

내성균생장저해물질개발

Development of Resistant Bacteria Growth Inhibitor

피페리딘계 옥사졸리디논 항생제 후보물질 창출

Generation of Oxazolidinone Candidates of Piperidine Series

주관연구기관

한국과학기술연구원

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “ 내성균생장저해물질 개발”과제 (세부과제 “피페리딘계 옥사졸리디논 항생제 후보물질 창출”) 의 보고서로 제출합니다.

2003. 3 .

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원

주관연구책임자 : 김 중 협

연 구 원 : 최경일, 남길수, 서재홍, 최광현, 김동윤, 최진우, 황선균, 고훈영, 조용서, 배애님, 차주환, 김혜연, 김상희, 최병철, 오병규, 전보경, 김학수, 강순방, 금교창, 장민석, 장택수, 조상원, 모길웅, 이종윤

여 백

보고서 초록

과제관리번호		해당단계 연구기간	2001.08.15-2003.05. 14	단계 구분	2 / 2
연구사업명	중 사업명	중점국가연구개발사업			
	세부사업명	생리활성화학물질개발사업			
연구과제명	중 과제명	내성균생장 저해물질의 개발			
	세부(단위)과제명	피페리딘계 옥사졸리디논 항생제 후보물질 창출			
연구책임자	김중협	해당단계 참여연구원수	총 : 56 명 내부 : 21 명 외부 : 35 명	해당단계 연구비	정부: 617,000 천원 기업: 105,000 천원 계: 722,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국과학기술연구원		참여기업명	일동제약, 화일약품, 이연제약	
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명: 서울 의대, 서울약대, 경희약대		연구책임자: 오명돈, 천문우, 정진현		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서면수	118
<p>1. 연구개발의 내용 및 범위</p> <ul style="list-style-type: none"> - 3D QSAR연구를 통해 설계·합성되어 우수한 항균활성을 나타내었던 KST150A058을 기본으로 한 structural modification으로 새로운 피페리딘계 oxazolidinone 화합물을 설계·합성하였음. - 합성된 신규화합물을 MRSA, MRSE, VRE등 균주에 적용하여 생체내, 외 약효 검색 및 약동력학 검사를 실시하였음. <p>2. 연구개발결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 새로운 oxazolidinone화합물들은 MRSA, <i>S. aureus</i>, <i>S. epidermidis</i>, <i>Enterococci faecali</i>, <i>E. pyogenes</i>등 균주에 대해서 약효를 나타내었다. 그중 KST150A080, KST150A091, KST150A092, KST150A093등 신규 물질은 대조 물질인 Linezolid보다 항균활성이 우수하고 Vancomycin과 유사하며 이화합물은 VRE균주에 대해 좋은 약효를 나타냄. <p>3. 연구개발결과의 활용계획</p> <p>옥사졸리디논 항생제 연구를 통해 신규 항생제 후보물질을 도출하였으며 옥사졸리디논 화합물은 기존의 시판되고 있는 대조물질 linezolid에 비해 MRSA 및 VRE등에 2-4배 정도 우수한 항균활성을 보이고 있고, 생체내 약동력학 연구결과 linezolid 보다 약간 낮은 정도의 우수한 후보물질을 도출하였다. 이와같은 연구 결과는 앞으로 많은 drug target에 접근할 수 있는 연구 수행방법을 제시할 수 있고, 신규 의약품 합성 및 개발연구에 도움이 될 것임.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한글	항생제, 옥사졸리디논, 피페리딘계, 내성, 합성, 활성			
	영어	antibacterial agents, oxazolidinone, piperidiny, resistance, synthesis, activity			

여 백

요약문

I. 제목

피페리딘계 옥사졸리디논 항생제 후보물질 창출

II. 연구개발 목적 및 필요성

항생제 오용 및 남용으로 인하여 새로운 내성균주 또는 다제내성균주의 발현 문제는 세계적으로 심각하게 대두되고 있는 상황이다. 근본적으로 이 문제를 해결하기 위해서는 새로운 화학적 구조와 항균 mechanism을 지닌 항생제의 연구개발이 매우 중요하게 인식이 되고 있다.

Oxazolidinone계 열화합물은 바로 이러한 특징을 지닌 새로운 화합물구조의 항생제로서 MRSA, MRSE, VRE 등 균주에 대해 좋은 활성을 나타내고 있다. 이런 화합물은 현재 임상에서 사용되는 항생제와는 달리 간단한 화학적 구조를 갖고 있으며 protein synthesis의 가장 초기 단계에서 억제작용을 하고 있다는 것이 밝혀졌다. 이 계열 화합물에 대한 정량적 구조-활성관계 연구 시도는 현재까지 진행되지 않았기 때문에 이에 대한 기반 연구는 매우 필요하다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 3D QSAR 연구를 통해 설계·합성되어 우수한 항균활성을 나타내었던 KST150A058을 기본으로 한 구조변환에 의해 새로운 oxazolidinone 화합물을 설계·합성하였음.
- 합성된 신규 화합물을 MRSA, MRSE, VRE 등 균주에 적용하여 약효 검색을 실시하였음.

IV. 연구개발결과

- 새로운 oxazolidinone 화합물들은 MRSA, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococci faecali*, *E. pyogenes* 등 균주에 대해서 약효를 나타내었다. 그중 KST150A080, KST150A091, KST150A092, KST150A093 등 신규 물질은 대조 물질인 linezolid보다 항균화성이 우수하고 vancomycin과 유사하며 모든 물질은 VRE 균주에 대해 좋은 약효를 나타내었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

옥사졸리디논 항생제 연구를 통해 신규 항생제 후보물질을 도출하였으며 옥사졸리디논 화합물은 기존의 시판되고 있는 대조물질 linezolid에 비해 MRSA 및 VRE 등에 2-4배 정도 우수한 항균활성을 보이고 있고, 생체 내 약동력학 연구결과 linezolid 보다 약간 낮은 정도의 우수한 후보물질을 도출하였다. 이와 같은 연구 결과는 앞으로 많은 drug target에 접근할 수 있는 연구 수행방법을 제시할 수 있고, 신규 의약품 합성 및 개발연구에 도움이 될 것임.

여 백

Summary

I. Title

Generation of Oxazolidinone Candidates of Piperidine Series

II. The purpose and necessity of the project

Along with the increase of resistant strains due to abuse of antibacterial agents, there exists an urgent need for a new class of antibacterial agents with an entirely different structure and a mode of action.

Oxazolidinone compounds are a new class of synthetic antibacterial agents designed for this need, which possesses a simple structure different from other antibacterial agents currently being used clinically and a unique action mechanism as protein synthesis inhibitor at the early stage. Up to now, structure-activity relationships of oxazolidinone compounds have been studied qualitatively but seldom quantitatively.

The purpose of this study is to design and synthesize oxazolidinone derivatives having a potential activity against resistant strains, such as MRSA, MRSE and VRE, and establishment of the quantitative structure-activity relationships for oxazolidinone compounds systematically.

III. Contents and scope of the research

New oxazolidinone compounds were synthesized through the structural modification of KST150A058 derived from 3D QSAR studies.

All of the new compounds were tested for antibacterial activities.

IV. Results

Four series of new antibacterial agents against MRSA, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. pyogenes* were synthesized. Some of them showed a good activity: **KST150A080**, **KST150A091**, **KST150A092** and **KST150A093** are superior to **linezolid** and comparable to **Vancomycin**.

V. Future plan

Novel candidates for antibacterial agents were generated by studies on oxazolidinone antibiotics. Those compounds were 2-4 fold potent than linezolid against MRSA and VRE. The pharmacokinetic profile of KST150A058 and KST150A080 were comparable to linezolid. These results may provide a good way of approaching many drug targets and accomplishing new drug development.

여 백

CONTENTS

Chapter 1	INTRODUCTION	13
Chapter 2	STATE-OF-THE-ART REPORT	21
Chapter 3	CONTENTS AND RESULTS OF THE RESEARCH	25
Chapter 4	MEASURES OF ACHIEVEMENT AND CONTRIBUTION	73
Chapter 5	FUTURE PLAN	73
Chapter 6	REFERENCES	75
APPENDIX	77

여 백

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	13
제 1 절 개발의 배경	13
제 2 절 항생제 분야의 연구개발 현황	14
제 2 장 국내외 기술개발 현황	
제 1 절 국내외 기술개발 현황	21
제 2 절 Oxazolidinone화합물의 작용기전	22
제 3 절 구조-활성 관계연구	22
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	
제 1 절 신규화합물의 설계	25
제 2 절 화합물의 합성	29
제 3 절 항균활성 결과	54
제 4 절 피롤리딘은 유도체 합성	58
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	73
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	73
제 6 장 참고자료	75
부록	
화합물의 Spectroscopic data	77

여 백

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 개발의 배경

증가하고 있는 Gram-positive 내성균주 및 다제 내성균주의 의 발현은 여러 계열의 항생제의 심각한 임상적 문제를 야기 시키고 있다. 현재 세계적으로 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)¹⁾, *Streptococcus pneumoniae*²⁾, *Mycobacterium tuberculosis*³⁾같은 내성균주들이 많이 나타나고 있다. 특히 Gram-positive infection에 대하여 가장 강력한 항생제로 간주되고 있는 vancomycin에 저항력을 갖는 vancomycin-resistant enterococci (VRE)⁴⁾의 발현과 증가 추세가 미국과 영국의 병원으로부터 보고 되기 시작했다.

이러한 항생제에 대한 내성의 문제는 새로운 현상은 아니다. 1945년 Penicillin이 항생제로 사용되기 시작한 이후 많은 종류의 항생제들이 개발 되었으며 감염질환을 치료하기 위한 가장 보편적인 치료제들로 사용되어져 왔다. Penicillin이 치료제로 사용되기 시작한 이후 몇 년이 지나지 않아 대장균 (*Escherichia coli*) 로부터 내성균이 발견되었고, 1959년에는 penicillinase-producing *Staphylococcus aureus* 이 관찰되었다. 또한 1959년에는 *Shigella dysenteriae*의 균주들로부터 다제 내성(multi-drug resistance)이 관찰되었으며, 내성균주의 수도 점차적으로 늘어나는 추세이다.

항생제가 임상에 주로 사용된 초기 내성균주들은 주로 Gram-positive (*Streptococcal species* and *Staphylococcus aureus*) 등이었다. 1970년대 penicillin에 대해 내성을 지니고 있는 *Enterococci* 균주는 1935년의 3%로부터 1970년의 19%로 늘어났고, *Klebsiella-Enterobacter*균주는 0%에서 39%로 증가되었다⁵⁾. 1980년대는 혈액병의 원인균은 주로 *Coagulase-negative Staphylococci* (CNS), *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.* 와 *Candia spp.*⁷⁾ 등 네 가지 종류였지만 현재는 보다 다양한 종류의 항생제들에 대한 내성이 여러 종류의 균주들로부터 관찰되고 있으며, 항생제의 사용범위가 확대됨에 따라 박테리아 자체가 좀더 다양하게 변이를 일으키게 되어 폭발적으로 내성이 증가하고 있다. 또한 항생제의 급증은 항생제의 내성문제를 과거보다 훨씬 복잡하게 이끌고 있다. 그 중 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 균주는 1961년 영국에서 발견되었으며 대부분의 penicillin, penems 과 carbapenems, fluoroquinolone 등 항생제에 대하여 내성을 나타내고 있다. 1980년대 중반에만 해도 flouroquinolone이 치료제로 많이 사용되었는데 1980년대 말에 들어서서는 MRSA의 80%가 fluoroquinolone에 대해 내성을 나타냈다⁸⁾. 1992년의 통계에 의하면 MRSA의 68%가 다제 내성을 지닌 균주라고 보고 되었다. 1993년 미국 내에서 발견된 vancomycin의 내성균주 enterococci는 1989년의 0.4%로서 1993년의 13.6%로 증가되었다¹⁰⁾. 현재 다제 내성 MRSA균주에 활성을 보이는 치료제로는 단

지 vancomycin 하나만 쓰이고 있다. Enterococci 는 대개가 penicillin, cephalosporin, aminoglycoside와 같은 항생제에 대해 내성을 보이고 있다. 현재 이러한 균주들에 대한 감염증을 치료하기 위하여서는 2가지의 항생제를 복합적으로 사용하거나 vancomycin으로만 사용이 가능하다. Methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci*(MRCNS)는 penicillinase-resistant penicillins (methicillin, oxacillin)에 대해 내성을 갖고 있다. CNS의 치료제는 역시 vancomycin 만이 가능하다. 그러나 지금은 vancomycin도 큰 우려를 보여주고 있는 실정이다.

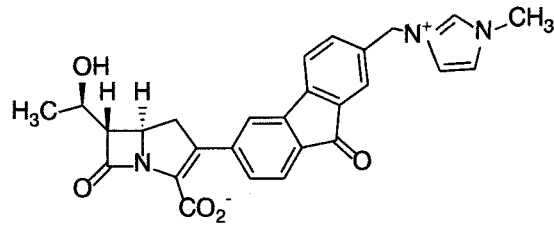
이러한 시점에서 새로운 항생제의 연구개발은 필수적이다. 이미 내성균주들이 현재 임상에 사용 중인 대부분의 항생제에 대해 내성을 나타내고 있기 때문이다. 내성균주 문제를 해결하기 위하여 새로운 구조와 작용기전을 갖는 항생제를 연구가 절실히 필요하다.

제 2 절 항생제 분야의 연구개발 현황

항생제는 화학구조에 의하여 β -Lactam, Aminoglycoside, Macrolide, Quinolone, Tetracycline 및 Glycopeptide계열로 크게 구분 할 수 있다.

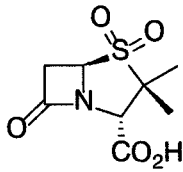
1. β -Lactam계열 항생제

β -Lactam계열 항생제는 Penicillin, Cephalosporins, Cephameycins, Monobactams와 Thienamycins 등으로 이루어졌다. 높은 항균력, 항균 범위와 가장 적은 부작용등의 특징을 갖고 있는 β -Lactam계열 항생제는 peptidoglycan synthesis와 cell wall synthesis를 억제하므로 항균 작용을 한다. 그러나 β -lactamase의 출현으로 기존의 β -lactam 항생제들이 무능화되고 있다. 이를 해결하기 위한 β -lactamase inhibitor 또는 β -lactamase에 안정한 β -lactam계열 항생제 개발이 시도되고 있다. 예를 들어, MRSA균주에 대해 PBP-2a enzyme에 높은 affinity를 갖고 있으며 MRSA, penicillin-resistant *pneumococci*에 활성을 나타내는 L-695256 (1-1)과 같은 새로운 형태의 2-Arylcarbapenem¹¹⁾ 계열 화합물들이 개발되고 있으며 현재 임상에서는 β -lactamase inhibitor로 sulbactam (1-2)과 tazobactam (1-3) 등을 사용하고 있다.



