

10-(치환)-레보플록사신 유도체의 합성 및 항균 작용

이재영 · 유진철 · 고옥현[#]

조선대학교 약학대학

(Received July 23, 2001; Revised August 6, 2001)

Synthesis and Antimicrobial Activity of 10-Substituted Levofloxacin Derivatives

Jae-Young Lee, Jin-Cheol Yoo and Ok-Hyun Ko[#]

College of Pharmacy, Chosun University, Kwangju 501-759 Korea

Abstract — A series of (-)-9-fluoro-2,3-dihydro-3(S)-methyl-10-(4-substituted-1-piperazinyl)-7-oxo-7H-pyrido [1,2,3-de] [1,4]-benzoxazine-6-carboxylic acid (**5-8**) was synthesized and evaluated for antibacterial activity against gram(+) and gram(-) bacteria. These synthesized compounds showed a lower activity than levofloxacin.

Keywords □ 7H-pyrido [1,2,3-de] [1,4]-benzoxazine, quinolone antibiotics

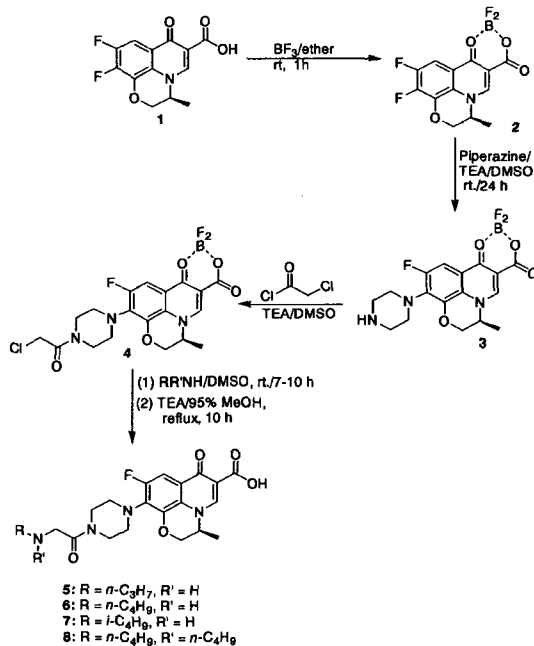
Gram(+) 및 Gram(-)균에 우수한 항균력을 가진 Quinolone계 항균제로는 Norfloxacin,¹⁾ Enoxacin,²⁾ Ciprofloxacin,³⁾ Aminofloxacin,⁴⁾ Perfloxacin⁵⁾ 등이 알려져 있다. 이 약품들은 분자구조의 6번 위치에 fluorine, 7번 위치에 1-piperazinyl기를, 3번 위치에 carboxyl기를 공통적으로 가지고 있으며 이렇기 항균 작용에 중요한 기능을 하는 것으로 사료된다. 특히, 삼원환 구조를 가진 quinolone 항균제로 flumequine,⁶⁾ methylflumequine⁶⁾ 및 ofloxacin⁷⁻¹⁰⁾ 등이 보고 되어 있다. Ofloxacin은 pyridobenzoxazine 환을 가지며 oxazine의 C-3위치에 methyl기가 (S)-배열로 결합되어 있는 항균제로 세계각국의 시장에 널리 알려져 있다. Ofloxacin에서 (S)-(-)-ofloxacin(levofloxacin)이 (R)-(+)-ofloxacin 보다 8~128배의 항균력을 지니며 racemate 보다도 약 2배의 항균력을 가진다고 보고⁸⁾ 되어 있다. 본 저자는 항균력이 뛰어난 (S)-(-)-ofloxacin(levofloxacin)의 N-methylpiperazine 부위를 주목하여 piper-

azinyl기의 N-H를 여러 가지 N-COCH₂NRR'기를 도입한 화합물을 합성하여 Gram(+)과 Gram(-)균에 대하여 항균 작용을 시험 하였다.

