

새로운 베타락탐 항생물질의 합성과 생물활성에 관한 연구

宋泰興* · 金永浩

세종대학교 자연과학대학 화학과

(1991. 8. 29 접수)

Studies on the Synthesis and Antibacterial Activity of New β -Lactam Antibiotics

Tae Heung Song* and Young Ho Kim

Department of Chemistry, King Se-jong University, Seoul 133-150, Korea

(Received August 29, 1991)

요 약. 신규 cephalosporin계 항생제로서, 7-[(Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-oxyiminoacetamido]-3-(4,6-diamino-1-alkyl-1,3,5-triazin-2-yl)thiomethyl-3-cephem-4-carboxylate의 유도체들을 합성하였다. 7-위치의 side chain에 있는 oxyimino 부위를 변화시켜서, 구조 변화에 따른 항균 활성의 변화를 측정하였다. 그 결과, 3-위치에서 4,6-diamino-1-methyl-1,3,5-triazin-2-yl group을 가지며, 또한 7- α -methoxyimino기를 가진, C-1 유도체가 가장 강력하고도 광범위한 항균활성을 그람 양성균과 그람 음성 bacteria에 대하여 나타내었다.

ABSTRACT. The synthesis of a series of 7-[(Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-oxyiminoacetamido]-3-(4,6-diamino-1-alkyl-1,3,5-triazin-2-yl)thiomethyl-3-cephem-4-carboxylates is described. Variations of an oxyimino moiety in the 7-side chain and quaternary ammonium moiety in the 3-side chain were examined and structure-activity relationship was studied. The 4,6-diamino-1-methyl-1,3,5-triazin-2-yl derivative of the 7- α -methoxyimino series of cephalosporins, particularly 7-[(Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetamido]-3-(4,6-diamino-1-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)thiomethyl-3-cephem-4-carboxylate(C-1), exhibited broad antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria including *Pseudomonas aeruginosa*.

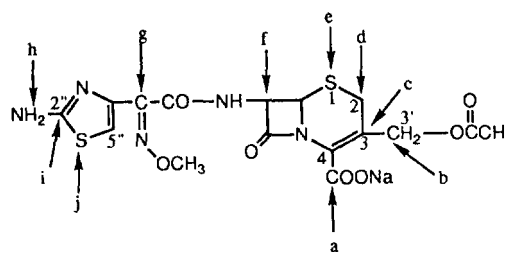
서 론

항생제 시장은 전세계 의약품 시장의 약 16%를 점유하고 있으며 그 중에서도 cephalosporin계 항생제는 50% 정도인 100억\$을 차지하고 있어 항생제 분야에서 가장 중요한 위치를 차지하고 있다.

특히 80년대 초기부터 시판되기 시작한 cephalosporin계 항생제는 항생제에 대한 저항성이 큰 녹농균에 까지 항균 스펙트럼이 강화됨으로서 다른 계열의 항생제를 대체하는 등 사용 범위가 확대되고 있으나 상대적으로 그람 양성균에 대한 항균효력이 약화되었고, MRSA(Methicillin Resistant Staphylococcus aureus)에 대한 항균 효력이 미약함으로서 좀더 강력한 항균력을 보유한 항생제의 개발이 요

구되고 있다.

따라서, 본 연구에서는 최초의 제 3세대 cephalosporin계 항생제인 cefotaxime¹ 개발이 후, 보다 더 강력한 항균력을 가진 항생제를 개발하기 위한 연구의 일환으로서, cefotaxime 분자구조에서 화학적으로 변환이 가능한 위치를 변형시켜서 더 강력한



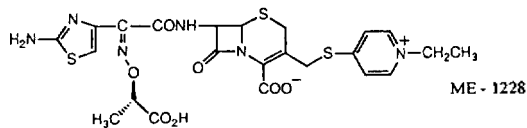
항생제를 개발하고자 하였다.

Cefotaxime 구조에서 변환이 가능한 위치는 상기의 그림과 같다.

상기 구조식에서, 이제까지 밝혀진 구조와 항균 활성과의 상관관계를 간략히 고찰해 보면 다음과 같다.

