

7-엑소메칠렌 세팔로스포라네이트 유도체의 합성과 β -락타메이즈 억제작용

이종민 · 최수항 · 이현수 · 임채욱 · 임철부[#]

중앙대학교 약학대학 의약화학 교실

(Received November 11, 1999)

Synthesis and β -Lactamase Inhibitory Activity of 7-Exomethylene Cephalosporanates

Jong Min Lee, Su Hang Choi, Hyun Soo Lee, Chaeuk Im and Chul Bu Yim[#]

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

Abstract — 7-Oxocephalosporanate **1** was treated with phosphonium salts **2**~**4** by Wittig reaction to afford 7-exomethylene cephalosporanates **5**~**7**. They were oxidized to sulfones **8**~**10** with mCPBA. Deprotection of benzhydryl 7-exomethylene cephalosporanate with $AlCl_3$ and $NaHCO_3$ gave sodium salts of 7-exomethylene cephalosporanates **11**~**16**. The β -lactamase inhibitory activity of synthesized compounds **11**~**16** were compared with sulbactam, tazobactam and clavulanic acid against Type I, II, III, IV and TEM-2 β -lactamase *in vitro*. Compound **15** showed more potent activity than sulbactam and clavulanic acid against Type III, IV β -lactamase enzyme.

Keywords □ 7-Exomethylene cephalosporanates, β -lactamase inhibitors.

임상에서 널리 사용되고 있는 β -lactam 항생제에 대한 내성균의 출현으로 기존 항생제의 약효가 감소하여 내성균에 유용한 새로운 항생제 개발의 필요성이 끊임없이 제기되고 있다. 가장 일반적인 세균의 내성 기전은 β -lactam 항생제를 파괴시키는 β -lactamase라는 효소를 내성균이 분비하여 항생제의 약효를 제거하는 것이다. 이러한 내성균 문제를 극복하는 방법으로 β -lactamase 효소에 안정한 항생제를 개발하는 방법이 있으나, 이들도 곧 새로운 β -lactamase 효소에 파괴되는 경향을 보여 주고 있다. 내성균을 치료할 수 있는 보다 근본적인 방법은 β -lactamase 효소를 파괴하는 β -lactamase 억제제를

개발하고, β -lactam 항생제와 병용 투여하여 β -lactam 항생제를 β -lactamase 효소로부터 보호하는 것이다.

최근에 이러한 β -lactamase 억제제로 clavulanic acid,^{1,2)} sulbactam³⁾ 및 tazobactam⁴⁾이 개발되어 임상에서 사용되고 있다. 그러나 지금까지 연구된 β -lactamase 억제제는 대부분 penam 또는 penem구조의 화합물 이어서 주로 penicillin계 항생제를 보호하지만, 현재 임상에서 많이 쓰고 있는 cephalosporin계 항생제의 보호에는 미흡하다. 그리고 cephalosporin계 항생제를 보호할 수 있는 cephalosporanate 구조의 β -lactamase 억제제는 소수만 문헌에 보고되고 있다.^{5, 6)} 따라서 저자들은 cephalosporanate구조의 β -lactamase 억제제를 개발할 목적으로 7-치환 methylene cephalosporanate유도체

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-820-5603 (팩스) 02-815-2199

를 합성하고 이들의 β -lactamase 효소 억제력을 측정하였다.

실험방법

시약 및 기기 - 본 실험에서 사용된 시약들은 Aldrich사와 Fluka사의 것을 사용하였으며 각종 용매는 특급시약을 사용하였다. $^1\text{H-NMR}$ spectra는 Varian Gemini 2000(300 MHz)을 사용하여 얻었고, CDCl_3 의 경우 TMS(tetramethylsilane)를 내부 표준물질로 사용하였고 DMSO- d_6 의 경우 잔류하는 DMSO를 내부 표준물질로 사용하였다. TLC는 Merck silica gel 60 F₂₅₄(thickness 0.2 μm)를 사용하였고, Reverse TLC로는 Merck RP-18F_{254S}(thickness 0.25 mm)를 사용하였으며 UV Lamp로 spot을 확인하였다. 용점측정은 Büchi Melting point B-540을 사용하였고, IR spectra는 Jasco FT/IR 300E을 사용하여 얻었다. Column chromatography는 silica gel(Merck type 9355, 230~400 mesh)을 사용하였고, 역상 column chromatography는 Comosil 75 C₁₈-OPN(42-105 μ , Nacalaitesque, Japan)을 사용하였다.

