

## 6-Exomethylenepenam 유도체의 베타락타마제 효소억제력과 베타락탐항생제 병용시 활성비교

임채욱 · 박희석 · 정미량 · 강주성 · 임철부<sup>#</sup>

중앙대학교 약학대학 의약품화학 교실

(Received December 2, 2003; Revised December 18, 2003)

### $\beta$ -Lactamase Inhibitory Activity and Comparative Activity of 6-Exomethylenepenam Derivatives Combined with $\beta$ -Lactam Antibiotics

Chaek Im, Hee Suk Park, Mi Lyang Chung, Joo Sung Kang and Chul Bu Yim<sup>#</sup>

Division of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, Chung-ang University, Seoul 156-756, Korea

**Abstract** — *In vitro*  $\beta$ -lactamase inhibitory activity of 6-exomethylenepenam compounds (1, 2, 3, 4 and 5) was compared with clavulanic acid, sulbactam and tazobactam. The inhibitory activity of compound 3 was stronger than those of sulbactam and clavulanic acid against Type I and II enzymes and stronger than tazobactam against Type III, IV, TEM enzymes. The inhibitory activity of 5 was stronger than sulbactam and clavulanic acid against Type I and II enzymes and stronger than tazobactam against Type III and IV enzymes. The *in vitro* antimicrobial activity of 3, 4 and 5 combined with ampicillin and cefoperazone was compared with the sulbactam against  $\beta$ -lactamase producing 27 strains. But, synergistic activity of 3 and 5 was inferior to tazobactam.

**Keywords** □ antimicrobial activity,  $\beta$ -actamase inhibitors, 6-exomethylenepenam

세균의 내성기전에는 세균의 PBP(penicillin binding protein)의 변형에 의한 내성, 세균막의 투과성 저하에 의한 내성 및  $\beta$ -lactamase 효소에 의한 내성 등이 있다.  $\beta$ -Lactam계 항생제에 대한 세균의 일반적인 내성기전은  $\beta$ -lactam 항생제를 불활성화시키는  $\beta$ -lactamase 효소를 내성균이 분비하여 항생제의 약효를 제거하는 것이다. 내성균 문제를 극복하는 방법으로  $\beta$ -lactamase 효소에 안정한 새로운 항생제를 개발하는 방법이 있으나, 이들도 곧 새로운  $\beta$ -lactamase 효소에 파괴되는 경향을 보여 주고 있다. 이런 내성균을 치료할 수 있는 보다 근본적인 방법은  $\beta$ -lactamase 효소를 억제하는  $\beta$ -lactamase 억제제를 개발하고,  $\beta$ -lactam 항생제와 병용 투여하여  $\beta$ -lactam 항생제를  $\beta$ -lactamase 효소로부터 보호하는 것이다.<sup>1-3)</sup>

*Streptomyces clavuligerus*에서 분리한 clavulanic acid를 시작으로 sulbactam, tazobactam이  $\beta$ -lactamase 억제제로 개발되었고, 이들을 amoxicillin, ampicillin, piperacillin 등 기존 항생제와 병용 투여하여  $\beta$ -lactamase를 분비하는 내성균의 치료에 사용하

고 있다.  $\beta$ -Lactamase 억제제들은 항균력이 약하지만,  $\beta$ -lactamase 효소에는 강한 친화력이 있는 suicide inhibitor로 작용한다. Clavulanic acid의 경우,  $\beta$ -lactamase 효소 활성부위의 serine OH기와 억제제의  $\beta$ -lactam carbonyl bond 사이에 acyl 결합이 발생하고, 효소의 활성부위에 결합하여  $\beta$ -lactamase의 기능을 억제한다. 특히, tazobactam은 다양한 플라스미드 매개형  $\beta$ -lactamase를 강력히 억제하고, 기존의  $\beta$ -lactam 항생제와 병용하여 우수한 효소 억제력을 보여주었다.<sup>4-8)</sup>

본 실험에서는 기존의  $\beta$ -lactamase 억제제보다 우수한 억제효과가 있는 신규화합물을 개발하기<sup>9-11)</sup> 위하여 합성된 6-exomethylene penamsulfone 유도체 5종에 대한 약효검색의 기초자료를 얻으려고 *in vitro*  $\beta$ -lactamase 효소 억제력을 측정하였고,  $\beta$ -lactamase를 생산하는 내성균주를 대상으로 현재 임상에서 사용되고 있는  $\beta$ -lactamase 억제제와 *in vitro* 항균력을 비교 실험하였다.

