

## 6-[(N-4-플루오로페닐)아미노]-7-클로로-5,8-퀴놀린디온의 *in vivo* 항진균 작용 평가

박윤미 · 김희정 · 김도희 · 이인경 · 김동현\* · 유충규<sup>#</sup>

이화여자대학교 약학대학, \*경희대학교 약학대학

(Received November 13, 1995)

### The Evaluation of *in Vivo* Antifungal Activities of 6-[(N-4-Fluorophenyl)amino]-7-Chloro-5,8-Quinolinedione

Yun-Mi Park, Hee-Jeong Kim, Do-Hee Kim, In-Kyung Lee,  
Dong-Hyun Kim\* and Chung-Kyu Ryu<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

\*College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

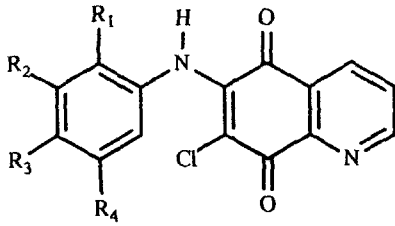
**Abstract**—6-[(N-4-Fluorophenyl)amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione(RCK3) was tested for antifungal activities, *in vivo*, against *Candida albicans*. RCK3 was compared with ketoconazole and fluconazole in the treatment of systemic infection with *Candida albicans* in normal mice. The therapeutic potential of RCK3 had been assessed by evaluating their activities (survival rate) against systemic infections in normal mice. RCK3 had ED<sub>50</sub>, 8.78±0.18 mg/kg but ketoconazole and fluconazole had ED<sub>50</sub>, 8.00±0.73, 10.00±0.43 mg/kg respectively. Intraperitoneally administered RCK3 at the ED<sub>50</sub>, 8.78 mg/kg for 7 days and 14 days reduced *Candida albicans* colony count in the kidneys and livers as well as ketoconazole and fluconazole at these ED<sub>50</sub>, 8.00 and 10.00 mg/kg. And administered RCK3 at the ED<sub>50</sub> for 14 days improved survival rates better than ketoconazole.

**Keywords** □ 6-[(N-4-fluorophenyl)-amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione, *in vivo*, antifungal, *Candida albicans*.

진균감염은 광범위 항생물질 및 면역억제약의 남용에 의한 기회감염증 증가로 중요시되고 있다. 가장 흔한 진균 감염원은 우리 몸의 구강, 질, 소화관내 정상 세균총인 *Candida albicans*이다. 특히 전신적인 *C. albicans* 감염은 기회감염으로 면역력이 저하된 무력숙주에서 빈번하며, 이는 광범위 항생제, 면역억제제, steroid 제제의 투여로 인해 악화될 수 있고, HIV 감염 같은 세포성 면역을 감소시키는 질환 또한 전신적 candidiasis를 악화시킨다.<sup>1-3)</sup> 이런 진균 감염증의 치료를 위해 사용되는 대표적인 항진균제는 amphotericin B, griseofulvin, flucytosine, ketoconazole, fluconazole등을 들 수 있

다. 이들 기존 항진균제의 문제점은 장기간 투여로 인한 강한 독성 및 부작용 등이 나타나는 것이다. 또한 내성균이 출현하고, 빠른 대사 배설로 병발부위에 혈중농도 유지가 어렵다.<sup>1,2)</sup> 항진균제의 개발은 일반적인 항생균제의 개발에 비하여 매우 어렵고, 약물 개발의 속도도 늦은 편이었다. 이는 항진균제가 작용할 진균세포가 진핵세포(eukaryote)로 인간세포와 세포생리적인 특성이 매우 비슷하기 때문이며, 실제로 항진균제가 독성이 큰 것도 이 때문이다.<sup>2,3)</sup> 그래서 본 연구자 등은 약제 내성이 없고 독성이 적은 새로운 작용 기전을 갖는 항진균제를 개발하기 위하여 quinolinedione 유도체를 합성하여 screening한 결과 *in vitro*에서 우수한 항진균작용을 가지고 있으며 작용기전이 기존의 항진균제와는 다르다는 것을 알았다.<sup>4-11)</sup> Quinolinedione의 항진균, 항말라

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-360-3027 (팩스) 02-360-3051



RCKs ; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = F, Cl, Br

RCK3 ; R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = H, R<sub>3</sub> = F

Fig. 1—Chemical structure of 6-[(N-halophenyl)amino]-7-chloro-5,8-quinolinediones.

