

새로운 의약품의 합성에 관한 연구(II) : 새로운 세파로스포린 항생물질의 합성과 그의 생물활성에 관한 연구

崔元植* · 李英行[†] · 李察浩[†]
순천향대학교 이과대학 유전공학과
[†]원광대학교 자연과학대학 화학과
(1994. 2. 21 접수)

Synthesis of New Medicinal Agents(II) : Synthesis and Antibacterial Activities of New Cephalosporin Derivatives

Won-Sik Choi*, Young-Haeng Lee[†], and Chai-Ho Lee[†]
Department of Genetic Engineering, Soon Chun Hyang University,
Asan 337-880, Korea
[†]Department of Chemistry, Won Kwang University, Iri 570-479, Korea
(Received February 21, 1994)

요 약. 새로운 cephalosporin 항생물질인 7-[(3,4-dihydro-6-methoxycarbonyl-2,2-dimethyl-2H-1,4-thiazin-3-yl)acetamido]-3-heterocyclothiomethyl-3-cephem-4-carboxylic acid 유도체(2a~2d)들을 합성하여, 구조변화에 대한 항균활성을 측정하였다. 그 중에서 7-[(3,4-dihydro-6-methoxycarbonyl-2,2-dimethyl-2H-1,4-thiazin-3-yl)acetamido]-3-[(2-methyl-1,3,4-thiadiazol-5-yl)thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylic acid가 그람양성 및 음성균에 대하여 광범위한 항균능력을 나타내었다.

ABSTRACT. New cephalosporin antibiotics, 7-[(3,4-dihydro-6-methoxycarbonyl-2,2-dimethyl-2H-1,4-thiazin-3-yl)acetamido]-3-heterocyclothiomethyl-3-cephem-4-carboxylic acid derivatives(2a~2d) were synthesized. Antibacterial activities of these new cephalosporin derivatives and the relationship between their structures and their activities were examined. Among them, 7-[(3,4-dihydro-6-methoxycarbonyl-2,2-dimethyl-2H-1,4-thiazin-3-yl)acetamido]-3-[(2-methyl-1,3,4-thiadiazol-5-yl)thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylic acid exhibited the broad antibacterial activities against Gram(+) and Gram(-) bacteria.

서 론

1945년 Brotz에 의해 cephalosporin C가 발견되고, 1966년 Woodward 등에 의해 cephalosporin C가 전합성되었으나 현재는 발효 기술을 이용하여 대량 생산되고 있다. 또한, 발효방법으로 생산한 cephalosporin C의 7-위치의 아미노기를 절단하여 7-aminocephalosporanic acid(7-ACA)를 대량 생산하게 되면서부터 수많은 반합성 cephalosporin 유도체들이 합성되었으며, 이중 약 50여종이 시판되거나 임상중에 있다¹.

최근에 개발되어 시판되기 시작한 3세대 cephalo-

sporin 항생제들은 여러 박테리아에 대한 항균 스펙트럼이 강화되었으며, 특히 녹농균에 까지 그 사용범위가 확대되었으나 상대적으로 그람양성균에 대한 항균능력이 약화되어 이러한 박테리아에 더 강력한 항균능력을 갖는 새로운 반합성 cephalosporin 유도체들의 개발이 필요하게 되었다.

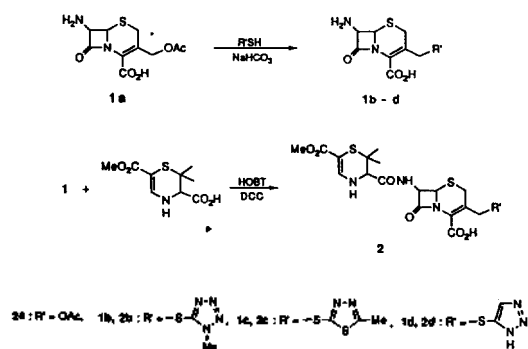
3세대 cephalosporin계 항생물질인 cefotaxim³이 개발된 후보다 강력한 항균력을 갖는 화합물을 개발하기 위하여 cefotaxim 분자구조에 화학적으로 변형이 가능한 3-위치의 acetoxymethyl기의 acetoxy기 대신 헤테로고리 thiol, 헤테로고리 quater-