#### 실험방법

#### 시약 및 균주

$\beta$ -Lactamase Type I(from *Bacillus cereus*), Type II(from

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-820-5599 (팩스) 02-815-2199  
(E-mail) yimcb@cau.ac.kr

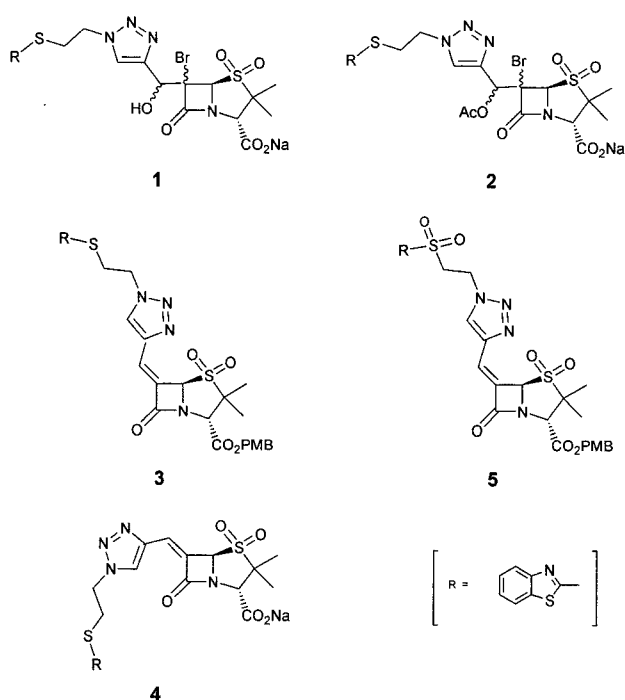


Fig. 1 - Structure of synthesized compounds.

*Bacillus cereus*), Type III(from *Enterobacter cloacae*), Type IV (from *Enterobacter cloacae*) 및 TEM(from *Escherichia coli* 205) 효소는 Sigma 회사에서 구입하여 사용하였다. 대조약물로 clavulanic acid(Smithkline Beecham), sulbactam(Pfizer), tazobactam(한미약품)을 이용하였고, 그밖에 cuvette(quartz), Mueller Hinton broth(Difco) 및 membrane filter paper(0.2  $\mu$ m, 22 mm : Gilman) 등을 사용하였다. Penam 유도체는 본 실험실에서 합성한 것이었고,  $\beta$ -lactamase를 생산하는 균주 27종은 한미약품에서 제공한 것이었다.

#### *In vitro* $\beta$ -Lactamase 효소 억제활성 측정<sup>12,13)</sup>

UV/Vis Spectrophotometer를 이용하여 합성한 화합물 5종의  $\beta$ -lactamase 효소의 억제활성을 측정하였다(Table I). 효소 활성을 50% 억제하는데 필요한 화합물의 농도 즉,  $\beta$ -lactamase에 의한 기질의 가수분해를 50% 억제하는 억제제의 농도를  $IC_{50}$  수치로 계산하였다. 합성된 화합물들은 5가지의 농도(0.01, 0.1, 1, 10, 100  $\mu$ M)로 조제하여 사용하였다.

#### $\beta$ -Lactamase Type I에 대한 억제제의 $IC_{50}$

Cuvette에 phosphate 완충용액(pH 7.0, 2.875 ml),  $\beta$ -lactamase 효소 Type I(15  $\mu$ l, 0.2 unit/assay) 및 합성 화합물 용액 50  $\mu$ l를 넣고 잘 섞은 후, 30°C에서 10분간 방치한다. 여기에 효소에 대한 기질로 penicillin G(60  $\mu$ l, 10 mM)를 가하고 233 nm에서 2분간 흡광도를 측정하여 각 화합물 농도에 대한 억제율(%)을 구

