

## 항균제로서 Pteridine이 치환된 Pyridonecarboxylic Acids의 합성 및 항균 작용에 관한 연구

류 성 렬\* · 주 동 준

대불대학교 화학공학과\*, 경희대학교 문리과대학 화학과  
(1996년 7월 20일 접수, 1996년 11월 15일 채택)

### Studies on the Synthesis of Pteridine Substituted Pyridonecarboxylic Acids as Potential Antibacterial Agents and their Antimicrobial Activities

Seoung Ryual Ryu\* and Dong Joon Choo

\*Dept. Chem. Eng., Dae Bul Univ., Young Arm 526-890, Korea

Dept. Chem. College of Liberal Arts and Sciences, Kyung Hee Univ., Seoul 130-701, Korea

(Received July 20, 1996, Accepted November 15, 1996)

**요 약 :** 새로운 항균제 및 항종양제를 합성하기 위하여 norfloxacin(8) 또는 ciprofloxacin(9)이 pteric acid의 C-9 위치에 치환되고 C-2 위치에 아미노기 대신 CH<sub>3</sub>기가 치환된 새로운 pteric acid 유도체 13a와 13b를 합성하였다. 이는 출발 물질인 norfloxacin과 ciprofloxacin의 piperazine N-4 위치에 2-amino-3-cyano-5-chloro-methylpyrazine(20)을 결합하여 1-alkyl(ethyl, cyclopropyl)-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-[[4-N-(2-amino-3-cyanopyrazin-5-yl)methyl]piperazin-1-yl]-3-quinolinecarboxylic acid(12a, 12b)를 합성하였다. 이를 각각 acetamidine. HCl과 고리화시켜 C-2 위치에 아미노기 대신 CH<sub>3</sub>기가 치환된 새로운 pteric acid 유도체 13a와 13b를 각각 76.2%와 82.8%의 수율로 합성하였다. 그리고 이들 화합물에 대한 항균활성의 측정은 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027을 포함하여 Gram-positive와 Gram-negative bacteria에 대하여 검토한 결과 합성한 화합물 13a와 13b는 일반적으로 norfloxacin보다 낮은 항균활성을 나타냈다.

**Abstract:** In order to synthesize a new antibacterial and antitumor agents, we have prepared new analogues pteric acid(13a, 13b), which means C-9 position of pteric acid has been replaced by norfloxacin(8) or ciprofloxacin(9) and amino group of C-2 position by CH<sub>3</sub>. These derivatives were synthesized coupling at N-4 piperazine of norfloxacin and ciprofloxacin with 2-amino-3-cyano-5-chloromethylpyrazine(20) provided 1-alkyl(ethyl, cyclopropyl)-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-[[4-N-(2-amino-3-cyanopyrazin-5-yl)methyl]piperazin-1-yl]-3-quinoline-carboxylic acid(12a, 12b). It was then cyclized with acetamidine. HCl to obtain new analogues of C-2 desaminomethylptericoic acid(13a, 13b) in yield of 76.2% and 82.8% respectively. These compounds were tested *in vitro* on antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria including *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027. In general, these synthesized compounds(13a, 13b) showed less potent activities than those of norfloxacin.

1. 서 론

1988년 Kovacs[1] 등이 개발한 trimethoprim (TMP) 계열 화합물인 pyrimethamine은 폐렴과 중양 등의 치료에 유효한 것으로 알려졌다[2]. 그리고 Broughton과 Queener[3]에 의한 *P. carinii dihydrofolate reductase(DHFR)*에 대한 연구결과에 의하면 그후 개발된 trimetrexate(TMQ, 1)은 TMP보다 100~1000배 정도 약효가 우수한 것으로 알려졌다[4]. 또한 pyrido[2,3]-pyrimidine piritrexim(PTX, 2)도 TMQ와 거의 비슷한 약효를 나타낸 것으로 보고되었다[4]. 오랜기간 동안 항암제로서 암 치료에 사용되고 methotrexate(MTX, 4)는 pteridine을 모핵으로 이루어진 화합물로 극성인 유기용매에 거의 불용성인 화합물이다. 그러나 TMQ와 PTX 화합물들은 모핵이 pyrimidine계 화합물과 변형된 pteridine계 화합물을 갖는 유도체로서 극성 용해도가 크게 개선된 것으로 보고 되었다[4].