첫째, 3위치의 변형이 항균활성에 미치는 영향을 보면, S 원자로써 결합된 3'-치환기(예; tetrazole, thiadiazole 등)는 cefotaxime과 비교했을 때 실제로 항균범위는 변화하지 않으나, pharmacokinetics, β -lactamase stability, 그리고 metabolism에 영향을 미친다고 밝혀졌다.² 한편, pyridine이나 그 유도체가 3'-위치에 quaternary ammonium salt 형태로 치환된 경우는 *Pseudomonas*를 비롯한 그람 음성 균주에 대해 좋은 항균력을 나타낸다. 그러나 cefotaxime과 비교시 *Staphylococci*와 다른 그람 양성 bacteria에 대해서는 항균력이 감소된다. 둘째, oxime residue에 대한 치환기 효과는 일반적으로 저급 alkyl기 일수록 항균력이 증가한다.³ 셋째, aminothiazole 고리의 2"-위치에 존재하는 amino-기는 필수적이며 5"-위치의 수소 대신에 염소, 혹은 브롬으로 치환시키면 항균력이 감소한다.⁴

Table 1에서 보는 바와 같이 치환기를 도입하는 위치는 첫째로 oxime 부위, 둘째로 C-3 위치에 heterocyclic thiol 화합물이나, pyridinium 잔기를 치환시키는 것이 대부분이나 최근 경향으로서 quaternary ammonium salt 구조를 갖는 heterocyclic thiol을 치환시킨 ME-1228⁵이 일본의 Meiji Seika社에서 개발되어 발표되었는데, 우수한 항균 활성을 가지고 있는 것으로 발표되었다.



따라서, 본 연구에서는 triazine의 유도체가 antibacterial agent로써 최근 활발히 연구되고 있는데 착안하여⁶ triazin thione 유도체들을 합성하여, cephem의 3-위치에 Scheme 1, 2의 합성 방법에 따라 도입하여, 그람 음성균주인 *Pseudomonas*에 대한 항균력이 우수한 것으로 알려진 heterocyclic quaternary ammonium salt의 구조를 갖는 신규의 유도

Table 1. Aminothiazole cephalosporins

Name	Structure			Reference
	R ₁	R ₂	R ₃	
Cefmenoxime	-CH ₃		-OH	7
Ceftizoxime	-CH ₃	-H	-OH	8
Ceftriaxone	-CH ₃		-OH	9
Cefodizime	-CH ₃		-OH	10
Cefzonam	-CH ₃		-OH	11
Ceftiolen	-CH ₃		-OH	12
Cefpiome	-CH ₃			13

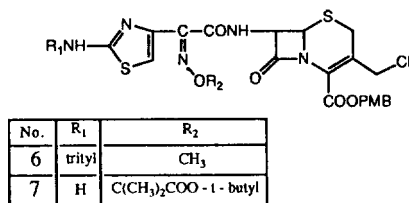
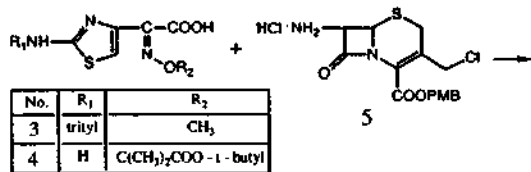
체를 합성하고 이의 MIC(Minimum Inhibitory Concentration)를 측정하였다.

실 험

시약 및 기기

적외선 분광기는 Perkin-Elmer 599B를 사용하였고, 핵자기 공명 분광기는 Bruker AW-80과 Bruker AMX-400을 사용했으며, 녹는점 측정기는 Thomas-Hoover 모세관 녹는점 측정기를 사용하였고, 컬럼 크로마토그래프는 silica gel(kiesel gel 60, 70~230 mesh, E. Merck)를 사용하였다.

p-Methoxybenzyl 7-amino-3-chloromethyl-3-cephem-4-carboxylate hydrochloride는 일본의 Otsuka社제, 그밖의 용매 및 시약은 Aldrich社의 Janssen社의 제품을 사용하였다. 그리고 (Z)-2-(2-Tritylaminothiazol-4-yl)-2-(substituted-oximino) acetic acid는 R. Bucourt 등의 방법으로¹⁴ 합성하였으며, 4,6-diamino-1-alkyl-1,3,5-triazin-2-thione들의 합성



Scheme 1

은 F. Kurtzer 등의 방법¹⁵에 의하여 합성하였다.