Table I - *In vitro*  $\beta$ -lactamase inhibitory activity of synthesized compounds ( $IC_{50}$ ,  $\mu$ M)

Inhibitor	Enzymes				
	Type I	Type II	Type III	Type IV	TEM
Sulbactam	17.7	29.1	10.8	26	1.0
Tazobactam	0.12	0.22	1.82	3.8	0.022
Clavulanic acid	>100	>100	>100	15	0.15
1	>100	>100	>100	>100	>100
2	>100	>100	>100	2.78	0.22
3	3.73	4.06	1.03	0.39	0.02
4	>100	>100	11.84	10.12	0.75
5	3.85	1.28	0.04	0.07	0.58

하고  $IC_{50}$  값을 계산하였다.

#### $\beta$ -Lactamase Type II에 대한 억제제의 $IC_{50}$

$\beta$ -Lactamase Type II를 이용하여  $\beta$ -lactamase Type I와 동일한 방법으로  $IC_{50}$  값을 계산하였다.

#### $\beta$ -Lactamase Type III에 대한 억제제의 $IC_{50}$

Cuvette에 phosphate 완충용액(pH 7.0, 2.875 ml),  $\beta$ -lactamase Type III(15  $\mu$ l, 0.2 unit/assay) 및 합성 화합물 용액 50  $\mu$ l 넣고 잘 섞은 후, 30°C에서 10분간 방치한다. 여기에 효소에 대한 기질로 cephaloridine(60  $\mu$ l, 5 mM)를 가하고 260 nm에서 2분간 흡광도를 측정하여 각 화합물 농도에 대한 억제율(%)을 구하고  $IC_{50}$  값을 계산하였다.

#### $\beta$ -Lactamase Type IV에 대한 억제제의 $IC_{50}$

$\beta$ -Lactamase Type IV를 이용하여  $\beta$ -lactamase Type III와 동일한 방법으로  $IC_{50}$  값을 계산하였다.

#### TEM 효소에 대한 억제제의 $IC_{50}$

$\beta$ -Lactamase TEM 효소를 이용하여  $\beta$ -lactamase Type III와 동일한 방법으로  $IC_{50}$  값을 계산하였다.

#### 항균력실험(MIC)<sup>14)</sup>

시판하는  $\beta$ -lactamase 억제제와 유사하거나 우수한 효소억제력을 보여주는 새로운 penam유도체 3종(3, 4, 5)의 합성물에 대하여  $\beta$ -lactamase를 생산하는 27종의 내성균주를 대상으로 현재 임상에서 사용되고 있는  $\beta$ -lactamase 억제제인 sulbactam과 *in vitro*에서 상대적인 항균력 활성을 비교 실험하였다. 본 실험에서는 억제제와 항생제의 혼합비율을 고정하고 2배 희석법으로 희석하여 결과를 나타냈다. 항균시험은 National Committee for Clinical Laboratory Standard(NCCLS)의 "Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria"의 규정에 따라 액체배지 희석법으로 실시하였다.  $\beta$ -Lactamase 억제제와  $\beta$ -

lactam 항생제의 혼합 용량비를 최종농도가 1.00 mg/ml가 되게 하였고, 합성된 화합물도  $\beta$ -lactam 항생제를 혼합하여 1.00 mg/ml 정도로 맞추었다. 균주는  $10^8$  CFU가 되도록 제조한 후,  $10^5$  까지 희석하여 100  $\mu$ l씩 접종하였다. 세균의 접종은 Mueller Hinton broth로 표준 2배 희석법으로 실시하였다. 완성된 well plate는 35~37°C에서 16~24시간 배양하였다. 배양 후 육안으로 탁도를 살펴서 생존여부를 조사하였고, 균의 성장이 억제된 최소한의 농도를 MIC(Minimal Inhibitory Concentration)로 하였다.