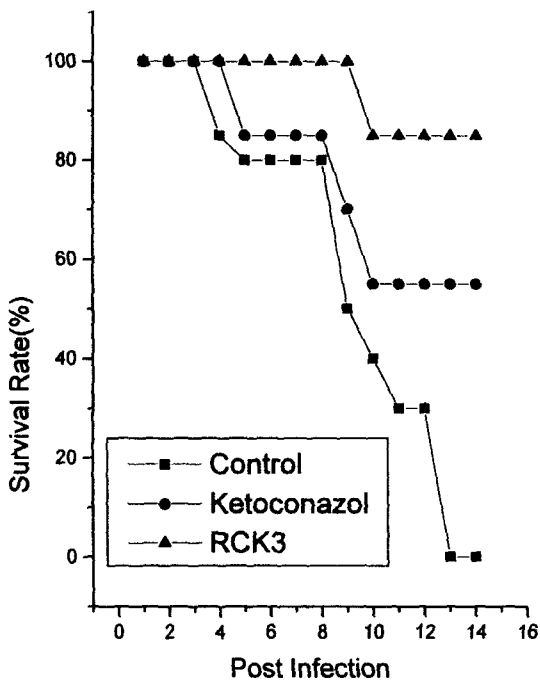


Fig. 2—Survival of *C. albicans* systemically infected mice treated with RCK3 and ketoconazole. Treatment was begun 4 days after infection and continued for a total of 14 days. Mice (7 per group) received intraperitoneally therapy once daily. Data for groups given RCK3 at the ED<sub>50</sub>, 8.78 mg/kg/day and ketoconazole at the ED<sub>50</sub>, 8.00 mg/kg/day. ▲, RCK3; ●, Ketoconazole; ■, Control (saline with 0.25% Tween).

리아작용은 미토콘드리아의 전자전달계를 저해함에 기인한다.<sup>5,6)</sup> Quinolinedione은 ubiquinone 구조유사체로 상경적으로 작용하여 미토콘드리아의 Co-Q dependent succinoxidase 전자전달을 저해한다. 구조가

유사한 quinone 유도체는 항진균작용이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>5-11)</sup> Quinone유도체를 합성하여 *in vitro*에서 항진균작용을 검색한 결과 5,8-quinolinedione 유도체가 우수함을 발견하였고<sup>4,8,9)</sup>, 그 중에 6-[(N-halophenyl)amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione(RCKs, Fig. 1) 이 우수하였다.<sup>8)</sup> RCKs유도체 중 RCK 20의 *in vivo* 항진균작용을 평가하여 보고하였다.<sup>4)</sup> 그리고 RCKs의 유전독성연구 결과도 평가하여 보고하였다.<sup>7)</sup> 그 결과 RCKs 유도체는 항진균작용도 우수하고 안전성도 높은 것으로 평가되었다.

그래서 5,8-quinolinedione 유도체의 항진균작용을 계속 연구하여 선도 물질로서의 개발 가능성을 연구하기 위해 *in vitro*에서 우수한 항진균작용을 갖는 6-[(N-fluorophenyl)amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione (RCK3)의 항진균작용을 *in vivo*에서 검색했다. 생쥐에 *C. albicans*를 전신감염 시킨 후 RCK3을 투여하여 치료율<sup>2,14)</sup>을 측정하여 ED<sub>50</sub>를 구했다. 그리고 전신 감염에 대한 생명 연장 효과<sup>2,12-14)</sup> 등을 ketoconazole, fluconazole과 비교하여 측정했다.

## 실험방법

### 항진균 작용측정

시약 - 6-[(N-fluorophenyl)amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione (RCK3)을 전보<sup>8)</sup>에 보고한 방법대로 합성하여 항진균작용 시험에 사용했다.

Mueller-Hinton broth, Sabouraud Agar, BHI (brain heart infusion)는 Difco Co.에서, DMSO는 Tedia Co.에서 구입하였고, 그 밖에 사용된 각종 시약은 모두 특급시약을 사용하였다. Disposable petri dish (87×15 mm)는 녹십자 제품을 사용하였다.

항진균작용 측정에 사용된 시약과 용매는 모두 사용 직전에 증류하였으며 모든 기구는 고온 가압 멸균 처리하여 사용했다.

기기 - 융점측정 : 융점측정기는 Thomas Hoover capillary melting point apparatus model을 사용하였다.

IR : IR-spectrum은 KBr pellet으로 만들어서 Perkin-Elmer 1420 spectrometer로 기록하였다.

<sup>1</sup>H-NMR : TMS를 표준물질로 Varian Model T-69A spectrophotometer (80 MHz)로 측정하였다.

Incubator : Vision scientific Co. LTD를 사용하여

측정하였다.