그러나 pteridine 모핵을 포함하는 화합물들이 항암[5] 및 항 malaria[6] 그리고 항균작용을[7] 나타낸다는 것으로 알려졌다. 그 중 aminopteridine과 MTX는 pteridine계 화합물로서 folic acid의 antagonist로 작용하는 것으로 1940년에 이미 화학구조가 밝혀졌으며 Seeger[8]와 Montgomery[9] 등에 의해서 MTX가 최초로 항암제로 적용되어 현재까지도 우수한 항암제로 사용되고 있다. 그러나 MTX 합성방법은 반응 중 pteridine의 낮은 극성 용해도로 pteridine 유도체를 합성하는 반응의 어려움과 낮은 수율 그리고 불순물을 제거하는 정제 과정이 어려웠으나 Taylor[10]와 Montgomery 등에 의해서 합성방법이 개선되었다. 이러한 화합물들의 중간체 합성에는 pyrazine과 pteridine 1-oxide가 이용되고 있으며, 또 pteridine 모핵의 C-2 위치와 pyrazine 고리의 일부가 변형되어 독성이 경감되고 용해도가 크게 개선된 새로운 항암제들이 개발되고 있다[11]. 다른 한편으로 quinolone 항균제는 순수한 화학요법제로서 지난 30여년 동안 oxolinic acid(5), nalidixic acid(6), 그리고 pipemidic acid(7)가 새로운 항균제 연구의 lead 화합물로서 병원균 치료에 널리 사용되었다[12]. 이러한 화합물들은 경구 투여시 높은 항균력과 넓은 항균 스펙트럼을 보여주며  $\beta$ -lactam계나 cephem계 항생제 또는 aminoglycoside계 화합물을 대체할 수 있는 품목으로 많은 관심을 끌고 있다. 또한 quinolone

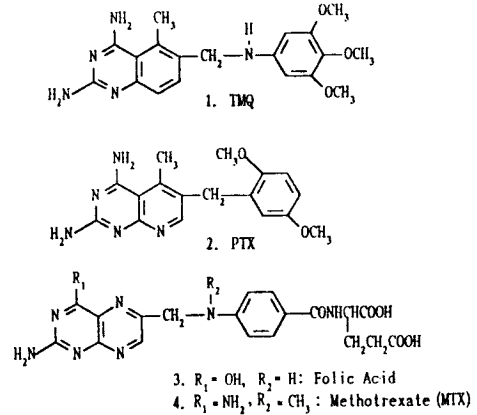


Fig. 1. Structure of methotrexate and trimetrexate derivatives.

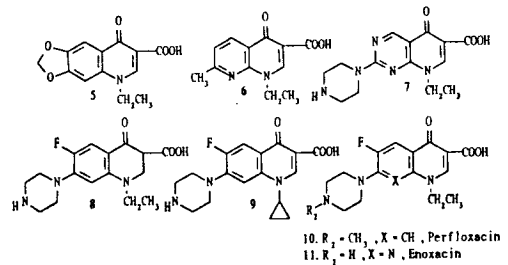
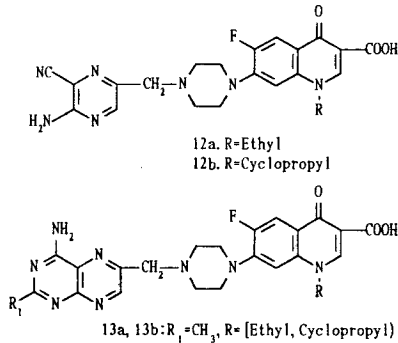


Fig. 2. Clinically significant quinolone antibacterial agents.

계 항균제는 G(-) 및 G(+)에 모두 유효하며  $\beta$ -lactamase에 안정하고 경구투여 및 정맥주사가 가능할 뿐만 아니라 요로 감염증과 중이염, 골수염, 폐염, 편도선염 등 다양한 감염증에 적용되고 있다.

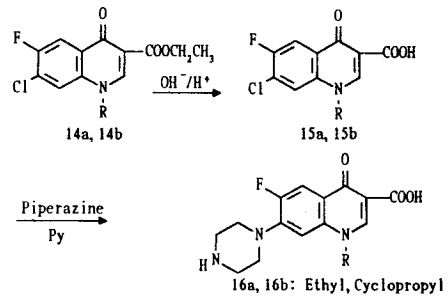
Fujita의 QSAR 연구결과 quinolone 구조적인 특징은 quinolone고리의 C-6 위치에 플루오르가 있고 C-7 위치에 1-piperazinyl기가 있으면 중전의 quinolone에 비해 gram 음성균뿐만 아니라 gram 양성균에 대해서도 항균력이 더 강하며, 전신 감염증에도 매우 우수한 치료 효과를 나타내어  $\beta$ -lactam antibiotics에 필적하는 항균제로 평가되고 있다[13]. 이와 같은 구조활성 관계로 개발된 대표적인 norfloxacin (NFLX, 8)은 1980년 Koga와 Itoh[14]에 의하여 개발되어 강력한 항균력이 있다고 보고되었다. 그러나 Wise[15] 등은 ciprofloxacin(9)이 norfloxacin(8)보다 강력한 항균작용이 있다고 보고하였으며 그후



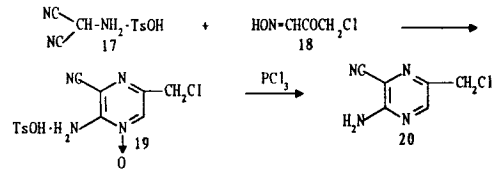
Scheme 1. The structure of designed pyrazine and pteridone derivatives.

