



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2020년 2월
석사학위논문

다제내성 *Acinetobacter baumannii*에
대한 C₁₂-prp 펩타이드의 항생효과
평가

조선대학교 대학원

의과학과

이 슬 비

2020년 2월

석사학위논문

다제내성 *Acinetobacter baumannii*에
대한 C₁₂-prp 펩타이드의 항생효과
평가

조선대학교 대학원

의과학과

이 슬 비

다제내성 *Acinetobacter*
*baumannii*에 대한 C₁₂-prp
펩타이드의 항생효과 평가

Assessment of antimicrobial effect of C₁₂-prp peptide
against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*

2020년 2월 25일

조선대학교 대학원

의과학과

이 슬 비

다제내성 *Acinetobacter baumannii*에
대한 C₁₂-prp 펩타이드의 항생효과
평가

지도교수 장 속 진

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2019년 10월

조선대학교 대학원

의과학과

이 슬 비

이슬비의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 박 건 인

위 원 조선대학교 교수 강성호 인

위 원 조선대학교 교수 장속진 인

2019년 11월

조선대학교 대학원

목차

ABSTRACT

I. 서론	1
II. 연구방법	3
A. 연구 대상 균주	3
B. 대상 균주의 배양 및 DNA 추출	3
C. <i>Acinetobacter baumannii</i> 균종 확인용 PCR	3
D. 최소억제농도(Minimum inhibitory concentration, MIC) 측정	4
E. 다중조합살균검사(Multiple combination bactericidal testing, MCBT) 측정	4
F. Time-kill assay	5
III. 결과	7
A. C12-prp의 MIC	7
B. C12-prp와 각종 항생제간 MCBT 결과	7
C. Time-kill assay	7
IV. 고찰	9
V. 참고문헌	18
VI. 감사의 글	21

표 목 차

Table 1. Minimum inhibitory concentration of C₁₂-prp and antimicrobial susceptibility results against 25 XDR clinical isolates in *A. baumannii*12

Table 2. Time-kill assay and synergy against two-drug combinations of C₁₂-prp and colistin of 25 XDR clinical isolates in *A. baumannii*13

Table 3. Time-kill assay and synergy against two-drug combinations of C₁₂-prp and tigecycline in 25 XDR clinical isolates of *A. baumannii*14

Table 4. Time-kill assay and synergy against two-drug combinations of C₁₂-prp and rifampicin of

25 XDR clinical isolates in *A. baumannii*
.....15

**Table 5. Comparison of time-kill assay of Colistin +
C₁₂-prp combination, Tigecycline + C₁₂-prp
combinations, Rifampicin + C₁₂-prp combinations of
25 XDR clinical isolates in *A. baumannii***
.....16

그림 목차

Figure 1. Time-kill analyses of test 4 isolates.

Time-kill analysis was performed only for the strains which showed bactericidal activity with MCBT test 17

ABSTRACT

Assessment of antimicrobial effect of C₁₂-prp peptide against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*

Lee, SeulBi

Adviser: Prof. Jang, Sook-Jin, M.D., Ph.D

**Department of Biomedical Sciences,
Graduate School of Chosun University**

Background: Given the limitations of monotherapy for Extensively drug resistant (XDR) *A. baumannii* strains, urgent need to find out new treatment options such as combination regimen of antibiotics and peptide useful for microbial eradication in patients infected with XDRab strains. we evaluated antimicrobial activity of peptide- antibiotics combinations against XDR *A. baumannii* clinical isolates.

Materials and methods: Twenty-five clinical isolates of extensively drug resistant (XDR) *A. baumannii* were used in this study. Antimicrobial susceptibility results obtained by VITEK II system were used to select XDR *A. baumannii*. We determined minimum inhibitory concentration (MIC) of antimicrobials used for time-kill assay by broth microdilution method. We used multiple-combination bactericidal test (MCBT) to select effective antibiotic candidates among 8 antibiotics including ceftazdime, cepefime, ciprofloxacin, colistin, doxycycline, meropenem, rifampicin, tigecycline. Then we performed time-kill assay of selected peptide-antibiotics combinations to determine synergy

rate of each combination. We used two criteria (criteria 1 and 2) for definition of synergy. The criteria 1 for synergism was defined as $\geq 2 \log_{10}$ CFU/mL reduction with the combination compared with the most active single agent. The criteria 2 for synergism was defined as $\geq 2 \log_{10}$ CFU/mL reduction with the combination compared with the most active single agent and $\geq 2 \log_{10}$ CFU/mL reduction below the initial inoculum at 24 hr.

Result: Among 7 combination of peptide-antibiotics, 3 combination of c12-prp [peptide] + colistin, peptide + rifampicin and peptide + tigecyclin showed higher synergy rate than other combinations. The synergy rates of colistin + C₁₂-prp combination was 96% by synergy criteria 2. the synergy rates of tigecycline + C₁₂-prp combination and rifampicin + C₁₂-prp combination were 100% by criteria 1 and 2 using time-kill assay. c rate of colistin + c12-prp combination, tigecycline + C₁₂-prp combination, and rifampicin + C₁₂-prp combination were 96%, 100%, and 92%, respectively.

Conclusion: Because the rates of c and bactericidalities were very high in colistin + C₁₂-prp combination, tigecycline + C₁₂-prp combination, and rifampicin + C₁₂-prp combination, these combinations might be the good candidates for in vivo assessment of antimicrobial effect.

I. 서론

*Acinetobacter baumannii*는 기회감염균으로 빈번하게 원내감염을 일으키며 다제내성을 보이는 경우가 많아 치료를 위한 적절한 항생제 선택이 어려운 경우가 흔하다 [Peleg., et al. (2008)]. 세계적으로 *A. baumannii* 다약제 내성균주는 2002년 이후 증가하는 추세를 보이고 있다. 최근에는 항생제 치료의 최후의 보루로 여겨지던 colistin에 대해서까지 내성인 균들이 생기는 추세이기 때문에 이러한 항생제 내성을 극복할 수 있는 전략이 시급하다 [Munoz-Price., et al. (2008) ; Cai Y., et al. (2012)].