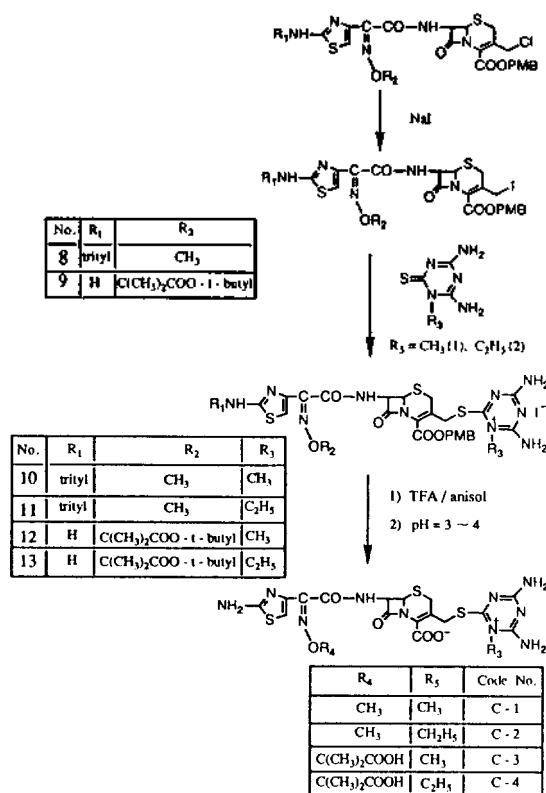
합성

ρ -Methoxybenzyl 7-[(Z)-2-(2-tritylaminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetamido]-3-chloromethyl-3-cephem-4-carboxylate(6)의 합성. 화합물(3) 10 g (22.55 mmol)에 DMF 50 ml와 1-hydroxybenzotriazole 2.77 g(23.67 mmol)을 가한 다음, DCC 4.88 g (23.67 mmol)을 가하고 20~25°C의 온도에서 3시간 반응시키면, 결정이 석출된다. 여과하여 결정을 제거하고, 이 여액에 ρ -methoxybenzyl 7-amino-3-chloromethyl-3-cephem-4-carboxylate hydrochloride (5) 7.76 g(19.16 mmol)에 DMF 38 ml와 증류수 20 ml를 가한 다음, 5~10°C에서 NaHCO₃ 1.81 g (21.55 mmol)을 가하여 20분간 교반시킨 후, 이 용액을 가했다. 30~32°C의 온도에서 4시간 반응시킨 다음 아세트산 에틸 200 ml와 증류수 1.0 l를 가하여 5분간 교반 후 층분리하고, 수층에 다시 아세트산 에틸 50 ml를 가하여 추출한다. 아세트산 에틸층을 합한 다음 증류수 500 ml, 0.5 N-HCl 수용액 500 ml, 2% sodium acetate 수용액 500 ml, 다시 증류수 500 ml로 세척한 후, anhydrous MgSO₄로 건조시키고, 감압 농축하여, 잔유물을 silica gel column chromatography(eluent : EtOAc/Cyclohexane = 1 : 1)하여 감압 농축하고, n-hexane에 분산, 여과하여 담황색 분말을 얻었다.

수득율 : 11.50 g(75%)

녹는점 : 120°C

¹H NMR(80 MHz, CDCl₃) : 3.50(2H, d, 2-H), 3.73



* PMB = ρ -Methoxybenzyl-

Scheme 2

(3H, s, OCH₃), 4.01(3H, s, N-OCH₃), 4.45(2H, d, -CH₂Cl), 4.90(1H, d, 6-H), 5.14(2H, s, -OCH₂-Ph), 5.82(1H, dd, 7-H), 6.49(1H, s, thiazole-H), 6.85~7.30(20 H, m, Ph-, -PhOCH₃, thiazole-NH)

IR(KBr) cm⁻¹ : 1790, 1725, 1686.

ρ -Methoxybenzyl 7-[(Z)-2-(2-tritylaminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetamido]-3-iodomethyl-3-cephem-4-carboxylate(8)의 합성. 화합물(6) 10 g (12.57 mmol)에 NaI 2.0 g(13.34 mmol)과 acetone 80 ml를 가하고 실온에서 1.5시간 반응시킨 다음, 감압 농축시켜 용매를 제거하고, 잔유물에 아세트산 에틸 300 ml를 가하여 용해시킨 다음, 증류수 5% Na₂S₂O₃ 수용액, 20% 식염수로 세척하고, anhydrous MgSO₄로 건조한 다음 감압 농축하여 n-hexane에 분산, 여과하고 진공 건조하여 미황색 분말을 얻었다.

수득율 : 10.11 g(91%)

녹는점 : 130°C(dec.)

¹H NMR(80 MHz, CDCl₃) : δ 3.49(2H, s, 2-H),

3.75(3H, s, -OCH₃), 4.01(3H, s, N-OCH₃), 4.34(2H, d, -CH₂I), 4.95(H, d, 6-H), 5.18(2H, s, -OCH₂-Ph), 5.80(1H, dd, 7-H), 6.54(1H, s, thiazole-H), 6.85~7.27(20H, m, Ph-, -PhOCH₃, thiazole-NH).

IR(KBr) cm⁻¹: 1790, 1724, 1685

p-Methoxybenzyl 7-[(Z)-2-(2-tritylaminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetamido]-3-(4,6-diamino-1-methyl-1,3,5-triazinium-2-yl)thiomethyl-3-cephem-4-carboxylate Hydroiodide(10)의 합성.