nary ammonium salt나 헤테로고리 cathecol기들을 치환시킨 새로운 4세대 cephalosporin 유도체들이 현재 개발중에 있다. 3-위치에 acetoxymethyl기의 acetox기 대신 thiol기가 치환된 화합물들은 일반적으로 cefotaxim과 비슷한 항균력을 나타내며⁴, 헤테로고리 quaternary ammonium salt가 치환된 화합물들은 그람음성균들과 *Pseudomonas*에 대해서는 좋은 항균력을 나타내지만 *Staphylococci*와 그람양성균에 대해서는 항균력이 감소되며⁵⁻⁷, 헤테로고리 cathecol기가 치환된 유도체들 역시 그람음성균들은 물론 그람양성균주인 *Staphylococci*와 *Pseudomonas* 균에 대해 강한 활성을 보여주며, β -lactamase에 안정한 것으로 알려졌다⁸.

따라서, cefotaxim의 경우에는 7-위치의 acylamido기의 acyl 위치에 thiazole기를 가지고 있으며, 이 화합물은 좋은 항균력을 나타내고 있다. 본 연구에서는 7-위치의 acylamido기의 acyl기 대신 thiazine기를 도입하고, 3-위치에는 acetoxymethyl기나 acetox기 대신 헤테로고리 thiol 유도체(1-methyl-5-mercapto-1,2,3,4-tetrazole, 2-methyl-5-mercapto-1,3,4-thiadiazole, 5-mercapto-1,2,3-triazole)들을 반응시켜 새로운 cephalosporin 유도체들을 Scheme 1과 같은 방법으로 합성하였다. 특히, thiazine 화합물로는 반합성 penicillin 제조시 중간체로 사용되는 6-aminopenicillanic acid를 출발물질로 하여 6-bromopenicillanic acid⁹를 합성한 후 이 화합물을 염기조건에서 가수분해하여 얻어진 3,4-dihydro-6-methoxycarbonyl-2,2-dimethyl-2H-1,4-thiazin-3-carboxylic acid¹⁰를 사용하였다. 또한, 새로이 합성한 cephalosporin 유도체들에 대한 항균능력을 알아보기 위하여 MIC(Minimum Inhibitory Concentration) 실험을 실시하여 각 화합물들의 항균능력을 측정하였다.

실 험

시약 및 기기. 합성물질들을 확인하기 위하여 적외선 스펙트럼은 Perkin-Elmer 1130 Grating Diffraction IR-Spectrophotometer를, 핵자기 공명스펙트럼은 Bruker CW 80 NMR Spectrometer를 사용하여 얻었다. 합성에 사용한 시약중 6-aminopenicil-



Scheme 1.

lanic acid는 Denmark의 Novo사 제품을, 7-aminocephalosporanic acid는 제일제당 제품을, 1-methyl-5-mercapto-1,2,3,4-tetrazole, 2-methyl-5-mercapto-1,3,4-thiadiazole과 5-mercapto-1,2,3-triazole은 Aldrich 회사 제품을, 1-hydroxybenzotriazole, dicyclohexylcarbodiimide는 Merck 회사 제품을 사용하였으며, ¹H-NMR의 내부 표준물질로는 TMS를 사용하였다.