Autoclave : Vision scientific Co. LTD를 사용하여 측정하였다.

Hemocytometer : W. Germany SUPERIOR, 1/10 mm DEEP, 1/400-SQMM을 사용하여 측정하였다.

**균주 및 동물** - *C. albicans* 균주는 candidiasis를 앓고 있는 경희 의료원 내 환자로부터 분리한 임상 분리 균주이고 실험 동물은 대한 실험 동물 센터로부터 구입한 무게 20 g안팎의 수컷 생쥐를 사용하였다. 먹이는 (주)삼양사의 마우스용 사료를 사용하였고 물은 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다.

**ED<sub>50</sub>치 측정<sup>2,10</sup>** - 임상 분리한 *C. albicans*를 0.1 ml의 멸균 생리 식염수에  $2 \times 10^6$  (생쥐를 48시간 내에 치사시키는 농도)의 균이 되도록 현탁한 균액을 125 마리의 생쥐에 꼬리정맥 주사하여 전신 감염을 유발시키고 각 약물당 농도별로 4~6마리씩 나누어 놓았다. 멸균 증류수와 Tween 20의 혼액으로 만든 용매에 RCK3의 농도가 10, 2, 0.5, 0.1, 0.025 mg/kg이 되도록 약물을 제조하여 *C. albicans*의 전신감염 1, 4, 24 시간 후 0.2 ml씩 복강 주사하였다. 대조약물로 사용한 ketoconazole은 40, 10, 2, 0.5, 0.1 mg/kg의 농도로 제조하여 같은 방법으로 복강 투여하였다. 대조군은 용매(0.25% Tween을 포함하는 생리식염수)만을 복강 주사하고 감염 48시간 후의 생존율로 ED<sub>50</sub>치를 측정하였다.

**전신 감염에 대한 활성 평가<sup>12,14</sup>** - 임상 분리한 *C. albicans*로 멸균 생리 식염수에  $2 \times 10^4/0.1$  ml되게 현탁한 균액을 70마리의 생쥐에 꼬리정맥 주사하여 전신 감염을 유발시키고, 10마리씩 7군으로 나눈 후, 앞의 실험에서 측정된 각 약물의 ED<sub>50</sub>용량으로 약물을 제조하여 감염 4일 후부터 24시간마다 복강주사 하였다. 약물을

주사한 지 각각 1주일과 10일 되는 마지막 날로부터 3일 후 생쥐를 해부하여 간, 신장을 취해 무게의 3배 되게 멸균 생리식염수로 희석, homogenization한 후 Sabouraud dextrose agar배지에 이식하고 2일간 배양하여 차라 나온 colony의 수를 세었다.

**전신감염 생쥐에서의 항진균효과<sup>14</sup>** - 임상 분리한 *C. albicans*로 멸균 생리 식염수에  $2 \times 10^4/0.1$  ml되게 현탁한 균액을 49마리의 생쥐에 꼬리정맥 주사하여 전신 감염을 유발시키고 7마리씩 7군으로 나눈 후, ED<sub>50</sub>치 용량으로 제조한 각 약물을 감염 4일 후부터 매일 14일간 복강 주사로 투여하면서 생존율을 평가하였다.

자료의 통계학적 해석 ED<sub>50</sub>치는 Probit 법에 의해 계산했다. 기타 통계학적 처리는 Student's-t 검정을 행하고 P<0.05, P<0.01의 수준으로 대조군과 시험물질 투여군을 비교하였다.

## 결과 및 고찰

새로운 작용 기전을 갖는 항진균제를 개발하기 위해 *in vitro* 항진균작용이 우수한 RCK3에 대하여 *in vivo* 항진균작용을 검색하였다. 현재 임상에 사용되는 ketoconazole 및 fluconazole과 비교하여 치료제로서의

**Table I**— Efficacy of RCK3 against systemic infection with *Candida albicans* in normal mice

Compound	Mean ED <sub>50</sub> ±SD(n≥5) in normal mice (mg/kg)
RCK3	8.78±0.18
Ketoconazole	8.00±0.73
Fluconazole	10.00±0.43

a) Dose range: 0.2, 1.0, 2.0, 10.0, 40.0 mg/kg

b) Post infection: 2 days

**Table II**— Colony counts of *Candida albicans* recovered from kidney and liver of systemic infected mice

Organ	Agent & Dosage (ED <sub>50</sub> , mg/kg)	Mean log <sub>10</sub> CFU/g of tissue±S.E.	
		7-Day Rx <sup>a</sup>	14-Day Rx
Liver	Control <sup>b</sup>	2.084±0.100	5.875±0.780
	Fluconazole (10.00)	2.544±0.475*	5.353±0.321*
	RCK3 (8.78)	2.449±0.220**	5.377±0.402*
Kidney <sup>c</sup>	Control	3.733±0.190	5.888±0.520
	Fluconazole (10.00)	3.380±0.950*	5.765±0.471
	RCK3 (8.78)	3.429±0.755*	5.699±0.480

a) Rx: Drug treatment

b) Control: saline with 0.25% Tween.

c) Mean for right and left kidneys

\* P<0.05    \*\* P<0.01

유효성 여부를 알아보았다.