### 실험결과 및 고찰

#### 효소억제효과(IC<sub>50</sub>)

$\beta$ -Lactamase Type I에 대하여 화합물 3과 5의 IC<sub>50</sub>가 각각 3.73  $\mu$ M과 3.85  $\mu$ M으로 sulbactam과 clavulanic acid보다 효소 억제력이 우수하였으나, tazobactam보다는 약하였다. Type II 효소에 대해서 화합물 3과 5의 IC<sub>50</sub>가 각각 4.06  $\mu$ M과 1.28  $\mu$ M으로 sulbactam과 clavulanic acid보다 효소억제력이 강력하였으나, tazobactam보다는 약하였다. 그러나, Type III 효소에 대해서 화

합물 3과 5의 IC<sub>50</sub>가 각각 1.03  $\mu$ M과 0.04  $\mu$ M으로 sulbactam과 clavulanic acid 뿐만아니라 가장 강력한 억제제인 tazobactam보다 우수한 효소억제력을 보였다. 특히, 화합물 5는 tazobactam보다 45배 강력한 효소억제력을 나타내었다. Type IV 효소에 대해서 화합물 2의 IC<sub>50</sub>는 2.78  $\mu$ M으로 sulbactam과 clavulanic acid보다 우수하고, tazobactam과 유사한 효소억제력을 보였다. 화합물 3과 5의 IC<sub>50</sub>는 각각 0.39  $\mu$ M과 0.07  $\mu$ M으로 tazobactam보다 각각 10배와 54배 강력한 효소억제력을 나타내었다. TEM 효소에 대해서 화합물 3의 IC<sub>50</sub>는 0.02  $\mu$ M으로 효소 억제력이 sulbactam 및 clavulanic acid보다 우수하였고, tazobactam과 유사한 낮은 활성을 보였다.

화합물 1은 모든  $\beta$ -lactamase 효소에 대하여 거의 활성을 보여주지 못하였고, 2과 4의 경우, Type IV와 TEM 효소에 대해서만 효소억제력을 보여주었다. 그러나, 화합물 3과 5는 시판하는  $\beta$ -lactamase 억제제와 유사하거나 더욱 강력한 효소억제력을 보여주었다(Table I).

#### In vitro 항균력실험

$\beta$ -Lactamase를 생산하는 27종의 내성균주를 대상으로 penam

**Table II** - Antimicrobial activity of ampicillin alone and in combination with sulbactam or synthesized compounds (3, 4 and 5)

$\beta$ -Lactamase Producing strains	Minimal Inhibitory Concentration (MIC $\mu$ g/ml)				
	AMP	AMP+SUL	AMP+3	AMP+4	AMP+5
<i>C. freundii</i> NIH10018-68	256	64	256	256	256
<i>E. aerogenes</i> 37	512	64	256	256	256
<i>K. pneumoniae</i> F11035	512	64	512	512	512
<i>S. marcescens</i> 1	512	128	256	512	512
<i>S. marcescens</i> 2	512	256	512	512	512
<i>P. vulgaris</i> 20	256	8	32	64	64
<i>P. vulgaris</i> GN 76	512	32	256	512	512
<i>P. aeruginosa</i> F0013	512	128	256	512	512
<i>P. aeruginosa</i> 5164	512	512	512	512	512
<i>P. aeruginosa</i> 6390	512	128	256	256	256
<i>P. aeruginosa</i> GN 918	512	256	512	512	512
<i>A. calcoaceticus</i> S21	256	64	256	256	256
<i>E. coli</i> ML4901/Rms213	256	64	256	128	256
<i>E. coli</i> ML1401/RNG 14	512	64	256	512	512
<i>E. coli</i> ML1401/RNG823	512	128	512	512	512
<i>E. coli</i> 1193E	512	64	512	512	512
<i>E. coli</i> 3455E	512	128	256	512	512
<i>E. coli</i> 3739E	512	32	256	512	512
<i>E. coli</i> 3457E	512	32	512	512	512
<i>E. coli</i> 2639E	512	32	512	512	512
<i>S. aureus</i> MS15009/1258	32	4	16	16	32
<i>C. diversus</i> 2046E	512	64	512	512	512
<i>E. cloacae</i> 1194E	512	256	512	512	512
<i>E. cloacae</i> P99	512	512	512	512	512
<i>E. cloacae</i> 11	512	128	512	512	512
<i>K. aerogenes</i> 1976E	512	512	512	512	512
<i>K. aerogenes</i> 1082E	512	512	512	512	512

AMP=Ampicillin, SUL=Sulbactam.

