA gate 부위의 격자 상자 내부에서 자유롭게 이동, 회전 및 굴곡하면서 DNA gate 부위에 가장 강한 결합력을 갖는 화합물이 선별될 수

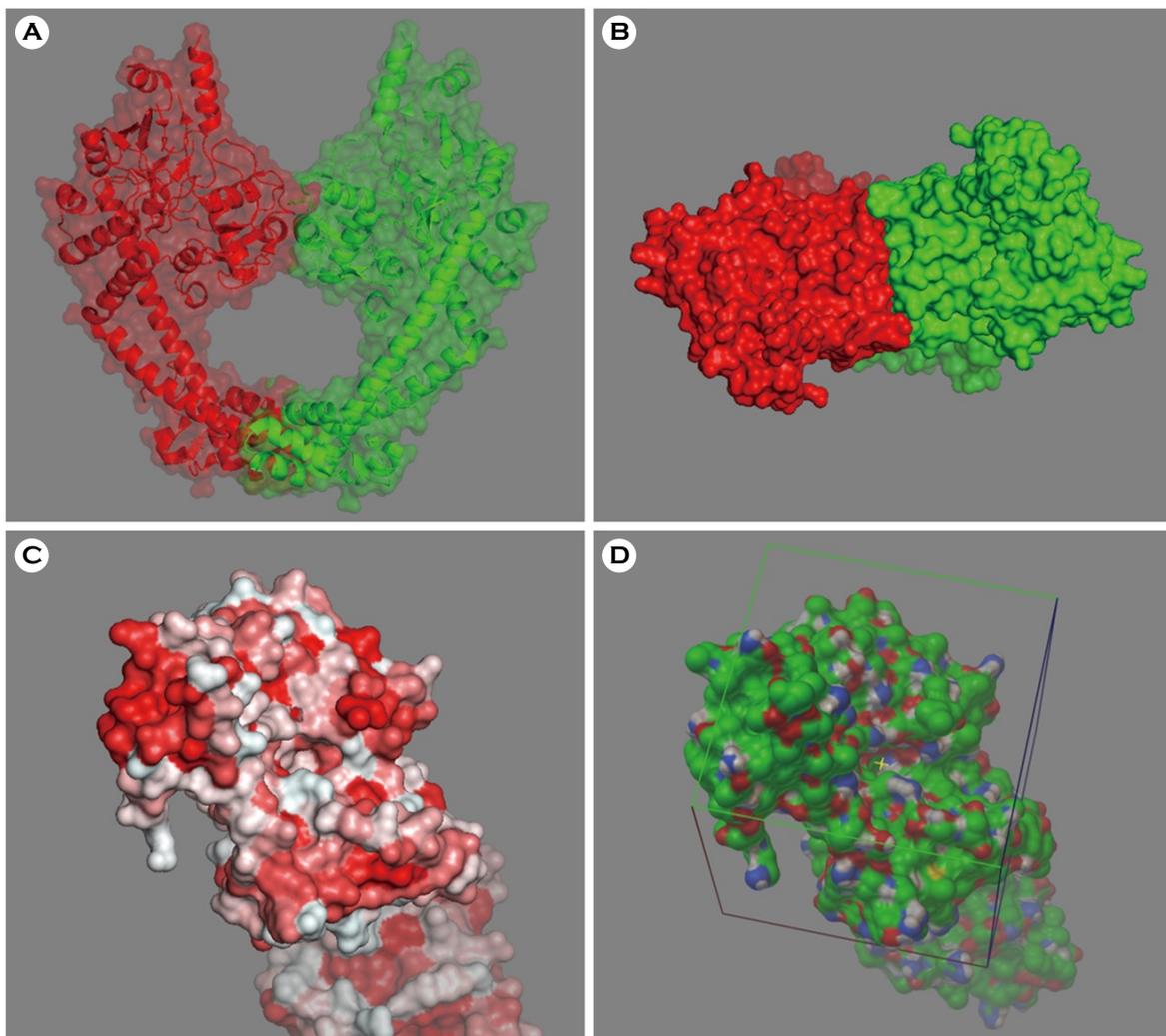


Figure 1. The molecular structures of *Escherichia coli* DNA gyrase. (A) Secondary and tertiary structures of the GyrA homodimer. (B) DNA-gate region of the GyrA homodimer. (C) Hydrophobicity of the DNA-gate region (hydrophobic, red; hydrophilic, white). (D) Cubic box for the virtual screening centered at the DNA-gate region. Green, red, blue, white, and yellow spheres represent carbon, oxygen, nitrogen, hydrogen, and sulfur atoms, respectively.