개발된 perfloracin(PFLX, 10)[16]과 enoxacin(ENX, 11)[17] 등의 약제들은 quinolone 모핵의 C-7 위치에 있는 piperazine 고리의 4번 질소에 결합한 치환기에 따라 두 가지로 분류되고 있다. 하나는 이차 아민형(A)으로서 NFLX, ENX 등이 포함되며 이러한 화합물들은 quinolone의 C-7 위치에 piperazine 기를 가지고 있다. 다른 하나는 piperazine N-4 위치가 3차 아민형(B)으로 PFLX가 여기에 속한다. 이러한 화합물은 Fig. 2에 나타난 바와 같이 quinolone의 C-7 위치가 4-methylpiperazine기로 치환되어 있다. 그런데 PFLX는 NFLX 보다 *in vivo test*에서 활성도가 2.2~7배 높은 것으로 보고되어 있다[15].

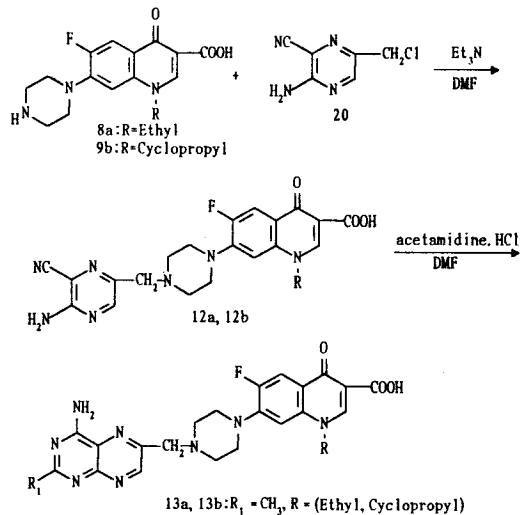
본 논문에서는 그중 항균력이 가장 우수한 norfloxacin과 ciprofloxacin에 있는 piperazine 고리의 N-4 위치에 3차 아민 형태를 갖는 화합물을 합성하기 위하여 Ferris[18] 등의 방법을 이용하여 aminomalononitrile.tosylate(17)를 합성하고 이 화합물을 Taylor[19] 등의 방법으로 합성한  $\beta$ -chloropyruvaldoxime과 반응시켜 2-amino-3-cyano-5-chloromethylpyrazine(20)을 합성하고 이를 norfloxacin 또는 ciprofloxacin과 결합하여 새로운 화합물 12a와 12b를 합성하였다. 다른 한편으로 Jones[20] 등에 의하면 quinazoline 모핵의 C-2 위치에서 NH<sub>2</sub>기 대신 CH<sub>3</sub>기로 치환되면 극성에 대한 용해도가 개선된 것으로 보고되었다. 그래서 저자들은 모핵인 pteridine 고리에서 C-2 위치에 있는 NH<sub>2</sub>기 대신 CH<sub>3</sub>기로 치환된 화합물을 합성하기 위하여 화합물 12a와 12b를 고리화하여 3-quinolonecarboxylic acid 유도체 13a와 13b를 합성하였다. 이 화합물은 antifolate



Scheme 2. Quinolone 항균제의 합성경로.



Scheme 3. 2-Amino-3-cyano-5-chloromethylpyrazine의 합성경로.



Scheme 4. Norfloxacin과 ciprofloxacin을 이용한 2-desaminomethyl pteridone 유도체 합성.

로서 강력한 항균력과 항 malaria 및 항암성을 동시에 갖는 신규 화합물로 기대된다. 그것은 약효 면에서 더 우수한 PTX와 화학 구조식이 비슷한 pteridine 모핵을 갖으면서 TMQ나 PTX 구조식에서 항균성을 갖는 trimethoxyphenylamino기나 trimethoxyphenyl기 대신보다 항균력이 우수한 pyridonecarboxylic acid를 도입하여 강력한 항균활성을 갖는

antifolate로서 항종양제로 예상되는 화합물 13a와 13b를 합성하였다. 이 화합물은 pteric acid와 같은 antifolate로 기대되는 DHFR의 억제제로 알려진 non classical antifolate인 TMQ나 PTX와의 약효검색을 비교해 보고 앞으로 화합물 13a와 13b를 L-glutamic acid와의 결합을 시도하여 MTX와 항암성에 관한 약효 검색을 비교할 계획이다. 먼저 합성하고자 하는 화합물은 scheme 1에 나타내었으며 그리고 치환체 합성경로 및 유도체의 합성경로는 scheme 2, 3, 4에 각각 나타내었다.

## 2. 실험

### 2.1. 재료 및 방법

#### 2.1.1. 시약 및 기기

시약 및 용매는 Aldrich사 제품을 그대로 사용하였으며,  $\beta$ -chloro-pyruvaldoxime은 Taylor 등의 방법[19]으로 직접 합성하여 사용하였다. 합성한 화합물을 확인하는데 사용한 기기중 용점측정은 Thomas Hoover melting point Apparatus를 사용하였으며 보정은 하지 않았다. 핵자기공명 분광기는 Varain T60과 HA-100을 사용하였다. 그리고 적외선 분광기는 Bruker IFS 66 FT-IR Spectrophotometer를 사용하여 측정하였으며 T.L.C plate는 Merk DC-Fertig Platten Kieselgel 60F 254를 사용하였다. 그리고 Minimum Inhibitory Concentration test는 Abbott Co., Advantage Analysis Module, U.S.A을 사용하였다.