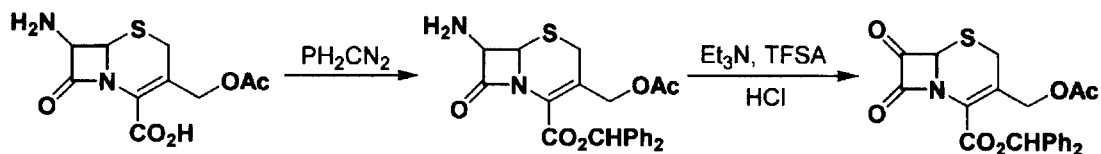
7-Exomethylene cephalosporanate 유도체의 합성에서 중요한 중간체인 benzhydryl 7-aminocephalosporanate⁷⁾과 7-oxocephalosporanate¹⁸⁾는 문헌에 있는 방법으로 합성하였다(Scheme 1).

4-Fluorobenzyltriphenylphosphonium chloride (2)의 합성 - 4-Fluorobenzyl chloride 3 g (20.7 mmol)을 무수 THF (15 ml)에 용해하고, triphenylphosphine 4.46 g (20.7 mmol)을 가하여 10시간 동안 가열 환류하였다. 반응액을 냉각하여 침전물을 얻어서 ether로 세척하고, 건조하여 백색의 화합물 3.2 g(42%)를 얻었다 : mp 316~317°C; $R_f=0.5$ (methanol : ethylacetate=1:1); IR (KBr) 1504, 1216 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 5.64(d, 2H, $J=14.4$ Hz), 6.79(t, 2H), 7.16(m, 2H) 7.61~7.81(m, 15H).

4-Chlorobenzyltriphenylphosphonium chloride (3)의 합성 - 4-Chlorobenzyl chloride 3 g (18.6 mmol)과 triphenylphosphine 4.98 g (18.6 mmol)을 이용하여 화합물 2와 동일한 방법으로 합성하여 백색의 화합물 4.5 g (56%)을 얻었다 : mp 275~276°C; $R_f=0.61$ (methanol : ethylacetate=1:1); IR(KBr) 1482 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 5.68(d, 2H, $J=15$ Hz), 7.06(d, 2H, $J=8.7$ Hz), 7.12(d, 2H, $J=2.4$ Hz), 7.61~7.83(d, 2H, $J=2.4$ Hz).

2-Nitrobenzyltriphenylphosphonium chloride (4)의 합성 - 2-Nitrobenzyl chloride 3 g (17.4 mmol)과 triphenylphosphine 4.59 g (17.4 mmol)을 이용하여 화합물 2와 동일한 방법으로 합성하여 노란색 화합물 6.3 g (83%)을 얻었다 : mp 218~219°C; $R_f=0.47$ (methanol : ethylacetate=1:1); IR(KBr) 1438 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 6.10(d, 2H, $J=14.7$ Hz), 7.52(m, 1H), 7.62~7.81(m, 16H), 7.95(d, 1H, $J=8.1$ Hz), 8.11(d, 1H, $J=6$ Hz).

Benzhydryl 7-[(Z)-4-fluorobenzylidene]cephalosporanate (5)의 합성 - 4-Fluorobenzyltriphenylphosphonium chloride 2 1.91 g (4.7 mmol)을 무수 THF (10 ml)에 용해하고 N_2 gas로 치환한 후, -78°C에서 2N *n*-butyllithium 1.75 ml (3.5 mmol)을 가하고 1시간 동안 반응하여 ylide 화합물을 얻었다. -78°C를 유지하면서 이 반응액을 benzhydryl 7-oxocephalosporanate 1 2 g (4.7 mmol)의 무수 THF(15 ml)용액에 가하고 10분간 반응하였다. 반응액에 포화 NH_4Cl (25 ml)용액을 가하여 반응을 중지시키고 ethyl acetate(20 ml)로 추출하고, 증류수(40 ml)로 세척하여 건조한 후 농축하였다. Silica gel column chromatography(ethyl acetate : Hexane=1:1)로 정제하여 노란색의 유상화합물 0.68 g(27%)를 얻었다: $R_f=0.76$ (ethylacetate : hexane=3:1); IR (NaCl, neat) 1740, 1509, 1234 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 2.03(s, 3H), 3.41(d, 1H, $J=14.1$ Hz), 3.62(d, 1H,



1

Scheme 1 - Synthesis of benzhydryl 7-oxocephalosporanate.