Table 1. Virtual screening hit list against *Escherichia coli* DNA gyrase

ZINC ID ^a	NSC ID ^b	Binding energy (kcal/mol)
04824645	97920	-19.6
13152284	84100	-10.6
18055497	84100	-10.6
01736227	84100	-10.5
01690699	61610	-10.4
04896472	80313	-10.3
01855333	670283	-10.1
01568793	308835	-10.0
18057104	260594	-9.7
12671898	59620	-9.7
13154306	60785	-9.7
29590275	309874	-9.7
00990239	345845	-9.6
01726776	142335	-9.5
04707806	71097	-9.5
17465958	158413	-9.5
01687247	5856	-9.4
01568966	309892	-9.3
01635676	163443	-9.3
05664697	328101	-9.3
01045530	319435	-9.2
01573829	327702	-9.2
01627329	81750	-9.2
01701460	109451	-9.2
02476372	6844	-9.2
04822288	102742	-9.2
01568035	305798	-9.1
01590864	379555	-9.1
04628938	305798	-9.1
04773602	217697	-9.1
04783229	37553	-9.1
01559756	268487	-9.0
01608817	24032	-9.0
01665801	33575	-9.0
05124960	156565	-9.0
08627502	109747	-9.0

ZINC ID^a: the ZINC database identifier. NSC ID^b: an identifier for substances submitted to the Developmental Therapeutics Program repository at the National Cancer Institute.

있도록 했다. 가상 약효 검색 상에서 DNA gate 주위에 강한 결합력을 나타내는 36종의 화합물을 선별했다. 해당 화합물의 결합력은 Table 1과 같았다.

가상 약효 검색에서 발굴된 후보 약물의 항균 능력 시험관 내 검증

가상 약효 검색을 통해서 선별된 대장균의 DNA 선회효소에 강한 결합력을 보인 36개의 화합물 중에서 중복된 화합물을 제외하고 분량이 가능한 32종의 화합물을 미국 국립암센터 Developmental Therapeutics Program을 통하여 입수하여 대장균에 대한 실제 항균 효과를 시험관 내에서 검증하였다. 화합물의 항균 효과를 0.25~256 µg/ml의 범위에서 확인한 결과 ZINC18057104 (NSC260594, 4-[(1-methyl-6-nitroquinolin-1-ium-4-yl)amino]-N-[4-[(1-methylpyridin-1-ium-4-yl)amino]phenyl]benzamide) 화합물에서 대장균 ATCC[®] 25922TM에 대한 최소 억제 농도가 2 µg/ml 수준인 항균 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 2). 나머지 31개의 화합물에서는 256 µg/ml까지의 농도에서 항균 효과를 확인할 수 없었다. 대장균에 대해서 항균 효과를 보인 ZINC18057104 화합물의 구조가 퀴놀론계 항균제의 핵심 구조와 유사한 퀴놀린(quinoline)을 포함하고 있었기 때문에 기존의 퀴놀론계 항균제에 내성을 보이는 임상 유래 병원성 대장균 72종에 대해서 ZINC18057104의 항균 능력을 액체배지 미량희석법으로 0.03125~64 µg/ml의 농도범위에서 확인하였다(Table 2). 그 결과 ZINC18057104의 50%의 균주의 성장을 억제하거나 사멸시킬 수 있는 최소 억제 농도(MIC₅₀)는 4 µg/ml이었으며 90% 균주에 대한 최소 억제 농도(MIC₉₀)는 64 µg/ml로 확인되었다.