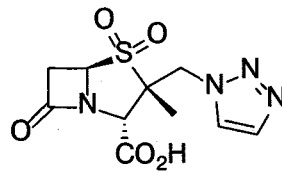
(1-1)

L-695256



sulbactam

(1-2)

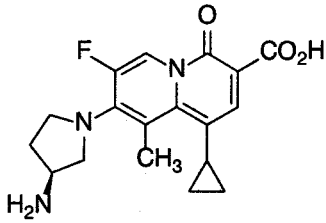


tazobactam

(1-3)

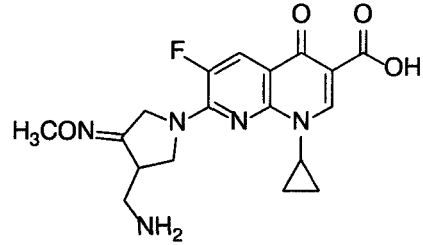
2. Quinolone계열 항생제

Fluoroquinolone계열 항생제는 DNA Gyrase inhibitor로 작용하는 것으로 알려져 있다. 최근의 보고에 의하면 *Staphylococcus aureus*의 경우에 fluoroquinolone의 일차 목표는 type IV topoisomerase라고 알려졌다. 이들에서의 내성은 gyrase의 mutation이나 efflux system의 변화, 외부 세포벽의 변화 등에 기인하고 있다. 이러한 내성을 극복하기 위하여 Clinafloxacin¹²⁾, Trovafloxacin¹³⁾, DU-6859a¹⁴⁾와 같은 화합물들이 연구 개발되었고, 최근에는 새로운 계열로 미국 Abbott에서 개발한 A-867191 보고되었고, 이 화합물은 MRSA 균주에 매우 강한 항균 활성을 나타내는 것으로 보고되었다.¹⁵⁾ 화합물 1-5는 oxime - aminomethyl구조로 개선된 Fluoroquinolone계 화합물로서 MRSA와 같은 Gram-positive 균주에 대해 좋은 항균활성을 지닌다고 국내의 LG회사에서 보고되었다.¹⁶⁾



A-867191

(1-4)

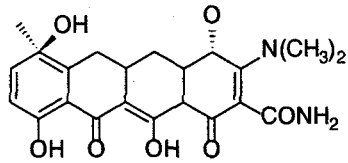


(1-5)

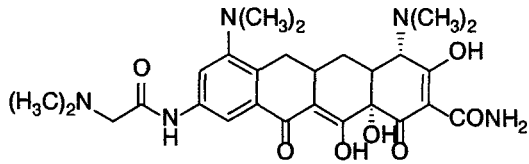
3. Tetracyclines

Tetracyclines 계열 항생제는 30S ribosomal subunit에 binding하므로 aminoacyl-tRNA와의 binding을 방해하여 bacterial protein synthesis를 억제하는 작용을 한다. 이 계열 화합물로는 chlortetracycline, oxytetracycline와 tetracycline를 포함하는 broad spectrum을 나타내고 있는 항생제가 있고, 90년대 초에 들어서 Lederle laboratories에서는 *S. aureus*, *E. faecalis*와 *E. coli*등 균주에 대해 활성을 지니고 있는 반합성 항생제 1-7과 1-8 등을 발표하였다.

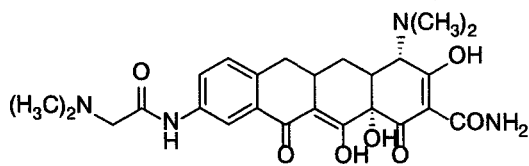
Tetracycline계 항생제에 대한 내성 발현은 대개 2가지로 그 기전이 알려져 있다. 즉 plasmid 또는 transposon-encoded efflux system이나 ribosomal protection factor의 발현으로 설명하고 있다. 특히 이들 화합물은 내성이 빨리 발현하는 단점을 나타내었다. 항생제 1-9는 efflux protein을 억제할 수 있는 화합물이다.¹⁷⁾¹⁸⁾ 기존의 tetracycline에 대해 내성을 지닌 균주에 병용 투여하면 상승효과를 볼 수 있다. 항생제 1-8은 glycylicycline계열로 화학적으로 변형된 새로운 구조의 화합물로서 ribosomal factor나 efflux determinant를 가지고 있는 균주에 대하여 활성을 지닌 것으로 알려져 있다. 이 화합물들은 minocycline, doxycycline, sancycline으로부터 합성이 되는데¹⁹⁾²⁰⁾ Vancomycin이나 β -Lactams 항생제에 내성을 보이는 균주들에 대해 활성을 보이는 것으로 현재 임상 사용중이다.²¹⁾²²⁾ 특히 이들은 MRSA에 의한 질환 치료에 유용하게 적용될 전망이다.



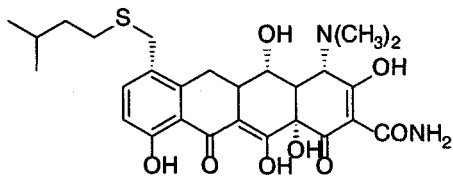
(1-6)



(1-7)



(1-8)



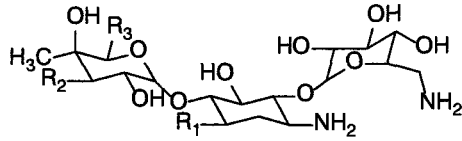
(1-9)

4. Macrolides

임상에서는 Clarithromycin, Azithromycin과 같은 macrolides계열 항생제가 사용되어 왔다. 이들은 ribosome에 작용하여 protein synthesis를 저해한다. 최근에 들어 clarithromycin의 11,12-carbonate 유도체가 내성이 있는 *S. pyogenes*에 대해 활성을 보이고 있다. 특히 3-descladinosyl-3-oxo-11,12-cyclic carbamate, clarithromycin 유도체가 penicillin-resistant 와 erythromycin-resistant *S. pneumoniae*에 활성이 있다는 것이 보고 되었다. 현재 이러한 화합물들은 Macrolide계열 항생제에서 유망한 것으로 보고 있다.

5. Aminoglycosides

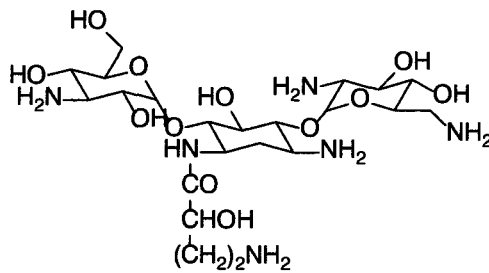
Streptomyces, Micromonospora와 Bacillus 등으로 이루어진 Aminoglycosides계열 화합물은 ribosomes와 결합하며 protein synthesis를 억제하는 항생제들이다. 이런 화합물은 Gram-negative 균주에 특히 좋은 항균 효과를 지니고 있다. 이들 중, Isepamicin과 Arbekacin 등 항생제는 MRSA, AME균주에 대해 broad spectrum을 갖고 있다.



R ₁	R ₂	R ₃
	—NHCH ₃	H

Isepamicin

(1-10)



Arbekacin

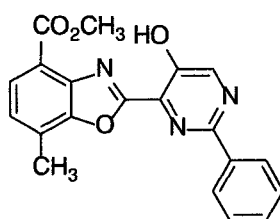
(1-11)

6. Glycopeptide

Glycopeptide계열로는 Vancomycin과 Teicoplanine와 같은 항생제가 사용 중에 있으며 *S. aureus* 또는 *Enterococci*와 같은 Gram-positive균주에 대해 항균활성을 지니고 있다. 이들에 있어서 내성 발현으로 새로운 glycopeptide합성 연구에 집중되어 있는데 대개 2가지 방향으로 연구가 진행되고 있다. 첫째로는 screening과 fermentation으로 우수한 glycopeptide를 찾는 것이고, 둘째로는 현재 사용 중인 화합물의 화학구조 개선이다. 이러한 노력의 일환으로 미국 Eli Lilly 제약회사는 변형된 LY264826과 LY333328과 같은 화합물들을 개발하고 있다.²³⁾²⁴⁾ 이런 화합물은 Vancomycin의 vancisamine sugar를 변형하여 다양한 형태의 화합물을 합성하였고, MRSA 균주뿐만 아니라 glycopeptide에 내성이 있는 *Enterococci*에 대해 매우 높은 활성을 보이는 것으로 보고 되었다. Gram-positive 균주에 대해 높은 활성을 보이고 있어서 임상단계에서의 연구가 진행되는 것으로 알려져 있다.

앞에서 언급한 이외에도 Oxazolidinone화합물, Eystidine, Arginine등으로 이루어진 peptide화합물, Everninomicin, Sch27899등은 항생제 분야에서 새롭게 부각 되고있는 화합물들이다. 현재 새로운 항생제 개발에 있어서 narrow activity spectrum을 갖고 있거나 혹은 기존의 항생제와 전혀 다른 action mechanism을 갖고 있는 항생제를 개발하여야만 내성균주 또는 다제내성균주에 우수한 약효를 나타낼 수 있다는 점을 인식하였다. Oxazolidinone계열 화합물과 Boxazomycin계 화합물들은 바로 이러한 장점을 갖고 있는 새로운 후보 약물이다. 이들에 대한 연구개발이 현재 활발히 진행되고 있는 상황이다.

7. Boxazomycin 유도체인 경우 MRSA, CRSA와 같은 Gram-positive 내성균주와 anaerobe 균주에 대해 높은 활성을 가지고 있는 것으로 최근에 밝혀지고 있다. 이 화합물은 미국 Parke-Davis 회사에서 기존의 항생제에서 다루고 있는 것과는 달리 새롭게 발견된 화학 구조이다.



Boxazomycin
(1-12)

원래 이 화합물은 Actinomycetes G495-11에서 분리된 화합물로서 아주 초기에 protein synthesis를 억제하는 것으로 알려지고 있다. 이런 화합물들에서의 구조적 변화는 benzoxazole의 5-위치와 2-위치에 치환된 치환기의 형태에 따라 부분적으로 이루어졌다.

8. Oxazolidinone계열 화합물

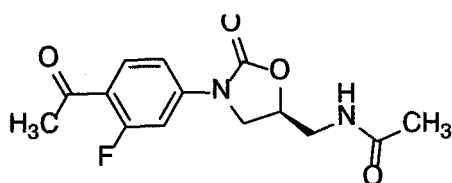
Oxazolidinone계열 화합물은 2-oxooxazolidine기본구조를 갖고 있으며 화학적 구조가 단순하고, protein synthesis를 저해하므로 항균활성을 나타낸다. 따라서 기존의 항생제와 구별되는 새로운 작용기전으로 강력한 항생작용을 나타내는 새로운 제제이다. Oxazolidinone 항생제는 광범위한 항균력으로 MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, VRSA(vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*), VREF (vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*)등을 포함하는 다제내성 균주와 대부분의 Gram-positive균주에 우수한 감수성을 나타낸다.

여 백

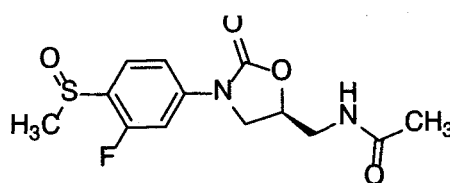
제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술개발 현황

Oxazolidinone계 화합물이 항균활성을 지니고 있다는 사실은 DuPont사에서 처음으로 밝혀졌다. 1987년 DuPont사에서 **DuP-105**와 **DuP-721**을 합성하였고, **DuP-721**은 MRSA, MRSE등을 포함한 Gram-positive균주 뿐 아니라 Gram-negative *anaerobes*와 *Mycobacterium tuberculosis*등의 균주에 대해서도 활성을 지닌 것으로 보고 되었다.



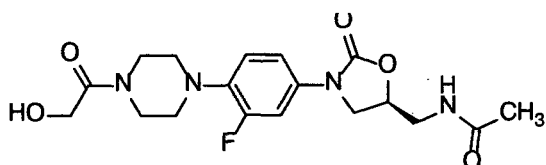
DuP-721



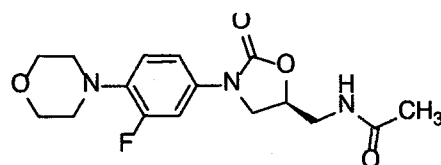
DuP-105

그러나 **DuP-105**과 **DuP-721**은 Upjohn사에서 실시된 임상실험의 phase I단계에서 치명적인 독성문제가 나타나면서 연구가 더 이상 진행되지 못하였다. **DuP-105**과 **DuP-721**의 연구결과로 얻은 oxazolidinone 화합물이 항균활성을 갖는다는 사실을 바탕으로 진행된 연구의 결과로 미국 Upjohn사는 1996년 **Linezolid**와 **Eperezolid**를 보고하였다. 이런 화합물들은 *Staphylococcus aureus* (MRSA를 포함), *Streptococci*와 *Enterococci*등 Gram-positive균주에 대한 항균 활성은 vancomycin과 비슷하다. 그러나 Gram-negative 균주에 대해서는 매우 낮은 활성을 보였다.

이들 중 **Linezolid**는 새로운 항생제로 미국 식품 의약국 (Food and Drug Administration, FDA)으로부터 2000년 4월에 공식 승인을 받았다. **Linezolid**는 지복스 (Zyvox)라는 이름으로 시판되며, 35년 만에 처음으로 선을 보인 새로운 유형의 항생제이다.



Eperezolid



Linezolid

제 2 절 Oxazolidinone화합물의 작용기전

Oxazolidinone화합물은 독특한 작용기전을 가지는 것으로 보고 되었다. Protein은 아미노산의 연결된 형태이며, 그 연결 순서는 protein의 기능과 형태를 결정하게 된다. 또한 bacterial cell에서의 protein의 합성은 생존을 위한 필수 요건이다. Protein합성은 30S와 50S subunit에 의해서 만들어진 ribosome이 messenger RNA 그리고 transfer RNA등의 initiation factor들과 함께 70S initiation complex를 형성하며 진행된다. 이러한 complex가 형성이 될 때, amino acid가 순차적으로 연결되며 protein합성이 일어나게 되며, 이러한 chain elongation은 messenger RNA에 의해서 program화된 polypeptide를 합성하게 된다. Oxazolidinone화합물은 50S ribosomal subunit에 결합하여 initiation complex의 형성을 방해하며, 따라서 protein합성은 더 이상 일어나지 않게 된다. Protein합성의 중단으로 인해 bacterial cell들은 필수적 기능을 수행하지 못하고 결국 죽게 된다.

이상과 같은 oxazolidinone 항생제의 작용기전은 다음과 같이 요약된다.

- ① Polypeptide의 elongation 혹은 termination에 대해서는 억제작용이 없다.
- ② Protein synthesis의 가장 초기에 억제 작용을 한다.
- ③ Oxazolidinone화합물은 30S ribosome과 결합하여, mRNA, fmet-tRNA와 작용한다.
- ④ Oxazolidinone화합물의 70S ribosome과의 결합은 기존항생제와는 다르다.
- ⑤ Oxazolidinone화합물은 initiation complex를 방해한다.