$J=14.1$ Hz), 4.68(d, 1H, $J=11.5$ Hz), 4.96(d, 1H, $J=11.5$ Hz), 5.46(s, 1H), 7.02(s, 1H), 7.16(s, 1H), 7.26~7.51(m, 14H).

Benzhydryl 7-[(Z)-4-chlorobenzylidene]cephalosporanate (6)의 합성 - 4-Chlorobenzyltriphenylphosphonium chloride **3** 1.99 g (4.7 mmol)과 benzhydryl 7-oxocephalosporanate **1** 2 g (4.7 mmol)을 이용하여 화합물 **5**와 같은 방법으로 노란색의 유사화합물 0.95 g(37%)을 합성하였다 : $R_f=0.58$ (ethylacetate : hexane=3:1); IR(NaCl, neat) 1740, 1493, 1231 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 2.05(s, 3H), 3.41(d, 1H, $J=14$ Hz), 3.62(d, 1H, $J=14$ Hz), 4.67(d, 1H, $J=12$ Hz), 4.95(d, 1H, $J=12$ Hz), 5.44(s, 1H), 7.05(s, 1H), 7.08(s, 1H), 7.26~7.41(m, 14H).

Benzhydryl 7-[(Z)-2-nitrobenzylidene]cephalosporanate (7)의 합성 - 2-Nitrobenzyltriphenylphosphonium chloride **4** 2.04 g (4.7 mmol)과 benzhydryl 7-oxocephalosporanate **1** 2 g (4.7 mmol)을 이용하여 화합물 **5**와 동일한 방법으로 고동색의 유사화합물 0.54 g (21%)을 합성하였다 : $R_f=0.64$ (ethylacetate : hexane=1:1); IR(NaCl, neat) 1734, 1524, 1230 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 2.04(s, 3H), 3.41(d, 1H, $J=16$ Hz), 3.59(d, 1H, $J=16$ Hz), 4.66(d, 1H, $J=13$ Hz), 4.92(d, 1H, $J=13$ Hz), 5.39(s, 1H), 7.01(s, 1H), 7.26(s, 1H), 7.29~7.55(m, 13H).

Benzhydryl 7-[(Z)-4-fluorobenzylidene]cephalosporanate sulfone (8)의 합성 - Benzhydryl 7-[(Z)-4-fluorobenzylidene]cephalosporanate **5** 0.30 g (0.57 mmol)을 dichloromethane (10 ml)와 pH 6.4 phosphate buffer 용액(10 ml)에 용해하고 mCPBA 0.41 g (2.4 mmol)을 가한 후, 상온에서 40분간 반응하였다. Ether(50 ml)를 이용하여 추출하고 NaHCO_3 용액(30 ml)으로 세척하여 농축한 후, silica gel column chromatography(ethylacetate : hexane=1:2)로 정제하여 미황색의 화합물 0.21 g(66%)을 얻었다 : $R_f=0.22$ (ethylacetate : hexane=1:2); IR(KBr) 1732, 1509, 1235 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 2.05(s, 3H), 3.84(d, 1H, $J=18.2\text{Hz}$), 4.08(d, 1H, $J=18.2$ Hz), 4.69(d, 1H, $J=14$ Hz), 5.04(d, 1H, $J=14$ Hz), 5.57(s, 1H), 6.99(s, 1H), 7.14(s, 1H), 7.26~7.71(m, 14H).