대장균에 대한 항균 후보 물질의 작용 기전 분석

퀴놀론과 화학 구조가 유사한 ZINC18057104가 퀴놀론에 내성을 가진 임상 유래 대장균에 대해서 항균 효과를 보였기 때문에 ZINC18057104의 항균 기전을 알아보기 위해서 화합물의 화학 구조식과 대장균의 DNA 선회효소 간의 상호작용에 대해서 3차원 구조 분석을 실시하였다(Fig. 3). ZINC18057104는 대장균의 DNA 선회효소에 설정된 격자상자 안에서 DNA 결합 부위에 위치하고 있어서 효소의 활성의 억제 기전이 DNA에 대한 경쟁적 저해(competitive inhibition)임을 유추할 수 있었다. ZINC18057104와 DNA 결합 부위 간의 결합에 물 분자 3개가 참여하고 있었다. ZINC18057104는 수소 결합과 쌍극자 힘(dipole-dipole in-

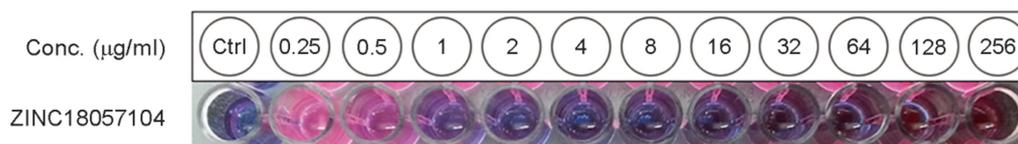


Figure 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) of ZINC18057104 against *Escherichia coli*. A broth microdilution test was done according to Clinical and Laboratory Standards Institute's recommendations, using the cation-adjusted Müller-Hinton broth. *E. coli* ATCC[®] 25922[™] was used for the test. Turbidity was measured after 20 hours of treatment of ZINC18057104, and then the viability of the *E. coli* was confirmed again by a resazurin reduction assay. Conc.: concentration. Ctrl: control without inoculation.