중간체 합성. 3,4-Dihydro-6-methoxycarbonyl-2,2-dimethyl-2H-1,4-thiazine-3-carboxylic acid는 Orlek 등의 방법에 의하여¹⁰ 6-aminopenicillanic acid를 디아조화 반응시킨 후 NaBr와 반응시켜 6-bromopenicillanic acid를 제조하고 CH₃ONa를 사용하여 염기성 조건에서 가수분해시켜 합성하였으며, 7-amino-3-[(1-methyl-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylic acid(1b)는 미국 특허에 보고된 방법에 의하여^{11,12} 7-aminocephalosporanic acid와 1-methyl-5-mercapto-1,2,3,4-tetrazole을 진한 H₂SO₄과 반응시켜 합성하였으며, 7-amino-3-[(2-methyl-1,3,4-thiadiazol-5-yl)thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylic acid(1c)는 Kariyone 등의 방법에 의하여^{13,14} 7-aminocephalosporanic acid와 2-methyl-5-mercapto-1,3,4-thiadiazole를 NaHCO₃ 수용액에서 반응시켜 합성하였으며, 7-amino-3-[(1,2,3-triazol-5-yl)thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylic acid(1d)는 Dann 등의 방법에 의하여^{15,16} 7-aminocephalosporanic acid와 5-mercapto-1,2,3-triazole을 NaHCO₃ 수용액에서 반응시켜 합성하여 최종 화합물들을 합성하는 중간 물질로

사용하였다.

7-[(3,4-Dihydro-6-methoxycarbonyl-2,2-dimethyl-2H-1,4-thiazin-3-yl)acetamido]-3-cephem-4-carboxylic acid의 (2a) 합성. 3,4-Dihydro-6-methoxycarbonyl-2,2-dimethyl-2H-1,4-thiazine-3-carboxylic acid(0.605 g, 2.83 mmole)에 *N,N*-dimethylacetamide 10 ml과 1-hydroxybenzotriazole (0.37 g, 2.83 mmole)을 가한 다음 dicyclohexylcarbodiimide(0.61 g, 2.95 mmol)을 가하고 20~25°C에서 3시간 반응시켜 생성된 결정물을 여과하여 제거하고 여액을 보관한다. 한편으로 7-aminocephalosporanic acid(0.648 g, 2.39 mmol)에 *N,N*-dimethylacetamide 5 ml와 bis(trimethylsilyl)-acetamide (0.634 g, 3.11 mmole)를 가하여 실온에서 완전히 용해시킨 후 이 용액을 위에서 제조한 용액에 가하고 0~5°C에서 2시간 반응시킨다. 이 반응액에 물 40 ml를 가하고 triethylamine으로 반응물의 pH를 5.0으로 조절하여 생성된 불순물들을 여과하여 제거하고 여액의 pH를 2.0으로 조절하여 실온에서 3시간 교반한 후 여과하고 차가운 acetone으로 세척하여 40°C에서 감압 건조하면 화합물(2a) 0.56 g(48.3%)을 얻는다.

IR(KBr) cm^{-1} : 3600~2800, 1780, 1670, 1620.

¹H-NMR(DMSO-*d*₆) δ : 1.2(d, 6H, 2CH₃), 2.6(s, 3H, CH₃), 3.2~3.6(dd, 2H, 2-H, CH₂S), 3.8(s, 3H, OCH₃), 3.9(s, 1H, thiazine 3-H), 4.8(d, 2H, -CH₂O), 5.1(d, 1H, 6-H), 5.9(dd, 1H, 7-H), 7.5~7.8(m, 2H, thiazine NH, thiazine 5-H).

7-[(3,4-Dihydro-6-methoxycarbonyl-2,2-dimethyl-2H-1,4-thiazin-3-yl)acetamido]-[3-(methyl-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylic acid(2a)의 합성. 2,3-Dihydro-6-methoxycarbonyl-2,2-dimethyl-2H-1,4-thiazine-3-carboxylic acid(1.21 g, 5.00 mmole)을 *N,N*-dimethylformamide 12.5 ml에 용해시키고 1-hydroxybenzotriazole(0.69 g, 5.00 mmole)과 dicyclohexylcarbodiimide(1.22 g, 5.00 mmole)을 가하여 실온에서 3시간 동안 반응시키고 생성된 침전물을 여과하여 제거하고 여액을 0~5°C에서 보관한다. 한편으로 7-amino-3-[(1-methyl-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylic acid(1b) (2.49 g, 7.50 mmole)