Benzhydryl 7-[(Z)-4-chlorobenzylidene]cephalo-

sporanate sulfone (9)의 합성 - Benzhydryl 7-[(Z)-4-chlorobenzylidene]cephalosporanate **6** 0.46 g(0.86 mmol)과 mCPBA 0.59 g (3.4 mmol)을 이용하여 화합물 **8**과 동일한 방법으로 합성하여 미황색의 화합물 0.2 g (47%)을 얻었다 : $R_f=0.35$ (ethylacetate : hexane=1:1); IR(KBr) 1697, 1574, 1262 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 2.05(s, 3H), 3.77(d, 1H, $J=17.7$ Hz), 4.03(d, 1H, $J=17.7$ Hz), 4.69(d, 1H, $J=14.4$ Hz), 5.02(d, 1H, $J=14.4$ Hz), 5.59(s, 1H), 6.87(s, 1H), 7.01(s, 1H), 7.26~8.10 (m, 14H).

Benzhydryl 7-[(Z)-2-nitrobenzylidene]cephalosporanate sulfone (10)의 합성 - Benzhydryl 7-[(Z)-2-nitrobenzylidene]cephalosporanate **7** 0.56 g(1.02 mmol)과 mCPBA 0.70 g (4.2 mmol)을 이용하여 화합물 **8**과 동일한 방법으로 합성하여 노란색 화합물 0.26 g(43%)을 얻었다 : $R_f=0.26$ (ethylacetate : hexane=1:1); IR(KBr) 1697, 1524, 1262 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 2.06(s, 3H), 3.49(d, 1H, $J=17.6$ Hz), 3.62(d, 1H, $J=17.6$ Hz), 4.42(d, 1H, $J=13.8$ Hz), 4.58(d, 1H, $J=13.8$ Hz), 5.30(s, 1H), 6.74(s, 1H), 7.00(s, 1H), 7.26~8.09 (m, 14H).

Sodium 7-[(Z)-4-fluorobenzylidene]cephalosporanate (11)의 합성 - Benzhydryl 7-[(Z)-4-fluorobenzylidene]cephalosporanate **5** 0.29 g(0.56 mmol)을 dichloromethane(10 ml)과 무수 anisole(5 ml)에 용해하고 -78°C 에서 AlCl_3 0.19 g(1.4 mmol)을 가하여 30분간 반응하였다. NaHCO_3 (0.34 g)을 녹인 수용액(20 ml)과 ethylacetate(20 ml)를 반응액에 가하고 5 분간 교반한 후, 반응액을 여과하여 침전물을 제거하였다. 수층을 분리하여 농축하고 역상 column chromatography (acetonitrile : $\text{H}_2\text{O}=1:3$)를 이용하여 정제한 후, 동결 건조하여 미황색의 화합물 0.12 g(57%)을 얻었다 : $R_f=0.71$ (acetonitrile : $\text{H}_2\text{O}=1:1$); IR(KBr) 1736, 1601, 1236 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 2.02 (s, 3H), 3.29(d, 1H, $J=17.4$ Hz), 3.59(d, 1H, $J=17.4$ Hz), 4.77(d, 1H, $J=12.3$ Hz), 4.96(d, 1H, $J=12.3$ Hz), 5.78(s, 1H), 7.19(s, 1H), 7.30(m, 2H), 7.69(m, 2H).

Sodium 7-[(Z)-4-chlorobenzylidene]cephalosporanate (12)의 합성 - Benzhydryl 7-[(Z)-4-chlorobenzylidene]cephalosporanate **6** 0.50 g과 AlCl_3 0.31 g (2.33 mmol)을 이용하여 화합물 **11**과 동일한 방법으로

합성하여 미황색 화합물 0.13 g(35%)을 얻었다 : $R_f=0.65$ (acetonitrile : $H_2O=1:1$); IR(KBr) 1736, 1616, 1235 cm^{-1} ; 1H -NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ 2.02 (s, 3H), 3.29(d, 1H, $J=18$ Hz), 3.60(d, 1H, $J=18$ Hz), 4.77(d, 1H, $J=12$ Hz), 4.96(d, 1H, $J=12$ Hz), 5.79(s, 1H), 7.19(s, 1H), 7.55(d, 2H, $J=8.4$ Hz), 7.65(m, 2H, $J=8.4$ Hz).