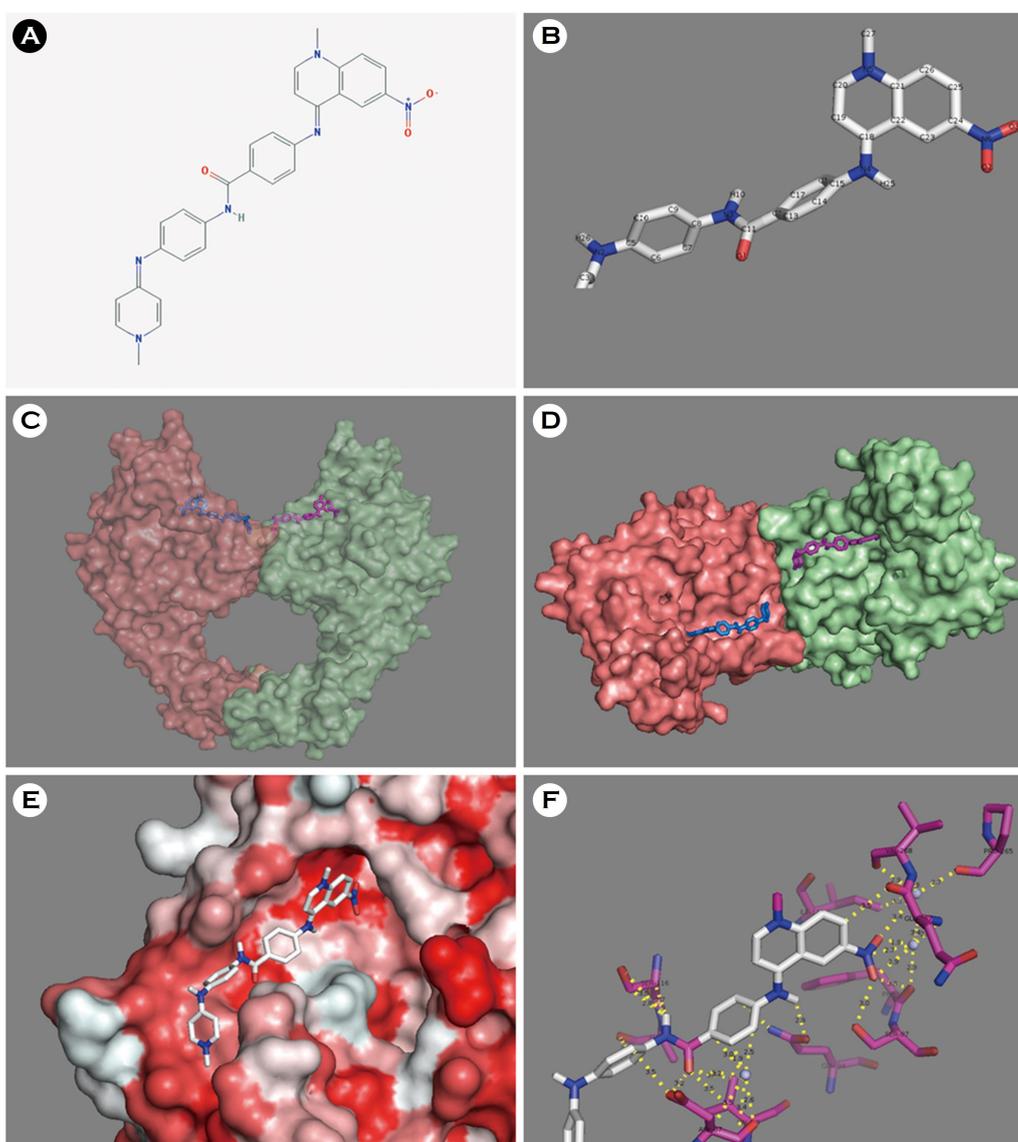


Figure 3. ZINC18057104 and its molecular interaction with *E. coli* DNA gyrase A. (A-B) Chemical structure of ZINC18057104. (C-D) Three-dimensional structure of the *E. coli* DNA gyrase-ZINC18057104 complex. (E) Hydrophobicity of the ZINC18057104 binding site (hydrophobic, red; hydrophilic, white). (F) Molecular interactions (yellow dotted lines) between the *E. coli* DNA gyrase (purple) and ZINC18057104.

Table 2. The antimicrobial effect of ZINC18057104 on the quinolone-resistant *Escherichia coli* clinical isolates

No.	MIC	No.	MIC	No.	MIC
1	4	26	4	51	4
2	4	27	4	52	32
3	16	28	4	53	2
4	4	29	4	54	4
5	32	30	16	55	4
6	4	31	8	56	4
7	4	32	16	57	8
8	16	33	4	58	4
9	4	34	4	59	4
10	32	35	4	60	4
11	4	36	4	61	32
12	> 64	37	4	62	4
13	16	38	4	63	4
14	4	39	8	64	2
15	4	40	> 64	65	4
16	64	41	8	66	16
17	4	42	8	67	4
18	> 64	43	16	68	2
19	4	44	4	69	64
20	> 64	45	64	70	4
21	4	46	4	71	2
22	> 64	47	4	72	4
23	4	48	4	MIC ₅₀	4
24	2	49	> 64	MIC ₉₀	64
25	32	50	4		

MIC: minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$). MIC₅₀, MIC₉₀: Minimum inhibitory concentration at which 90% and 50% of the isolates were inhibited by ZINC18057104, respectively.

teraction)을 포함한 비공유 결합을 통해 대장균 DNA 선회효소의 ASP87, VAL90, GLN94, PHE96, SER97, ILE112, SER116, ALA117, PRO265, GLN267, VAL268 아미노산과 상호작용하고 있음을 확인할 수 있었다.

대장균에 대한 항균 후보 물질의 독성 시험

ZINC18057104의 독성을 확인하기 위해서 액체 배양상태의 예쁜꼬마선충에게 해당화합물을 여러 농도로 처리하

고 생존의 변화를 관찰하였을 때 ZINC18057104의 처리 농도가 4 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 통계적으로 유의한 생존의 감소를 확인할 수 있었으며 4, 8, 16, 32 $\mu\text{g/ml}$ 의 약물처리의 생존감소에 대한 비례위험도는 각각 1.369, 2.360, 2.891, 3.420이었다(Fig. 4A). 인체 유래 세포에 대한 ZINC18057104의 독성 시험에서는 세포주의 종류에 따라 6.28과 19.13 $\mu\text{g/ml}$ 의 CC50이 확인되었다(Fig. 4B).