RCK3을 진균 전신 감염 생쥐에 *in vivo* 항진균시험한 결과 ED<sub>50</sub>가 8.78±0.18 mg/kg으로 대조약물인 ketoconazole의 8.00±0.73 mg/kg과 fluconazole의 10.00 mg±0.43 mg/kg과 유사하였다(Table I).

전신 감염시킨 생쥐에 대하여 RCK3은 ED<sub>50</sub> 8.78 mg/kg과 fluconazole은 10.00 mg/kg을 복강 투여한 후 간장과 신장에서의 균수를 측정함으로써 이들 화합물의 활성을 측정하였다. Table II에서 보는 것처럼 RCK3을 투여한 후 7일에 간과 신장에서의 자라 나온 균수를 비교한 결과 대조군에 비해서 RCK3은 유의성 있는 균수의 감소를 관찰할 수 있었으며 신장에 비해 간장에서 효과가 우수했다.

약물투여 14일 후에는 fluconazole 과 RCK3은 모두 대조군에 비해 균수가 유의하게 감소했으며 간에서의 균수의 감소는 fluconazole이 우수했으나 신장에서의 균수의 감소는 RCK3이 우수했다. RCK3은 fluconazole에 비교해서 비슷한 항진균효과를 나타냈다. *C. albicans*를 만성 전신 감염시킨 생쥐에서의 약물의 생명유지 효과를 측정하였다. *C. albicans*를 만성 전신 감염시키고 대조군의 생쥐가 모두 사망할 때까지 유효농도의 약물을 하루에 한번씩 투여하였다. 즉 RCK3은 ED<sub>50</sub> 8.78 mg/kg과 ketoconazole은 8.00 mg/kg을 투여하면서 생존율을 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. RCK3의 생존연장을 측정 결과 대조군에 비해 85%까지 생명을 연장시킴으로써 항진균 효과를 나타내었다. 한편 기존의 ketoconazole은 50%까지 생명을 연장시켰다. 따라서 RCK3의 항진균력이 ketoconazole에 비교해서 우수하다고 사료된다.

새로운 항진균작용 기전을 갖는 항진균제를 개발하기 위해 quinolinedione유도체중 RCK3의 항진균작용을 검색하였다.

*C. albicans* 감염 생쥐를 이용한 ED<sub>50</sub>치 측정 결과 RCK3은 ketoconazole과 유사한 활성을 나타내었다. 아울러 전신감염 생쥐의 간장과 신장에서의 *Candida albicans*의 회수된 균수를 측정된 결과, 간장에서 대조군에 비해 균수가 감소한 것으로 나타났으나, 신장에서는 유의성이 없었다. 생존율 측정 결과 대조군 50%에 비해 85%까지 생명을 연장시킴으로써 항진균 효과를 나타내었다. 이 생명 연장 효과는 AIDS 환자에게서 일어나는 기회성 진균 감염의 치료제로 RCK3을 사용하면 환자의 생명을 어느 정도 연장시킬 수 있을 가능성을

보여 주었다. 이상과 같이 항진균작용을 검색한 결과 기존의 fluconazole, ketoconazole보다 우수한 항진균 작용을 나타냈다. 또한 전보<sup>7)</sup>에서 RCK3에 대해 독성 시험을 행하여 보고한 바에 의하면 유의할 만한 독성은 거의 없었고 안전성도 높았다.

RCK3은 기존의 약물보다 우수하거나 대등한 항진균 효과를 나타냄을 알 수 있다. 기존의 약물과는 전혀 다른 활성 기전을 갖고 있기 때문에 앞으로 이 약물의 단독 또는 다른 약물과의 병용 투여로 진균 치료의 상승 효과를 기대해 볼 수 있을 것이다. 그리고 RCK3의 항진균력을 보다 많은 균주를 가지고 *in vivo*에서 피부감염 항진균작용을 검색하고, 일반 및 특수독성시험, 대사 등을 연구하여 항진균성 신약 후보물질을 창제하는 것이 앞으로의 과제로 사료된다.