최근 다양한 항균물질들을 항생제 치료의 보조제로 사용하여 항생제에 대한 감수성을 회복시키거나 항생제와 항균물질들을 병합사용하여 항생효과를 높이는 전략이 모색되고 있다. 항균물질들 중에서도 특히 펩타이드를 사용하여 병합하거나 항생제 보조제로서의 효과에 대한 연구들이 이어지고 있다. 펩타이드는 잠재적 항생제로서 장래성이 좋아서 최근 광범위한 관심을 받고 있다. 일반적으로 펩타이드는 세포막을 주로 공략하기 때문에 광범위한 내성을 야기하지는 않는다. 이런 펩타이드 중에서도 Lipopeptide는 펩타이드에 지질로 연결된 구성 분자를 말한다. 이 lipopeptide의 활성은 일반적으로 원형질막과의 상호작용과 관련이 있으며 원형질막의 스테롤 성분이 이러한 상호작용에서 중요한 역할을 하고 있다. 이러한 lipopeptide에 일정 길이의 지질 그룹을 첨가하면 살균 활동이 증가한다. 일반적으로 첨가하는 지질 그룹은 C10-C12이다. 최근 짧은 길이의 Proline 이 풍부한 Lipopeptide (Proline-Rich Lipopeptide)중 C₁₂-PRP (L-isomer)와 C₁₂-prp (D-isomer)가 다제내성 *Pseudomonas aeruginosa* 균에 대한 minocycline과 rifampin의 항생효과를 증대시켜서 보조제로서 좋은 효과를 보였다고 한다.

C₁₂-PRP가 C₁₂-prp보다 항균효과가 더 좋기는 하나 C₁₂-PRP는 L-amino acid 이어서 L-amino acid peptide bonds를 쉽게 인지하여 분해하는 인간 proteases에 의해 분해되기 쉽다고 여겨지고 있다. 이러한 인간 proteases에 의한 비특이적인 단백질분해효소에 의한 분해를 피하여 혈청내 안정성을 증가시키기 위해 연쇄는 동일하지만 L-amino acids 대신 D-amino acids 를 사용한

D-lipopeptide analog인 C₁₂-prp를 주된 연구대상 약제로 사용하였다 [Domalaon., et al. (2018)]. 다제내성 *A. baumannii*에 의한 감염증을 위한 새로운 치료요법 개발이 시급한 현 시점에서 *P. aeruginosa* 균에 우수한 항균효과를 보였던 이 C₁₂-prp제제가 다제내성 *A. baumannii*에도 좋은 항균효과를 보이는지 확인하고, C₁₂-prp제제와 좋은 병합효과가 있는 항생제 조합을 찾기 위하여 본 연구를 시행하였다.

II. 연구 방법

A. 연구 대상 균주

조선대학교병원 진단검사의학과에서 배양하여 분리된 XDR *A. baumannii* 임상분리주 25주를 대상으로 하였다. 균주의 항생제 감수성검사는 VITEKII 자동분석기(VITEK2, BioMérieux Vitek, USA)로 측정하였고 그 결과를 참고해 XDR 균주를 연구대상 균주로 선별하였다. XDR의 정의는 Magiorakos 등의 논문에 의거하여 2가지 이하의 항생제 category를 제외한 모든 항생제 category에서 1개 이상의 항생제에 대해 비감수성인 균으로 정하였다 [Magiorakos., et al. (2012)].

B. 대상 균주의 배양 및 DNA 추출

A. baumannii 임상분리주들은 혈액한천평판(BAP)에 균주를 획선 도말 후, 37°C 배양기에서 24시간 배양한 후, 다음날 형성된 집락을 취해, Luria-Bertani (LB) 한천 배지에 획선 도말 방법으로 계대 배양하여 37°C 배양기에서 24시간 배양하여, 단일 집락을 취했다. 균 접종을 위해 Mueller Hinton (MH) broth (Difco™ Mueller Hinton Broth (USA), BD) 에 단일 집락을 접종하였으며, 37°C 교반배양기에서 220 rpm으로 24시간 교반배양을 하였다. 다음날 새로운 MH broth 10 mL에 교반배양한 균주 100 μL (1%)를 균 접종 후, 3시간동안 추가로 교반배양하였다 [Fernando., et al. (2012)].

3시간 교반배양 후, 4,000 rpm으로 15분간 원심분리 한 후에 얻은 pellet을 Phosphate buffer saline (PBS) 200 μL에 부유하였다. 이를 genomic DNA extraction Kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 시약사용설명서에 따라 genomic DNA를 추출하였다.

C. *Acinetobacter baumannii* 균종 확인용 PCR

VITEKII 자동분석기를 통해 *A. baumannii* 로 동정된 임상분리주들은 PCR 기법을 사용해 *A. baumannii* 종이 맞는지 확인하였다. 실험에 사용한 PCR 기법은 blaOXA-51-like PCR과 higgins PCR이었고 각각의 임상분리주에서 추출한 genomic DNA를 template DNA로 사용하여 PCR (CFX-96™ real-time system, Bio-Rad, Korea)을 수행하였다.

blaOXA-51-like PCR은, 95°C에서 5분 pre-denaturation 후, 95°C에서 25초간 denaturation, 55°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 45초간 extension하는 3단계를 30회 반복하였고, 72°C에서 7분간 post-extension시켰다. [Feizabadi., et al. (2008)]. Higgins PCR은 98°C에서 3분 동안 denaturation 후, 98°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 30초간 annealing, 72°C 45초간 extension하는 3단계를 40회 동안 반복하였고, 72°C 5분간 post-extension시켰다 [Higgins., et al. (2007)].

증폭된 PCR 산물은 2% agarose gel을 이용하여 전기영동 후, Image analysis system (Digital Image stocker DS-100, ToYoBo, Japan)으로 확인하였다. blaOXA-51-like PCR 산물 크기가 353 bp이고, Higgins PCR에서 200 bp와 400 bp 길이의 증폭산물이 함께 나올 때 균종을 *A. baumannii* 로 판단하였다.