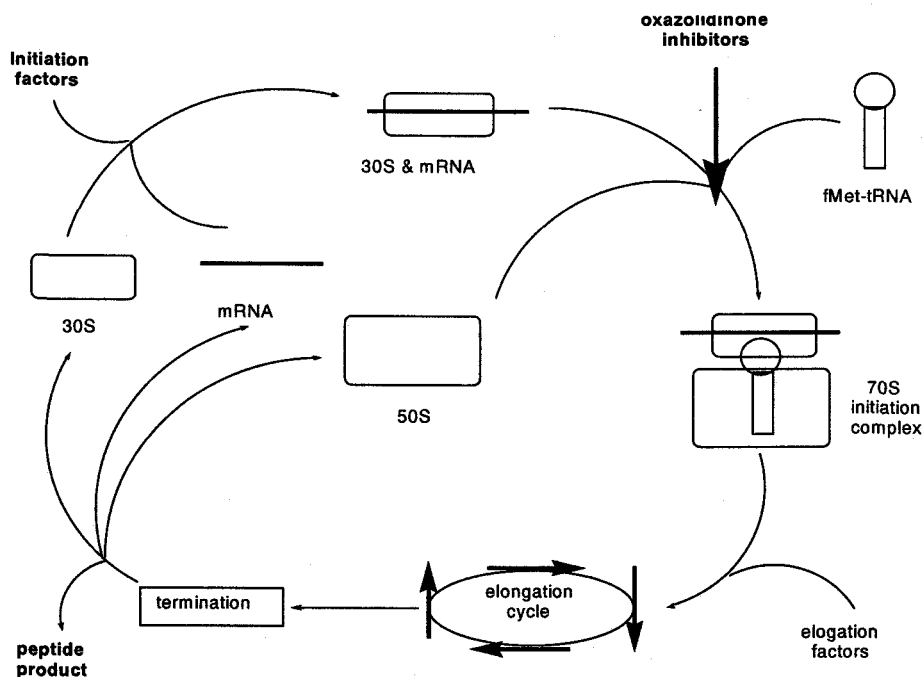
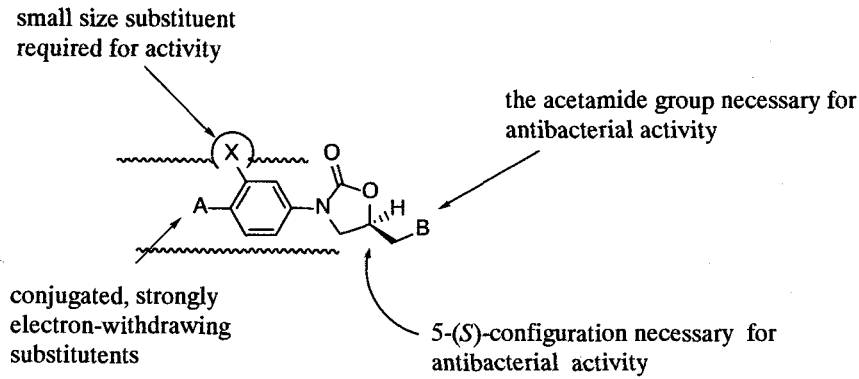


Figure 1. The reaction mechanism-the ribosome cycle

제 3 절 구조-활성 관계연구

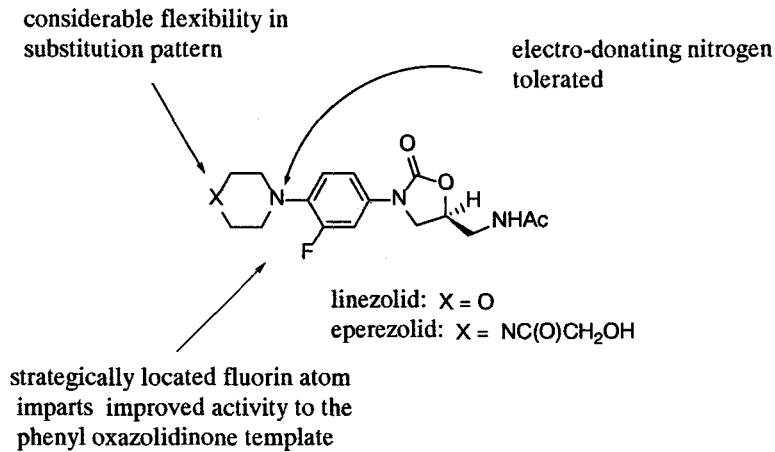
DuPont사의 oxazolidinone의 구조-활성관계에 대한 연구결과는 다음과 같이 표시할 수 있다.



<SAR of Dupont>

위의 그림에서 보는 바와 같이 Oxazolidinone항생제의 구조-활성관계 연구결과는 아래와 같이 설명할 수 있다.

- ① 2-Oxooxazolidinone ring의 5-위치 (S)-configuration은 항균활성에 필수이다.
- ② B group은 acetylaminomethyl기가 치환해야만 가장 좋은 activity를 보여준다.
- ③ A 위치는 conjugated, strongly electron-withdrawing 치환체일수록 활성이 증가하는 것을 볼 수 있다.
- ④ Phenyl ring의 3,4-disubstituted할 때의 활성은 4-monosubstituted 화합물과 비슷한 활성을 보이며 3-위치의 치환체는 small steric bulk한 치환체이어야만 활성증가효과를 볼 수 있다.



<SAR of Upjohn>

Upjohn사의 구조-활성관계연구에 의하면

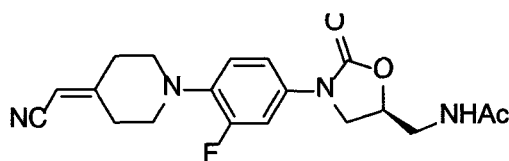
- ① Piperazinyl N-위치에 acyl, carbamoyl, sulfonyl등 치환체를 가지면 가장 좋은 항균활성을 나타냈다.
- ② Piperazinyl N-위치에 cyano, fluoro, methoxy와 같은 polar한 치환체는 alkyl치환체보다 항균활성에 상승효과를 보였다.
- ③ Piperazinyl ring의 alkyl 치환체에 의해 활성에 많은 차이를 보였다.
- ④ Aromatic ring에 fluorine는 화합물의 항균활성 증가함에 있어서 가장 큰 의미를 갖고 있다. Single fluorine atom은 화합물의 생체 외 항균활성을 2배정도 높이고, 생체 내 항균활성도 증가시켰다.
- ⑤ Phenyl ring에 또 하나의 fluorine atom을 도입하면 생체 외 항균활성은 일정한 정도로 증가하는 것을 볼 수 있지만 생체 내 활성에서는 영향을 주지 못하였다.
- ⑥ 이 계열 화합물들은 Mycobacterim tuberculosis균주에 대해 좋은 활성을 지니고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 신규화합물의 설계

1. KST150A058의 설계

KST150A058은 본 실험실에서 이루어진 옥사졸리디논계열 항생제 연구 중 매우 좋은 *in vitro* 활성을 나타내는 물질이었다. KST150A058을 포함하는 series의 화합물 설계는 우선 Ujohn회사의 화합물인 PNU-100592와 PNU-171933 그리고 PNU-172576을 기본으로 한 분자 modeling (QSAR)방법으로 수행 되었다. PNU-100592는 piperazine ring의 4번 위치에 hydroxymethylcabonyl기를 가지고 있다. 따라서 amide (-CON<)의 bioisostere인 methylene group (>CH=CH<)이 piperidiny ring에 도입되었다. 다음으로, Gram 양성균 뿐 아니라 haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis등과 같은 Gram 음성균에 대해서도 매우 강한 활성을 지니는 물질로 보고된 바 있는 PNU-100592와 PNU-171933는 극성 치환기인 3-cyanopyrrole 과 4-cyanopyrazole을 가진다. Simple, polar, rigid한 구조적 특성을 갖는 이러한 치환기들을 새로운 화합물의 구조설계에 도입하였다. Figure 2 와 3은 화합물 설계과정을 도식적으로 나타낸 것이다.



KST150A058

2. 새로운 옥사졸리디논 유도체들의 구조설계

새로운 옥사졸리디논 유도체들의 구조설계는 본 실험실의 연구결과들 중 매우 좋은 활성을 보였던 **KST150A058**의 구조설계와 **KST150A058** 자체의 물리 화학적 특성을 기본으로 한 structural modification에 의해 시도하였다. **KST150A058**은 piperidine ring의 4번 위치에 polar한 cyanomethylene기를 가지며, 따라서 Simple, polar, rigid한 구조적 특성을 갖는 치환기들을 새로운 화합물의 구조설계에 도입하였다. 또한 piperidine ring을 보다 작은 size를 갖는 pyrrolidine ring으로의 변환, isoxazolyl tetrahydropyridinyl 및 alkyl 1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl group의 도입, piperidine에 cyano group과 alkoxy group이 직접 치환된 유도체 등의 구조설계를 통해 새로운 옥사졸리디논 유도체들의 합성을 시도하였다

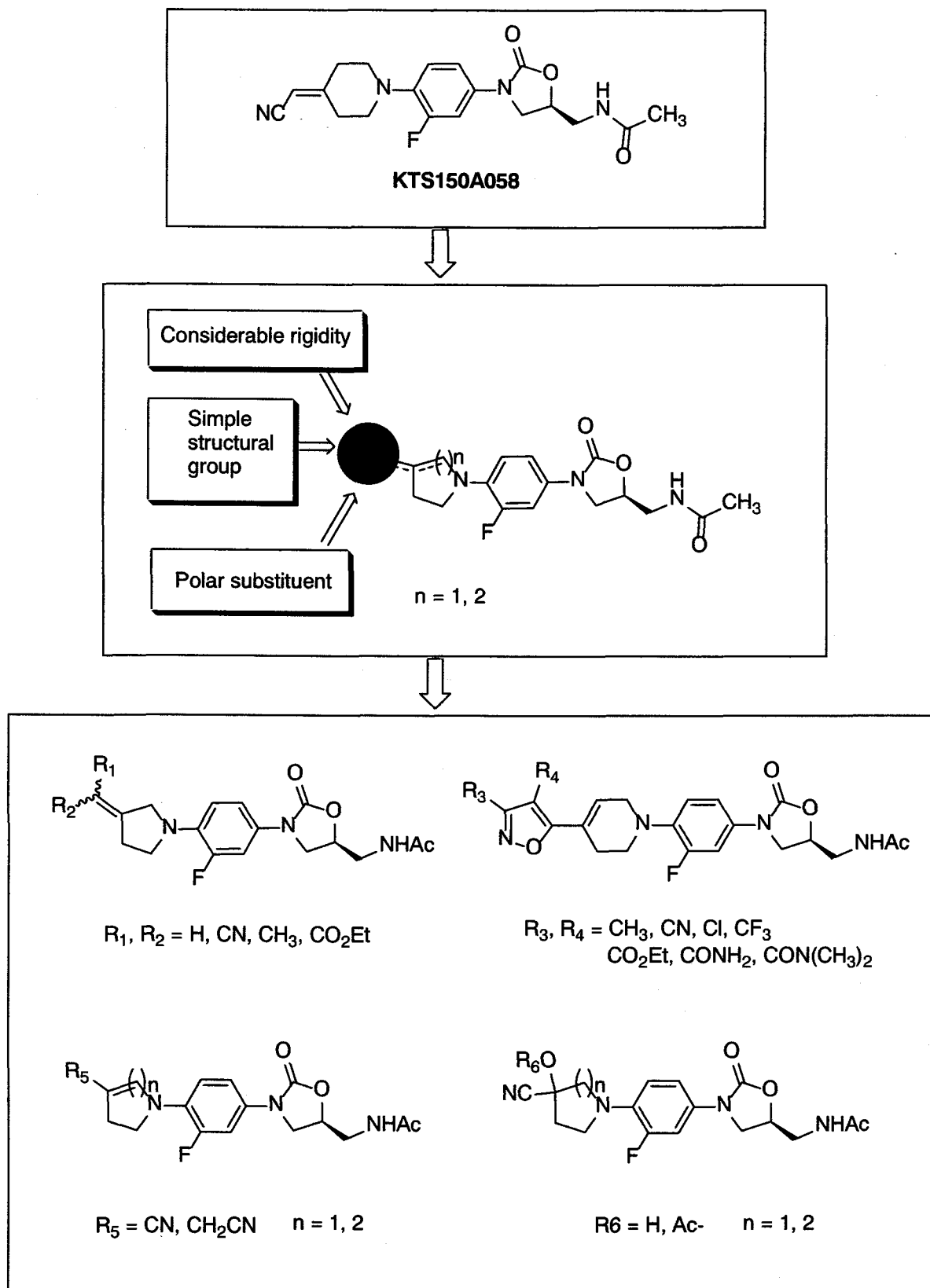


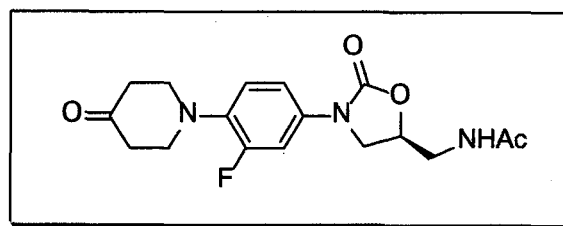
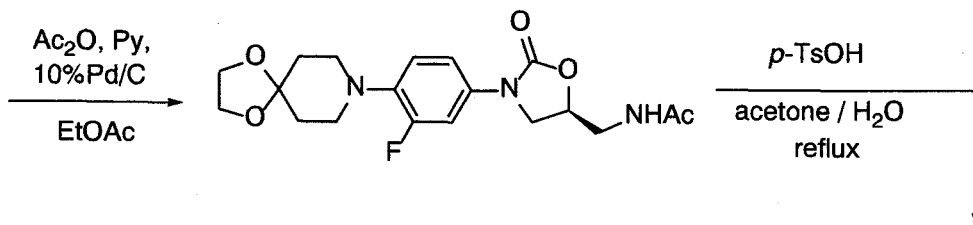
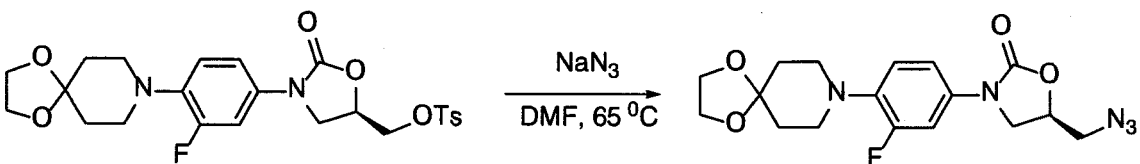
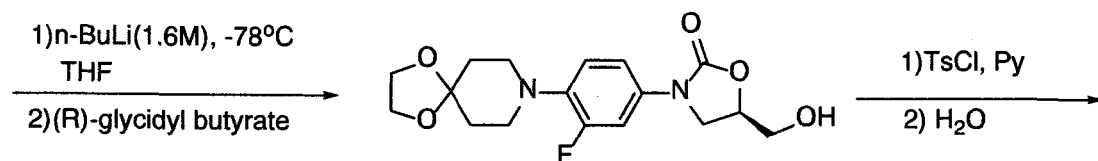
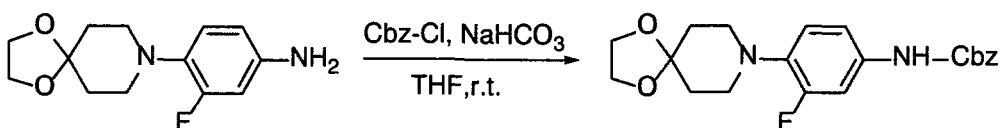
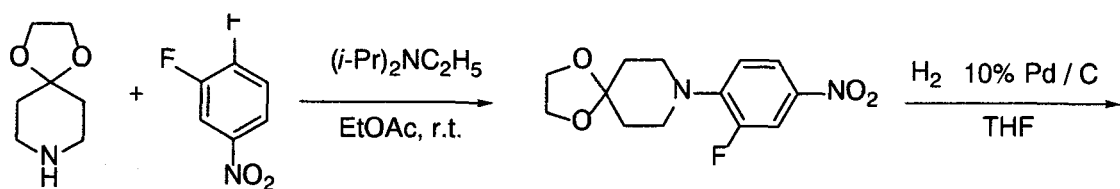
Figure 3. 새로운 화합물의 구조설계

제 2 절 화합물의 합성

1. 주요 중간체들의 합성

(가) N-{3-[3-Fluoro-4-(4-oxopiperidin-1-yl)phenyl]-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl}acetamide의 합성 (Scheme 1)²⁵⁾

현재 알려진 방법에 따라 2개의 출발물질을 coupling한 후 nitro group을 Pd/C 촉매를 사용하여 수소화 하였다. 이 반응에서 Key step은 바로 2-oxooxazolidine ring의 형성이다. 합성된 [4-(1,4-Dioxo-8-azaspiro[4.5]dec-8-yl)-3-fluorophenyl]carbamic acid benzyl ester를 질소 분위기 하에서 freshly distilled THF에 녹여 -78℃로 유지하면서 n-butyllithium을 천천히 떨어뜨려 가한다. -78℃에서 1.5시간 동안 반응 한 후 (R)-glycidyl butyrate를 가하고 실온으로 올려서 3시간 동안 반응시켜 2-oxooxazolidine ring을 형성했다.