### 2.2. Quinolone 중간체의 합성

#### 2.2.1. 1-Ethyl-6-fluoro-7-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid(15a)의 합성

Koga 등의 방법[14]에 의하여 합성한 화합물(14a) 30.0g(0.1mol)을 알카리 가수분해하여 백색의 고체 화합물 23.0g(85.3%)을 얻었다.

수율 : 85.3% 녹는점 : 283~284°C

Lit[14] : 284~285°C

IR(KBr),  $\text{Cm}^{-1}$  : 3300~3400(OH), 3100(=C-H), 1717(CO), 1610, 1500(C=C), 1220(C-O)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  : 1.85(t, 3H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $J=7.2$  Hz), 4.72(q, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $J=7.2$  Hz), 8.43(d, 1H, C8-H,  $J=5.8$  Hz), 8.45(d, 1H, C5-H,

$J=9.76$  Hz), 8.9(s, 1H, C2-H)

#### 2.2.2. 1-Cyclopropyl-6-fluoro-7-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid(15b)의 합성

Wise 등의 방법[21]에 의하여 합성한 화합물(14b) 31.0g(0.1mol)을 알카리 가수분해하여 백색결정 화합물 25.0g을 얻었다.

수율 : 88.8% 녹는점 : 224~225°C

Lit[21] : 223~225°C

IR(KBr),  $\text{Cm}^{-1}$  : 3520(OH), 3050(=C-H), 1708(CO), 1610 and 1460(C=C)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  : 1.25~1.32(m, 4H, cyclopropyl 2- $\text{CH}_2$ -), 3.75~3.82(m, 1H, cyclopropyl =CH-), 8.25(d, 1H, C8-H,  $J=8.2$  Hz), 8.35(d, 1H, C5-H,  $J=13$  Hz), 8.7(s, 1H, C2-H)

#### 2.2.3. 1-Ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinolonecarboxylic acid(16a)의 합성

Koga 등의 방법[14]으로 화합물(15a) 10.0g(0.04mol)을 piperazine과 결합하여 백색 결정 화합물 6.30g을 얻었다.

수율 : 53.2% 녹는점 : 227~228°C (dec.)

Lit[14] : 227~228°C

IR(KBr),  $\text{Cm}^{-1}$  : 3500~3400(O-H), 1730(acid C=O), 1628(C=O), 1600 and 1500(C=C), 1100(C-O)

$^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CF}_3\text{COOD}$ ),  $\delta$  : 1.82(t, 3H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4.15~4.23(m, 8H, piperazine  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 4.9(q, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 7.45(d, 1H, C8-H,  $J=8.0$  Hz), 8.2(d, 1H, C5-H,  $J=12.0$  Hz), 9.2(s, C1-H, C2-H)

#### 2.2.4. 1-Cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinolinecarboxylic acid(16b)의 합성

Wise 등의 방법[21]으로 화합물(15b) 10.0g(0.04mol)을 piperazine과 결합하여 백색결정 화합물 7.15g을 얻었다.

수율 : 60% 녹는점 : 255~257°C (dec.)

Lit[21] : 255~257°C

IR(KBr),  $\text{Cm}^{-1}$  : 3500~3400(O-H), 1620

(acid C=O), 1500 and  
1490(C=C)

<sup>1</sup>H-NMR(CF<sub>3</sub>COOD), δ: 1.38~1.41(m, 4H, cyclopropyl 2-CH<sub>2</sub>-), 3.76~3.82(m, 1H, cyclopropyl =CH-), 3.86~4.1(m, 8H, piperazine 4-CH<sub>2</sub>), 7.69(d, 1H, C8-H, J=7.0 Hz), 8.14(d, 1H, C5-H, J=13 Hz), 9.19(s, 1H, C2-H)

2.2.5. 2-amino-3-cyano-5-chloromethylpyrazine-1-oxide tosylate(19)의 합성

Ferris 등의 방법[18]에 의해서 합성한 화합물 aminomalononitrile.tosylate(17) 10.7g(0.04mol)과 β-chloro-pyruvaldoxime(18) 50.0g(0.41mol)을 Taylor[19]의 방법으로 결합하여 갈색 결정화합물 3.0g을 얻었다.

yield : 19.7%

mp : 139~144°C Lit[19] : 140~144°C

IR(KBr), Cm<sup>-1</sup> : 3440(NH<sub>2</sub>), 2240(CN)

<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>), δ : 1.45(s, 3H, CH<sub>3</sub>),

4.65(s, 2H, -CH<sub>2</sub>Cl),

6.48(d, 2H, -C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-),

6.8(d, 2H, -C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-),

8.12(brs, 2H, NH<sub>2</sub>),

8.6(s, 1H, 6-H)