D. 최소억제농도(Minimum inhibitory concentration, MIC) 측정

*A. baumannii*에 대해 C₁₂-prp 펩타이드의 항생효과를 평가하기 위해 broth dilution method를 사용하여 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline에 따라 MIC를 측정하였다. [CLSI., (2018)]. 계대배양한 균주의 단일 집락을 취해 MH 액체배지에 접종하여 37°C에서 24시간동안 배양하였다. 다음날 새로운 MH 액체배지에 교반배양한 균액 100 μL (1%)를 균 접종 후, 3시간동안 추가로 교반배양하였다. 교반배양한 균액의 O.D₆₀₀값을 측정한 후

1×10^6 CFU/mL으로 균을 준비한다. [Swenson., et al. (2004)] MIC 측정에 사용한 항생제의 농도는 C₁₂-prp(1,2,4,8,16,32,64,128 μ g/mL)을 사용하였다. MIC는 항생 물질의 최소 억제 농도를 측정하는 방법으로 하룻밤 배양한 후 균의 성장을 보이지 않는 최소 희석 배수를 MIC로 정의하였다.

E. 다중조합살균검사(Multiple combination bactericidal testing, MCBT) 측정

연구대상 균주 25주의 MIC₅₀값의 1/4와 1/8에 해당하는 16 μ g/mL, 32 μ g/mL의 C₁₂-prp를 약제의 혈청 도달가능 농도(achievable serum drug concentration)의 ceftazidime, cepefime, ciprofloxacin, colistin, doxycycline, meropenem, rifampicin, tigecycline과 병합하여 균의 성장을 가장 잘 억제시키는 조합을 찾아 선택하였다.

MH broth에서 MIC와 동일한 방법으로 24시간 교반배양한 균액을 1%가 되도록 새로운 MH broth에 접종하여 3시간동안 추가로 교반배양하였다. OD₆₀₀값을 측정하여 균수를 계산하고 1×10^6 CFU/mL만큼 맞춰서 준비하였다. 이때 균액의 최종농도는 5×10^5 CFU/mL이 되게 맞춰주었다.

Broth에서 균의 성장을 보이지 않는 well의 균액을 선택해 MH agar plate에 10 μ l씩 접종한 후 37°C에서 배양해준 후 집락수 산정(viable counting)을 하여 colony가 생성되지 않는 조합의 항생제를 선택하였다 [Slinger R., et al. (2006) ; Slinger., et al. (2006)].

F. Time-kill assay

Time-kill assay 에서 검사한 조합은 C₁₂-prp + colistin, C₁₂-prp + tigecycline, C₁₂-prp + rifampicin 이다. C₁₂-prp 의 농도는 앞서 측정한 MIC 농도 1/4에 해당되는 32 μ g/mL 을 사용하였고 colistin, tigecycline, rifampicin 의 항생제는 혈청도달가능 농도인 2 μ g/mL 를 사용하였다. 최종 농도가 1×10^6 CFU/mL 이 되게 MH 액체배지에 접종하였다. 10mL 의 MH 액체배지가 담긴 tube 에

최종 균 농도가 1×10^6 CFU/mL 이 되게 준비한 다음 37°C에서 교반배양 하였다. 배양한 균액을 꺼내 희석한 후 10 μ L 씩 취해 MH 한천배지에 접종한 후 24시간 뒤 집락수를 세어주었다.

상승효과의 판단은 연구자마다 다른 기준을 쓰는 경향이 있어, 서로 방법이 다른 논문들의 결과를 함께 비교하기 어려운 경우가 있기 때문에, 상승효과에 대해 흔히 사용되고 있는 두 가지 기준(기준1과 기준2)을 적용하여 각각 판정하였다. 기준1(criteria 1)은 24시간 배양 후, 가장 활성이 높은 단독약제 처리조건에서 자란 균수보다 병합제 처리조건에서 자란 균수가 $2 \log_{10}$ CFU/mL 이상 감소한 경우를 상승효과로 정의하였다. 기준2(criteria 2)는 상승효과의 기준1을 만족하면서, 24시간 배양 후 집락수가 최초 균점종량보다 $2 \log_{10}$ CFU/mL 이상 감소한 경우를 상승효과로 정의하였다. 무관(indifferent)은 균 수가 $2 \log_{10}$ CFU/mL 미만으로 증가 또는 감소했을 경우이며, 길항효과(antagonistic)는 $2 \log_{10}$ CFU/mL 이상으로 증가한 경우로 정의하였다. 각각의 균주에 대해 기준1과 기준2를 모두 적용하여 상승효과율(synergy rate)을 산출, 비교하였다. 최초 균 점종량보다 24시간 배양 후 균 수가 $3 \log_{10}$ CFU/mL 이상 감소했을 때 살균력이 있다고 판정하였다 [Principe., et al. (2013)].

III 결과

A. *A. baumannii*에 대한 C12-prp 의 MIC

연구대상 균주 25주의 C₁₂-prp에 대한 MIC는 25주 중 12주에서 128 µg/mL 이었고, 13주는 128 µg/mL 이상이었다. C₁₂-prp의 MIC₅₀은 128 µg/mL, MIC₉₀은 128 µg/mL이었다(Table1).

B. *A. baumannii*에 대한 C12-prp와 각종 항생제간 MCBT

연구대상 *A. baumannii* 25주에 대해 ceftazdime, cepefime, ciprofloxacin, colistin, doxycycline, meropenem, rifampicin, tigecycline으로 구성된 8개의 항생제를 C₁₂-prp와 각각 병합하여 MCBT 방법으로 병합 효과를 확인하였다.

MCBT에 사용한 항생제의 농도는 혈청 도달 가능 농도를 사용하였고 균 사멸이 관찰된 조합은 C₁₂-prp + colistin, C₁₂-prp + tigecycline, C₁₂-prp + rifampicin이었다. 나머지 5개의 조합에서는 균 사멸이 일어나지 않았다. MCBT 결과에서 균 사멸이 관찰된 3가지 조합으로 time-kill assay를 진행하였다.