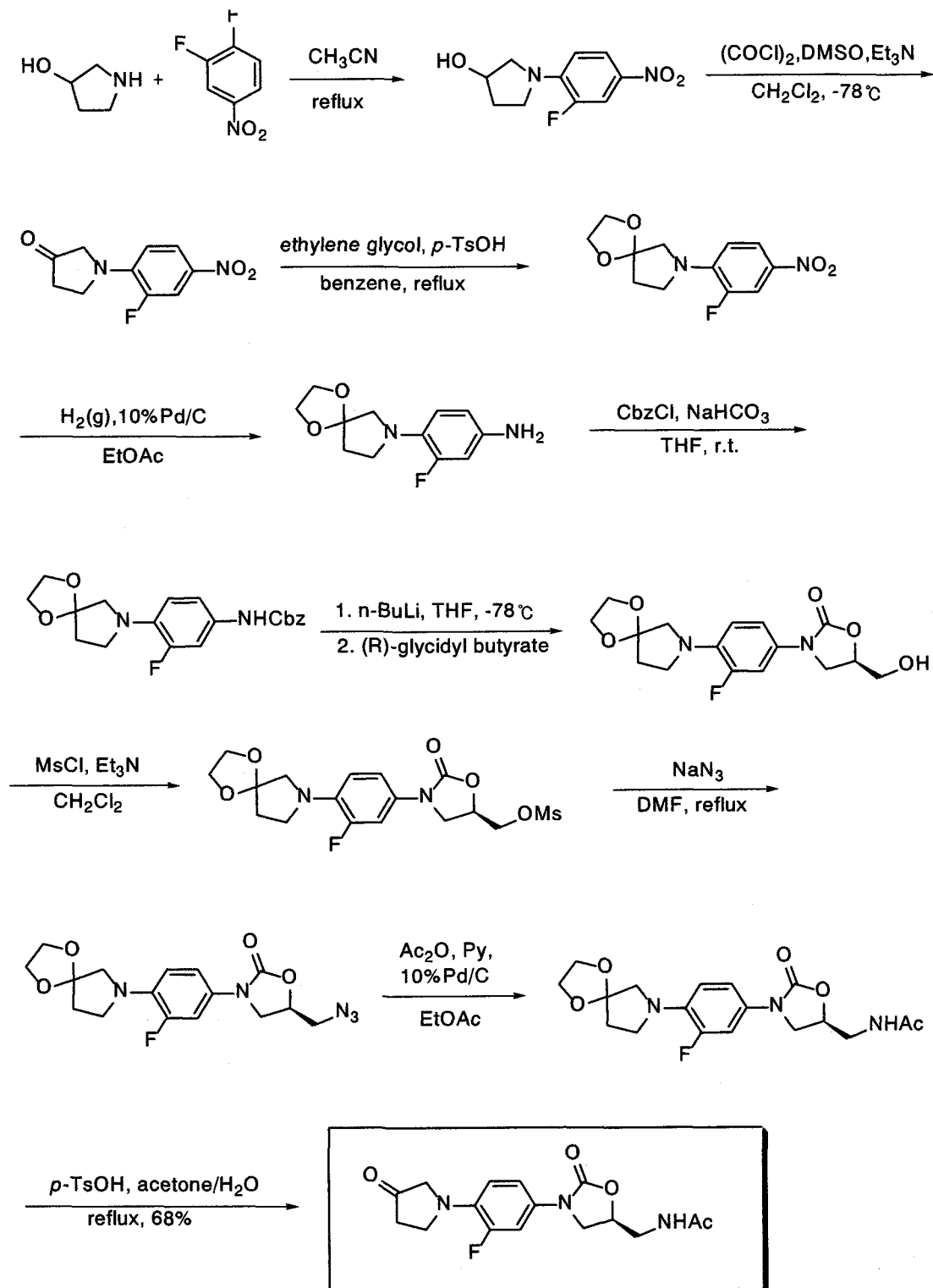


(I)

Scheme 1. Key intermediate (I)의 합성

(나) N-{3-[3-Fluoro-4-(3-oxopyrrolidin-1-yl)phenyl]-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl}acetamide의 합성 (Scheme 2)²⁶⁾

현재 알려진 방법에 따라 2개의 출발물질의 coupling으로부터 9단계의 실험을 거쳐 합성하였다.



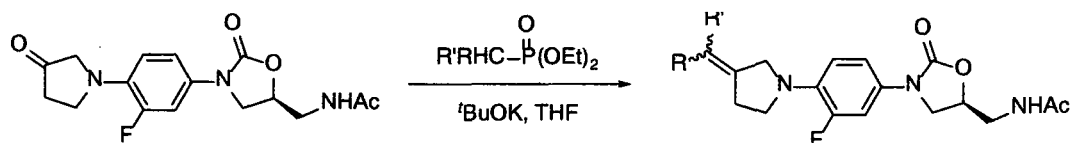
(II)

Scheme 2. Key intermediate (II)의 합성

2. 화합물의 합성

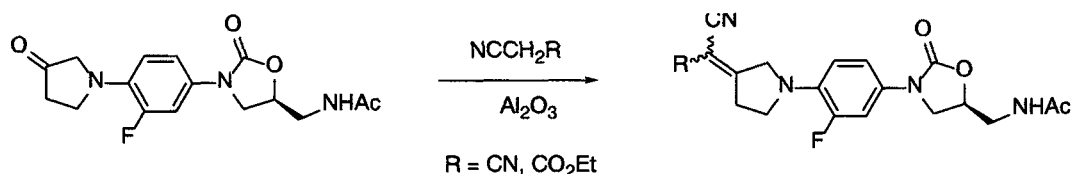
(가) Wadsworth-Horner-Emmons Reaction과 Knoevenagel Condensation²⁷⁾에 의한 Methylenepyrrolidinylphenyloxazolidinone (KST150A080, 082~084)의 합성

Wadsworth-Horner-Emmons Reaction은 mild condition 하에서 높은 수율로 olefin을 형성할 수 있는 반응으로 잘 알려져 있다. 다양한 phosphonate 음이온들을 정제된 tetrahydrofuran에서 phosphonate들과 potassium *tert*-butoxide과의 반응에 의해서 형성한 용액에 N-{3-[3-Fluoro-4-(3-oxopyrrolidin-1-yl)phenyl]-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl} acetamide 를 가하고, 이를 수 시간 동안의 반응을 거쳐 원하는 화합물을 얻는다.



Scheme 3. Wadsworth-Horner-Emmons Reaction

Knoevenagel condensation은 대표적인 base-catalysed reaction이다. Ammonia, ammonium salts, amine류와 그들의 염, potassium fluoride, cesium fluoride 등은 이 반응의 촉매로 많이 사용되는 base들이다. 본 연구에서는 aluminium oxide가 효과적인 촉매로 사용되어, N-{3-[3-Fluoro-4-(3-oxopyrrolidin-1-yl)phenyl]-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl}acetamide와 malonitrile 그리고 cyanoacetic acid ester와의 반응으로 원하는 화합물을 얻었다.

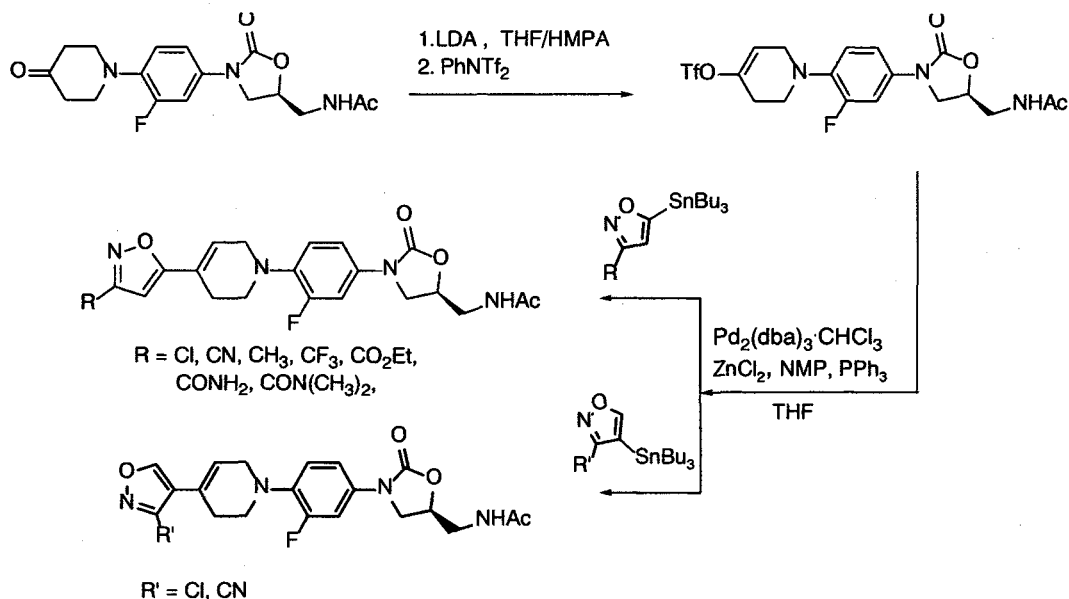


Scheme 4. Knoevenagel condensation

(나) Stille-coupling reaction²⁸⁾을 통한 isoxazolyltetrahydropyridine 유도체 (KST150A081, 085~091, 095)의 합성

Stille-coupling reaction은 Pd을 촉매로 하여 organohalides 또는 triflates와

organostannanes 간의 cross-coupling reaction으로 carbon-carbon 결합을 형성하는 효과적인 반응법이다. 본 연구에서는 key intermediate (I)을 4-Trifluoromethanesulfonyloxy-1-[4-[5-(acetylaminoethyl)-2-oxooxazolidin-3-yl]-2-fluorophenyl]-1,2,3,6-tetrahydropyridine 으로 변환한 이후에, [2 + 3] cycloaddition reaction으로 얻어진 여러 가지 다양한 tributylstannanylisoxazole 유도체들과 반응하여 새로운 화합물들을 생성하였다.

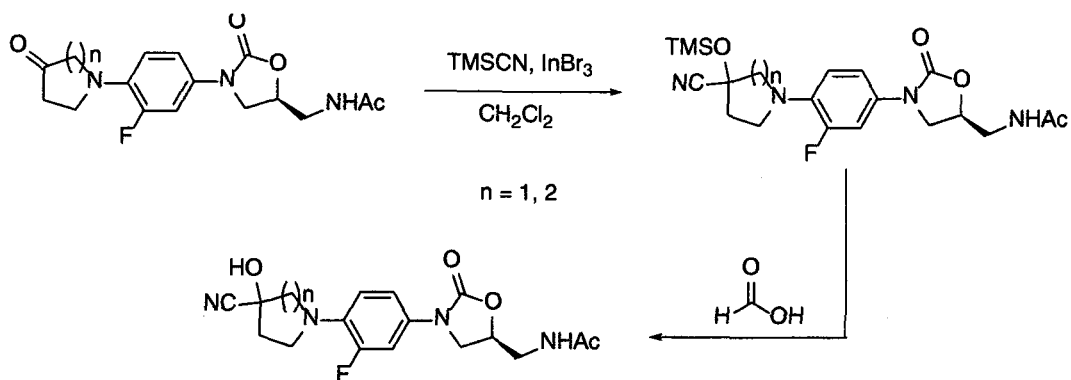


Scheme 5. Stille-coupling reaction

(다) Trimethylsilyl cyanide의 친핵 반응 통한 alcohol의 합성.

유도체(KST150A092~094)의 합성

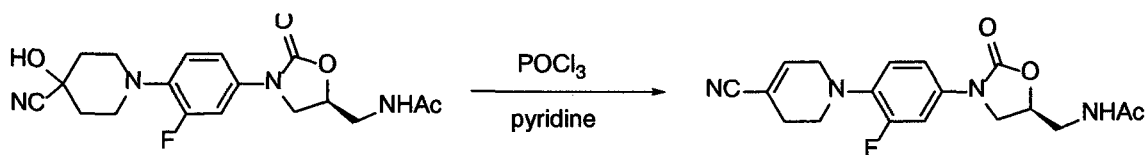
TMSCN의 nucleophilic -CN group의 carbonyl attack을 통해 cyano group으로 치환된 alcohol을 손쉽게 만들 수 있었다. 이때 Lewis acid인 Indium bromide를 사용해 carbonyl group을 activation 시켰다. 산소에 결합된 TMS기는 formic acid와의 반응으로 간단히 이탈되어 alcohol을 얻었다.



Scheme 6. Synthesis of alcohol.