DMSO 18 ml에 화합물(8) 6.0 g(6.766 mmol)을 용해시킨 다음 4,6-diamino-1-methyl-1,3,5-triazin-2-thione(1) 1.09 g(6.934 mmol)을 가하고 실온에서 3시간 반응시킨 다음 isopropyl ether 300 ml에 분산, 여과한 후 감압 건조하여 황색의 분말을 얻었다.

수득율: 4.5 g(63%)

녹는점: 152~155°C

¹H NMR(80 MHz, DMSO-d₆): δ 3.35(3H, s, N-CH₃), 3.68(5H, m, OCH₃, 2-H), 3.73(3H, s, N-OCH₃), 4.20(2H, ABq, 3-CH₂S-), 5.15(3H, brs, -OCH₂Ph, 6-H), 5.60(1H, dd, 7-H), 6.62(1H, s, thiazole-H), 6.80~7.25(20H, m, Ph-, PhOCH₃, thiazole-NH), 8.27~8.69(4H, m, triazinium-NH₂), 9.46(1H, s, -CONH-).

IR(KBr) cm⁻¹: 1784, 1670, 1640.

7-[(Z)-2-(2-Aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetamido]-3-(4,6-diamino-1-methyl-1,3,5-triazinium-2-yl)thiomethyl-3-cephem-4-carboxylate(C-1)의 합성. Dichloromethane 9.0 ml에 화합물(10) 3.0 g(2.876 mmol)을 가하고, trifluoroacetic acid 9.0 ml과 anisole 1.4 ml를 가한다. 실온에서 1시간 교반시킨 다음 isopropyl ether 300 ml에 분산하여 여과한다. 여과한 결정에 증류수 4.0 ml를 가하고, 포화 NaHCO₃ 수용액으로 pH 7.0으로 조절한 다음 5분간 교반하고 여과하여 여액의 pH를 6 N-HCl 수용액으로 pH 3.0으로 조정한다 다음 silica gel column chromatograph(eluent; CH₃CN/H₂O=6:1)로, 순수 분리한 다음 동결건조하여 미황색의 결정을 얻었다.

수득율: 600 mg(38%)

¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆): δ 3.37(2H, ABq, 2-H), 3.42(3H, s, N-CH₃), 3.82(3H, s, N-OCH₃), 3.38, 4.81(2H, dd, 3-CH₂S), 4.97(1H, s, 6-H), 5.60(1H,

dd, 7-H), 6.72(1H, s, thiazole-H), 7.22(2H, s, thiazole-NH₂), 8.15~8.82(4H, m, triazinium-NH₂), 9.51(1H, d, -CONH-).

IR(KBr) cm⁻¹: 3380, 1775, 1650, 1605.

p-Methoxybenzyl 7-[(Z)-2-(2-tritylaminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetamido]-3-(4,6-diamino-1-ethyl-1,3,5-triazinium-2-yl)thiomethyl-3-cephem-4-carboxylate Hydroiodide(11)의 합성. DMSO 18 ml에 화합물(8) 6.0 g(6.766 mmole)을 가하여 용해시킨 다음 4,6-diamino-1-ethyl-1,3,5-triazin-2-thione(2) 1.21 g(7.067 mmol)을 가하고 실온에서 4시간 반응시킨 다음 이소부틸 에테르: 아세트산 에틸(1:1) 용액 300 ml에 분산, 여과하여, 감압 건조하여 황색의 분말을 얻었다.

수득율: 4.7 g(66%)

¹H NMR(80 MHz, DMSO-d₆): δ 1.11(3H, t, N-CH₂CH₃), 3.67(5H, m, OCH₃, 2H), 3.75(3H, s, N-OCH₃), 4.28(4H, m, 3-CH₂S, N-CH₂CH₃), 5.14(3H, brs, -CH₂Ph, 6-H), 5.61(1H, dd, 7-H), 6.62(1H, s, thiazole-H), 6.80~7.24(20H, m, Ph-, -PhOCH₃, thiazole-NH), 8.15~8.66(4H, m, triazinium-NH₂), 9.42(1H, d, -CONH-).

IR(KBr) cm⁻¹: 1791, 1722, 1635, 1525.

7-[(Z)-2-(2-Aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetamido]-3-(4,6-diamino-1-ethyl-1,3,5-triazinium-2-yl)thiomethyl-3-cephem-4-carboxylate(C-2)의 합성. Dichloromethane 9.0 ml에 화합물(11) 5.0 g(4.730 mmol)을 가하고 trifluoroacetic acid 15.0 ml와 anisole 2.5 ml를 가한 다음, 화합물(C-1) 합성방법과 같은 방법으로 처리하여, 미황색 결정을 얻었다.