C. Time-kill assay

C₁₂-prp 를 단독으로 쓸 경우 연구대상 *A. baumannii* 25주 모두가 잘 자라서 C₁₂-prp 가 균의 성장에 영향을 미치지 않았다. 혈청도달가능농도의 항생제를 단독으로 쓸 경우 colistin 과 rifampicin 은 균 성장을 억제시키나 사멸시키진

않았고, tigecycline 은 균 성장을 상당히 억제시켰으나 사멸시키진 않았다. C₁₂-prp 와 항생제 각각을 조합했을 때의 결과는 C₁₂-prp + colistin 조합은 기준 1의 상승효과 판정을 적용할 경우 25주 중 25주 (100%)가 상승효과를 보였지만 기준 2의 상승효과 판정에서는 25주 중 24주 (96%)가 상승효과를 보였으며 antagonism 은 보이지 않았다. 또한 살균력을 보이는 균주는 25주 중 24주 (96%)였다(Table2).

C₁₂-prp + tigecycline 의 경우 기준 1의 상승효과 판정을 적용할 경우 25주 모두(100%)가 상승효과를 보였고 기준 2의 상승효과 판정에서도 25주 (100%)가 모두 상승효과를 보였으며 antagonism 은 보이지 않았다. 또한 25주 (100%)가 살균력을 보였다(Table3).

C₁₂-prp + rifampicin 의 경우 기준 1의 상승효과 판정을 적용할 경우 25주 모두(100%)가 상승효과를 보였고 기준 2의 상승효과 판정에서도 25주 (100%)가 모두 상승효과를 보였으며 antagonism 은 보이지 않았다. 또한 23주 (92%)가 살균력을 보였다(Table4) (Table5).

대표로 선택된 4개 임상 균주에 대해서는 time-kill curve 를 측정하였다(Figure1).

IV. 고 찰

본 연구에서 25주의 XDR *A. baumannii* 임상분리주를 대상으로 C12-prp와 3가지 항생제를 각각 병합했을 때 상승효과율은 96~100%로 매우 높았다. 살균력을 보인 비율은 단독으로 사용했을 때는 낮았으나 C12-prp와 항생제와 병합했을 경우 92~100%로 매우 높았다.

펩타이드는 광범위한 항생 spectrum을 가지고 있으면서도 통상적인 항생제에 대한 전형적인 내성기전에 영향을 받지 않는 장점이 있어[*das Neves., et al. (2019)*] 새로운 치료 전략 개발에 자주 활용될 가능성이 있다. 그러나 체내에서 인체내 분해 효소 등에 의해 신속히 소멸되고 합성시 비용이 높은 단점이 있다. 또한 체외실험에서 효과가 있었더라도 체내에서 효과를 연구해보았을 때 유의한 차이를 나타내지 못했다는 연구결과들도 있다.[*das Neves., et al. (2019)*]

본 연구에서 높은 항생 활성을 보인 C12-prp는 프로린이 풍부한 짧은 길이의 펩타이드(short proline-rich lipopeptides, SPRLPs)이다. 프로린이 풍부한 항미생물성 펩타이드(Proline-rich antimicrobial peptides, PRAMPs)는 양이온 항미생물성 펩타이드(amphiphilic cationic peptides)이다 [*Domalaon., et al. (2018)*]. 양이온 항미생물성 펩타이드는 최근 잠재적 항생제로서 잠재성이 좋아서 광범위한 관심을 받아왔다. 양이온 항미생물성 펩타이드는 전형적으로 양친매성의 구조를 보여서 음전하를 띤 세균막과 상호작용이 증가하게 된다. 항생 펩타이드는 세포원형질막이나 세포벽의 지질과 주로 작용하여 막 투과성을 높이고 세포 용해나 사멸을 초래한다. lipid monolayer와 항생 펩타이드의 상호작용은 펩타이드 응집(aggregation)을 야기하여 구멍들을 형성하게 하거나, lipid와 펩타이드가 연합하여 도넛모양의 구멍(toroidal pore)들을 형성하게 하거나, 막을 직접 파괴(disruption)할 수 있다. [*das Neves., et al. (2019)*]. 펩타이드가 세포막에 작용할 뿐만 아니라 세포벽에 작용할 수도 있고 단백질 접힘(folding)이나 효소 활성을 억제하거나 세포내 작용을 할 수도 있다고 알려져 있다. [*Bechinger., et al. (2017)*]. 본 연구에서 C12-prp와 3가지 항생제를 각각 병합했을 때 상승효과율과 살균력을 보인 비율이 매우 높았던 것에는 이러

한 항생 펩타이드의 다양한 작용이 기여했을 것으로 생각된다. 이렇게 항생 펩타이드와 항생제를 병합할 때 상승효과가 나타날 수 있고 항생 펩타이드가 항생제에 보조제로 작용하여 항생제의 감수성을 재회복시키는 현상도 나타나기 때문에 이를 새로운 치료 전략으로 개발하고자 하는 연구들이 이어지고 있다.

Domalaon 등이 일련의 short proline-rich lipopeptides (SPRLPs)를 합성하여 항생효과를 조사한 결과 MDR 또는 XDR *P. aeruginosa* 균주에서 이들 SPRLPs들이 minocycline과 rifampin의 MIC 값을 감수성 breakpoints 이하로 떨어뜨려서 항생효과를 증진시키는 것이 밝혀졌다. 이러한 보조제로서의 효력 (adjuvant potency)은 연구한 여러 SPRLPs중에서 C12-PRP에서 가장 좋았으며 D 형태의 거울상 이성체인 C12-prp에서도 보조 항생효과가 나타났다 [Domalaon., et al. (2018)]. 이들이 연구한 균이 *P. aeruginosa*라 *A. baumannii*로 연구한 본 연구 결과를 바로 비교하기는 어렵겠지만 그래도 두 연구에서 SPRLPs 펩타이드의 항생효과가 나타난 점은 유사하였다.