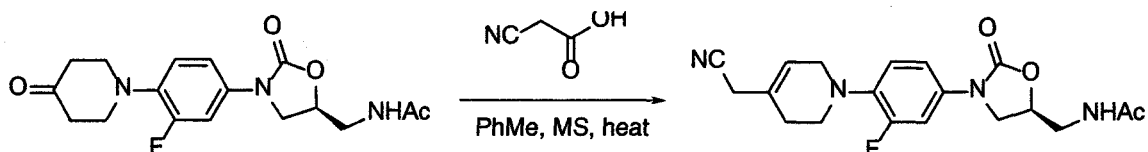
(라) Phosphorous oxychloride를 이용한 탈수반응 및 cyanoacetic acid와의 탈수·decarboxylation reaction을 통한 Alkyl 1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl 유도체들의 합성. 유도체(KST150A096~097)의 합성

강한 electron-withdrawing group인 cyano group에 인접한 alcohol로부터의 탈수반응은 쉽게 일어나지 않지만, phosphorous oxychloride와 pyridine 조건에서 효과적으로 탈수된 목적 화합물을 얻을 수 있었다. (KST150A096)



Scheme 7. Dehydration reaction

Cyanoacetic acid의 2번 위치의 탄소는 용이하게 음이온화 하여 출발물질의 carbonyl group과 반응하기에 충분하다. 고온의 반응조건에서 탈수반응과 함께 decarboxylation이 함께 일어나 목적 화합물을 얻었다. 이 때, molecular sieve를 사용한 물의 azeotropic removal이 필요하다. (KST150A097)



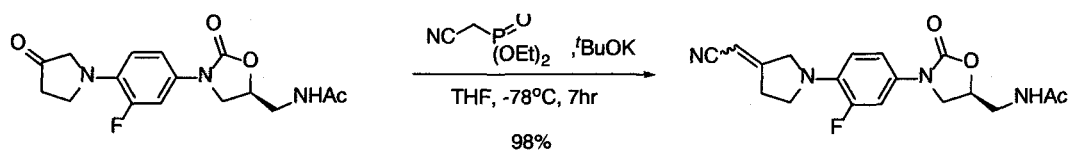
Scheme 8. Dehydration and decarboxylation reaction

3. 실험 방법

(가) Pyrrolidinyl 유도체들의 합성

①

N-{3-[4-(3-Cyanomethylenepyrrolidin-1-yl)-3-fluorophenyl]-2-oxo-oxazolidin-5-ylmethyl}-acetamide(KST150A080) 의 합성



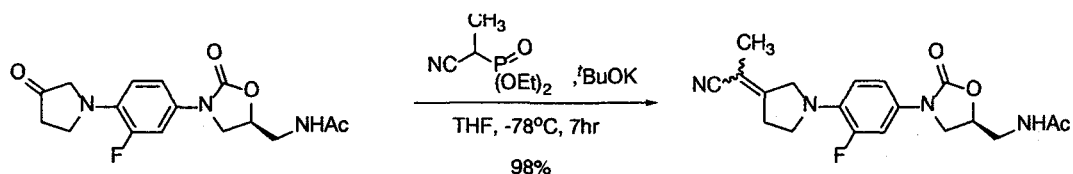
Scheme. 9. Synthesis of KST150A080

질소존재 하에서 *t*BuOK (836.5 mg, 1.4911 mmol)을 THF 30 mL에 녹이고 -78°C 로 냉각하였다. Diethyl cyanomethylphosphonate (1.35 g, 7.6046 mmol)을 THF 30 mL에 녹여 천천히 적가하고 1시간 교반 하였다.

N-{3-[3-Fluoro-4-(3-oxo-pyrrolidin-1-yl)phenyl]-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl}acetamide (500 mg, 1.4911 mmol)을 THF (90 mL)에 녹여 1시간 동안 적가하고 1시간 동안 교반하였다. 물을 가하여 반응을 종결시킨 후 EtOAc로 추출하고 무수 MgSO₄로 건조, 농축하였다. Et₃N으로 중화시킨 silica gel (230~400mesh)을 사용해 EtOAc:MeOH (40:1) 로 column chromatography하고, 농축한 후 EtOAc와 hexane로 solidify하여 생성물 525.7 mg (98%) 을 얻었다

¹H NMR (CDCl₃, 300MHz), δ 7.40 (dd, *J* = 2.43, 2.49, 1H), 7.05 (d, *J* = 8.76, 1H), 6.70 (m, 2H), 5.38 (d, *J* = 2.37, 1H), 4.77 (m, 1H), 4.23 (s, 1H), 4.13 (s, 1H), 4.01 (t, *J* = 8.91, 1H), 3.76 (t, *J* = 7.88, 1H), 3.66 (d, *J* = 2.66, 2H), 3.48 (m, 2H), 2.92 (m, 2H), 2.02 (s, 3H). IR (KBr, cm⁻¹) 2218 (CN), ¹³C NMR (CDCl₃, 300MHz, δ) 171.69, 166.61, 154.95, 154.84, 151.40, 133.31, 13.20, 133.17, 131.38, 131.25, 117.10, 117.07, 117.03, 116.37, 116.40, 114.80, 114.76, 108.41, 108.06, 91.91, 91.58, 77.89, 77.46, 77.05, 72.40, 56.02, 55.93, 50.04, 49.98, 49.66, 49.60, 48.13, 42.31, 32.96, 32.12, 23.40. HRMS (FAB+) Calcd. for C₁₈H₁₉FN₄O₃ 358.1441, found 359.1471.

② N-{3-[4-(3-Cyanomethylenepyrrolidin-1-yl)phenyl]-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl}acetamide의 합성



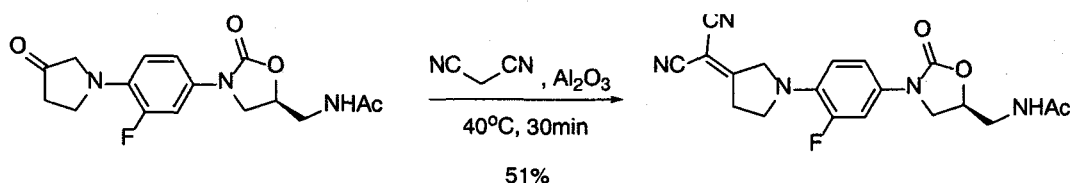
Scheme. 10. Synthesis of KST150A082

질소존재 하에서 *t*-BuOK (133.8 mg, 0.2386 mmol)을 THF (5mL)에 녹이고 Diethyl 1-cyanoethylphosphonate (214.4 μ l, 1.2167 mmol)을 THF (5mL)에 녹여 천천히 적가하고 30분간 교반 후 -78°C 로 냉각하였다.

N-{3-[4-(3-Cyanomethylenepyrrrolidin-1-yl)phenyl]-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl}acetamide (80 mg, 0.2386 mmol)을 THF (16 mL)에 녹여 15분간 적가하고 8시간 동안 교반하였다. 물을 가하여 반응을 종결시킨 후 EtOAc로 추출하고 무수 MgSO_4 로 건조, 농축하였다. Silica gel (230~400 mesh)을 사용해 EtOAc:MeOH (40:1)로 column chromatography하고, 농축한 후 EtOAc와 hexane로 solidify하여 생성물 88.0 mg (98%)을 얻었다

^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz): δ 7.45 (d, $J = 15.12$, 1H), 7.09 (d, $J = 8.61$, 1H), 6.80 (m, 1H), 6.00 (s, 1H), 4.77 (M, 1H), 4.60 (s, 2H), 4.31 (m, 2H), 4.02 (t, $J = 8.80$, 1H), 3.75 (m, 2H), 3.61 (m, 3H), 3.18 (m, 2H), 2.03 (s, 3H), 1.37 (t, $J = 7.14$, 3H), IR (KBr, cm^{-1}) 2218 (CN)

③ N-{3-[4-(3-Dicyanomethylenepyrrrolidin-1-yl)-3-fluorophenyl]-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl}acetamide의 합성



Scheme. 11. Synthesis of KST150A083

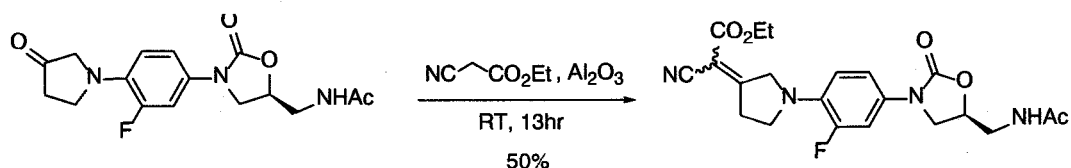
N-{3-[3-Fluoro-4-(3-oxopyrrrolidin-1-yl)phenyl]-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl}acetamide (50 mg, 0.1491 mmol)과 Al_2O_3 (Basic, I, Aldrich, 200 mg)과 malononitrile (0.5 g)을 혼합하여 40°C 에서 30분 교반하였다. CH_2Cl_2 으로 추출한 후 물로 씻어주고 magnesium sulfate로 건조하고 농축한 다음 Column chromatography (SiO_2 , EtOAc:MeOH=40:1)로

분리하여 생성물 29.4 mg (51%)을 얻었다.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz): δ 7.48 (dd, $J = 2.49, 2.58$, 1H), 7.11 (d, $J = 10.5$, 1H), 6.78 (t, $J = 3.0$, 1H), 5.97 (s, 1H), 4.78 (m, 1H), 4.43 (s, 2H), 4.03 (t, $J = 9.00$, 1H), 3.74 (m, 3H), 3.61 (m, 2H), 3.20 (t, 2H), 2.00 (s, 3H)

④

(1-[4-[5-(Acetylaminoethyl)-2-oxooxazolidin-3-yl]-2-fluorophenyl]pyrrolidin-3-ylidene)cya-
noacetic acid ethyl ester의 합성



Scheme. 12. Synthesis of KST150A084

N-[3-[3-Fluoro-4-(3-oxopyrrolidin-1-yl)phenyl]-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl]acetamide (50 mg, 0.1491 mmol)을 ethyl cyanoacetate (5 mL, excess)와 Al_2O_3 (Basic, I, Aldrich, 58 mg)와 혼합하고 실온에서 13시간 교반하였다. 반응완결 후 물을 가하여 씻어주고, CH_2Cl_2 으로 추출한 후 magnesium sulfate로 건조하고 농축한 다음 Column chromatography (silica, EtOAc:MeOH=40:1)로 분리하여 생성물(32.3 mg, 50.3 %)을 얻었다.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz): δ 7.45(d, $J = 15.12$, 1H), 7.09(d, $J = 8.61$, 1H), 6.80(m, 1H), 6.00(s, 1H), 4.77(m, 1H), 4.60(s, 2H), 4.31(m, 2H), 4.02(t, $J = 8.80$, 1H), 3.75(m, 2H), 3.61(m, 3H), 3.18(m, 2H), 2.03(s, 3H), 1.37(t, $J = 7.14$, 3H)

(나) Isoxazolyltetrahydropyridine 유도체들의 합성

① Stille Coupling reaction을 위한 Isoxazole 유도체들의 합성

㉞ 3-Methyl-5-tributylstannanylisoxazole의 합성

hydroxylamine hydrochloride (192.2 mg, 2.7661 mmol)를 가하고 19시간 동안 실온에서 교반한다. 여기에 NaHCO₃ (488.0 mg, 5.8088 mmol)를 천천히 가한 후 2 mL의 methylene chloride를 가하고 4 °C로 냉각시킨다. 반응온도를 10 °C이하로 유지하면서 Cl₂ gas를 통과시킨다. 동 온도에서 3시간 동안 교반한 뒤 유기층을 분리한다. 수용액 층은 methylene chloride로 추출하여 합한다. Magnesium sulfate로 건조시킨 후 여과하고, 0 °C에서 용매를 감압 증류 농축하여 목적화합물 1.4 g (47%)를 얻었다.

3-Chloro-4-tributylstannanylisoxazole (2-3) 및 3-Chloro-5-tributylstannanylisoxazole (2-2)의 합성

Dichloroformaldoxime(43 mg, 0.3774 mmol)과 potassium bicarbonate (90.6 mg, 0.9058 mmol) 을 methylene chloride (2 mL)에 녹이고, tributylethynyltin (65.5 μl, 0.2265 mmol)을 가하고 24시간 동안 실온에서 교반한 뒤 물로 씻어주고 methylene chloride로 추출하였다. Magnesium sulfate로 건조시킨 후 여과하고, 농축한 뒤 column chromatography (silica, EtOAc:n-hexane=1:150)하여 목적화합물 3-Chloro-4-tributylstannanylisoxazole (24.0 mg), 3-Chloro-5-tributylstannanylisoxazole (45.0 mg, total 78%)을 얻었다.

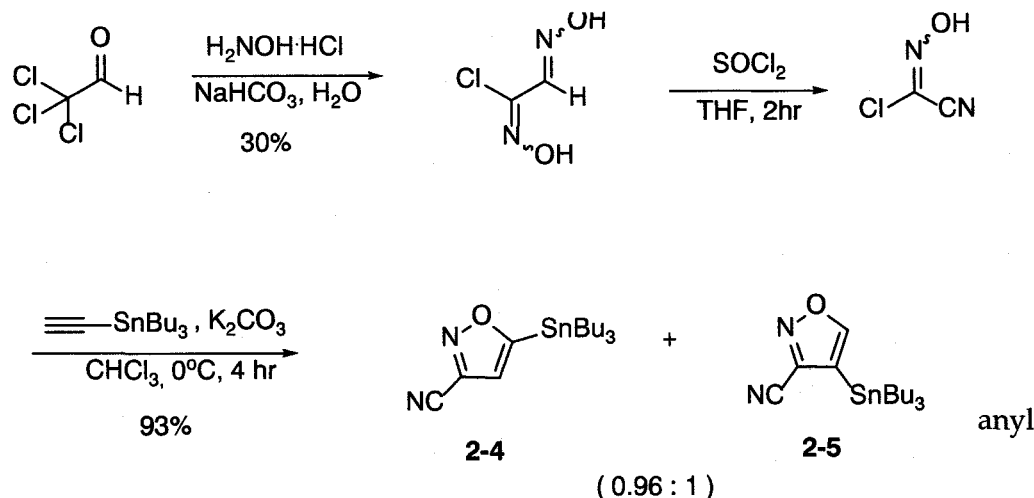
3-Chloro-4-tributylstannanylisoxazole

¹H NMR(CDCl₃, 300MHz) : δ8.06(s, 1H), δ1.54(m, 6H), δ1.34(m, 6H), δ1.14(t, J = 8.37, 6H), δ0.90(t, J = 7.26, 9H)

3-Chloro-5-tributylstannanylisoxazole

¹H NMR(CDCl₃, 300MHz) : δ6.36(s, 1H), δ1.56(m, 6H), δ1.34(m, 6H), δ1.21(t, J = 8.28, 6H), δ0.90(t, J = 7.32, 9H)

⊕ 5-Tributylstannanylisoxazole-3-carbonitrile (2-4) 및 4-Tributylstannanylisoxazole-3-carbonitrile (2-5) 의 합성



Scheme. 15. Synthesis of 2-4, 2-5

Chloroglyoxime의 합성

Hydroxylamine hydrochloride (10.68 g, 0.1537 mol)을 물 (20 mL)에 녹이고, 40 mL의 물에 녹인 NaHCO₃ (6.45 g, 0.0768 mol)을 천천히 적가하고, chloral (5.0 mL, 0.0512 mol)을 천천히 적가하고 실온에서 4시간 교반한 후, 0 °C로 냉각하였다. 20 mL의 물에 녹인 sodium hydroxide (8.19 g, 0.2048 mol)을 약 25분간 적가하고 30분간 교반하였다. 진한 황산을 사용해 pH 3을 맞추고 diethyl ether로 추출하고, 무수 magnesium sulfate로 건조하고 농축하였다. 얻어진 반응혼합물을 column chromatography (SiO₂, benzene : hexane : diethyl ether : EtOAc = 20 : 3 : 2)하여 목적화합물 1.91 g (30.5%)을 얻었다.