실 험

시약 및 기기 — 본실험에 사용된 시약은 Aldrich Co., Sigma Co., Merck사에서 구입한 일급시약을 사용하였다. 합성 중간체인 (-)-9,10-difluoro-3(S)-methyl-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de] [1,4]-benzoxazine-6-carboxylic acid (**1**)은 알려진 방법^{7,8,10)} 의하여 합성하여 사용하였다. 용매는 필요에 따라 정제하여 사용하였다. TLC는 Kieselgel F₂₅₄(0.25 mm, Merck)를 바른 유리판을 잘라 사용하였으며 spot는 자외선 램프 UVGL-58 및 phosphomolybdic acid의 10% EtOH 용액으로 확인 하였으며 column chromatography는 silica gel(230~240 mesh, 60Å, Merck)을 사용하였다. 융점측정은 Thomas-Hoover type melting point apparatus를 사용하였으며 이에 대한 보정은 하지 않았다. NMR spectra는 Bruker사의 300 MHz spectro-

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 062-230-6375 (팩스) 062-222-5414



Scheme 1 - Synthesis of 10-substituted levofloxacin derivatives.

meter를 사용하여 proton과 carbon13를 측정하였다. 이때 화학이동은 TMS를 reference로 하여 ppm 단위로 기록하였다. Optical rotation은 Rudolph사의 Autopol IV automatic polarimeter를 사용하였다.

(-)-9,10-Difluoro-3(S)-methyl-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-*de*] [1,4]benzoxazine-6-carboxylic acid BF₂-chelate (2)

화합물 1 50 mg(0.16 mmol)에 Et₂O 10 ml, boron-trifluoride etherate 0.7 ml를 가하여 실온에서 1시간 교반하였다. 생성된 결정을 여과하고 Et₂O, MeOH로 여러번 세척하여 미황색 결정 51 mg을 얻었다.

Yield: 95%; mp > 300°C [lit.¹⁰⁾ > 300°C]; [α]_D²⁵ -9.2 (c=0.5, DMSO) ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.52 (d, 3H, CH₃), 4.58 (dd, 1H, OCH₂), 4.85 (d, 1H, OCH₂), 5.34 (m, 1H, CHCH₃), 8.25 (m, 1H, CHCF), 9.69 (s, 1H, CHN); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 15.9, 59.8, 82.2, 109.9, 111.2, 127.2, 130.8, 138.7, 141.4, 170.8, 186.6.

(-)-9-Fluoro-2,3-dihydro-3(S)-methyl-10-piperazinyl-7-oxo-7H-pyrido[1,2,3-*de*] [1,4]benzoxazine-6-carboxylic acid BF₂-chelate (3)

화합물 2 1.0 g(3.03 mmol)을 DMSO 10 ml에 용해한후 천천히 가온하면서 용해시켰다. 여기에 TEA 0.84 ml를 천천히 가한후 piperazine 0.31 g(3.6 mmol)을 상온에서 가한다. 24시간 교반한후 물 50 ml를 가하여 결정을 얻었다. 생성된 고체를 여과하고 증류수로 여러번 세척한후 EtOH로 재결정 하였다.

Yield: 864 mg (72%), mp: 258~262°C(dec.), [α]_D²⁵ -29° (c=1.25, DMSO). ¹H NMR (DMDO-*d*₆) δ: 1.52 (s, 3H, CH₃), 3.18~3.52 (m, 9H, CHCH₃, 4CH₂N), 4.30 (d, 1H, CHO), 4.62 (d, 1H, CHO), 7.70 (d, 1H, CHCF), 9.41 (s, 1H, CHN); ¹³C NMR (DMDO-*d*₆) δ: 16.7, 49.8, 58.6, 59.7, 82.2, 109.2, 110.7, 112.9, 124.2, 127.2, 130.8, 136.7, 156.6, 170.8, 186.6.

(-)-9-Fluoro-2,3-dihydro-3(S)-methyl-10-[4-(2-chloroacetyl)piperazin-1-yl]-7-oxo-7H-pyrido[1,2,3-*de*] [1,4]benzoxazine-6-carboxylic acid BF₂-chelate (4)

화합물 3 0.5 g(1.26 mmol)을 무수 DMSO 5 ml에 용해한후 TEA 0.36 ml 및 chloroacetyl chloride (0.12 ml, 1.2eq)을 상온에서 가한다. 이 반응액을 24시간 교반한후 물 50 ml를 가하여 생성된 고체를 여과하였다. 물로 수회 세척하여 진공 건조 하였다.