본 연구와 다른 대상균주나 펩타이드, 또는 항생제를 조합한 연구들에서도 펩타이드가 항균 작용을 보이거나 보조약으로 항생제의 효과를 회복시켰다는 보고들이 이어지고 있다. 예를 들면 branched peptide인 B2088가 lipid A에 결합하여 LPS의 supramolecular organization 을 파괴한다는 것이 확인되었고, 온전한 세균 안에서 외막이 파괴된 것이 형광발광 분광학(fluorescence spectroscopy)으로 관찰되었다. B2088과 다양한 항생제를 병합시 강하거나 중간 정도의 상승효과가 있음이 checkerboard assays로 확인되었다. B2088과 항생제조합의 상승효과의 potency는 time-kill kinetics와 mammalian cell culture infections model 및 bacterial keratitis의 in vivo model에서 더 확인되었다 [Lakshminarayanan., et al. (2016)].

XDR *Acinetobacter baumannii*에 polymyxin B에서 파생된 펩타이드인 SPR741의 효과가 좋다는 것도 밝혀져 있다 [Zurawski., et al. (2017)]. polymyxin B class의 항생제와 연관된 신독성을 최소화하기 위해 고안된 SPR741은 그람음성균의 막을 투과하게 해주는 항생제 보조제(antibiotic adjuvant)이다. XDR *A. baumannii* strain인 AB5075을 대상으로 standard in vitro assays 와 murine pulmonary model로 실험했을 때 SPR741-rifampin 병합제가 세균 부담을 현저히 감소시키고 활동성 감염인데도 동물의 생존을 증

진시키는 것이 관찰되었다 [Zurawski., et al. (2017)].

전체적으로 볼 때, 다제내성 Gram-음성 세균감염을 치료할 새로운 치료제 개발이 시급히 요구되고 있는 현실에서 이와 같은 항생효과를 나타내고 있는 펩타이드는 새로운 치료전략 개발의 자원으로 부상하는 것으로 여겨진다. 직접 세균을 사멸시키는 항생제에 추가하여 기존 항생제에 대한 내성병원균의 감수성을 증가시킬 수 있는 보조제로 개발되어 널리 연구되고 있다. 세균막을 파괴하는 보조제는 막을 통과할 수 없었던 항생제의 세포내 투과성을 증가시켜서 항생제의 감수성을 회복시킬 수 있을 것이다. 결론적으로 본 연구에서 확인된 C12-prp와 colistin, tigecycline, rifampicin의 조합은 매우 높은 상승효과를 보였기 때문에 항생제와 병합하여 상승효과를 보이는 좋은 펩타이드-항생제 조합을 발굴하는 것은 임상적 치료전략을 풍부하게 해줄 수 있는 한 대안이 될 것이라고 생각된다. 그러므로 향후 여러 다제 내성균을 대상으로 다양한 항생제나 항생물질간 조합에 대해 다양한 방법으로 병합시험을 시행하여 그 효과를 평가하여 우수한 조합을 발굴할 필요가 있다고 본다.

Table 1. Minimum inhibitory concentration of C₁₂-prp and antimicrobial susceptibility results against 25 XDR clinical isolates in *A. baumannii*

Isolate s	MIC of C ₁₂ -p rp(μg /mL)	SAM	ATM	FEP	CTX	CAZ	TGC	CIP	GEN	IPM	PIP	TZP	TIM	TMP/S MX	CST	MEM	MIN
321-21	128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
321-45	>128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
321-63	>128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
321-79	128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I
321-87	>128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
321-93	128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
322-18	>128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
322-19	128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I
322-23	128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
322-45	128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
322-49	>128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
322-94	128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
323-21	128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
323-52	>128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
323-74	128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
324-45	>128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
324-77	128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
325-51	>128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
325-74	>128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
326-77	128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I
326-79	>128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
327-62	128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
327-69	>128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
327-75	>128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
327-88	>128	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S

*MIC, minimum inhibitory concentration; SAM, Ampicillin/Sulbactam; ATM, Aztreonam; FEP, Cefepime; CTX, Cefotaxime; CAZ, Ceftazidime; IPM, Imipenem; MEM, Meropenem; CIP, Ciprofloxacin; GEN, Gentamicin; PIP, Piperacillin; TZP, Piperacillin/Tazobactam; TIM, Ticarcillin/Clavulanic acid; TMP/SMX, Trimethoprim/Sulfamethoxazole; CST, Colistin; MIN, Minocycline; TGC, Tigecycline; TOB, Tobramycin; TET, Tetracycline

Table 2. Time-kill assay and synergy against two-drug combinations of C₁₂-prp and colistin of 25 XDR clinical isolates in *A. baumannii*

Bacterial strain	VC at 24hr			(VC combination - VC _{MASA}) at 24hr	Synergy	VC24 hr - VC0 hr	Synergy	Bactericidalities		
	C ₁₂ -prp	Colistin†	Colistin + C ₁₂ -prp		criteria 1‡	Colistin + C ₁₂ -prp	criteria 2§	C ₁₂ -prp	Colistin†	Colistin + C ₁₂ -prp
321-21	10.88	8.32	0.00	-8.32	S	-6.69	S	NB	NB	B
321-45	10.84	9.10	0.00	-9.10	S	-6.87	S	NB	NB	B
321-63	10.71	7.82	0.00	-7.82	S	-5.97	S	NB	NB	B
321-79	10.65	7.60	0.00	-7.60	S	-5.91	S	NB	NB	B
321-87	10.82	7.90	3.12	-4.78	S	-2.76	S	NB	NB	B
321-93	10.86	7.67	0.00	-7.67	S	-5.92	S	NB	NB	B
322-18	10.88	8.23	3.56	-4.66	S	-3.17	S	NB	NB	B
322-19	10.64	8.17	0.00	-8.17	S	-6.79	S	NB	NB	B
322-23	10.67	7.71	0.00	-7.71	S	-5.59	S	NB	NB	B
322-45	10.44	7.85	0.00	-7.85	S	-5.44	S	NB	NB	B
322-49	10.84	7.81	0.00	-7.81	S	-5.65	S	NB	NB	B
322-94	10.88	7.74	3.88	-3.85	S	-1.77	I	NB	NB	NB
323-21	10.80	7.52	0.00	-7.52	S	-6.85	S	NB	NB	B
323-52	10.94	9.23	0.00	-9.23	S	-6.66	S	NB	NB	B
323-74	10.57	8.08	0.00	-8.08	S	-6.37	S	NB	NB	B
324-45	10.93	8.82	0.00	-8.82	S	-5.71	S	NB	NB	B
324-77	11.01	7.72	0.00	-7.72	S	-5.59	S	NB	NB	B
325-51	10.90	7.95	0.00	-7.95	S	-5.75	S	NB	NB	B
325-74	10.91	7.72	0.00	-7.72	S	-5.92	S	NB	NB	B
326-77	10.79	7.62	0.00	-7.62	S	-5.95	S	NB	NB	B
326-79	10.71	8.58	0.00	-8.58	S	-5.91	S	NB	NB	B
327-62	10.76	7.72	0.00	-7.72	S	-5.90	S	NB	NB	B
327-69	10.65	6.64	0.00	-7.53	S	-5.93	S	NB	NB	B
327-75	10.78	7.41	0.00	-7.41	S	-5.67	S	NB	NB	B
327-88	10.65	6.64	0.00	-6.64	S	-5.94	S	NB	NB	B