DISCUSSION

이 연구에서는 대장균의 DNA 선회효소의 삼차원 구조를 기반으로 가상 약효 검색을 시행하여 36종의 신규 항균제 후보 물질을 발굴하고 후보 물질의 항균력을 시험관 내에서 확인하여 ZINC18057140 화합물의 퀴놀론 내성 대장균에 대한 항균 효과를 검증하였다. 신규 항균 후보 물질 ZINC18057104는 퀴놀론 내성 대장균의 DNA 선회효소의 DNA 결합 부위에 DNA와 경쟁적으로 결합하여 효소의 작용을 방해함으로써 대장균에 대한 항균 효과를 갖는 것으로 예상된다(Fig. 3D) (16). ZINC18057104는 퀴놀론의 구조를 가지고 있기 때문에 기존의 퀴놀론계 약물들과 구조적으로 매우 유사하다(Fig. 3A). 이런 구조적 유사성에도 불구하고 ZINC18057104는 임상에서 사용 중인 퀴놀론계 항균제에 내성을 가지고 있는 임상 유래 대장균 72주에 대해 MIC₅₀와 MIC₉₀이 각각 4와 64 $\mu\text{g/ml}$ 인 항균 능력을 가진 것으로 확인되었다(Table 2). 임상 유래 대장균 72주는 6종의 퀴놀론계 항균제 중 한 가지 이상의 항균제에 내성을 갖는 균들로 CLSI의 기준에 따라 ofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin에 대해 8 $\mu\text{g/ml}$, norfloxacin에 대해 16 $\mu\text{g/ml}$, nalidixic acid에 대해 32 $\mu\text{g/ml}$, cinoxacin에 대해 64 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 MIC를 가질 때 내성균으로 판정되었다 (13). 임상 유래 대장균의 퀴놀론계 약물에 대한 MIC₅₀는 8~16, MIC₉₀는 32~128 $\mu\text{g/ml}$ 정도로 보고되고 있고 이 연구에서는 퀴놀론계 항생제에 내성을 가지고 있는 대장균만을 선별하여 ZINC18057104의 항균력을 시험하였을 때 4와 64 $\mu\text{g/ml}$ 의 MIC₅₀와 MIC₉₀가 확인되었다는 점과 ZINC18057104가 다른 퀴놀론계 항균제에 비해서 큰 분자량(ZINC18057104: 506.566 Da, nalidixic acid: 232.231 Da, norfloxacin: 319.331 Da, ofloxacin과 levofloxacin: 361.368 Da, cinoxacin: 262.218 Da, moxifloxacin: 401.431 Da)을 가지고 있어서 $\mu\text{g/ml}$ 단위의 질량-퍼센트 농도 기준의 시험에서 불리하게 평가된다는 점을 고려한다면 이 연구에서 발굴