Table III – Antimicrobial activity of cefoperazone alone and in combination with sulbactam or synthesized compounds (3, 4 and 5)

Antibiotics β-Lactamase Producing strains	Minimal Inhibitory Concentration (MIC µg/ml)				
	CEF	CEF+SUL	CEF+3	CEF+4	CEF+5
<i>C. freundii</i> NIH10018-68	1	0.25	0.5	0.5	0.25
<i>E. aerogenes</i> 37	64	32	64	64	16
<i>K. pneumoniae</i> F11035	512	16	128	256	256
<i>S. marcescens</i> 1	128	32	128	128	128
<i>S. marcescens</i> 2	512	64	256	256	256
<i>P. vulgaris</i> 20	256	64	64	64	256
<i>P. vulgaris</i> GN 76	256	16	128	128	128
<i>P. aeruginosa</i> F0013	64	32	64	64	32
<i>P. aeruginosa</i> 5164	256	128	256	256	256
<i>P. aeruginosa</i> 6390	256	8	32	128	256
<i>A. calcoaceticus</i> S21	512	16	256	256	128
<i>E. coli</i> ML4901/Rms213	128	16	128	128	128
<i>E. coli</i> ML1401/RNG 14	16	4	8	8	8
<i>E. coli</i> ML1401/RNG823	128	8	16	16	32
<i>E. coli</i> 1193E	64	4	4	16	4
<i>E. coli</i> 3455E	32	4	8	16	16
<i>E. coli</i> 3739E	64	4	32	32	32
<i>E. coli</i> 3457E	32	2	16	16	8
<i>E. coli</i> 2639E	128	16	64	128	16
<i>P. aeruginosa</i> GN 918	64	16	32	32	32
<i>S. aureus</i> MS15009/1258	8	1	4	2	1
<i>C. diversus</i> 2046E	256	32	128	128	128
<i>E. cloacae</i> 1194E	64	32	32	64	32
<i>E. cloacae</i> P99	256	128	128	128	256
<i>E. cloacae</i> 11	128	64	64	128	128
<i>K. aerogenes</i> 1976E	128	16	16	32	16
<i>K. aerogenes</i> 1082E	512	256	512	512	256

CEF=Cefoperazone, SUL=Sulbactam.

유도체 3종(3, 4 및 5)의 합성물이 항생제(ampicillin과 cefoperazone)와 병용시 보여주는 항균력을 sulbactam과 비교하여 Table II와 III에 나타내었다.

Ampicillin의 경우, 합성화합물 3종(3, 4 및 5)과 병용할때, 27종의 내성균주 가운데 4종의 균주에서 sulbactam과 유사한 병용효과를 보여주었고, 23종의 균주에서는 sulbactam보다 낮은 병용효과를 보여주었다. 그러나, ampicillin을 단독으로 사용한 경우보다 합성화합물과 병용한 경우, 수종의 내성균주에서 MIC가 우수하게 나타나서 합성화합물의 병용효과를 일부 확인하였다(Table II).

Cefoperazone의 경우, 화합물 3과 병용할때, 27종의 내성균주 가운데 6종의 균주에서 sulbactam과 유사한 병용효과를 보여주었고, 21종의 균주에서는 sulbactam보다 낮은 병용효과를 보여주었다. 화합물 5와 병용할때, 27종의 내성균주 가운데 1종의 균주에서 sulbactam보다 우수한 병용효과를 보여주었고, 8종의 균주에서는 sulbactam과 유사한 병용효과를 보여주었다. 그리고, 화합물 4는 2종의 균주에서만 sulbactam과 병용할때와 유사한 MIC를 보여주어서 병용효과가 낮게 나타났다. 그러나, cefoperazone을 단독으로 사용한 경우보다 합성화합물과 병용한 경우, 대

부분의 내성균주에서 MIC가 우수하게 나타나서 sulbactam보다는 낮지만 합성화합물의 병용효과를 확인하였다(Table III).