수득율: 730 mg(27%)

¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.21(3H, t, N-CH₂CH₃), 3.40(2H, ABq, 2-H), 3.82(3H, s, N-OCH₃), 3.90, 4.80(2H, dd, 3-CH₂S), 3.94(2H, q, N-CH₂CH₃), 4.97(1H, d, 6-H), 5.58(1H, dd, 7-H), 6.72(1H, s, thiazole-H), 7.22(2H, s, thiazole-NH₂), 7.88~8.57(4 H, m, triazinium-NH₂), 9.50(1H, d, -CONH-).

IR(KBr) cm⁻¹: 3380, 1773, 1636, 1600

p-Methoxybenzyl 7-[(Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(2-t-butoxycarbonylprop-2-oxymino)acetamido]-

3-chloromethyl-3-cephem-4-carboxylate(7)의 합성. DMF 100 ml에 화합물(4) 21.87 g(66.4 mmol)을 사용하여, 화합물(6)의 합성 방법과 동일하게 반응시켜서 처리하여 미황색 분말을 얻었다.

수득율 : 28.9 g(64%)

¹H NMR(80 MHz, DMSO-*d*₆) : 1.35(15H, s, *t*-butyl-, OC(CH₃)₂-), 3.59(2H, d, 2-H), 3.71(3H, s, -OCH₃), 4.44(2H, d, -CH₂-Cl), 5.16(3H, brs, -OCH₂Ph, 6-H), 5.81(7H, dd, 7-H), 6.63(1H, s, thiazole-H), 6.83~7.41(6H, m, Ph, thiazole-NH₂), 9.41(1H, d, -CONH-).

IR(KBr) cm⁻¹ : 1792, 1724, 1694.

***p*-Methoxybenzyl 7-[(Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(2-*t*-butoxycarbonylprop-2-oxyimino)acetamidol]-3-(4,6-diamino-1-methyl-1,3,5-triazinium-2-yl)thiomethyl-3-cephem-4-carboxylate Hydroiodide(12)의 합성.** DMSO 42 ml에 화합물(7) 6.80 g(0.01 mol)과 NaI 1.65 g(0.011 mol)을 가하고 실온에서 1시간 교반시킨 다음, 화합물(1) 1.73 g(0.011 mol)을 가하고 30~32°C에서 5시간 반응시키고, 아세트산 에틸 300 ml에 분산, 여과한 후, 소량의 아세트산 에틸로 세척한 다음, 감압 건조하여 황색의 분말을 얻었다.

수득율 : 6.58 g(71%)

¹H NMR(80 MHz, DMSO-*d*₆) : 1.33(15H, s, *t*-butyl-, -OC(CH₃)₂-), 3.62(2H, s, 2-H), 3.71(6H, s, -OCH₃, N-CH₃), 4.22(2H, ABq, 3-CH₂S), 5.18(3H, s, -OCH₂Ph, 6-H), 5.62(1H, dd, 7-H), 6.63(1H, s, thiazole-H), 6.82~7.40(6H, m, -PhOCH₃, thiazole-NH₂), 8.18(2H, brs, triazinium-NH₂), 8.30(2H, brs, triazinium-NH₂), 9.38(1H, d, -CONH-).

IR(KBr) cm⁻¹ : 1785, 1720, 1680.

7-[(Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(2-carboxyprop-2-oxyimino)acetamidol]-3-(4,6-diamino-1-methyl-1,3,5-triazinium-2-yl)thiomethyl-3-cephem-4-carboxylate (C-3)의 합성. 화합물(12) 3.0 g(3.175 mmol)에 dichloromethane 9.0 ml와 anisole 1.7 ml 그리고 trifluoroacetic acid 9.0 ml를 가한 다음, 실온에서 1시간 교반시키고, 화합물(C-1) 합성방법과 동일하게 처리하여 백색결정을 얻었다.

수득율 : 660 mg(30%)

¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.41(6H, d, OC

(CH₃)₂-), 3.38(2H, ABq, 2-H), 3.40(3H, s, N-CH₃), 3.91, 4.77(2H, dd, 3-CH₂S), 4.95(1H, d, 6-H), 5.67(1H, dd, 7-H), 6.71(1H, s, thiazole-H), 7.18(2H, brs, thiazole-NH₂), 8.13~8.75(4H, m, triazinium-NH₂)

IR(KBr) cm⁻¹ : 3378, 1768, 1660, 1600

***p*-Methoxybenzyl 7-[(Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(2-*t*-butoxycarbonylprop-2-oxyimino)acetamido]-3-(4,6-diamino-1-ethyl-1,3,5-triazinium-2-yl)thiomethyl-3-cephem-4-carboxylate Hydroiodide(13)의 합성.** DMSO 45 ml에 화합물(7) 6.80 g(0.01 mol)과 NaI 1.65 g(0.011 mol)을 가하고, 실온에서 1시간 교반시킨 다음, 4,6-diamino-1-ethyl-1,3,5-triazin-2-thione(2) 1.88 g(0.011 mol)을 가하고, 30~32°C에서 6시간 반응시키고, 아세트산 에틸 300 ml에 분산, 여과한 후, 소량의 아세트산 에틸로 세척한 다음, 감압 건조하여 황색의 분말을 얻었다.