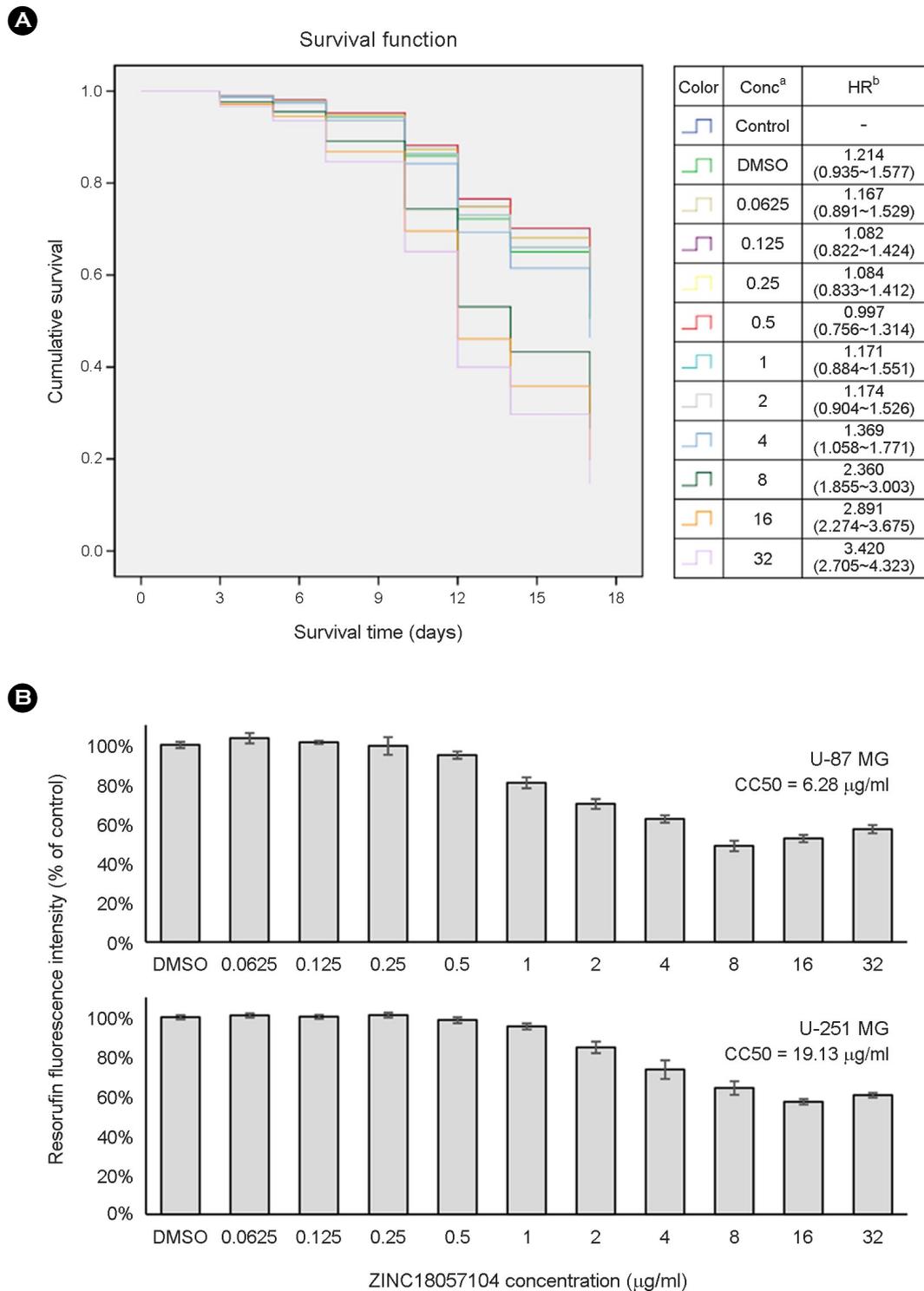


Figure 4. Toxicity analyses of ZINC18057104 against *Caenorhabditis elegans* and human glioblastoma cells. (A) Cox proportional hazards survival analysis of *C. elegans* treated with ZINC18057104 at different concentrations. Conc^a: concentration ($\mu\text{g/ml}$). HR^b: hazard ratio (95% confidence interval). (B) Percent viable human cells [measured as average fluorescence intensity ratio (test agent relative to Dimethyl sulfoxide)] for cytotoxicity analysis of ZINC18057104 at 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, and 32 $\mu\text{g/ml}$ against U-87MG and U-251MG cells using the resazurin reduction assay. Dimethyl sulfoxide was used as a negative control to determine a baseline measurement for the cytotoxic impact of each concentration. CC50 is the concentration at which 50% cell survival is obtained. DMSO: dimethyl sulfoxide.