## 결론

합성화합물 5종에 대한 β-lactamase 효소억제 활성실험에서 6-exomethylene의 구조(3, 4 및 5)가 β-lactamase 효소 억제력에 중요하고, 6-exomethylene에서도 (Z)-form의 구조(3과 5)가 (E)-form의 구조(4)보다 효소 활성억제 효과에 중요하다는 결과를 얻었다. 그리고, sulfone 구조의 화합물(5)이 sulfide 구조의 화합물(3과 4)보다 효소 억제력이 우수하게 나타났다. 특히, 화합물 3과 5는 현재 임상에서 사용하는 clavulanic acid, sulbactam 및 tazobactam과 유사하거나 더욱 우수한 효소억제력을 보여주었고, 화합물 4는 Type IV와 TEM 효소에 대해서 우수한 효소억제력을 보여주어서, β-lactamase를 생산하는 내성균주를 대상으로 항생제와 병용시 보여주는 항균력을 sulbactam과 비교하였다. 합성화합물(3, 4 및 5)과 ampicillin의 병용효과는 낮았고, 화합물 3, 5와 cefoperazone의 병용효과는 있으나 sulbactam보다는 낮았다.

## 감사의 말씀

본 연구는 2003년도 중앙대학교 학술연구비의 지원으로 수행 되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 1) Sandanayaka, V. P. and Prashad, A. S. : Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics: Structure and mechanism based design of  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry* **9**, 12, 1145 (2002).
- 2) Jacoby, G. A. and Archer, G. L. : New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *New Eng. J. Med.* **324**, 60, 1, (1991).
- 3) Moland, E. S., Black, J. A., Ourada, J., Reisbig, M. D., Hanson, N. D. and Thomson, K. S. : Occurrence of newer  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 U.S. Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 12, 3837 (2002).
- 4) Maddux, S. M. : Effects of  $\beta$ -lactamases mediated antimicrobial resistance: The role of  $\beta$ -lactamases inhibitors. *Pharmacotherapy* **11**, Parts 2, 40 (1991).
- 5) Smith, J. T., Hamilton-Miller, J. M. T. and Knox, R. : Bacterial resistance to penicillins and cephalosporins. *J. Pharm. Pharmacol.* **21**, 337 (1969).
- 6) Quinn, J. P. : Clinical significance of extended spectrum beta-lactamases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**, (Suppl. 1), S39 (1994).
- 7) Aronoff, S. C., Jacobs, M. R., Johanning, S. and Yamabe, S. : Comparative activities of the  $\beta$ -lactamase inhibitors YTR830, sodium clavulanate, and sulbactam combined with amoxicillin or ampicillin. *J. Antimicrob. Chemother.* **26**, 580 (1984).
- 8) Fassand, J. R. and Prior, B. R. : Comparative *In vitro* activities of piperacillin-tazobactam and ticarcillin-clavulanate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 1268 (1989).
- 9) Bennet, I., Broom, N. J. P., Bruton, G. S., Alvert, C., Clarke, B. P., Coleman, K., Edmondson, R., Edwards, P., Jones, D., Osbone, N. F. and Walker, G. : 6-(Substituted methylene) penems, potent broad spectrum inhibitors of bacterial  $\beta$ -lactamase. *J. Antibiotics* **44**, 331 (1990).
- 10) Lin, Y. I., Bitha, P., Li, Z. and Francisco, G. D. : Preparation of 3,6-disubstituted penam sulfone derivatives with  $\beta$ -lactamase inhibiting activity for use as antibacterial agents, US Patent 6395726 B1 20020528 (2002).
- 11) Sandanayaka, V. P. and Prashad, A. S. : Preparation of 6-(spirocyclopropyl) penicillanic acid 4,4-dioxides as  $\beta$ -lactamase inhibitors. U.S. Pat. Appl. 2002147178 A1 20021010 (2002).
- 12) Waley, S. G. : A spectrophotometric assay of  $\beta$ -lactamase action on penicillins. *Biochem. J.* **139**, 789 (1974).
- 13) Ross, G. W., Chanter, K. V., Harris, A. M., Kirby, S. M., Marshall, M. J. and O'Callaghan, C. H. : Comparison of assay techniques for  $\beta$ -lactamase activity. *Anal. Biochem.* **54**, 9 (1973).
- 14) American national standards institute : Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow Aerobically. 2nd. NCCLS Document M7-A2. **10**, 1 (1990).