Sodium 7-[(Z)-2-nitrobenzylidene]cephalosporanate (13)의 합성 - Benzhydryl 7-[(Z)-2-nitrobenzylidene]cephalosporanate **7** 0.25 g (0.46 mmol)과 $AlCl_3$ 0.15 g (1.15 mmol)을 이용하여 화합물 **11**과 동일한 방법으로 합성하여 노란색 화합물 0.16 g(86%)을 얻었다 : $R_f=0.62$ (acetonitrile : $H_2O=1:1$); IR(KBr) 1748, 1617, 1235 cm^{-1} ; 1H -NMR(300MHz, DMSO- d_6) δ 2.01(s, 3H), 3.32(d, 1H, $J=18$ Hz), 3.56(d, 1H, $J=18$ Hz), 4.68(d, 1H, $J=12.6$ Hz), 4.92(d, 1H, $J=12.6$ Hz), 5.75(s, 1H), 7.59(s, 1H), 8.07~8.15(m, 4H).

Sodium 7-[(Z)-4-fluorobenzylidene]cephalosporanate sulfone (14)의 합성 - Benzhydryl 7-[(Z)-4-fluorobenzylidene]cephalosporanate sulfone **8** 0.17 g (0.3 mmol)과 $AlCl_3$ 0.10 g (0.75 mmol)을 이용하여 화합물 **11**과 동일한 방법으로 합성하여 미황색의 화합물 0.11 g(88%)을 얻었다: $R_f=0.62$ (acetonitrile : $H_2O=1:1$); IR(KBr) 1720, 1600, 1240 cm^{-1} ; 1H -NMR(300MHz, DMSO- d_6) δ 2.06 (s, 3H), 3.99(d, 1H, $J=17.1$ Hz), 4.35(d, 1H, $J=17.1$ Hz), 4.73(d, 1H, $J=13.8$ Hz), 4.99(d, 1H, $J=13.8$ Hz), 6.46(s, 1H), 7.13(s, 1H), 7.35~7.39 (m, 2H), 7.80~7.87(m, 2H).

Sodium 7-[(Z)-4-chlorobenzylidene]cephalosporanate sulfone (15)의 합성 - Benzhydryl 7-[(Z)-4-chlorobenzylidene]cephalosporanate sulfone **9** 0.29 g (0.5 mmol)과 $AlCl_3$ 0.17 g (1.3 mmol)을 이용하여 화합물 **11**과 동일한 방법으로 합성하여 미황색의 화합물 0.11 g(51%)을 얻었다 : $R_f=0.57$ (acetonitrile : $H_2O=1:1$); IR(KBr) 1749, 1616, 1328 cm^{-1} ; 1H -NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ 2.05 (s, 3H), 4.00(d, 1H, $J=18$ Hz), 4.35(d, 1H, $J=18$ Hz), 4.80(d, 1H, $J=14$ Hz), 5.00(d, 1H, $J=14$ Hz), 6.48(s, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.32~7.86(m, 4H).

Sodium 7-[(Z)-2-nitrobenzylidene]cephalospo-

Table I - *In vitro* β -lactamase inhibitory activities of synthesized compounds (IC_{50} , μM)

Inhibitor	β -lactamase				
	Type I ^a	Type II ^a	Type III ^b	Type IV ^b	TEM-2 ^b
Sulbactam	17.7	29.1	10.8	26	1.0
Tazobactam	0.12	0.22	1.82	3.8	0.22
Clavulanic acid	>100	>100	>100	15	0.15
11	>100	>100	>100	7.15	>100
12	>100	>100	>100	24.0	>100
13	>100	>100	>100	>100	>100
14	>100	>100	>100	>100	>100
15	>100	>100	4.69	0.3	>100
16	>100	>100	>100	>100	>100

^aSubstrate concentration (penicillin G), 10 mM.

^bSubstrate concentration (cephaloridine), 5 mM.

ranate sulfone (16)의 합성 - Benzhydryl 7-[(Z)-2-nitrobenzylidene]cephalosporanate sulfone **10** 0.18 g (0.31 mmol)과 $AlCl_3$ 0.10 g (6.78 mmol)을 이용하여 화합물 **11**과 동일한 방법으로 합성하여 노란색 화합물 0.13 g(89%)을 얻었다 : $R_f=0.40$ (acetonitrile : $H_2O=1:1$); IR(KBr) 1650, 1558 cm^{-1} ; 1H -NMR(300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.06(s, 3H), 3.98(d, 1H, $J=16.5$ Hz), 4.37(d, 1H, $J=16.5$ Hz), 4.75(d, 1H, $J=13.6$ Hz), 4.99(d, 1H, $J=13.6$ Hz), 6.01(s, 1H), 7.15(s, 1H), 7.33~7.89(m, 4H).