Cyanoformhydroximoyl Chloride의 합성

질소 분위기에서 Chloroglyoxime (2.19 g, 17.88 mmol)을 THF (10 mL)에 녹이고, thionyl chloride (5.5 mL)을 가하고 실온에서 1시간 40분간 교반하였다. THF와 과량의 thionyl chloride를 evaporation 하여주고 vacuum distillation 하여 목적화합물 506 mg (24%)를 얻었다.

5-Tributylstannanylisoxazole-3-carbonitrile (2-4) 및

4-tributylstannanylisoxazole-3-carbonitrile (2-5)의 합성

K₂CO₃ (37.5 mg, 0.2710 mmol)을 CHCl₃ (2 mL)에 녹이고 0 °C로 냉각 후 tributylethynyltin (117.6 μ l, 0.4065 mmol)을 가하고 실온으로 올려 1시간동안 교반 후 다시 0°C로 냉각하였다. Cyanoformhydroximoyl Chloride (70.8 mg, 0.6775 mmol)을 2 mL의 CHCl₃에 녹여 가해주고 4시간 동안 교반하였다. 반응완결 후 물로 씻어주고 CH₂Cl₂로 추출하여 무수 magnesium sulfate로 dry하였다. 이 용액을 농축하고 column chromatography (SiO₂, benzene : hexane = 1 : 7)하여 5-tributylstannanylisoxazole-3-carbonitrile (71.1 mg) 과 4-tributylstannanylisoxazole-3-carbonitrile (74.4 mg)을 얻었다. (total yield 93.4%)

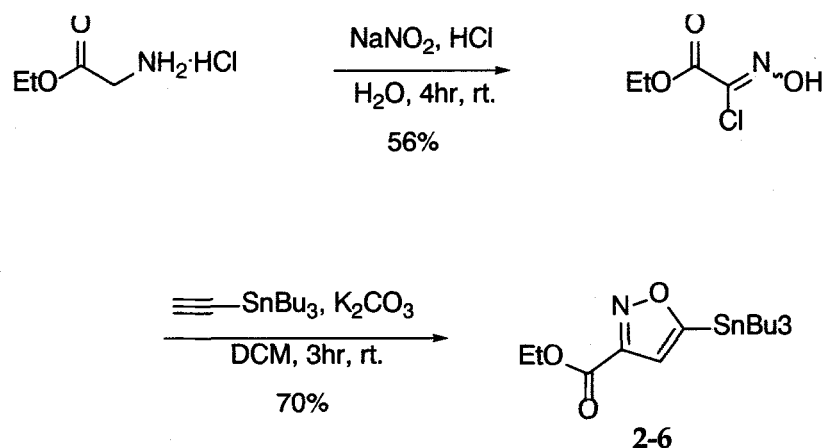
5-Tributylstannanylisoxazole-3-carbonitrile :

¹H NMR(CDCl₃, 300MHz) : δ 6.70(s, 1H), δ 1.57(m, 6H), δ 1.34(m, 6H), δ 1.23(t, J = 8.58, 6H), δ 0.88(t, J = 7.35, 9H)

4-Tributylstannanylisoxazole-3-carbonitrile

¹H NMR(CDCl₃, 300MHz) : δ 8.31(s, 1H), δ 1.55(m, 6H), δ 1.36(m, 6H), δ 1.21(t, J = 8.34, 6H), δ 0.91(t, J = 7.26, 9H)

Ⓢ 5-Tributylstannanylisoxazole-3-carboxylic acid ethyl ester (2-6)의 합성



Scheme. 16. Synthesis of 2-6

Ethyl chlorooximidoacetate의 합성

Glycine ethyl ester hydrochloride (5 g, 35.8218 mmol)을 6 mL의 물에 녹이고, conc. HCl (3.3 mL)를 적가한 후 온도를 -5 °C로 냉각하였다. 4 mL의 물에 녹인 sodium nitrate (2.5 g, 36.2319 mol)를 약 10분간 적가하고, 다시 conc. HCl (6.7 mL)를 가했다. 물 7 mL에 녹인 sodium nitrate (4.92g, 71.3043mmol) 10분간 적가한 후 40분간 동 온도에서 교반하였다. 반응 완결 후 diethyl ether를 사용해서 추출하고, 무수 magnesium sulfate로 건조한 후 농축하였다. 농축된 반응 혼합물을 ethyl acetate와 hexane을 사용하여 solidify하여 목적화합물 3.0 g (56%)를 얻었다.

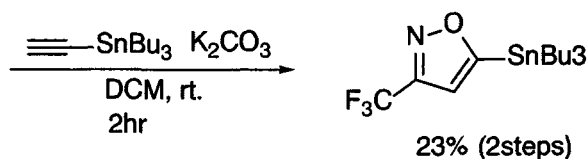
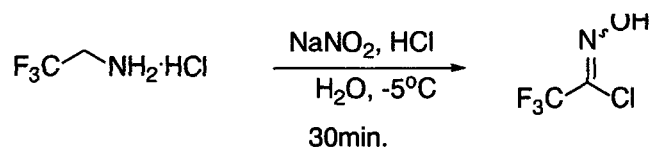
$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 300\text{MHz})$: δ 8.98(s, 1H), δ 4.40(q, $J = 13.8$, 2H), δ 1.40(t, $J = 7.14$, 3H)

5-Tributylstannanylisoxazole-3-carboxylic acid ethyl ester (2-6)의 합성

Ethyl chlorooximidoacetate (100 mg, 0.6598 mmol)을 CH_2Cl_2 (2 mL)에 녹이고, tributylethynyltin (190.9 μl , 0.6598 mmol)을 가했다. K_2CO_3 (100.3 mg, 0.7258 mmol)을 가하고 실온에서 5시간동안 교반하였다. 반응완결 후 물을 가해 씻어주고 CH_2Cl_2 으로 추출하고, 무수 magnesium sulfate로 건조하여 농축하였다. 반응혼합물을 column chromatography (SiO_2 , hexane : EtOAc = 40 : 1)하여 목적화합물 232.2 mg (81.81%)를 얻었다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 300\text{MHz})$: δ 6.81(s, 1H), δ 4.45(q, $J = 13.8$, 2H), δ 1.57(m, 6H), δ 1.44(t, $J = 6.6$, 3H), δ 1.33(m, 6H), δ 1.23(t, $J = 8.29$, 6H), δ 0.92(t, $J = 7.05$, 9H)

Ⓜ 5-Tributylstannanyl-3-trifluoromethylisoxazole (2-7)의 합성



2-7

Scheme. 17. Synthesis of 2-7

Trifluoromethylformhydroximoyl chloride의 합성

2,2,2-trifluoroethylamine hydrochloride (500 mg, 3.6895 mmol)을 물 (1 mL)에 녹이고 -5°C 로 냉각하였다. conc. HCl (0.33 mL)를 천천히 적가해주고, 물 0.5 mL에 녹인 NaNO_2 (254.57 mg, 3.6895 mmol)을 적가했다. 여기에 다시 conc. HCl (0.66 mL)를 적가해주고, 물 0.5 mL에 녹인 NaNO_2 (509.13 mg, 7.787 mmol)을 적가하고 같은 온도에서 30분간 교반하였다. 반응 혼합물에 약 10 mL의 CH_2Cl_2 를 가하여 추출하고, 무수 magnesium sulfate를 사용하여 건조하고 전체 용액의 약이 약 25 mL가 넘지 않게 여과하여, 목적화합물을 CH_2Cl_2 의 용액으로 얻었다.

5-Tributylstannanyl-3-trifluoromethylisoxazole (2-7)의 합성

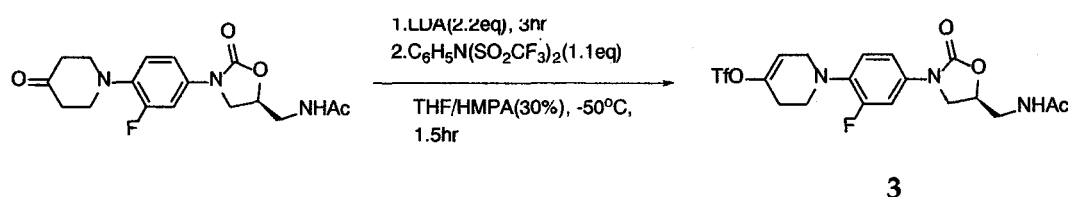
위에서 합성한 Trifluoromethylformhydroximoyl chloride의 CH_2Cl_2 용액에 tributylethynyltin (640.5 μl , 2.2137 mmol)을 가하고, K_2CO_3 (203.97 mg, 1.4758 mmol)을 가하고 실온에서 22시간 동안 교반하였다. 물을 가해 반응을 종결시키고 CH_2Cl_2 로 추출하였다. 무수 magnesium sulfate로 건조한 후 농축하고, column chromatography (SiO_2 , hexane : EtOAc = 40 : 1)하여 목적화합물 220 mg (23%, 2steps)를 얻었다.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) : δ 6.66(s, 1H), δ 1.57(m, 6H), δ 1.40(m, 6H), δ 1.20(t, $J = 7.95$, 6H), δ 0.90(t, $J = 7.50$, 9H)

② Stille Coupling reaction을 위한 triflate의 합성

4-Trifluoromethanesulfonyloxy-1-[4-[5-(acetylaminoethyl)-2-oxooxazolidin-3-yl]-2-fluorop

henyl]-1,2,3,6-tetrahydropyridine (3)의 합성



Scheme 18. Synthesis of 3

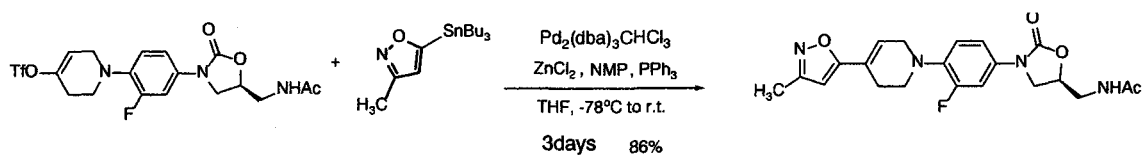
질소 분위기 하에서 diisopropylamine (91.94 μ l, 0.6560 mmol)을 THF (2 mL)에 녹이고 온도를 0°C로 냉각하고, *n*-BuLi (1.45 M in hexane, 452.4 μ l, 0.6560 mmol)을 천천히 적가해주고 30분간 교반했다. 온도를 -50°C로 냉각하고, THF 7mL와 HMPA 2.7mL에 녹인 N-{3-[3-Fluoro-4-(4-oxopiperidin-1-yl)phenyl]-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl}acetamide (100 mg, 0.2982 mmol)을 20분간 천천히 적가하였다. 3시간 동 온도에서 교반한 후, THF 2 mL에 녹인 N-phenyltrifluoromethanesulfonimide (117.2 mg, 0.3280 mmol)을 적가하여 주고 1시간 30분간 교반하였다. 반응이 완결되면 물로 씻어주고, EtOAc로 추출하여 brine으로 씻었다. 무수 MgSO₄로 건조하고 농축한 후, Et₃N으로 중화시킨 SiO₂를 사용하여 column chromatography (EtOAc : MeOH = 20 : 1)로 분리하여 생성물 (53.6 mg, 37.2%)를 얻었다.

¹H NMR(CD₃OD, 300MHz) : δ 7.46(d, *J* = 14.58, 1H), δ 7.11(m, 2H), δ 5.99(s, 1H), δ 4.77(m, 1H), δ 4.11(t, *J* = 9.00, 1H), δ 3.81(m, 3H), δ 3.55(d, *J* = 4.98, 2H), δ 3.36(t, *J* = 5.6, 2H), δ 3.30(s, 1H), δ 2.54(s, 2H), δ 1.96(s, 3H)

③ Isoxazolyltetrahydropyridine 유도체들의 합성을 위한 Stille coupling reaction

㉞

N-(3-{3-Fluoro-4-[4-(3-methylisoxazol-5-yl)-3,6-dihydro-2H-pyridin-1-yl]phenyl}-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl)acetamide의 합성



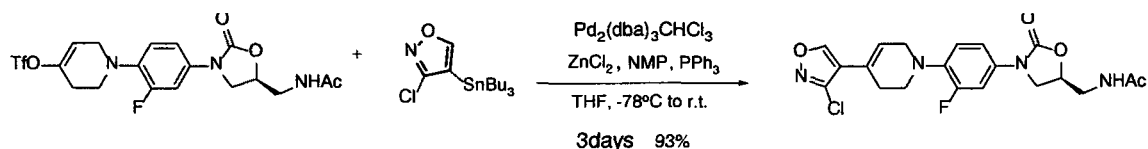
Scheme 19. Synthesis of KST150A081

4-Trifluoromethanesulfonyloxy-1-{4-[5-(acetylaminomethyl)-2-oxooxazolidin-3-yl]-2-fluorophenyl}-1,2,3,6-tetrahydropyridine (**3**, 53.1 mg, 0.1098 mmol)를 THF (3 mL)에 녹이고 -78 °C로 냉각하고, 1-methyl-2-pyrrolidone (550 μ l)를 가했다. PPh₃ (2.3 mg, 8 mol%)와 Pd₂(dba)₃ · CHCl₃ (2.3mg, 2 mol%)을 가했다. 3-methyl-5-tributylstannanylisoxazole (47.2 mg, 0.1318 mmol)을 THF (2 mL)에 녹여 가했다. ZnCl₂ (1M in hexane, 109.8 μ l, 0.1098 mmol)을 가하고, 30 °C water bath를 사용하여 온도를 급격히 올려준 후 실온에서 3일간 교반하였다. 반응 완결 후 물로 씻어주고 EtOAc를 사용하여 추출하고, 무수 MgSO₄로 건조하여 농축한 후 column chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂ : ethyl ether : MeOH = 10 : 5 : 1)하여 목적화합물 39.3 mg (86%)를 얻었다.