* C₁₂-prp 1/4 MIC; †Colistin 2 µg/mL; ‡≥2 log₁₀ CFU/mL reduction with the combination compared with the most active single agent at 24 hr; §≥2 log₁₀ CFU/mL reduction with the combination compared with the most active single agent at 24 hr and ≥2 log₁₀ CFU/mL reduction below the initial inoculum at 24 hr; Abbreviations: B, bactericidal; N, non-bactericidal; XDR, extensively drug-resistant; S, synergy; I, Indifference; VC, viable count, MASA, most active single agent.

Table 3. Time-kill assay and synergy against two-drug combinations of C₁₂-prp and tigecycline in 25 XDR clinical isolates of *A. baumannii*

Isolates	VC at 24hr			(VC combination - VC _{MASA}) at 24hr	Synergy	VC24 hr - VC0 hr	Synergy	Bactericidalities		
	C ₁₂ -prp	Tigecycline†	Tigecycline + C ₁₂ -prp		criteria 1‡	Tigecycline + C ₁₂ -prp	criteria 2§	C ₁₂ -prp	Tigecycline†	Tigecycline + C ₁₂ -prp
321-21	10.88	2.94	0.00	-2.94	S	-6.69	S	B	NB	B
321-45	10.84	4.97	0.00	-4.97	S	-6.87	S	NB	NB	B
321-63	10.71	7.93	0.00	-5.41	S	-5.97	S	NB	NB	B
321-79	10.65	3.80	0.00	-3.80	S	-5.91	S	NB	NB	B
321-87	10.82	2.89	0.00	-2.89	S	-5.88	S	B	NB	B
321-93	10.86	5.33	0.00	-5.33	S	-5.92	S	NB	NB	B
322-18	10.88	4.78	0.00	-4.78	S	-6.74	S	NB	NB	B
322-19	10.64	4.58	0.00	-4.58	S	-6.79	S	NB	NB	B
322-23	10.67	6.65	0.00	-6.65	S	-5.59	S	NB	NB	B
322-45	10.44	5.95	3.30	-5.95	S	-5.44	S	NB	NB	B
322-49	10.84	4.09	0.00	-4.09	S	-5.65	S	NB	NB	B
322-94	10.88	4.88	0.00	-4.88	S	-5.66	S	NB	NB	B
323-21	10.80	3.56	0.00	-3.56	S	-6.85	S	NB	NB	B
323-52	10.94	4.78	0.00	-4.78	S	-6.66	S	NB	NB	B
323-74	10.57	5.66	0.00	-5.66	S	-6.37	S	NB	NB	B
324-45	10.93	8.82	0.00	-5.78	S	-5.71	S	NB	NB	B
324-77	11.01	5.24	0.00	-5.24	S	-5.59	S	NB	NB	B
325-51	10.90	6.27	0.00	-6.27	S	-5.75	S	NB	NB	B
325-74	10.91	3.36	0.00	-3.36	S	-5.92	S	NB	NB	B
326-77	10.79	7.63	0.00	-5.30	S	-5.95	S	NB	NB	B
326-79	10.71	4.46	0.00	-4.46	S	-5.91	S	NB	NB	B
327-62	10.76	5.40	0.00	-5.40	S	-5.90	S	NB	NB	B
327-69	10.65	4.73	0.00	-4.91	S	-5.93	S	NB	NB	B
327-75	10.78	4.56	0.00	-4.56	S	-5.67	S	NB	NB	B
327-88	10.65	4.73	0.00	-4.73	S	-5.94	S	NB	NB	B

* C₁₂-prp 1/4 MIC; † tigecycline 2 µg/mL; ‡ ≥2 log₁₀ CFU/mL reduction with the combination compared with the most active single agent at 24 hr; § ≥2 log₁₀ CFU/mL reduction with the combination compared with the most active single agent at 24 hr and ≥2 log₁₀ CFU/mL reduction below the initial inoculum at 24 hr; Abbreviations: B, bactericidal; N, non-bactericidal; XDR, extensively drug-resistant; S, synergy; I, Indifference; VC, viable count, MASA, most active single agent.

Table 4. Time-kill assay and synergy against two-drug combinations of C₁₂-prp and rifampicin of 25 XDR clinical isolates in *A. baumannii*