***In vitro* β -Lactamase 억제활성 측정^{9,10)}** - 본 실험에서는 UV/Vis Spectrophotometer를 이용하여 합성한 화합물 **6**종의 β -lactamase 억제활성을 측정하였다(Table I). β -Lactamase 효소로는 Penicillinase Type I(from *Bacillus cereus*, Sigma), Penicillinase Type II(from *Bacillus cereus*, Sigma사), Penicillinase Type III(from *Enterobacter cloacae*, Sigma사), Penicillinase Type IV(from *Enterobacter cloacae*, Sigma사) 및 TEM-2(from *Escherichia coli*, Boehringer사)를 사용하였다. 대조약물로 clavulanic acid, sulbactam, tazobactam을 이용하였고 효소 활성을 50% 억제하는데 필요한 화합물의 농도 즉, β -lactamase에 의한 기질의 가수분해를 50% 억제하는 억제제의 농도를 IC_{50} 수치로 계산하였다. 합성된 화합물 **11**~**16**은 5가지의 농도(0.01, 0.1, 1, 10, 100 μmol)의 10% v/v DMSO-phosphate 완충용액(50 mmol, pH 7.0~0.5 M KH_2PO_4 , 0.5 M Na_2HPO_4)으로 조제하였고, 각 화합물의 %inhibition은 다음과 같이

계산하였다.

$$\text{Inhibition}(\%) = I(\%) = \frac{A_0 - A_\chi}{A_0} \times 100$$

A_0 : 억제제를 넣지 않은 경우의 UV 흡광도 감소율

A_χ : 억제제농도가 χ 일때의 UV 흡광도 감소율

Penicillinase Type I에 대한 억제제의 IC_{50} - Cuvett에 phosphate 완충용액(2.875 ml), Penicillinase Type I(15 μ l, 0.2 unit/assay) 및 합성 화합물 용액 50 μ l를 넣고 잘 섞은 후, 30°C에서 10분간 방치한다. 여기에 효소에 대한 기질로 penicillin G (60 μ l, 10 mmol)를 가하고 233 nm에서 2분간 흡광도를 측정하여 각 화합물 농도에 대한 억제율(%)을 구하고 IC_{50} 값을 계산하였다.

Penicillinase Type II에 대한 억제제의 IC_{50} - Penicillinase Type II(10 μ l, 0.2 unit/assay)을 이용하여 Penicillinase Type I와 동일한 방법으로 IC_{50} 값을 계산하였다.

Penicillinase Type III에 대한 억제제의 IC_{50} - Cuvett에 phosphate 완충용액(2.875 ml), Penicillinase Type III(15 μ l, 0.2 unit/assay) 및 합성 화합물 용액 50 μ l 넣고 잘 섞은 후, 30°C에서 10분간 방치한다. 여기에 효소에 대한 기질로 cephaloridine (60 μ l, 5 mmol)을 가하고 260 nm에서 2분간 흡광도를 측정하여 각 화합물 농도에 대한 억제율(%)을 구하고 IC_{50} 값을 계산하였다.

Penicillinase Type IV에 대한 억제제의 IC_{50} - Penicillinase Type IV(30 μ l, 0.006 unit/assay)을 이

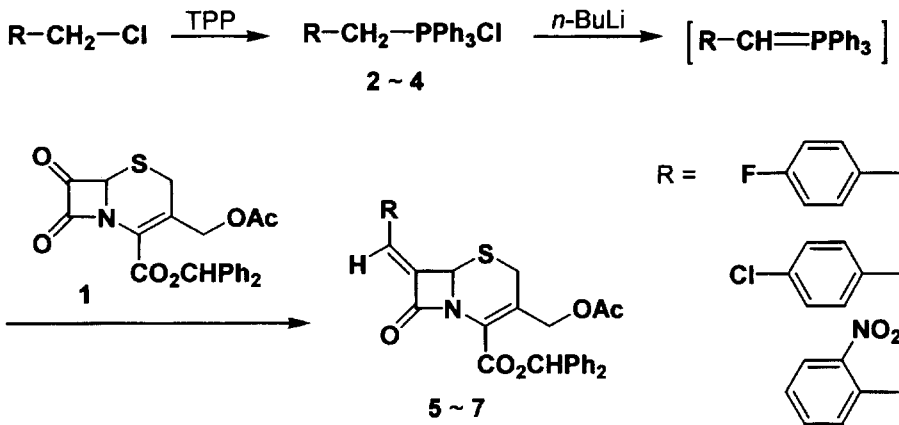
용하여 Penicillinase Type III와 동일한 방법으로 IC_{50} 값을 계산하였다.