에 물 15 ml를 가하고 NaHCO₃ 5.55 g을 가하여 실온에서 완전히 용해시킨 후 위에서 제조한 용액에 가하고 실온에서 2시간 반응시킨다. 이 반응액에 물 15 ml를 가하고 1:1 염산을 가하여 반응물의 pH를 5.0으로 조절하여 생성된 불순물들을 여과하여 제거하고 여액에 1:1 염산을 가하여 pH를 2.0으로 조절하고 3시간 동안 교반하면 결정물이 생성된다. 생성된 침전물을 여과하고 차가운 acetone으로 세척하여 진공건조하면 화합물(2b) 1.35 g(50.0%)을 얻는다.

IR(KBr) cm^{-1} : 3600~2800, 1780, 1670, 1610.

¹H-NMR(CD₃COCD₃) δ : 1.2(d, 6H, 2CH₃), 3.3~3.6(d, 2H, H-3, CH₂S), 3.8(s, 3H, -OCH₃), 4.0(s, 3H, tetrazol CH₃), 4.1(s, 1H, thiazine 3-H), 4.3(d, 2H, H-2), 5.1(dd, 1H, H-6), 5.7(dd, 1H, H-7), 7.4~7.8(m, 2H, thiazine N-H, thiazine 5-H).

7-[(3,4-Dihydro-6-methoxycarbonyl-2,2-dimethyl-2H-1,4-thiazin-3-yl)acetamido]-3-[(2-methyl-1,3,4-thiadiazol-5-yl)thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylic acid(2c)의 합성. 3,4-Dihydro-6-methoxycarbonyl-2,2-dimethyl-2H-1,4-thiazin-3-carboxylic acid (1.21 g, 5.00 mmole)과 7-amino-3-[(2-methyl-1,3,4-thiadiazol-5-yl)thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylic acid(1c) (3.35 g, 7.5 mmole)를 사용하여 화합물(2b)과 같은 방법으로 합성하면 화합물(2c) 0.98 g(35.2%)을 얻는다.

IR(KBr) cm^{-1} : 3700~2700, 1780, 1680, 1610.

¹H-NMR(DMSO-*d*₆) δ : 1.4(d, 6H, 2CH₃), 2.8(s, 3H, CH₃), 3.2~3.4(m, 2H, CH₂S), 3.8(s, 3H, -OCH₃), 4.2~4.4(m, 3H, H-2, CH₂, thiazine 3-H), 5.2(dd, 1H, H-6), 5.8(dd, 1H, H-7), 7.3~7.7(m, 2H, thiazine NH, thiazine 5-H).

7-[(3,4-Dihydro-6-methoxycarbonyl-2,2-dimethyl-2H-1,4-thiazin-3-yl)acetamido]-3-[(1,2,3-triazol-5-yl)thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylic acid(2d)의 합성. 3,4-Dihydro-6-methoxycarbonyl-2,2-dimethyl-2H-1,4-thiazin-3-carboxylic acid (1.21 g, 5.00 mmole)과 7-amino-3-[(1,2,3-triazol-5-yl)thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylic acid(1d) (2.35 g, 7.5 mmole)를 사용하여 화합물(2b)과 같은 방법으로 합성하면 화합물(2d) 1.15 g(43.7%)을 얻는다.

Table 1. Antibacterial activities (MIC, $\mu\text{g}/\text{ml}$) of new cephalosprin derivatives (2a~2d)