된 ZINC18057104는 퀴놀론 내성 대장균에서 항균 효과를 가지고 있는 것으로 판단할 수 있다 (17). 퀴놀론의 구조를 가진 ZINC18057104가 기존의 퀴놀론에 내성을 보이는 대장균에서 항균 효과를 가질 수 있는 기전을 파악하기 위해서 가상 약효 검색에서 계산된 ZINC18057104와 대장균 선회효소간의 분자결합을 확인했을 때 두 가지 특징을 확인할 수 있었다(Fig. 3F). 첫 번째는 ZINC18057104가 기존의 퀴놀론계 약물이 DNA 선회효소와 결합하기 위해서 필요한 아미노산과는 다른 아미노산을 통해서 분자 결합을 한다는 점이다. 실험실 및 임상 유래의 퀴놀론 내성 대장균의 90% 이상에서 대장균의 DNA 선회효소의 83번째 아미노산인 세린(serine, SER83)의 변이가 관찰된다 (18). 이것은 퀴놀론계 약물이 대장균의 DNA 선회효소와 결합할 때 퀴놀론 구조가 Mg^{2+} 와 물 분자를 매개로 선회효소의 SER83과 결합하는 것이 가장 중요한 결합 에너지를 형성해 주기 때문이다 (19). 그러나 ZINC18057104와 대장균의 DNA 선회효소의 결합에서는 SER83이 관여하고 있지 않고 ASP87, VAL90, GLN94, PHE96, SER97, ILE112, ALA117, PRO265, GLN267, VAL268 등이 관여하고 있는 것이 확인되었다(Fig. 3F). 따라서 ZINC18057104가 퀴놀론 내성 대장균에서 항균 효과를 나타낼 수 있는 이유 중 한 가지는 기존의 퀴놀론계 약물과는 다른 아미노산을 통한 약물 결합 때문인 것으로 추측된다. 퀴놀론 내성 병원균에 대한 신규 항균제 개발을 목적으로 DNA 선회효소와의 결합에서 SER83이 불필요한 quinazolidone 구조를 도입하고 있기 때문에 퀴놀론 구조의 개발 이후 활발한 연구가 진행되고 있지 않던 퀴놀린 구조를 가진 신규 항균제 또한 퀴놀론 내성 병원성균에 대한 대안이 될 수 있을 것으로 추측된다 (20, 21). ZINC18057104가 기존의 퀴놀론계 약물에 내성을 가진 대장균에서 항균 효과를 나타내는 두 번째 이유는 선형인 ZINC18057104의 화학 구조 때문이라고 판단된다 (19). ZINC18057104는 기존 퀴놀론계 약물보다 길쭉한 모양을 하고 있어서 선회효소의 DNA groove에 DNA의 backbone 처럼 길게 부착될 것으로 확인되었다(Fig. 3D). 또한 ZINC18057104는 길쭉한 화학 구조 덕분에 퀴놀린 구조와 DNA 선회효소 사이의 분자 결합 이외에도 퀴놀린 구조 결의 benzamide를 통한 선회효소와의 분자 결합을 다수 형성하고 있음을 확인할 수 있어 결합 에너지 형성에 상당한 역할을 하고 있음을 추측할 수 있었다(Fig. 3F).

기존 보고에 따르면 인간의 국소이성화효소는 세균의

DNA 선회효소와 달리 퀴놀론계 약물이 Mg^{2+} 와 물 분자를 매개로 결합될 수 있는 세린 등의 아미노산을 가지고 있지 않으며 이것이 퀴놀론계 항균제의 therapeutic window가 확보되는 이유로 알려져 있다 (22). ZINC18057104의 대장균의 DNA 선회효소와의 결합은 SER83 이외의 아미노산에 의한 것이므로 ZINC18057104가 인간의 국소이성화효소에 결합하여 독성을 유발할 수 있는 위험에 대한 검증이 필요했다. 따라서 이 연구에서는 단순한 형태의 다세포 진핵생물인 예쁜꼬마선충과 인간 신경교종 세포주 2종을 사용하여 ZINC18057104에 의한 장기적, 단기적인 독성을 평가하였다(Fig. 4). 예쁜꼬마선충을 ZINC18057104에 노출시키고 17일 동안 관찰하였을 때 4 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 사멸의 비례위험도가 1.369로 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 인간 신경교종 세포주에 ZINC18057104를 처리하고 24시간 후 생존율을 관찰하였을 때 세포주에 따라 6.28, 19.13 $\mu\text{g/ml}$ 의 CC50를 확인할 수 있었다. 따라서 ZINC18057104는 대장균에서 항균 효과를 갖는 농도에서 예쁜꼬마선충과 인간세포에 어느 정도의 독성을 가지고 있음을 추측할 수 있었다. 따라서 ZINC18057104의 항균제로서의 후속 개발을 위해서는 최적화(optimization) 단계에서 독성에 대한 고려가 필요할 것이라 판단된다. ZINC18057104는 NCI diversity set III에 포함되어 있는 약물로서 기본적으로 경구투여가 가능한 특성을 가지고 있다. ZINC18057104는 3개와 9개의 수소결합주개(hydrogen bond donors)와 받개(hydrogen bond acceptors)를 가지며 5.00의 XlogP를 가지고 있다. 다만 분자량이 506.566 Da으로 Lipinski's rule of 5의 기준인 500 Da를 초과하지만 다른 조건들은 모두 충족하고 있다 (23). 또한 위상 극성표면적(topological polar surface area)이 133 \AA^2 이고 회전가능결합(rotatable bonds)이 5개로 경구투여 가능 약물의 확장된 기준도 만족한다 (24). 따라서 쥐 등의 실험동물에서 경구투여를 통한 독성의 확인이 가능할 것으로 판단된다. 동물 실험에서 신장을 통한 약물 배설 등이 확인된다면 퀴놀론 내성 대장균에 의한 요로감염의 치료에 ZINC18057104가 후보 약물로 사용될 수 있는 근거를 확보할 수 있을 것이다.