2.2.6. 1-Ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-[[4-N-(2-amino-3-cyanopyrazin-5-yl)methyl]piperazin-1-yl]-3-quinolinecarboxylic acid(12a)의 합성

DMF 30ml에 화합물(16a) 0.30g(0.94mmol)을 넣어 녹인 다음 별도로 Taylor[19] 등의 방법으로 합성한 화합물(19)를 Taylor의 탈 산소화 반응방법[10]으로 반응시켜서 생성된 pyrazine 화합물(20) 0.67g(0.001mol)을 넣고 질소기류 하에서 triethylamine 2ml을 넣은 후 실온에서 30분 동안 저어주었다. 이 혼합물을 천천히 90°C로 올리고 7시간 동안 가온하고 냉각시킨 다음 증류수 20ml를 넣고 1:1 HCl로 중화시키면 백색결정이 생성된다. 이를 거른 다음 증류수와 ethanol로 씻어 준 후 건조하여 결정 화합물 1.52g을 얻었다.

수율 : 84.7% mp : 270°C(dec.)

IR(KBr), Cm<sup>-1</sup> : 3310, 3210(NH<sub>2</sub>), 2220(CN),

1722(C=O), 1620 and

1465(C=C)

<sup>1</sup>H-NMR(CF<sub>3</sub>COOD), δ : 1.79(t, 3H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,

J=7.5 Hz), 3.82~3.87(m, 4H,

piperazine -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 4.21~4.28

(m, 4H, piperazine -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-),

4.78~4.81(m, 4H, -CH<sub>2</sub>- and

-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 7.5(d, 1H, C8-H,

J=8.0 Hz), 8.3(d, 1H, C5-H,

J=15 Hz), 8.7(s, 1H, pyrazine

C6-H), 9.4(s, 1H, C2-H)

2.2.7. 1-Cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-[[4-N-(2-amino-3-cyanopyrazin-5-yl)methyl]piperazin-1-yl]-3-quinolinecarboxylic acid(12b)의 합성

DMF 30ml에 화합물(16b) 0.30g(0.91mmol)을 넣고 녹인 다음 pyrazine 유도체 화합물(20) 0.17g(0.001mol)을 넣은 다음 질소기류 하에서 화합물(12a)의 합성방법으로 반응시킨 다음 이를 걸러서 증류수와 ethanol로 씻어준 후 건조하여 결정 화합물 0.38g을 얻었다.

수율 : 81.3% mp : 237°C(dec.)

IR(KBr), Cm<sup>-1</sup> : 3450, 3310(NH<sub>2</sub>), 2220(CN),

1728(C=O), 1630 and

1485(C=C)

<sup>1</sup>H-NMR(CF<sub>3</sub>COOD), δ : 1.51~1.68(m, 4H, cyclo-

propyl 2-CH<sub>2</sub>-), 3.85(m, 1H,

cyclopropyl =CH-), 3.6~4.3

(m, 8H, piperazine 2-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-),

4.8(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 8.0(d, 1H, C8

-H), 8.4(d, 1H, C5-H, J=8.4

Hz), 8.4(s, 1H, pyrazine C6-H),

9.4(s, 1H, C2-H)

2.2.8. 1-Ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-[[4-N-(4-amino-2-desaminomethylpteridin-6-yl)methyl]piperazin-1-yl]-3-quinolinecarboxylic acid(13a)의 합성

Flask에 재 증류한 DMF 20ml을 넣고 화합물(12a) 0.30g(0.65mmol)을 넣어서 녹인 다음 별도로 MeOH 20ml에 sodium 0.02g(0.8mmol)을 녹인 용액을 소량씩 천천히 넣어 주었다. 이어서 acetamidine. HCl 0.08g(0.68mmol)을 일시에 넣은 후 30분 동안 저어 준 후 95°C로 온도를 천천히 올린 다음 약 4시

간 동안 반응시켰다. 이를 실온으로 냉각시키고 걸러서 여액을 감압 농축하였다. 그리고 용매를 제거하고 n-hexane 20ml을 소량씩 넣고 약 4시간 동안 방치한 다음 생성된 고체를 거르고 증류수로 2회 세척하여 노란색 화합물을 얻었다. 이를 0.4 N NaOH용액 30ml에 녹이고 다시 1:1 HCl로 중화시킨 다음 3시간 동안 방치하여 생성된 결정 화합물을 걸러서 증류수로 씻고 또 ethanol과 ether 순으로 씻어 준 다음 건조하여 0.24g을 얻었다.