Isolates	VC at 24hr			(VC combination - VC _{MASA}) at 24hr	Synergy	VC 24hr - VC 0hr	Synergy	Bactericidal		
	C ₁₂ -prp	Rifampicin†	Rifampicin + C ₁₂ -prp		criteria 1‡	Rifampicin + C ₁₂ -prp	criteria 2§	C ₁₂ -prp	Rifampicin†	Rifampicin + C ₁₂ -prp
321-21	10.88	7.81	0.00	-7.81	S	-6.69	S	NB	NB	B
321-45	10.84	7.51	0.00	-7.51	S	-6.87	S	NB	NB	B
321-63	10.71	7.93	0.00	-7.93	S	-5.97	S	NB	NB	B
321-79	10.65	7.73	0.00	-7.73	S	-5.91	S	NB	NB	B
321-87	10.82	7.61	0.00	-7.61	S	-5.88	S	NB	NB	B
321-93	10.86	7.77	0.00	-7.77	S	-5.92	S	NB	NB	B
322-18	10.88	7.20	2.00	-5.20	S	-4.74	S	NB	NB	B
322-19	10.64	6.80	0.00	-6.80	S	-6.79	S	NB	NB	B
322-23	10.67	7.96	0.00	-7.96	S	-5.59	S	NB	NB	B
322-45	10.44	7.82	3.30	-4.52	S	-2.14	S	NB	NB	NB
322-49	10.84	6.82	0.00	-6.82	S	-5.65	S	NB	NB	B
322-94	10.88	7.86	0.00	-7.86	S	-5.66	S	NB	NB	B
323-21	10.80	6.73	0.00	-6.73	S	-6.85	S	NB	NB	B
323-52	10.94	8.08	0.00	-8.08	S	-6.66	S	NB	NB	B
323-74	10.57	7.61	3.67	-3.94	S	-2.70	S	NB	NB	NB
324-45	10.93	7.95	0.00	-7.95	S	-5.71	S	NB	NB	B
324-77	11.01	8.38	0.00	-8.38	S	-5.59	S	NB	NB	B
325-51	10.90	8.02	0.00	-8.02	S	-5.75	S	NB	NB	B
325-74	10.91	7.56	0.00	-7.56	S	-5.92	S	NB	NB	B
326-77	10.79	7.63	0.00	-7.63	S	-5.95	S	NB	NB	B
326-79	10.71	7.77	0.00	-7.77	S	-5.91	S	NB	NB	B
327-62	10.76	7.53	0.00	-7.53	S	-5.90	S	NB	NB	B
327-69	10.65	7.19	0.00	-7.47	S	-5.93	S	NB	NB	B
327-75	10.78	7.90	0.00	-7.90	S	-5.67	S	NB	NB	B
327-88	10.65	7.19	0.00	-7.19	S	-5.94	S	NB	NB	B

* C₁₂-prp 1/4 MIC; † rifampicin 2 µg/mL; ‡ ≥2 log₁₀ CFU/mL reduction with the combination compared with the most active single agent at 24 hr; § ≥2 log₁₀ CFU/mL reduction with the combination compared with the most active single agent at 24 hr and ≥2 log₁₀ CFU/mL reduction below the initial inoculum at 24hr; Abbreviations: B, bactericidal; N, non-bactericidal; XDR, extensively drug-resistant; S, synergy; I, Indifference; VC, viable count, MASA, most active single agent.

Table 5. Comparison of time-kill assay of Colistin + C₁₂-prp combination, Tigecycline + C₁₂-prp combinations, Rifampicin + C₁₂-prp combinations of 25 XDR clinical isolates in *A. baumannii*

Combination of antibiotics	Colistin + C ₁₂ -prp	Tigecycline + C ₁₂ -prp	Rifampicin + C ₁₂ -prp
Synergy (criteria 1)	25 (100)	25 (100)	25 (100)
Synergy (criteria 2)	24 (96)	25 (100)	25 (100)
Indifference	1 (4)	0 (0)	0 (0)
Antagonism	0 (0)	0 (0)	0 (0)
bactericidal activity	24 (96)	25 (100)	23 (92)