## 결 론

- 1) *C. albicans* 전신감염 생쥐에 대해 RCK3의 ED<sub>50</sub>을 구한 결과 8.78±0.18 mg/kg로 대조약물인 ketoconazole, fluconazole의 8.00±0.73 mg, 10.00 mg±0.43 mg/kg 과 유사한 결과를 보여 주었다.
- 2) 전신감염 생쥐에서 *C. albicans*의 회수된 균수를 측정된 결과, 간장에서 대조군에 비해 균수가 감소한 것으로 나타났으나, 신장에서는 유의성이 별로 없었다.
- 3) 그리고 생존율 측정 결과 대조군에 비해 85%까지 생명을 연장시킴으로써 항진균 효과를 나타내었다. RCK3은 기존의 ketoconazole 50%보다 우수한 항진균 효과를 나타냈다.

## 감사의 말씀

이 연구는 이화여자대학교 약학연구소 연구비 지원에 의해 수행된 것으로 깊이 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Rex, J. H., Rinaldi, M. G. and Pfaller, M. A.: Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemother.*, **39**, 1 (1995).
- 2) McGinnis M. R. and Rinaldi, M. G.: Antifungal drug: Lorian, V. (Eds.), *Antibiotics in laboratory medicine*, 3rd ed., Williams and Wilkins, Bal-

- timore, p 198 (1991).
- 3) Sheehan, D. J., Espinel-Ingroff, A., Moor, D. J. and Webb, C. D.: Antifungal susceptibility tests of yeasts: A brief overview. *Clin. Infect. Diseases*, **17** (Suppl.2), 494 (1993).
  - 4) Ryu, C. K., Kim, D. H., Yun, Y. P., Heo, M. Y., Lee, B. M., Jang, S. J. Kim, H. J. and Park, Y. M.: The evaluation of *in vivo* antifungal activities and toxicities of 6-[(N-4-chlorophenyl) amino]-7-chloro-5,8-quinolinediones, *Yakhak Hoeji*, **39**, 417 (1995).
  - 5) Porter, T. H., Skelton, F. S. and Folkers, K.: Synthesis of 5,8-quinolinequinones as inhibitors of coenzyme Q as antimalarials. *J. Med. Chem.*, **16**, 1048 (1971).; Bowman, C. M., Porter, T. H., Skelton, F. S. and Folkers, K.: 5,8-Quinolinequinone analogs which inhibit mitochondrial succinoxidase. *J. Med. Chem.*, **14**, 206 (1973).
  - 6) Hudson, A. T.: Azoovaquone-A novel agent for the treatment of malaria, PCP and toxoplasmosis.; Bentley, P. H. and Ponsford, R. (Eds.), *Recent advances in the chemistry of anti-infective agents*, Royal society of chemistry, p 322 (1992).
  - 7) Ryu, C. K., Heo, M. Y., Park, Y. M. and Yun, Y. P.: The evaluation of genotoxicities of antifungal 6-[(N-halophenyl)amino]-7-chloro-5,8-quinolinediones, *J. Appl. Pharm.*, **3**, 182 (1995).
  - 8) Ryu, C. K. and Kim, H. J.: The synthesis of 6-(N-aryl-amino)-7-chloro-5,8-quinolinedione derivatives for evaluation of antifungal activities. *Arch. Pharm. Res.*, **17**, 139 (1994).
  - 9) Ryu, C. K. and Kim, D. H.: The antifungal susceptibility tests of 5,8-quinolinediones against *Candida sp.*, *Arch. Pharm. Res.*, **17**, 483 (1994).
  - 10) Ryu, C. K. and Kim, D. H.: The synthesis and antimicrobial activities of some 1,4-naphthoquinones. *Arch. Pharm. Res.*, **15**, 263 (1992).
  - 11) Ryu, C. K. and Kim, D. H.: The some antimicrobial activities of 1,4-naphthoquinones(III). *Arch. Pharm. Res.*, **16**, 161 (1993).
  - 12) Fisher, M. A., Lee, P. G. and Tarry W. F.: Fluconazole treatment of candidiasis in normal and diabetic rats, *Antimicrobial Agents and Chemother.*, **33**, 1042 (1989).
  - 13) Viscoli, C. and Terragna, A.: Fluconazole in the treatment of candidiasis in immunocompromised children. *Antimicrobial Agents and Chemother.*, **35**, 365 (1991).
  - 14) Sugar A. M., Salibian, M. and Goldani, L. Z.: Saperconazole therapy of murine disseminated candidiasis: Efficacy and interaction with amphotericin B, *Antimicrobial Agents and Chemother.*, **38**, 371 (1994).