수율 : 76.2% mp : 222°C(dec.)  
 IR(KBr),  $Cm^{-1}$  : 3350(NH<sub>2</sub>), 1715(C=O), 1620 and 1460(C=C)  
<sup>1</sup>H-NMR(CF<sub>3</sub>COOD),  $\delta$  : 1.8(t, 3H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.0(s, 3H, pteridine ring C2-CH<sub>3</sub>), 3.71~4.12(m, 4H, piperazine -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 4.13~4.32(m, 4H, piperazine -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 4.9(q, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5.3(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 7.6(d, 1H, C8-H, J=8.0Hz), 8.42(d, 1H, C5-H, J=12.0 Hz), 9.3(s, 1H, pteridine ring C7-H), 9.4(s, 1H, C2-H)

2.2.9. 1-Cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-[[4-N-(4-amino-2-desaminomethylpteridin-6-yl)methyl]piperazin-1-yl]-3-quinolinecarboxylic acid (13b)의 합성

Flask에 재 증류한 DMF 20ml와 화합물(12b) 0.30g(0.65mmol)을 넣고 녹인 다음 별도로 MeOH 20ml에 sodium 0.02g(0.8mmol)을 녹인 용액을 소량씩 천천히 넣어 주었다. 이어서 acetamidine.HCl 0.08g(0.68mmol)을 일시에 넣은 후 30분 동안 저어 주고 온도를 95°C로 올려서 약 4시간 동안 반응시켰다. 이를 화합물(13a)의 합성방법으로 반응시킨 다음 이를 걸러서 증류수로 씻어주고 또 ethanol과 ether 순으로 씻어준 다음 건조하여 0.27g을 얻었다.

수율 : 82.8% mp : 206°C(dec.)  
 IR(KBr),  $Cm^{-1}$  : 3400(NH<sub>2</sub>), 1720(C=O), 1630 and 1485(C=C)  
<sup>1</sup>H-NMR(CF<sub>3</sub>COOD),  $\delta$  : 1.6~1.9(m, 4H, cyclopropyl 2-CH<sub>2</sub>-), 3.2(s, 3H, pteridine ring C<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4.1~4.3(m, 4H, piperazine -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 4.4(m, 1H, cyclopropyl -CH-),

4.4~4.6(m, 4H, piperazine -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 5.5(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 8.2(d, 1H, C8-H, J=6.8 Hz), 8.6(d, 1H, C5-H, J=8.7 Hz), 9.6(s, 1H, pteridine C7-H), 9.7(s, 1H, C2-H)

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

합성한 신규 pteric acid 유도체 화합물 13a와 13b의 MIC test는 norfloxacin과 ciprofloxacin을 대조약물로 하고 미생물은 G(-)균으로 *Pseudomonas Aeruginosa* ATCC 9027, *E. coli* ATCC 10536, *E. coli* ATCC 8739과 *Proteus* MB 83059, *Salmonella typhimurium* ATCC 19438 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 그리고 G(+)균으로 *Staphylococcus epidermis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633을 사용하여 LB배지에서 37°C에서 24시간 인양 배양하였다. 그리고 실험에 사용한 배지는 Bactopeptone 20g, Yeast extract 10g, 그리고 NaCl 20g과 증류수 21ml의 조성으로 이루어진 LB배지를 pH 7.3으로 조정하여 사용하였다.

2.3.1. 검정배지 제조 및 항균력 판정

대조약물과 시험 물질을 DMF 0.30%(v/v) 함유한 phosphate buffer solution(1.00% w/w, pH 6.0) 1ml에 녹인 후 LB배지와 섞었을 때 최종 배지의 항균제와 시험물질의 농도를 100µg/ml에서부터 2배씩 희석하여 0.05µg/ml까지 12개 농도로 하였다. 그리고 CFU(Colony Forming Unit)는 1.20% LB agar 배지에서 측정하였으며, CFU 측정 결과로부터 배양한 균체액을 LB배지로 10cccls/ml가 되도록 희석하여 사용하였다. 그리고 항균력을 결정하기 위해 Avantage module에서 5분마다 670nm에서 광학밀도(Optical Density : OD)를 읽으면서 12시간에서 24시간까지 결과를 기록하고 증식곡선을 작성하여 최소발육 저지농도(Minimum Inhibitory Concentration : MIC)를 결정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Pteridine이 도입된 quinolone 유도체의 항균 활성효과

Table 1. Antibacterial Activities of Pteridine Derivatives(MIC,  $\mu\text{g/ml}$ )

Compounds	13a	13b	CFX*	NFX <sup>†</sup>
Test Micro organism				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0.2	0.34	0.2	0.4
<i>Staphylococcus epidermis</i> ATCC 12228	0.2	0.1	0.1	0.2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.2	0.34	0.2	0.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	12.5	3.13	0.4	0.78
<i>E. coli</i> , ATCC 10536	0.78	0.2	0.05**	0.05**
<i>E. coli</i> , ATCC 8739	0.78	0.1	0.05**	0.05**
<i>Proteus</i> MB 83059	1.56	0.1	0.05**	0.05**
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 19438	0.78	0.05	0.05**	0.05**

\*CFX : Ciprofloxacin, <sup>†</sup> NFX : Norfloxacin, \*\*lower than 0.05  $\mu\text{g/ml}$

신규 pteric acid 유도체 화합물 13a와 13b에 대한 *in vitro*에서 최소발육 저지농도(MIC,  $\mu\text{g/ml}$ )를 측정된 결과를 Table 1에 수록하였다.