Yield: 405 mg (68%); mp: 275~277°C; [α]_D²⁵ -21° (c=0.89, DMSO); Rf=0.4

(CH₃CN : H₂O = 12 : 1); ¹H NMR (DMDO-*d*₆) δ: 1.55 (s, 3H, CH₃), 3.30~3.61 (m, 9H, CHCH₃, 4CH₂N), 4.48 (d, 1H, CHO), 4.69 (d, 1H, CHO), 5.19 (s, 2H, CH₂Cl), 7.81 (d, 1H, CHCF), 9.47 (s, 1H, CHN); ¹³C NMR (DMDO-*d*₆) δ: 15.5, 46.8, 57.7, 48.2, 58.3, 81.2, 108.9, 110.0, 112.2, 123.8, 126.9, 129.3, 136.2, 156.5, 164.1, 170.0, 187.0.

General synthetic process of compounds 5, 6, 7, 8

화합물 4 5mmol을 DMSO 5 ml에 가하여 1시간 교반한후 amine류 22.5 mmol(4.4eq)을 천천히 가하였다. 이반응물을 7~10시간 상온에서 교반한후 DMSO를 감압농축하여 잔사를 얻었다. 이잔사를 정제하지 않고 95% MeOH 15 ml, TEA 2 ml를 가하여 10시간 환류시켰다. 반응물을 감압 건조한후 잔사를 column chromatography(CH₃CN : H₂O = 5 : 1)로 분리

하였다.

(-)-9-Fluoro-2,3-dihydro-3(S)-methyl-10-[4-(2-propylaminoacetyl)piperazin-1-yl]-7-oxo-7H-pyrido [1,2,3-de] [1,4]benzoxazine-6-carboxylic acid (5)

Yield: 48%; mp: 281~283°C; $[\alpha]_D^{25}$ -37.8° ($c=0.65$, DMSO); Rf=0.3 (CH₃CN:H₂O=4:1); ¹H NMR (DMDO-*d*₆): δ 0.96 (t, 3H, CH₃), 1.23 (s, 3H, CHCH₃), 1.45 (m, 2H, CH₂CH₃), 2.55 (t, 2H, CH₂NH), 3.36~3.65 (m, 11H, CHCH₃, 4CH₂N, CH₂CO), 4.50 (d, 1H, CHO), 4.72 (d, 1H, CHO), 7.88 (d, 1H, CHCF), 9.55 (s, 1H, CHN); ¹³C NMR (DMDO-*d*₆): δ 11.4, 15.5, 24.3, 46.8, 50.7, 57.7, 48.2, 58.5, 81.4, 109.1, 110.3, 112.4, 124.0, 127.2, 129.5, 136.4, 156.7, 164.3, 170.3, 187.2.

(-)-9-Fluoro-2,3-dihydro-3(S)-methyl-10-[4-(2-butylaminoacetyl)piperazin-1-yl]-7-oxo-7H-pyrido [1,2,3-de] [1,4]benzoxazine-6-carboxylic acid (6)

Yield: 42%; mp: 277~279°C; $[\alpha]_D^{25}$ -11.° ($c=0.56$, DMSO); Rf=0.4 (CH₃CN:H₂O=4:1); ¹H NMR (DMDO-*d*₆): δ 0.84 (t, 3H, CH₃CH₂), 1.33~1.44 (m, 7H, -CH₂CH₂-, CHCH₃), 2.55 (t, 2H, CH₂NH), 3.34~3.65 (m, 11H, CHCH₃, 4CH₂N, CH₂CO), 4.52 (d, 1H, CHO), 4.74 (d, 1H, CHO), 7.91 (d, 1H, CHCF), 9.57 (s, 1H, CHN); ¹³C NMR (DMDO-*d*₆): δ 13.7, 15.5, 20.5, 33.7, 46.5, 47.2, 50.1, 56.8, 58.1, 81.0, 108.6, 109.7, 112.1, 124.5, 127.7, 129.9, 136.9, 156.9, 164.7, 169.8, 188.7.

(-)-9-Fluoro-2,3-dihydro-3(S)-methyl-10-[4-(2-isobutylaminoacetyl)piperazin-1-yl]-7-oxo-7H-pyrido [1,2,3-de] [1,4]benzoxazine-6-carboxylic acid (7)

Yield: 45%; mp: 280~281°C; $[\alpha]_D^{25}$ -9.5° ($c=0.64$, DMSO); Rf=0.4 (CH₃CN:H₂O=4:1); ¹H NMR (DMDO-*d*₆): δ 1.01~1.23 (m, 9H, 3-CH₃), 2.07 (m, 1H, -CHCH₂-), 2.51 (d, 2H, CH₂NH), 3.30~3.68 (m, 11H, CHCH₃, 4CH₂N, CHCO), 4.57 (d, 1H, CHO), 4.79 (d, 1H, CHO), 7.96 (d, 1H, CHCF), 9.67 (s, 1H, CHN); ¹³C NMR (DMDO-*d*₆): δ 15.3, 19.7, 29.7, 48.7, 51.6, 57.9, 81.5, 109.2, 11137, 112.6, 125.1, 128.2, 130.4, 137.5, 157.7, 164.2,

169.2, 187.9.