수득율 : 6.67 g(71%)

¹H NMR(80 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.11(3H, t, N-CH₂CH₃), 1.33(15H, s, *t*-butyl-, OC(CH₃)₂-), 3.55(2H, ABq, 2-H), 3.68(3H, s, -OCH₃), 3.82~4.39(4H, m, 3-CH₂S, N-CH₂CH₃), 5.17(3H, brs, -CH₂Ph, 6-H), 5.66(1H, dd, 7-H), 6.62(1H, s, thiazole-H), 6.80~7.24(6H, m, -PhOCH₃, thiazole-NH₂), 8.20~8.69(4H, m, triazinium-NH₂), 9.27(1H, d, -CONH-).

IR(KBr) cm⁻¹ : 1793, 1724, 1640.

7-[(Z)-2-(2-Aminothiazol-4-yl)-2-(2-carboxyprop-2-oxyimino)acetamido]-3-(4,6-diamino-1-ethyl-1,3,5-triazinium-2-yl)thiomethyl-3-cephem-4-carboxylate(C-4)의 합성. 화합물(13) 3.0 g(3.175 mmol)에 dichloromethane 9.0 ml와 anisole 1.7 ml 그리고 trifluoroacetic acid 9.0 ml를 가한 다음, 실온에서 1시간 교반시키고 화합물(C-1) 합성 방법과 동일하게 처리하여 미백색 결정을 얻었다.

수득율 : 560 mg(28%)

¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.20(3H, t, N-CH₂CH₃), 1.41(6H, d, -OC(CH₃)₂CO-), 3.40(2H, ABq, 2-H), 3.90(2H, q, N-CH₂CH₃), 3.92~4.69(2H, dd, 3-CH₂S), 4.99(1H, d, 6-H), 5.69(1H, dd, 7-H), 6.72(1H, s, thiazole-H), 7.21(2H, s, thiazole-NH₂), 7.63~8.05(4H, m, triazinium-NH₂)

IR(KBr) cm⁻¹ : 3400, 1768, 1635, 1595.

Table 2. Antibacterial activities of cephalosporin derivatives (MIC, $\mu\text{g/ml}$)

No.	Strains	CFTX	C-1	C-2	C-3	C-4
1	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 633	0.4	0.4	0.4	—	1.6
2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	0.8	0.4	12.8	6.4	12.8
3	<i>Staphylococcus aureus</i> CW 106	12.8	6.4	6.4	51.2	51.2
4	<i>Streptococcus pyogenes</i> CW 102	12.8	6.4	25.6	25.6	102.4
5	<i>Streptococcus faecium</i> CW 103	3.2	1.6	6.4	6.4	51.2
6	<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	12.8	6.4	25.6	12.8	102.4
7	<i>Escherichia coli</i> CW 108	3.2	1.6	6.4	12.8	25.6
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO 303	>204.8	102.4	204.8	>204.8	>204.8
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CW 114	>204.8	25.6	51.2	204.8	>204.8
10	<i>Enterobacter cloacae</i> CW 120	3.2	1.6	6.4	25.6	51.2
11	<i>Klebsiella aerogenes</i> CW 118	6.4	6.4	12.8	51.2	51.2
12	<i>Salmonella typhimurium</i> CW 116	3.2	6.4	25.6	25.6	6.4

CFTX : Cefotaxime, Inoculum size : 10^8 C.F.U./ml, Mueller-Hinton Broth.

Minimum Inhibitory Concentration(MIC *in vitro*)의 측정

합성한 신규 cephalosporin 화합물(C-1~C-4)의 MIC test는 broth dilution method와 microtiter broth dilution method를 병용한 하기의 방법에 의하여 AVANTAGE microbial center(Abbott Lab.)를 이용하여 시험하였다.