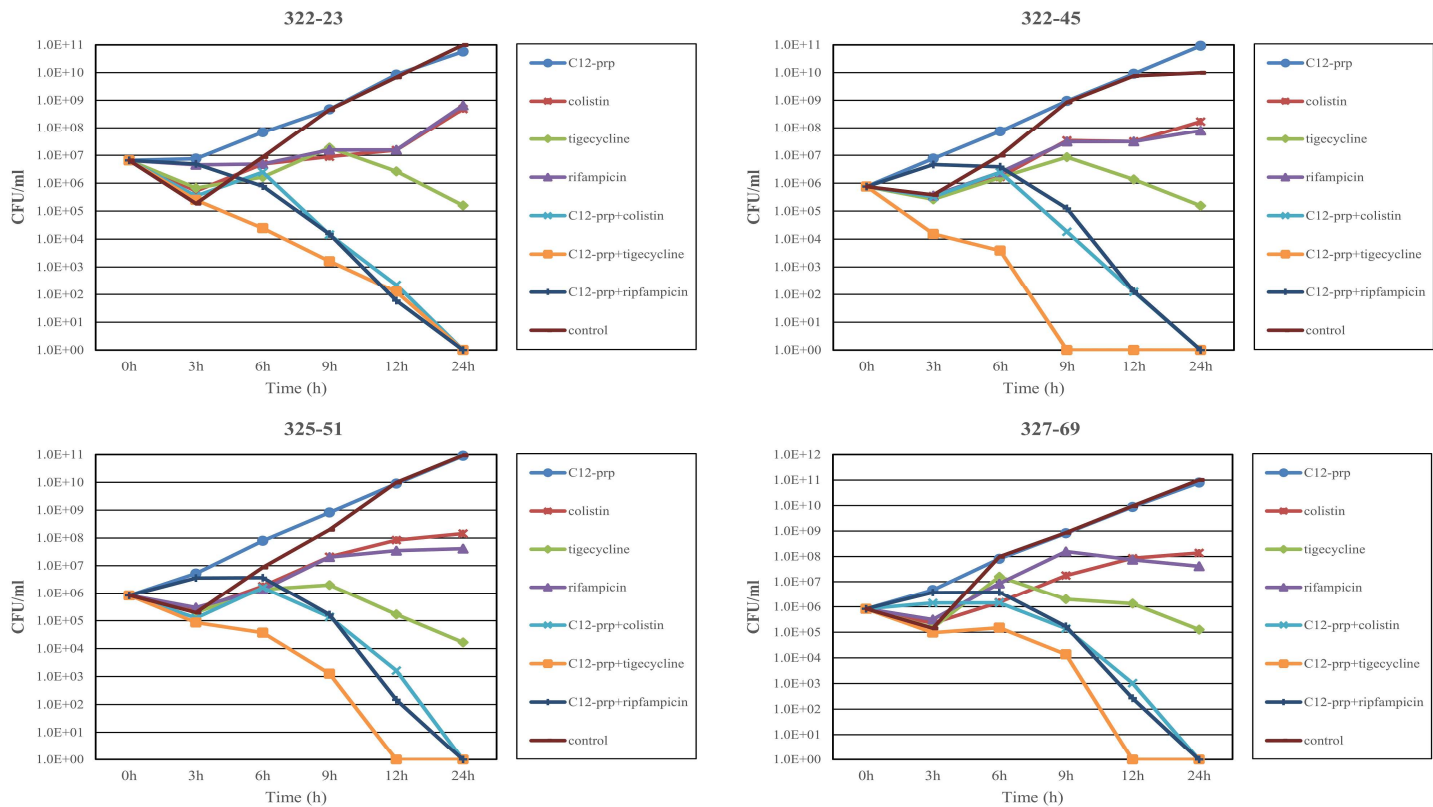


Figure 1. Time-kill analyses of test 4 isolates. Time-kill analysis was performed only for the strains which showed bactericidal activity with MCBT test. The log₁₀ decreases in colony counts at 24 h with the C₁₂-prp and antimicrobial combination compared to the most active single agent(MASA) are represented for each combination.

V. 참고문헌

Bechinger B and Gorr SU. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. J Dent Res 2017;96:254-60.

Bechinger B and Gorr SU. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. J Dent Res 2017;96:254-60.

Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. J Antimicrob Chemother 2012;67:1607-15.

das Neves RC, Mortari MR, Schwartz EF, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP. Antimicrobial and Antibiofilm Effects of Peptides from Venom of Social Wasp and Scorpion on Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Toxins (Basel) 2019;11:216.

Domalaon R, Sanchak Y, Koskei LC, Lyu YF, Zhanel GG, Arthur G, et al. Short Proline-Rich Lipopeptide Potentiates Minocycline and Rifampin against Multidrug- and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2018;62:e02374-17.

Feizabadi M, Fathollahzadeh B, Taherikalani M, Rasoolinejad M, Sadeghifard N,

Aligholi M, et al. Antimicrobial susceptibility patterns and distribution of blaOXA genes among *Acinetobacter* spp. Isolated from patients at Tehran hospitals. 2008;61:274-8.

Higgins PG, Wisplinghoff H, Krut O, Seifert H. A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:1199-201.

Lakshminarayanan R, Tan WX, Aung TT, Goh ET, Muruganatham N, Li J, et al. Branched Peptide, B2088, Disrupts the Supramolecular Organization of Lipopolysaccharides and Sensitizes the Gram-negative Bacteria. *Sci Rep* 2016;6:25905.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268-81.

Munoz-Price LS and Weinstein RA. *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med* 2008;358:1271-81.

Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:538-82.

Principe L, Capone A, Mazzarelli A, D'Arezzo S, Bordi E, Di Caro A, et al. In Vitro Activity of Doripenem in Combination with Various Antimicrobials Against

Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*: Possible Options for the Treatment of Complicated Infection. *Microb Drug Resist* 2013;19:407-14.

Saginur R, Stdenis M, Ferris W, Aaron SD, Chan F, Lee C, et al. Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:55-61.

Slinger R, Chan F, Ferris W, Yeung SW, St Denis M, Gaboury I, et al. Multiple combination antibiotic susceptibility testing of nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;56:247-53.

Swenson JM, Killgore GE, Tenover FC. Antimicrobial susceptibility testing of *Acinetobacter* spp. by NCCLS broth microdilution and disk diffusion methods. *J Clin Microbiol* 2004;42:5102-8.

Zurawski DV, Reinhart AA, Alamneh YA, Pucci MJ, Si Y, Abu-Taleb R, et al. SPR741, an Antibiotic Adjuvant, Potentiates the In Vitro and In Vivo Activity of Rifampin against Clinically Relevant Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61:e01239-17.

VI. 감사의 글

처음 연구실에 들어온 게 엇그제 같은데 벌써 졸업할 시기가 되었다니 감회가 새롭습니다. 학위 과정 동안 많은 도움을 주신 고마운 분들께 짧게 감사의 글을 남기려고 합니다.

먼저, 저를 격려로 꾸준히 이끌어주시고 어려울 땐 항상 도와주신 장숙진 교수님께 감사드립니다. 늘 저를 지켜봐주시며 올바른 길로 이끌어주셔서 학위를 무사히 마칠 수 있게 되었습니다. 또, 부족하지만 제 논문을 심사해주신 강성호 교수님, 박건 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 제가 궁금한 게 생기거나 막히는 일이 생기면 항상 도움을 주시는 김춘미 교수님, 김동민 교수님. 모두 감사드립니다.

학위 과정 중 저를 도와주신 연구실 식구들에게도 감사의 인사를 전합니다. 모르는 게 있을 때 언제든지 알려주시는 성연 박사님, 활기찬 성격으로 낮가리는 저에게 먼저 다가와서 챙겨주시던 수지 선생님, 항상 도와주시던 가영 선생님, 대륜 선생님 모두 모두 감사합니다. 또 같이 학위를 시작해 같이 마무리를 하게 된 동재 선생님께도 감사의 인사를 전합니다.

중학생 때부터 지금까지 항상 언니 같이 날 챙겨주던 희진이, 다정한 규리, 귀여운 윤정이. 나랑 잘 맞고 내가 말하면 웃어주는 경난이도 정말 고마워. 너희들이 있어서 지금까지 잘 버틸 수 있었던 것 같아.

마지막으로 학위 기간 동안 제가 잘 버티게 지지해준 우리 가족에게도 감사의 인사를 전합니다. 저를 믿고 지켜봐주신 엄마, 아빠가 있어 포기하지 않고 열심히 끝낼 수 있었던 것 같아요. 항상 사랑하고 감사합니다. 때로는 동생 같은 단비, 맨날 나 보면 장난치는 환희, 승원이 모두모두 고마워. 항상 나부터 걱정해주는 할머니, 항상 유쾌한 이모와 삼촌. 정말 정말 감사합니다.

짧은 글로 다 전해지지는 않겠지만 저에게 힘이 되어 주신 모든 분들께 다시 한 번 감사의 인사를 전합니다.

소중한 경험을 바탕으로 앞으로도 더욱 노력하며 성장하겠습니다.