(-)-9-Fluoro-2,3-dihydro-3(S)-methyl-10-[4-(2-dibutylaminoacetyl)piperazin-1-yl]-7-oxo-7H-pyrido [1,2,3-de] [1,4]benzoxazine-6-carboxylic acid (8)

Yield: 34%; mp: 285~288°C; $[\alpha]_D^{25}$ -15.1° ($c=0.92$, DMSO); Rf=0.4 (CH₃CN:H₂O=4:1); ¹H NMR (DMDO-*d*₆): δ 0.96~2.36 [m, 21H, CH₃CH, (CH₃-CH₂CH₂CH₂N)₂], 3.30~3.68 (m, 11H, CHCH₃, 4CH₂N, CHCO), 4.51 (d, 1H, CHO), 4.69 (d, 1H, CHO), 7.88 (d, 1H, CHCF), 9.42 (s, 1H, CHN); ¹³C NMR (DMDO-*d*₆): δ 13.9, 16.1, 20.8, 31.5, 47.9, 52.9, 58.3, 80.6, 109.8, 107.9, 113.6, 125.9, 128.7, 131.3, 137.3, 156.9, 166.1, 172.5, 189.3.

항균력실험

시험균주 - *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* R-209, *Micrococcus luteus* ACTCC 9341, *Escherichia coli* AB 1157, *Salmonella typhimurium* TV 119, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1637, *Alcaligenes faecalis* KCTC 1004, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 1560.

배지 - 시험균주의 전 배양 및 검정 plate의 제조 목적으로 mueller hinton agar(DIFCO) 배지를 사용하였다.

항균 활성 측정법 - 검정 plate의 제조-화합물 5, 6, 7, 8을 소량의 DMSO에 각각 녹인 후 증류수를 가하여 최종 DMSO의 농도가 3%(v/v)가 되도록 하였다. 각각의 시료 0.5 ml를 2단계 희석법으로 12차례 희석하여 mueller hinton agar 배지 14.5 ml와 섞었을 때 최종 배지내의 화합물 5, 6, 7, 8 및 대조물질(levofloxacin)의 농도가 각각 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.032, 0.016(μg/ml)이 되도록 제조하였다. 이때 대조용 배지는 3%(v/v) DMSO 용액 0.5 ml를 mueller hinton agar 14.5 ml와 섞어 제조하였다.

항균력 판정 - 각각의 시험균주들은 검정 plate에 접종하고 37°C에서 18시간 배양 후 육안으로 관찰하여 시험균주들의 성장이 억제되는 항균제의 최소발육저지 농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)를 정하여 Table I과 같은 결과를 얻었다.

Table I - MIC ($\mu\text{g/ml}$) of synthetic compounds and commercial antibiotic against representative microorganisms

Strains	Compounds				
	5	6	7	8	S
<i>Alcaligenes faecalis</i> KCTC 1004	32	2	4	32	0.032
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	2	0.25	0.5	2	<0.016
<i>Escherichia coli</i> AB 1157	16	2	4	32	0.032
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC 1560	32	4	16	>32	0.125
<i>Micrococcus luteus</i> ACTCC 9341	>32	2	8	>32	0.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1637	32	2	4	32	0.032
<i>Salmonella typhimurium</i> TV 119	16	2	4	16	0.032
<i>Staphylococcus aureus</i> R-209	16	0.5	1	4	0.125