¹H NMR(CDCl₃, 300MHz) : δ 8.25(m, 1H), δ 7.51(dd, *J* = 2.18, 2.45, 1H), δ 7.16(m, 2H), δ 6.59(s, 1H), δ 6.41(s, 1H), δ 4.70(m, 1H), δ 4.07(t, *J* = 8.9, 1H), δ 3.73(m, 3H), δ 3.42-3.24(m, 6H), δ 2.23(s, 3H), δ 1.83(s, 3H)

㉔

N-(3-{4-[4-(3-Chloroisoxazol-4-yl)-3,6-dihydro-2H-pyridin-1-yl]-3-fluorophenyl}-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl)acetamide의 합성



Scheme 20. Synthesis of KST150A085

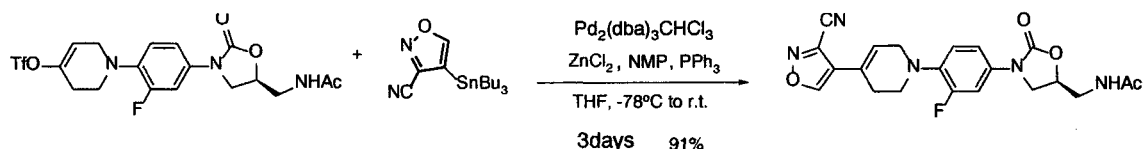
4-Trifluoromethanesulfonyloxy-1-{4-[5-(acetylaminomethyl)-2-oxooxazolidin-3-yl]-2-fluorophenyl}-1,2,3,6-tetrahydropyridine (**3**, 22.0 mg, 0.0455 mmol)를 THF (1 mL)에 녹이고 -78 °C로 냉각하고, 1-methyl-2-pyrrolidone (221 μ l)를 가했다. PPh₃ (0.94 mg, 8 mol%)와 Pd₂(dba)₃ · CHCl₃ (0.94 mg, 2 mol%)을 가했다. 3-chloro-4-tributylstannanylisoxazole (20.0 mg, 0.0501 mmol)을 THF (1 mL)에 녹여 가했다. ZnCl₂ (1 M in hexane, 45.5 μ l, 0.0455 mmol)을 가하고, 30 °C water bath를 사용하여 온도를 급격히 올려준 후 실온에서 3일간 교반하였다. 반응 완결 후 물로 씻어주고 EtOAc를 사용하여 추출하고, 무수 MgSO₄로 건조하여 농축한 후 column chromatography (SiO₂, EtOAc : MeOH = 30 : 1)하여 목적화합물 17.8 mg (93%)를 얻었다.

¹H NMR(CDCl₃, 300MHz) : δ 8.33(s, 1H), δ 7.44(dd, *J* = 2.70, 2.70, 1H), δ 7.01(m, 2H), δ 6.44(s, 1H), δ 6.33(m, 1H), δ 4.76(m, 1H), δ 4.01(t, *J* = 9.90, 1H), δ 3.73(m,

3H), δ 3.65(m, 2H), δ 3.36(m, 2H), δ 2.53(s, 2H), δ 1.96(s, 3H)

㉔

N-(3-{4-[4-(4-Cyanoisoxazol-5-yl)-3,6-dihydro-2H-pyridin-1-yl]-3-fluorophenyl}-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl)acetamide의 합성



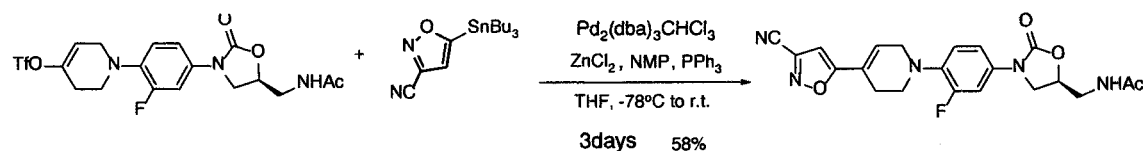
Scheme 21. Synthesis of KST150A086

4-Trifluoromethanesulfonyloxy-1-{4-[5-(acetylaminomethyl)-2-oxooxazolidin-3-yl]-2-fluorophenyl}-1,2,3,6-tetrahydropyridine (3, 35.0 mg, 0.0724 mmol)를 THF (1 mL)에 녹이고 -78 °C로 냉각하고, 1-methyl-2-pyrrolidone (352 μ l)를 가했다. PPh₃ (1.5 mg, 8 mol%)와 Pd₂(dba)₃ · CHCl₃ (1.5 mg, 2 mol%)을 가했다. 3-cyano-4-tributylstannanylisoxazole (30.0 mg, 0.0796 mmol)을 THF (1 mL)에 녹여 가했다. ZnCl₂ (1 M in hexane, 72.4 μ l, 0.0724 mmol)을 가하고, 30 °C water bath를 사용하여 온도를 급격히 올려준 후 실온에서 3일간 교반하였다. 반응 완결 후 물로 씻어주고 EtOAc를 사용하여 추출하고, 무수 MgSO₄로 건조하여 농축한 후 column chromatography (SiO₂, EtOAc : MeOH = 35 : 1)하여 목적화합물 28.0 mg (91%)를 얻었다.

¹H NMR(CDCl₃, 300MHz) : δ 8.55(s, 1H), δ 7.44(d, *J* = 14.10, 1H), δ 7.07(d, *J* = 8.4, 1H), δ 6.98(t, *J* = 9.00, 1H), δ 6.57(s, 1H), δ 6.38(m, 1H), δ 4.76(m, 1H), δ 4.02(t, *J* = 9.00, 1H), δ 3.78(m, 3H), δ 3.63(m, 2H), δ 3.36(m, 2H), δ 2.55(s, 2H), δ 2.02(s, 3H)

㉕

N-(3-{4-[4-(3-Cyanoisoxazol-5-yl)-3,6-dihydro-2H-pyridin-1-yl]-3-fluorophenyl}-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl)acetamide의 합성



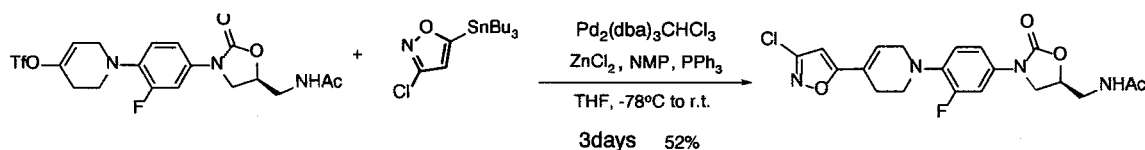
Scheme 22. Synthesis of KST150A087

4-Trifluoromethanesulfonyloxy-1-{4-[5-(acetylaminoethyl)-2-oxooxazolidin-3-yl]-2-fluorophenyl}-1,2,3,6-tetrahydropyridine (**3**, 62.5 mg, 0.1292 mmol)를 THF (1 mL)에 녹이고 -78 °C로 냉각하고, 1-methyl-2-pyrrolidone (630 μ l)를 가했다. PPh₃ (2.7 mg, 8 mol%)와 Pd₂(dba)₃ · CHCl₃(2.7 mg, 2 mol%)을 가했다. 3-cyano-5-tributylstannanylisoxazole (45.0 mg, 0.0796 mmol)을 THF (1 mL)에 녹여 가했다. ZnCl₂ (1M in hexane, 129.2 μ l, 0.1292 mmol)을 가하고, 30°C water bath를 사용하여 온도를 급격히 올려준 후 실온에서 3일간 교반하였다. 반응 완결 후 물로 씻어주고 EtOAc를 사용하여 추출하고, 무수 MgSO₄로 건조하여 농축한 후 column chromatography (SiO₂, EtOAc : MeOH = 40 : 1) 하여 목적화합물 32.0 mg (58%)를 얻었다.

¹H NMR(CDCl₃, 300MHz) : δ 7.48(d, *J* = 16.20, 1H), δ 7.01(m, 2H), δ 6.79(s, 1H), δ 6.50(s, 1H), δ 6.25(m, 1H), δ 4.79(m, 1H), δ 4.05(t, *J* = 9.00, 1H), δ 3.88(s, 1H), δ 3.79(m, 2H), δ 3.65(m, 2H), δ 3.36(m, 2H), δ 2.86(s, 2H), δ 2.04(s, 3H)

㉓

N-(3-{4-[4-(3-Chloroisoxazol-5-yl)-3,6-dihydro-2H-pyridin-1-yl]-3-fluorophenyl}-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl)acetamide의 합성



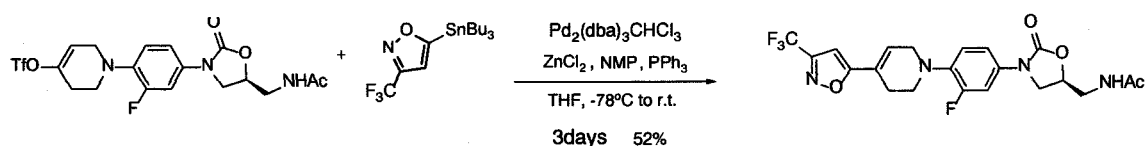
Scheme 23. Synthesis of KST150A088

4-Trifluoromethanesulfonyloxy-1-{4-[5-(acetylaminoethyl)-2-oxooxazolidin-3-yl]-2-fluorophenyl}-1,2,3,6-tetrahydropyridine (**3**, 40.3 mg, 0.0834 mmol)를 THF (1 mL)에 녹이고 -78 °C로 냉각하고, 1-methyl-2-pyrrolidone (450 μ l)를 가했다. PPh₃ (1.8 mg, 8 mol%)와 Pd₂(dba)₃ · CHCl₃(1.8 mg, 2 mol%)을 가했다. 3-cyano-5-tributylstannanylisoxazole (36.0 mg, 0.0917 mmol)을 THF (1 mL)에 녹여 가했다. ZnCl₂ (1M in hexane, 83.4 μ l, 0.0834 mmol)을 가하고, 30 °C water bath를 사용하여 온도를 급격히 올려준 후 실온에서 3일간 교반하였다. 반응 완결 후 물로 씻어주고 EtOAc를 사용하여 추출하고, 무수 MgSO₄로 건조하여 농축한 후 column chromatography(SiO₂, EtOAc : MeOH = 40 : 1)하여 목적화합물 18.9 mg (52%)를 얻었다.

^1H NMR(CDCl_3 , 300MHz) : δ 7.48(d, J = 16.20, 1H), δ 7.01(m, 2H), δ 6.79(s, 1H), δ 6.50(s, 1H), δ 6.25(m, 1H), δ 4.79(m, 1H), δ 4.05(t, J = 9.00, 1H), δ 3.88(s, 1H), δ 3.79(m, 2H), δ 3.65(m, 2H), δ 3.36(m, 2H), δ 2.86(s, 2H), δ 2.04(s, 3H)

㉞

N-(3-(3-Fluoro-4-[4-(3-trifluoromethylisoxazol-5-yl)-3,6-dihydro-2H-pyridin-1-yl]phenyl)-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl)acetamide의 합성



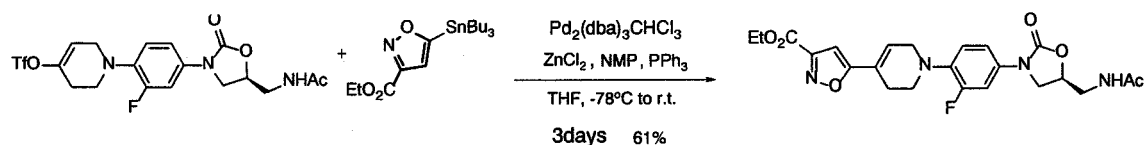
Scheme 24. Synthesis of KST150A089

4-Trifluoromethanesulfonyloxy-1-{4-[5-(acetylaminomethyl)-2-oxooxazolidin-3-yl]-2-fluorophenyl}-1,2,3,6-tetrahydropyridine (**3**, 50.5 mg, 0.1111 mmol)를 THF (1 mL)에 녹이고 -78 °C로 냉각하고, 1-methyl-2-pyrrolidone (540 μl)를 가했다. PPh_3 (2.3 mg, 8 mol%)와 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$ (2.3 mg, 2 mol%)을 가했다. 3-cyano-5-tributylstannanylisoxazole (48.5 mg, 0.1111 mmol)을 THF (1 mL)에 녹여 가했다. ZnCl_2 (1M in hexane, 111.1 μl , 0.1111 mmol)을 가하고, 30 °C water bath를 사용하여 온도를 급격히 올려준 후 실온에서 3일간 교반하였다. 반응 완결 후 물로 씻어주고 EtOAc를 사용하여 추출하고, 무수 MgSO_4 로 건조하여 농축한 후 column chromatography(SiO_2 , CH_2Cl_2 : MeOH = 40 : 1)하여 목적화합물 19.3 mg (52%)를 얻었다.

^1H NMR(DMOD, 300MHz) : δ 8.27(m, 1H), δ 7.53(d, J = 14.7, 1H), δ 7.29(s, 1H), δ 7.20(m, 2H), δ 4.73(m, 1H), δ 4.11(t, J = 8.4, 1H), δ 3.82(s, 1H), δ 3.73(m, 1H), δ 2.61(s, 2H), δ 1.85(s, 3H)

㉟

5-(1-{4-[5-(Acetylaminomethyl)-2-oxooxazolidin-3-yl]-2-fluorophenyl}-1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl)isoxazole-3-carboxylic acid ethyl ester의 합성



Scheme 25. Synthesis of KST150A090

4-Trifluoromethanesulfonyloxy-1-{4-[5-(acetylaminomethyl)-2-oxooxazolidin-3-yl]-2-fluorophenyl}-1,2,3,6-tetrahydropyridine (3, 53.4 mg, 0.1109 mmol)를 THF (1 mL)에 녹이고 -78 °C로 냉각하고, 1-methyl-2-pyrrolidone (540 μ l)를 가했다. PPh₃ (2.3 mg, 8 mol%)와 Pd₂(dba)₃ · CHCl₃ (2.3 mg, 2 mol%)을 가했다. Ethyl-5-tributylstannanyl-3-isoxazole carboxylate (48.0 mg, 0.1110 mmol)을 THF (1 mL)에 녹여 가했다. ZnCl₂ (1M in hexane, 110 μ l, 0.1100 mmol)을 가하고, 30 °C water bath를 사용하여 온도를 급격히 올려준 후 실온에서 3일간 교반하였다. 반응 완결 후 물로 씻어주고 EtOAc를 사용하여 추출하고, 무수 MgSO₄로 건조하여 농축한 후 column chromatography (SiO₂, EtOAc : MeOH = 50 : 1)하여 목적화합물 33.7 mg (61%)를 얻었다.

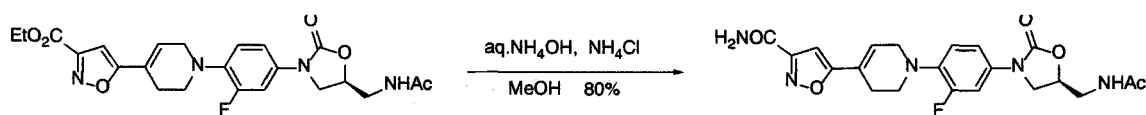
¹H NMR(CDCl₃, 300MHz) : δ 7.48(dd, *J* = 2.40, 2.40, 1H), δ 7.11(d, *J* = 9.60, 1H), δ 6.98(t, *J* = 8.70, 1H), δ 6.73(s, 1H), δ 6.59(s, 1H), δ 6.20(m, 1H), δ 4.80(m, 1H), δ 4.45(q, *J* = 7.20 1H), δ 4.06(t, *J* = 8.70, 1H), δ 3.86(s, 1H), δ 3.73(m, 2H), δ 3.38(m, 2H), δ 2.66(s, 2H), δ 2.05(s, 3H), δ 1.45 (t, *J* = 7.2, 3H)

④

5-(1-{4-[5-(Acetylaminomethyl)-2-oxooxazolidin-3-yl]-2-fluorophenyl}-1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl)isoxazole-3-carboxylic acid ethyl ester로 부터 Amide합성을 위한 Amidation reaction.