Strains	2a	2b	2c	2d	*CTX
<i>Streptococcus faecium</i> MD8b	250	100	125		500
<i>Staphylococcus aureus</i> SG511	500	500	500	0.906	0.98
<i>Staphylococcus aureus</i> 285	125	3.95	0.39	7.25	3.95
<i>Staphylococcus aureus</i> 503	0.98	0.49	0.39	1.81	0.49
<i>Escherichia coli</i> O 55	250	50	25	50	0.49
<i>Escherichia coli</i> DC 0	125	50	50	50	1.95
<i>Escherichia coli</i> DC 2	500	1.95	6.25	14.5	1.95
<i>Escherichia coli</i> TEM	125	62.5	500	100	3.95
<i>Escherichia coli</i> 1507E	500	15.62	50	100	3.95
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1771M	250	500	250	50	1.95
<i>Salmonella typhimurium</i>	125	62.5	50	50	125
<i>Klebsiella oxytoca</i> 1082E	500	62.5	500		
<i>Klebsiella aerogenes</i> 1522E	125	125	125		125
<i>Enterobacter cloacae</i> P99	500	500	500		500
<i>Enterobacter cloacae</i> 1321E	500		125		0.49

*CTX; cefotaxim.

다.

IR(KBr) cm^{-1} : 3600~2800, 1775, 1680, 1620.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 1.2(d, 6H, 2CH_3), 3.4(s, 2H, H-3, CH_2S), 3.7(s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.8(s, 1H, thiazine 3-H), 3.9~4.1(d, 2H, H-2), 5.2(dd, 1H, H-6), 5.3~5.5(dd, 1H, H-7), 7.2~7.8(m, 2H, thiazine NH, thiazine 5-H).

MIN(Minimum inhibitory concentration)의 측정. 새로 합성한 cephalosporin 화합물(2a~2d)의 MIC 실험은 broth dilution 방법과 microtiter broth dilution 방법을 병행하여 AVANTAGE microbial center (Abbott Lab.)를 이용하여 실험하였다. 시험균은 *Streptococcus faecium* MD8b 등 15종을 사용하였으며, 이들 균들을 Mueller-Hinton Ager(Difco.)에서 37°C , 18시간 동안 2회 preculture하여 colony를 증류수로 희석하여 0.5 Mcfarland로 조절한다. 화합물의 최종 농도가 $204.9 \mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 $0.00625 \mu\text{g}/\text{ml}$ 되게 2배 단계로 희석시킨 Mueller-Hinton broth(Difco.) 1.3 ml에 위의 균액을 $200 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 35°C Avantage module에서 배양시키고, 5분마다 탁도를 670 nm에서 측정하여 생육 곡선을 그리고 생육이 저지된 최저의 농도를 MIC로 정하였으며, 그 결과는 Table 1과 같다.

결과 및 고찰

합 성. 새로운 cephalosporin 유도체들의 합성 방법은 Scheme 1과 같다. 즉, 7-aminocephalosporanic acid(7-ACA)의 3-위치에 heterocyclothiome-thyl기들이 치환된 화합물들을 합성하기 위하여 7-ACA와 여러 thiol 유도체(1-methyl-5-mercapto-1,2,3,4-tetrazole, 2-methyl-5-mercapto-1,3,4-thiadiazole, 5-mercapto-1,2,3-triazole)들을 이미 알려진 방법에 의해 산성 또는 염기성 수용액에서 반응시켜 비교적 좋은 수율로 7-amino-3-[(1-methyl-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylic acid(1b), 7-amino-3-[(2-methyl-1,3,4-thiadiazol-5-yl)thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylic acid(1c), 7-amino-3-[(1,2,3-triazol-5-yl)thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylic acid(1d)를 합성하였다.

또한, 7-ACA와 7-amino-3-heterocyclothiome-thyl-3-cephem-4-carboxylic acid들을 3,4-dihydro-6-methoxy-carbonyl-2,2-dimethyl-2H-1,4-thiazine-3-carboxylic acid와 아실화 반응시켜 최종 목적들을 합성하였다. 이러한 아실화 반응에는 여러가지 방법이 있으나, 본 연구에서는 출발물질인 3,4-dihydro-6-methoxycarbonyl-2,2-dimethyl-2H-1,4-thiazine-3-carboxylic acid를 1-hydroxybenzotriazole와 dicyclohexylcarbodiimide로 반응시켜 active ester로 변환시킨 후 7-amino-3-heterocyclothiome-thyl-3-cephem-4-carboxylic acid들과 반응시켜 새로운 cephalosporin 유도체(2a~2d)들을 합성하였으며, IR 및 $^1\text{H-NMR}$ 등에 의해 합성한 물질의 구조를 확인하였다.