즉 합성한 신규 pteric acid 유도체 13a와 13b의 항균력을 살펴 보면 G(-)균인 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027과 *E. coli* ATCC 10536, *E. coli* ATCC 8739, *Proteus* MB 83059 및 *Salmonella typhimurium* ATCC 19438 균류에 대한 MIC가 화합물 13a는 각각 12.5  $\mu\text{g/ml}$ , 0.78  $\mu\text{g/ml}$ , 0.78  $\mu\text{g/ml}$ , 1.56  $\mu\text{g/ml}$ , 0.78  $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났으며 화합물 13b는 3.13  $\mu\text{g/ml}$ , 0.2  $\mu\text{g/ml}$ , 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , 0.05  $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 그리고 G(+)균인 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633에서는 화합물 13a는 각각 0.2  $\mu\text{g/ml}$ , 0.2  $\mu\text{g/ml}$ , 0.2  $\mu\text{g/ml}$ 로 균의 발육을 억제하였다. 그리고 화합물 13b는 각각 0.34  $\mu\text{g/ml}$ , 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , 0.34  $\mu\text{g/ml}$ 로 녹농균을 제외하고는 norfloxacin이나 ciprofloxacin에 비해 대등한 항균력을 보여주었다. 일반적으로 piperazine의 N-4 위치에 bulky한 치환체가 도입되었을 경우나 quinolone의 C-7 위치에 분자량이 큰 헤테로 고리 화합물이 치환된 경우 quinolone계 유도체들의 항균력은 크게 감소하는 일반적인 이론과는 달리 화합물 13b에서는 항균력이 높게 나타났다. 그리고 이와 같은 pteridine계 화합물로서 항균 및 항종양성을 갖는 새로운 물질을 합성하기 위하여 1-alkyl(ethyl, cyclopropyl)-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-[[4-N-(2-amino-3-cyanopyrazin-5-yl)methyl]piperazin-1-yl]-3-quinolinecarboxylic acid 화합물인 12a와 12b를 합성하는 방법은 n-butanol과 base로서 triethylamine을 이용하는 방법 보다는

DMF 용매하에서 triethylamine을 사용하였을 때의 방법이 반응이 더 빨랐으며 수율이 각각 84.9%와 90.5%로 더 높았다. 또한 합성한 화합물 12a와 12b에 대한 IR spectrum 결과에 의하면 CN기의 특성 피크가 2220  $\text{cm}^{-1}$ 에 나타남을 알 수 있었다. 그리고 pyrazine 화합물인 12a와 12b를 고리화하여 얻은 pteridine 화합물 13a와 13b에 대해서는 CN기의 bend가 없어짐으로써 본 화합물이 합성됨을 알 수 있었다. 그리고 pteridine 모핵의 C-2 위치에  $\text{NH}_2$  치환기 대신  $\text{CH}_3$ 로 치환된 pteric acid 유도체인 13a와 13b를 합성하기 위하여 화합물 12a와 12b를 acetamide.HCl과 고리화 반응으로 pteridine의 C-6에 side chain을 갖는 PTX 유도체인 13a와 13b를 76.2%와 82.8%로 합성하였다. 이러한 PTX 유도체를 합성하는 과정에서 pteridine 모핵의 C-2 위치에 있는  $\text{NH}_2$  대신  $\text{CH}_3$ 로 치환한 화합물은 일반적으로 DMF 용매나 알칼성 유기용매에 용해도가 좋았다. 이 사실로 미루어 보아 C-2 위치가  $\text{CH}_3$ 로 치환한 화합물이 극성 용해도가 증가됨을 알 수 있었다. 그 결과 용해도가 항균력에도 밀접한 관계가 있는 것을 고려했을 때 화합물 13a와 13b를 비교해 보면 13b는 13a에 비하여 녹농균인 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027에 대해서는 4배 정도 우수하였으며 비교대상 화합물인 norfloxacin보다는 13b가 4배 정도 낮은 항균력을 나타냈다. 또 간균에 있어서는 화합물 13a가 화합물 13b보다 오히려 1.7배 정도 우수하며 전 균류에 대해서는 화합물 13a보다 전반적으로 화합물 13b가 3.9배나 높은 항균력을 나타냈다. 항암 효과와 항균력 특히, 폐렴구균에 대한 항균력을 동시에 구비한 치료제를 개발하기 위하여 norfloxacin과

ciprofloxacin에 pteridine의 구조가 결합된 새로운 화합물 13a와 13b를 합성하였으며 이 화합물들의 MIC값을 측정된 결과 다음 몇 가지 결론을 얻었다.