시험균(*Bacillus subtilis*외 11종)을 Mueller-Hinton Agar(Difco.)에서 37°C, 18시간 동안 2회 preculture한 후, colony를 증류수로 희석하여 0.5 Mcfarland에 맞춘다(10^8 C.F.U./ml). 화합물의 최종농도가 204.8 $\mu\text{g/ml}$ 부터 0.00625 $\mu\text{g/ml}$ 되게 2배 단계로 희석시킨 Mueller-Hinton broth(Difco.) 1.3 ml에 상기의 균액을 200 μl 씩 첨가하여 Avantage module에서 배양시키고($35 \pm 0.5^\circ\text{C}$), 5분 마다의 탁도(670 nm)를 측정하여 생육 곡선을 그리고, 생육이 저지된 최저의 농도를 MIC로 정하였으며, 그 결과는 Table 2에 나타내었다.

결과 및 고찰

합성. 각각의 신규 cephalosporin 유도체의 합성 경로는 Scheme I, II)에 나타내었다. 즉, 출발 물질인(Z)-2-(2-protected-amino or aminothiazol-4-yl)-2-(substituted-alkoxyimino)acetic acid (3), (4)와 p-methoxybenzyl 7-amino-3-chloromethyl-3-cephem-4-carboxylate, HCl(ACLE)(5)를 반응시켜 3-

chloromethyl cephalosporin 중간체 (6), (7)을 합성하는 방법은 여러 가지 방법이 있으나, 본 실험에서는 1-hydroxybenzotriazole을 각각 출발물질 (3)이나 (4)와 DCC 존재하에서 반응시켜 active ester를 형성한 후 ACLE (5)와 반응시켜서 중간체 (6), (7)을 비교적 양호한 수득율로 합성하였다.

Cephem ring의 3'-위치의 halogen은 좋은 leaving group인데 3-chloromethyl cephalosporin 중간체 (6), (7)을 적당한 유기용매, 즉 acetone이나 DMSO 중에서, 각각 NaI 혹은 KI로 처리하여 3-iodomethyl-체로 변환시킨 다음 *in situ*에서나 혹은 단리해 내어 triazin thione 유도체 (1), (2)를 반응시켜서 quaternary ammonium salt 형태를 갖는 heterocyclic thiol이 도입된 중간체 (10), (11), (12), (13)을 합성하였다.

이들 합성된 중간체 (10)~(13)의 보호기 제거는 trifluoroacetic acid(TFA)와 anisole을 사용하여 수행하였으며, 보다 더 순수하게 하기 위하여 column chromatography(silica gel 60, 70~230 mesh, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}=10\sim4:1$)하여 순수한 cephalosporin 유도체들(C-1, C-2, C-3, C-4)를 합성하였다.

항균성. 합성한 신규 cephalosporin 유도체들의 MIC(Minimum Inhibitory Concentration) test 결과는 Table 2에 나타나 있다. 이들 유도체들의 구조와 활성 상관관계를 고찰해 보면 triazine의 N_1 에 치환된 alkyl기, 즉 methyl, ethyl기의 차이에 따른 항균 활성은 유도체 C-1과 C-2, C-3와 C-4를 비교

Table 3. Antibacterial activities of cephalosporin derivative C-1 (MIC, µg/ml)

No.	Strains	CFTX	CFPR	C-1
1	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.4	0.2	0.4
2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	0.8	0.4	0.4
3	<i>Sta. aureus</i> CW 106	12.8	12.8	6.4
4	<i>Sta. aureus</i> 89-1	1.6		0.4
5	<i>Sta. aureus</i> CW 104	0.4		0.8
6	<i>Sta. aureus</i> CW 105	12.8		0.8
7	<i>Streptococcus pyogenes</i> CW 102	12.8	3.2	6.4
8	<i>Strept. faecium</i> CW 103	3.2	1.6	1.6
9	<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	12.8	3.2	6.4
10	<i>E. coli</i> CW 108	3.2	3.2	1.6
11	<i>E. coli</i> CW 107	0.8		0.8
12	<i>E. coli</i> CW 109	1.6		1.6
13	<i>E. coli</i> CW 110	6.4		3.2
14	<i>E. coli</i> CW 111	6.4		6.4
15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO 303	>204.8	>204.8	102.4
16	<i>Pseu. aeruginosa</i> CW 114	>204.8	>204.8	25.6
17	<i>Pseu. aeruginosa</i> CW 112	102.4	25.6	51.2
18	<i>Pseu. aeruginosa</i> CW 113	102.4	25.6	51.2
19	<i>Pseu. aeruginosa</i> CW 115	25.6	12.8	12.8
20	<i>Pseu. aeruginosa</i> PAO 1670	102.4	102.4	51.2
21	<i>Pseu. chlororaphis</i> ATCC 9446	>204.8		
22	<i>Enterobacter cloacae</i> CW 120	3.2	1.6	1.6
23	<i>Ent. faecalis</i> 89.2	>204.8		102.4
24	<i>Ent. cloacae</i> CW 119	102.4		
25	<i>Klebsiella aerogenes</i> CW 118	6.4	6.4	6.4
26	<i>Kleb. oxytoca</i> CW 117	>204.8		
27	<i>Salmonella typhimurium</i> CW 116	3.2	3.2	3.2

Modified Broth Dilution Method CFTX : Cefotaxime, 10⁸ C.F.U./ml CFPR : Cefpirome, Mueller-Hinton Broth.