항균성. 새로 합성한 cephalosporin 유도체(2a~2d)들의 MIC 실험 결과는 Table 1에 나타내었으며, 제 3세대의 대표적인 cephalosporin계 화합물인 cefotaxim을 기준물질로 하여 비교 실험하였다. 3-위치의 결가지를 acetoxymethyl기, (1-methyl-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)thiomethyl기, (2-methyl-1,3,4-thiadiazol-5-yl)thiomethyl기와 (1,2,3-triazol-5-yl)thiomethyl기 등으로 변화시켜 항균력을 실험한 결과 이들 모든 화합물들이 그람양성균에서는 비슷한 항균력을 나타내지만 그람음성균에서는 항균력이 기준물질에 비해 저하되었다. 그러나 *Streptococcus fae-*

cium MD8b 군주에서는 기준물질인 cefotaxim보다 2배 이상의 항균 활성을 가지고 있음을 알았다. 이들 유도체(2a~2d)들이 비슷한 항균력을 나타내는 것은 3-위치의 치환기가 항균력에 큰 영향을 미치지 않기 때문으로 판단된다. 이들 유도체들 중에서는 화합물 (2c)가 가장 좋은 항균력을 나타내었다.

본 연구는 1993년도 교육부 기초과학연구비 (BSRI-93-334)의 지원에 의한 것으로 관계 당국에 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. Gregory, G. I. In *Recent Advance in the Chemistry of β -Lactam Antibiotics*; Royal Society of Chemistry: London, 1982.
2. Morin, R. B. In *Chemistry and Biology of β -Lactam Antibiotics*; Academic Press: New York, London, 1982; Vol. 1~3.
3. Heymes, R.; Lutz, A.; Schrinner, E. *Proc. 10th Intern. Congr. Chemother. (Zurich)*. 1977, 2, 823.
4. Walter, D.; Blumbach, J.; Lattrell, R.; Schenue-mann, K. H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1985, 24, 180.
5. Bucourt, R.; Heymes, R.; Lutz, A.; Perasse, L.; Peronnet, J. *Tetrahedron* 1978, 34, 2233.
6. Nakayama, E.; Watanabe, K.; Miyauchi, M.; Fujimoto, K.; Muramatsu, S.; Ide, J. *J. Antibiotics* 1991, 44, 854.
7. Nakayama, E.; Watanabe, K.; Miyauchi, M.; Fujimoto, K.; Muramatsu, S.; Yasuda, H.; Fukami, M. *J. Antibiotics* 1991, 44, 864.
8. Kosuzume, H. *J. Antibiotics* 1988, 41, 377.
9. Loosemone, M. J.; Pratt, R. F. *J. Org. Chem.* 1978, 43, 3611.
10. Orlek, B. S.; Peter, P. G. *J. C. S. Parkin I* 1980, 2322.
11. Charles, W. R. *United State Patent* 1970, 3, 641, 021.
12. James, M. G. *United State Patent* 1973, 3, 840, 531.
13. Kariyone, K.; Harada, H.; Kurita, M.; Takano, T. *J. Antibiotics* 1970, 23, 131.
14. Tadayoshi, T.; Hirakata; Masaru, K.; Takatsuki; Hiroo, K.; Ikeda; Masashi, M.; Amagasaki; Nobukiyo, K.; Kyoto; Risuki, N.; *United State Patent* 1969, 3, 516, 997.
15. Dunn, G. L.; Hoover, J. R. E.; Berges, D. A.; Taggart, J. J.; Davis, L. D.; Dietz, E. M.; Jakas, D. R.; Yim, N.; Actor, P.; Uri, V. J.; Weisbach, J. A. *J. Antibiotics* 1976, 29, 65.
16. George, L.; Dunn, W.; John, R. E.; Hoover. *United State Patent* 1974, 3, 867, 380.