TEM-2 효소에 대한 억제제의 IC_{50} - TEM-2(10 μ l, 0.2 unit/assay)을 이용하여 Penicillinase Type III와 동일한 방법으로 IC_{50} 값을 계산하였다.

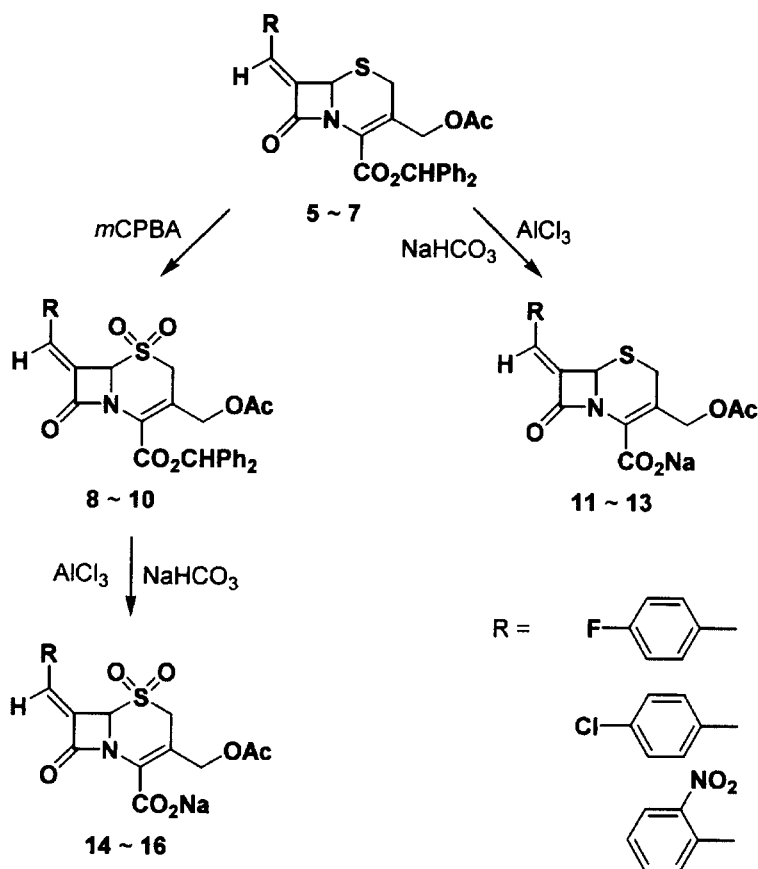
실험결과 및 고찰

치환된 benzyl chloride들은 triphenylphosphine 과 반응하여 42~83%의 수득율로 triphenylphosphonium chlorides 2~4를 합성하였다. 이들 화합물의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 CH_2 수소는 ^{31}P 과 coupling하여 14.4~15.0 Hz의 coupling constant를 보여주었다. 이들을 n-butyllithium으로 처리하여 ylide 화합물로 만든 후, 7-oxocephalosporanate 1 과 반응하여 7-exomethylene cephalosporanates 5~7을 27~37% 수득율로 합성하였다(Scheme 2). 이들의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 C_2 의 수소는 83.41~3.62에서 doublet, C_3 의 CH_2 는 84.66~4.96에서 2개의 doublet, C_6 의 수소는 85.39~5.46에서 singlet의 peak를 보여주었다. 화합물 5~7은 E-isomer와 Z-isomer로 존재할 수 있는데 E-isomer의 경우 C_6 의 수소는 84.9보다 고자장에서, Z-isomer의 경우 C_6 의 수소는 85.3보다 저자장에서 peak를 보여준다고 문헌에 보고 되어있다.⁸⁾ 따라서 합성한 화합물 5~7은 Z-isomer로 생각된다.