했을 경우, methyl-기가 치환된 경우가 항균 활성이 더 우수하였다. C-1과 C-3의 경우 methoxyimino-기와 acidic한 성질의 2-carboxyprop-2-oxyimino-기의 차이에 따른 항균 활성은 methoxyimino-기의 경우 항균 활성이 더 우수 하였다. 특히 7-[(Z)-2-(2-Aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino) acetamido]-3-(4,6-diamino-1-methyl-1,3,5-triazinium-2-yl)thiomethyl-3-cephem-4-carboxylate(C-1)는 제 3세대의 대표적 항생제인 cefotaxime과 비교하여 그람 양성 균주에서는 거의 2배 정도의 우수한 항균 활성을 보여주었고, 그람 음성 균주, 즉 *E. Coli* ATCC 9637 및 CW 108에 있어서는 2배의 항균활성을 나타내었으며, 특히 *Pseudomonas aeruginosa* CW 114에 대해서는 8배 이상의 항균 활성을 나타내었다.

신규 cephalosporin 유도체 C-1의 항균 spectrum을 더 광범위하게 test하기 위하여 시험 균주를 27 가지로 늘려서 cefotaxime 및 cefpirome과 MIC value를 비교하였다(Table 3).

C-1은 그람 양성 균주에 대해서는 cefotaxime 보다 2배 이상 그리고 cefpirome과는 거의 동등하고 특히 *Staphylococcus aureus* CW 105 균주에 대해서는 cefotaxime보다 16배 더 강력하였다. 그람 음성 균주에 대해서는 cefotaxime보다 우수하며 cefpirome과 비교하여 *Pseudomonas aeruginosa* CW 114에 대해서 8배 이상의 항균 활성을 나타내었다. 이것은 전반적으로, 제 4세대로 평가되고 있으며 현재 독일의 Hoechst社에 의하여 개발 중에 있는 cefpirome보다 그람 양성과 그람 음성 균주에 걸쳐서

균형있는 항균활성을 가지고 있는 것으로 사료된다.

인 용 문 헌

1. R. Heymes, A. Lutz, and E. Schrinner, *Proc. 10th Intern. Congr. Chemother.*(Zurich), **2**, 823 (1977).
2. D. Walter, J. Blumbach, R. Lattrell, and K. H. Schenuemann. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **24**, 180 (1985).
3. R. Bucourt, R. Heymes, A. Lutz, L. Perras, and J. Perronnet, *Tetrahedron*, **34**, 2233 (1978).
4. R. Latterel, W. Duerckheimer, and R. Kirrstetter, *et al.*, Vol. 4, PS 4. 2/11, 1-5. *Proceedings, 13th int. Congress of Chemotherapy(13th ICC)*, Verlag Egermann, Vienna 1983.
5. S. Seiji, O. Tsuneo, Y. Takashi, and M. Yasushi, *et al.*, *J. Antibiol.*, **43**, 62 (1990).
6. S. Miss, E. Tyagi, and R. L. Mital, *et al.*, *J. Indian Chem. Soc.*, **66**(5), 357 (1989).
7. *Drugs of the Future*, **5**, 226 (1980); **6**, 313 (1981).
8. H. Takasugi, H. Kochi, T. Masugi, H. Nakano, and T. Takaya, *J. Antibiol.*, **36**, 846 (1983).
9. R. Reiner, U. Weiss, U. Brombacher, P. Lanz, M. Montavon, A. Furlenmeier, P. Angehrn, and P. J. Probst, *J. Antibiol.*, **33**, 783 (1980).
10. M. Limbert, N. Klessel, K. Seeger, G. Seibert, I. Winkler, and E. Schrinner, *J. Antibiol.*, **37**, 892 (1984).
11. W. V. Curran and A. A. Ross, *J. Antibiol.*, **36**, 179 (1983).
12. *Drugs of the Future*, **9**, 572 (1984).
13. R. Lattrell, J. Blumbach, and W. Duerckheimer, *et al.*, *J. Antibiol.*, **41**, 1374 (1988).
14. Bucourt, R. R. Heymes, A. Lutz, L. Penasse, and J. Perronnet, *Tetrahedon*, **34**, 2233 (1978).
15. F. Kurtzer and E. D. Pitchfork, *J. Chem. Soc.*, 6296 (1965).