#### 4. 결 론

1. 항균제인 ciprofloxacin의 piperazine N-4 위치에 bulky한 화합물이 치환됐을 때 항균력의 급격한 감소 현상과는 달리 항균력 시험결과 항균력이 우수한 것으로 나타났다. 그리고 pteridine 유체들의 piperazine N-4 위치에 결합한 pteridine 모핵중 C-2 위치에 NH<sub>2</sub> 대신 CH<sub>3</sub>로 치환한 화합물 13a와 13b의 극성 용해도가 크게 증가됨을 알 수 있었다.
2. 서론에서 언급한 TMQ나 PTX가 폐렴균과 악성 종양의 감염치료에 약 효염이 뚜렷한 제제라고 언급하였다. 이를 TMQ나 PTX의 화학적 구조와 비교해보면 새로 합성한 화합물 13a와 13b는 일반적으로 잘 알려진 항암성 및 항균성이 있는 Pteridine핵을 이루고 있으며 또 TMQ나 PTX의 중간 치환체인 trimethoxyphenylamino기나 trimethoxyphenyl 치환기 대신에 최근에 약효면에서 항균력이 우수한 ciprofloxacin 항균제를 도입하여 우선적으로 항균력을 향상시키고자 하였으며 일반적으로 화합물 13a와 13b의 항균력이 실험 결과 비교적 우수한 것으로 나타났다. 그중 화합물 13b는 화합물 13a 보다는 약 1.7배 항균력이 우수하였다. 그리고 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermis* ATCC 12228, 그리고 *Salmonella tryphimurium* ATCC 19438에 대해서는 화합물 13b가 ciprofloxacin과 비슷하였으며 그 외의 균류들에 대해서는 NFX에 비하여 낮았다. 그러나 이들 pteridine 자체가 항균력이 있으나 친지성인 점으로 보아 항균력에 대한 세부검토 여부는 *in vivo test*를 실시하여야 될 것으로 사료된다. 또 이를 신규 화합물에 대한 항종양성 시험 여부는 가까운 시일내에 실시하여 보고하려고 한다.

#### 참고 문헌

1. J. A. Kovacs, C. A. Allegra., J. C. Swan, J. C. Drake, J. E. Parrillo, B. A. Chabner, and H. Masur, Potent Antipneumocystic and Antitoxoplasma Activities of Piritrexim, a Lipid-Soluble Antifolate, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **32**,

- 430-433(1988).
2. C. J. Allegra, J. A. Kovacs, J. C. Drake, J. C. Swan, B.A.Chabner, and H. Masur, Activity of Aitifolates Against Pneumocystis carinii, Dihydrofolate Reductase and Identification of a Potent New Agent, *J. Exp. Med.*, **165**, 926-931 (1987).
3. M. C. Broughton and S. F. Queener, Pnenmocystis carinii Dihydro folate Reductase Used to Screen Potential Antipneumocystis Drugs, *Antimicrob. Agent Chemother.*, **35**, 1348-1355(1991).
4. A. R. Castellano, M. D. Nettleman, Cost and Benefit of Secondary Prophylaxis for pneumocystis carinii pneumonia., *J. Am. Med. Assoc.*, **266**, 820-824(1991).
5. R. J. Schnitzer and F. Hawking, Ed., "Experimental Chemistry", Vol. IV, Part, I, Academic Press, N. Y.(1966).
6. R. M. Prinder in "Medicinal Chemistry", 3rd ed., Part I, A. Burger, Ed., 492-521, Wiley Interscience, New York(1990).
7. Maryam Ghazala. M, G. Nair, Y. Gaumont, and T. I. Kalam, *Med. Chem.*, **29**, 1263(1986).
8. D. R. Seeger, J. M. Smith, and M. Hulquist, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2567(1947).
9. J. R. Piper and J. A. Montgomery, *J. Het. Chem.*, **11**, 279(1974).
10. E. C. Taylor, "Chemistry and biology of pteridine", proceeding of the forth International symposium on pteridine, Toba, 79(1969), International academic printing Co., Ltd., Tokyo (1970).
11. L. R. Hughes, P. R. Marsham, J. Oldfield, and A. L. Jackman, *Proc. Am. Assoc. Cancer. Res.*, **29**, 286(1988).
12. V. Cecchettis, S. Dominich, A. Fravolini, and F. Schiaffella., *Eur. J. Med. Chem.*, **19**, 29(1984).
13. T. Fujita in Drug Design, Fact or Fantasy., G. Jolles, and K. R. H. Wooldridge, eds, 19, Academic Press, London(1984).
14. H. Koga, A. Itoh, S. Murayama, S. Suzue, and T. Irikura, *J. Med. Chem.*, **23**, 1358(1980).
15. R. Wise et al, *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **23**,



- 559(1983).
16. J. Matsumoto, T. Miyamoto, A. Minamida, Y. Nishimura, and H. Eqawa. *J. Med. Chem.*, **27**, 292(1984).
17. E. J. Vandamme. *Drugs and Pharnaceutical, Sciences.*, **22**, 111(1984).
18. J. P Ferris, R. A. Sanchez, and R. W. Marn-cuso, *Org. Syn. Colleet.*, **5**, 32(1973).
19. E. C. Taylor, R. C. Rortnoy, and D. C. Hochstetler, *J. Org. Chem.*, **40**, 2347(1975).
20. T. R. Jones, A. H. Calvert, A. L. Jackman, S. J. Brown, M. Jones, and K. R. Harrap, *Eur. J. Cancer.*, **17**, 11(1981).
21. R. Wise, J. M. Andrews, and I. Edward, *J. Anti-microb. Agents Chemother.*, **23**, 559(1983).