이들 화합물은 pH 6.4 phosphate 완충액에서 m-CPBA로 처리하여 sulfone 화합물 8~10을



Scheme 2 - Synthesis of benzhydry 7(Z)-exomethylene cephalosporanate.



Scheme 3 – Synthesis of sodium 7(Z)-exomethylene cephalosporanate.

43~66% 수득율로 합성하였다. Benzhydryl 화합물 5~10은 AlCl_3 로 처리하여 free carboxylic 화합물로 deprotection 시킨 후, NaHCO_3 용액으로 중화하여 sodium carboxylate 화합물을 만들었다. 이들 화합물을 역상 크로마토그래프컬럼으로 정제한 후, 냉동 건조하여 35~89% 수득율로 화합물 11~16을 얻었다(Scheme 3).

합성한 화합물에 대한 효소억제 활성에서 Type I, II 및 TEM-2 β -lactamase에 대하여 화합물 11~16은 낮은 효소 억제력을 보여 주었다. 그러나, Type III 효소에 대하여 화합물 15는 sulbactam과 clavulanic acid보다 활성이 강하고 tazobactam과 유사한 효소 억제력을 보여주었다. Type IV 효소에 대하여 화합물 15는 sulbactam, clavulanic acid 및 tazobactam 보다 강력한 효소 억제력을 보여주었고, 화합물 11과 12는 tazobactam 보다는 약하지만 sulbactam과 clavulanic acid와 유사한 효소억제력을 보여

주었다. 이상의 효소 억제활성으로부터 7-exomethylene cephalosporanate 구조를 갖는 β -lactamase 억제제는 Type IV 효소를 갖고 있는 내성균의 억제에 유용하리라고 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 1999년도 중앙대학교 연구지원처 학술연구비의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Reading, C. and Farmer, T.: The inhibition of β -lactamases from gram-negative bacteria by clavulanic acid. *Biochem. J.* **199**, 779 (1981).
- 2) Hunter, P. A., Cloeman, K. J. and Taylor, D.: *In vitro* synergistic properties of clavulanic acid with ampi-

- cillin, amoxicillin, ticarcillin, *J. Antimicrob. Chemother.* **6**(4), 455 (1980).
- 3) English, A. R., Retsema, J. A., Girard, A. E., Lynch, J. E. and Barth, W. E. : CP-45,899, β -lactamase inhibitor that extends the antibacterial spectrum of β -lactams: Initial bacteriological characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**(3), 414 (1978).
 - 4) Micetich, R. G., Maiti, S. N., Spevak, P., Hall, T. W., Yamabe, S., Ishida, N., Tanaka, M., Yamazaki, T., Nakai, A. and Ogawa, K. : Synthesis and β -lactamase inhibitory properties of 2 β -[(1,2,3-triazol-1-yl)methyl]-2 α -methylpenam-3 α -carboxylic acid 1,1-dioxide and related triazolyl derivatives. *J. Med. Chem.* **30**, 1469 (1987).
 - 5) Shintaro, N., Nobuyoshi, Y. and Hiroshi, S. : Synthesis and β -lactamase inhibitor activity of 3-cyano-3-cephem derivatives. *Bull. chem. Soc. Japan.* **63**(2), 412 (1990).
 - 6) John, D. B., Dipti, K., Brian, B., Kuangcong, N. and Grady, L. : Synthesis and Mechanistic Evaluation of 7-vinylidenecephem sulfones as β -lactamase inhibitor, *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 10955 (1994).
 - 7) John, E. G. K., Michael, D. C., Subramanian, N. and Mark, H. S. : Nucleophilic Sn2 displacement on penicillin 6- and cephalosporin-7-triflate; 6 β -Iodopenicillanic acid. A new β -lactamase inhibitor, *Tetrahedron lett.* **21**, 2991 (1980).
 - 8) John, D. B., Kuangcong, W., Brian, B., Dipti, K., Ling, H., Hanh, K. N. and Christa L. C. : Synthesis and Biological activity of 7-Alkylidene cepheems, *J. Med. Chem.* **38**, 1022 (1995).
 - 9) Waley, S. G. : A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. *Biochem. J.* **139**, 789 (1974).
 - 10) 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 β -lactamase activity. *Anal. Biochem.* **54**, 9 (1973).