S : Levofloxacin

실험결과 및 고찰

문헌에 따라 합성하여 사용한 (-)-9,10-difluoro-3(S)-methyl-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de]-[1,4]-benzoxazine-6-carboxylic acid를 boron trifluoride diethyl etherate로 처리하여 chelate 2를 양호한 수율로 얻었다. 화합물 2의 10번 위치에 있는 fluorine를 piperazine으로 치환하여 화합물3을 얻었다. Piperazine의 4번위치에 chloroacetyl chloride로 처리한후 propylamine, butylamine, isobutylamine 및 dibutylamine을 반응시켜 aminoacetyl기를 도입시킨 (-)-9-fluoro-2,3-dihydro-3(S)-methyl-10-[4-(2-propylamino-acetyl)piperazin-1-yl]-7-oxo-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]benzoxazine-6-carboxylic acid (5), (-)-9-fluoro-2,3-dihydro-3(S)-methyl-10-4-(2-butylaminoacetyl)piperazin-1-yl]-7-oxo-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]benzoxazine-6-carboxylic acid (6), (-)-9-fluoro-2,3-dihydro-3(S)-methyl-10-[4-(2-isobutylaminoacetyl)piperazin-1-yl]-7-oxo-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]benzoxazine-6-carboxylic acid (7), (-)-9-fluoro-2,3-dihydro-3(S)-methyl-10-[4-(2-dibutylaminoacetyl)piperazin-1-yl]-7-oxo-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]benzoxazine-6-carboxylic acid (8)를 각각 합성하여 항균력 시험을 하였다. Table I에서 보는 바와 같이 합성한 화합물들을 Gram(+), Gram(-) 세균에 대하여 항균력을 조사한 결과 화합물 5, 8는 levofloxacin에 비하여 전 시험군수에 대하여 낮은 항균력을 보여주었다. 화합물 6, 7의 경우에는 levofloxacin에 비하여 전 반적인 항균력은 다소 떨어졌으나 Gram(+) 세균인 *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*에 대하여는 levofloxacin에 근접한 수준의 항균

력을 보여주었다. 그러나 일반적으로 대조물질 보다는 항균력이 저하되었다.

감사의 말씀

이 논문은 1998년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었으므로 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Koga, H., Itoh, A., Murayama, S., Suzue, S. and Irikura, T.: Structure-activity relationship of antibacterial 6,7-and 7,8-disubstituted 1-alkyl-[1,4]-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid. *J. Med. Chem.* **23**, 1358 (1980).
- 2) Matsumoto, J., Miyamoto, T., Minamida, A. and Nishimura, Y.: Synthesis and structure-activity relationships of 1,6,7-trisubstituted [1,4]-dihydro-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acids, including enoxacin, a new antibacterial agent. *J. Med. Chem.* **27**, 292 (1984).
- 3) Campoli, D. M., Monk, J. P., Price, A., Benfield, P., Todd, P. A. and Ward, A.: Ciprofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs*, **35**, 373 (1988).
- 4) Wentland, M. P., Bailey, D. M., Cornett, J. P., Dobson, R. A., Powles, R. G. and Wagner, R. B.: Novel amino-substituted 3-quinoline carboxylic acid antibacterial agents: Synthesis and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **27**, 1103 (1984).
- 5) Gonzalez, J. P. and Henwood, J. M.: Perfloxacin. A review of its antibacterial activities, pharmacokinetic

- properties and therapeutic use. *Drugs*, **37**, 628 (1989).
- 6) Gerster, J. F., Rohlfing, S. R., Pecore, S. E., Winandy, R. M., Stern, R. M., Landmesser, J. E., Olsen, R. A., Gleasen, W. B. : *Abstracts 25th interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy*, Minneapolis, MN, 29 sept-2 Oct., 114, abstract 134, (1985).
- 7) Egawa, H., Miyamoto, T. and Matsumoto, J-I. : A new synthesis of 7H-pyrido [1,2,3-de][1,4] benzoxazine derivatives including an antibacterial agent, Ofloxacin. *Chem. Pharm. Bull.* **34**(10), 4098 (1986).
- 8) Mitscher, L. A., Sharma, P. N., Chu, D. T. W., Shen, L. L. and Pernet, A. G. : Chiral DNA gyrase inhibitors 2: Asymmetric synthesis and biological activity of the enantiomers of 9-fluoro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido [1,2,3-de]-1-benzoxazine-6-carboxylic acid (Ofloxacin). *J. Med. Chem.* **30**, 2283 (1987).
- 9) Hayakawa, I., Hiramitsu, T. and Taraka, Y. : Synthesis and antibacterial activities of substituted 7-Oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de] [1,4] benzoxazine-6-carboxylic acids. *Chem. Pharm. Bull.* **32**(12), 4907 (1984).
- 10) Atarashi, S., Yokohama, S., Yamazaki, K. I., Sakano, K. I., Imamura, M. and Hayakawa, I. : Synthesis and antibacterial activities of optically active Ofloxacin and its fluoromethyl derivatives. *Chem. Pharm. bull.* **35**(5), 1898 (1987).