REFERENCES

- 1) Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2004;2:123-40.

- 2) Sanchez GV, Master RN, Karlowsky JA, Bordon JM. *In vitro* antimicrobial resistance of urinary *E. coli* isolates among U.S. outpatients from 2000 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2181-3.
- 3) Petty NK, Ben Zakour NL, Stanton-Cook M, Skippington E, Totsika M, Forde BM, *et al.* Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:5694-9.
- 4) Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997;61:377-92.
- 5) Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol* 2015; 13:269-84.
- 6) Jean SS, Coombs G, Ling T, Balaji V, Rodrigues C, Mikamo H, *et al.* Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of pathogens causing urinary tract infections in the Asia-Pacific region: Results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART), 2010-2013. *Int J Antimicrob Agents* 2016;47:328-34.
- 7) Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:935-49.
- 8) Sliwoski G, Kothiwale S, Meiler J, Lowe EW Jr. Computational methods in drug discovery. *Pharmacol Rev* 2013;66: 334-95.
- 9) Rose PW, Bi C, Bluhm WF, Christie CH, Dimitropoulos D, Dutta S, *et al.* The RCSB Protein Data Bank: new resources for research and education. *Nucleic Acids Res* 2013;41:D475-82.
- 10) Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 2009;30:2785-91.
- 11) Irwin JJ, Shoichet BK. ZINC—a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model* 2005;45:177-82.
- 12) Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 2010;31:455-61.
- 13) Patel JB, Cockerill FR, Alder J, Bradford PA, Eliopoulos GM, Hardy D, *et al.* Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. CLSI standards for antimicrobial susceptibility testing 2014;34:1-226.
- 14) Solis GM, Petrascheck M. Measuring *Caenorhabditis elegans* life span in 96 well microtiter plates. *J Vis Exp* 2011;49: 2496.
- 15) Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984;22:27-55.
- 16) Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 2014;53:1565-74.
- 17) Gönüllü N, Aktaş Z, Şalcioglu M, Bal C, Anđ Ö. Comparative *in vitro* activities of five quinolone antibiotics, including gemifloxacin, against clinical isolates. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:499-503.
- 18) Morgan-Linnell SK, Becnel Boyd L, Steffen D, Zechiedrich L. Mechanisms accounting for fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:235-41.
- 19) Wohlkonig A, Chan PF, Fosberry AP, Homes P, Huang J, Kranz M, *et al.* Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17:1152-3.
- 20) Pan XS, Gould KA, Fisher LM. Probing the differential interactions of quinazolinone PD 0305970 and quinolones with gyrase and topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3822-31.
- 21) Malik M, Marks KR, Mustaev A, Zhao X, Chavda K, Kerns RJ, *et al.* Fluoroquinolone and quinazolinone activities against wild-type and gyrase mutant strains of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:2335-43.
- 22) Aldred KJ, Schwanz HA, Li G, McPherson SA, Turnbough CL Jr, Kerns RJ, *et al.* Overcoming target-mediated quinolone resistance in topoisomerase IV by introducing metal-ion-independent drug-enzyme interactions. *ACS Chem Biol* 2013;8:2660-8.
- 23) Lipinski CA. Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol* 2004;1:337-41.
- 24) Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem* 2002;45: 2615-23.