가

5-(1-{4-[5-(Acetylaminomethyl)-2-oxooxazolidin-3-yl]-2-fluorophenyl}-1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl)isoxazole-3-carboxylic acid amide의 합성



Scheme 26. Synthesis of KST150A091

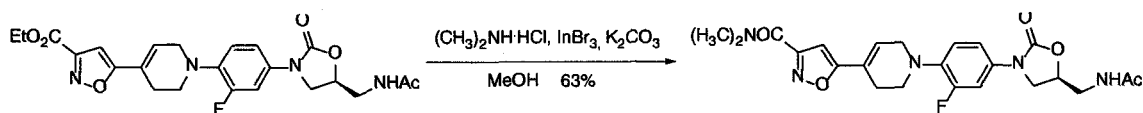
5-(1-{4-[5-(Acetylaminomethyl)-2-oxooxazolidin-3-yl]-2-fluorophenyl}-1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl)isoxazole-3-carboxylic acid ethyl ester (17.5 mg, 0.0370 mmol)을 methanol (3 mL)에 녹이고 NH₄OH (28% in water, 500 μ l, excess)와 NH₄Cl (50 mg, excess)를 가해 주고 실온에서 21시간동안 교반하였다. 반응 완결 후 methanol을 모두 제거하고 CH₂Cl₂로 녹인 후 물로 씻어주었다. 유기층을 분리하여 무수 MgSO₄로 건조하여 농축한 후 column chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1)하여 목적화합물 13.1 mg

(80%)를 얻었다.

^1H NMR(DMSO, 300MHz) : δ 8.09(s, 1H), δ 7.80(s, 1H), δ 7.49(dd, J = 1.5, 1.8, 1H), δ 7.16(m, 2H), δ 6.82(s, 1H), δ 6.71(s, 1H), δ 4.69(m, 1H), δ 4.07(t, J = 8.70, 1H), δ 3.76(s, 2H), δ 3.69(m, 1H), δ 2.55(s, 2H), δ 2.05(s, 3H),

㉞

5-(1-{4-[5-(Acetylaminoethyl)-2-oxooxazolidin-3-yl]-2-fluorophenyl}-1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl)isoxazole-3-carboxylic acid dimethylamide 의 합성



Scheme 27. Synthesis of KST150A095

5-(1-{4-[5-(Acetylaminoethyl)-2-oxooxazolidin-3-yl]-2-fluorophenyl}-1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl)isoxazole-3-carboxylic acid ethyl ester (35 mg, 0.0741 mmol)과 Indium bromide (26.3 mg, 0.0742 mmol), potassium carbonate (350 mg, excess), 그리고 dimethylamine hydrochloride (100 mg, excess)를 무수 methanol (30 mL)에 녹이고 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 완결 후 methanol을 모두 제거하고 CH_2Cl_2 로 녹인 후 물로 씻어주었다. 유기층을 분리하여 무수 MgSO_4 로 건조하여 농축한 후 column chromatography (SiO_2 , CH_2Cl_2 : MeOH = 20 : 1)하여 목적화합물 22.0 mg (63%)를 얻었다.

^1H NMR(CDCl_3 , 300MHz) : δ 7.46(dd, J = 2.43, 2.37, 1H), δ 7.10(d, J = 8.79, 1H), δ 6.96(t, J = 9.03, 1H), δ 6.68(s, 1H), δ 6.47(s, 1H), δ 5.99(m, 1H), δ 4.77(m, 1H), δ 4.03(t, J = 8.91, 1H), δ 3.84(s, 1H), δ 3.76(m, 2H), δ 3.36(t, J = 5.64, 2H), δ 3.31(s, 3H), δ 2.63(s, 2H), δ 2.03(s, 3H)

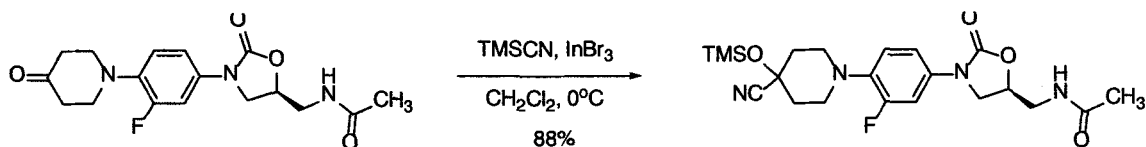
(다) Trimethylsilyl cyanide의 친핵 반응 통한 alcohol의 합성.

①

N-{3-[4-(4-Cyano-4-hydroxypiperidin-1-yl)-3-fluorophenyl]-2-oxo-oxazolidin-5-ylmethyl}acetamide 의 합성

㉞

N-[3-[4-(4-Cyano-4-trimethylsilanyloxypiperidin-1-yl)-3-fluorophenyl]-2-oxo-oxazolidin-5-ylmethyl]acetamide의 합성



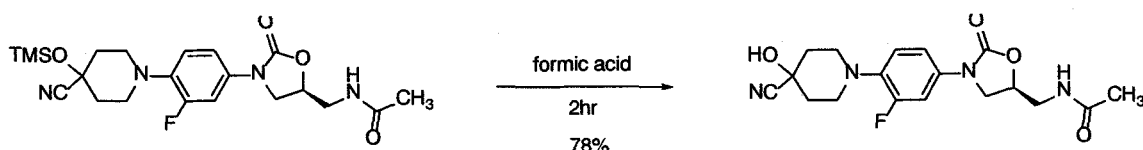
4-1

Scheme 28. Synthesis of 4-1

N-[3-[3-Fluoro-4-(4-oxopiperidin-1-yl)phenyl]-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl]acetamide (250 mg, 0.7156 mmol)과 InBr₃ (25.4 mg, 0.0716 mmol)을 CH₂Cl₂ (30 mL)에 녹이고 0 °C로 냉각하고, trimethylsilyl cyanide (429.4 μ l, 3.2202 mmol)을 약 5분간 천천히 적가한 후 교반하였다. 3시간 후 InBr₃ (25.4 mg, 0.0716 mmol)과 trimethylsilyl cyanide (143 μ l, 1.0724 mmol)을 더 가해주고 0 °C에서 38시간 동안 교반하였다. 반응 완결 후 물을 가해 씻어주고 CH₂Cl₂로 추출 하여 무수 MgSO₄를 사용해 건조한 후 농축하였다. Column chromatography (SiO₂, EtOAc : MeOH = 40 : 1)하여 목적화합물 282.2 mg (88%)를 얻었다.

㉟

N-[3-[4-(4-Cyano-4-hydroxypiperidin-1-yl)-3-fluorophenyl]-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl]acetamide의 합성



Scheme 29. Synthesis of KST150A092

N-[3-[4-(4-Cyano-4-trimethylsilanyloxypiperidin-1-yl)-3-fluorophenyl]-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl]acetamide (280.0 mg, 0.6242 mmol)에 formic acid (2 mL)를 가하고 실온에서 2 시간동안 교반하였다. Rotary evaporator에서 formic acid를 모두 제거하고 소량의 EtOAc로 녹인 후 isopropyl ether를 사용해 solidify하여주고 충분히 씻어주어 목적화합물 183 mg (78%)를 얻었다.

¹H NMR(CD₃OD, 300MHz) : δ 7.50(dd, J = 2.4, 2.4, 1H), δ 7.13(m, 2H), δ 4.83(m, 1H), δ 4.13(t, J = 8.70, 1H), δ 3.80(q, J = 6.30, 1H), δ 3.56(d, J = 4.8, 2H), δ

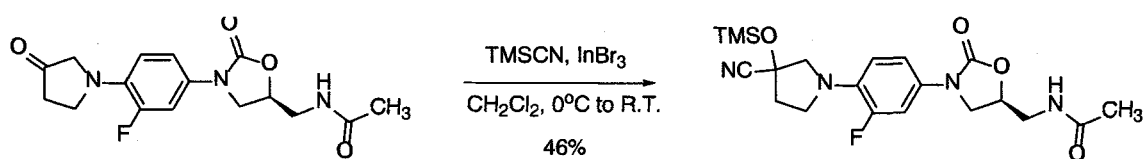
3.03(m, 2H), δ 2.21(m, 2H), δ 2.033(m, 2H), δ 1.97(s, 3H)

㉔

N-{3-[4-(3-Cyano-3-hydroxypyrrolidin-1-yl)-3-fluorophenyl]-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl}acetamide의 합성

㉕

N-{3-[4-(3-Cyano-3-trimethylsilyloxyppyrolidin-1-yl)-3-fluorophenyl]-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl}acetamide의 합성

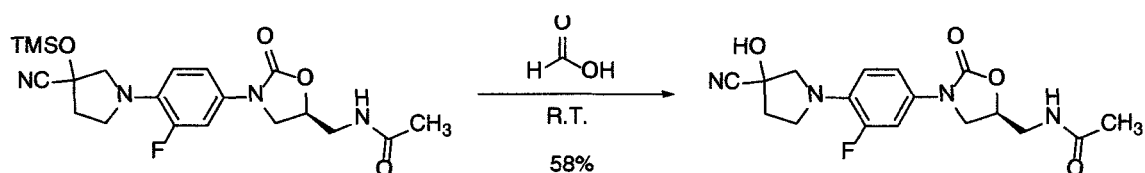


Scheme 30. Synthesis of 4-2

N-{3-[3-Fluoro-4-(3-oxopyrrolidin-1-yl)phenyl]-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl}acetamide (50 mg, 0.1491 mmol)과 InBr_3 (52.9 mg, 0.1491 mol)을 CH_2Cl_2 로 녹인 후 (10 mL)에 녹이고 0°C로 냉각하고, trimethylsilyl cyanide (119.3 μl , 0.8946 mmol)을 천천히 적가한 후 10분간 교반하고 실온으로 올려 34시간 동안 교반하였다. NaHCO_3 포화 수용액을 가해 반응을 종결하고, 물을 가해 씻어주고 CH_2Cl_2 로 추출 하여 무수 MgSO_4 를 사용해 건조한 후 농축하였다. Column chromatography (SiO_2 , $\text{EtOAc} : \text{MeOH} = 40 : 1$)하여 목적화합물 30.0 mg (46%)를 얻었다.

㉖

N-{3-[4-(3-Cyano-3-hydroxypyrrolidin-1-yl)-3-fluorophenyl]-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl}acetamide의 합성



Scheme 31. Synthesis of KST150A094

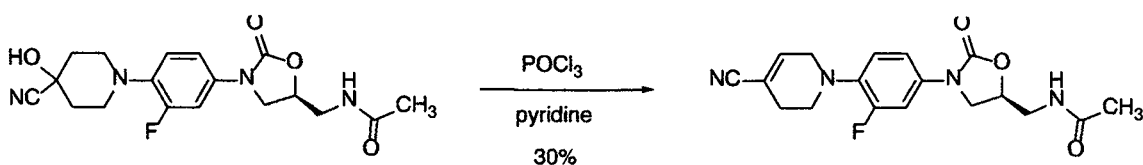
N-{3-[4-(3-Cyano-3-trimethylsilanyloxyppyrolidin-1-yl)-3-fluorophenyl]-2-oxooxazolidin-5-yl methyl}acetamide (30 mg, 0.0690 mmol)에 formic acid (1 mL)를 가하고 실온에서 2시간 동안 교반하였다. Rotary evaporator에서 formic acid를 모두 제거하고 column chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1)하여 목적화합물 14.5 mg (58%)를 얻었다.

¹H NMR(CD₃OD, 300MHz) : δ7.40(dd, J = 2.64, 2.49, 1H), δ7.08(m, 1H), δ6.76(t, J = 9.6, 1H), δ4.83(m, 1H), δ4.76(m, 1H), δ4.08(t, J = 8.79, 1H), δ3.92(d, J = 2.61, 1H), δ3.76(m, 1H), δ3.30(m, 2H), δ2.46(m, 1H), δ2.34(m, 1H), δ1.96(s, 3H)

(라) 치환된 1,2,3,6-tetrahydropyridine 유도체들의 합성

①

N-{3-[4-(4-Cyano-3,6-dihydro-2H-pyridin-1-yl)-3-fluorophenyl]-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl}acetamide의 합성



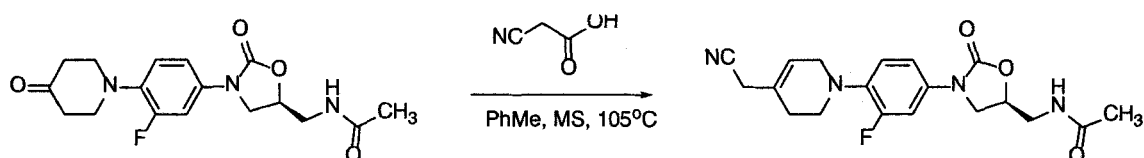
Scheme 32. Synthesis of KST150A097

N-{3-[4-(4-Cyano-4-hydroxypiperidin-1-yl)-3-fluorophenyl]-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl}acetamide (60.0 mg, 0.1594 mmol)을 pyridine (1 mL)에 녹이고 0 °C로 냉각한 후, phosphorous oxychloride (93.7 μL, 1.004 mmol)을 천천히 적가해주고 10분 교반 후 실온에서 31시간 동안 교반하였다. 반응 완결 후 물을 가해 반응혼합물을 씻어주고 CH₂Cl₂로 추출하였다. 추출한 용액을 무수 MgSO₄를 사용해 건조한 후 농축하고 Column chromatography (SiO₂, EtOAc : ethyl ether : MeOH = 10 : 10 : 1)하여 목적화합물 17.0 mg (30%)를 얻었다.

¹H NMR(CDCl₃, 300MHz) : δ(s, 1H), δ7.46(dd, J = 2.70, 2.70, 1H), δ7.16(d, J = 8.7, 1H), δ6.93(m, 1H), δ6.69(s, 1H), δ6.31(m, 1H), δ4.78(m, 1H), δ4.03(t, J = 8.70, 1H), δ3.72(m, 5H), δ3.26(m, 1H), δ2.51(s, 2H), δ2.03(s, 3H),

②

N-{3-[4-(4-Cyanomethyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-1-yl)-3-fluorophenyl]-2-oxooxazolidin-5-yl methyl}acetamide의 합성



Scheme 33. Synthesis of KST150A096

N-{3-[3-Fluoro-4-(4-oxopiperidin-1-yl)phenyl]-2-oxooxazolidin-5-ylmethyl}acetamide (30 mg, 0.0859 mmol)을 toluene (3 mL)에 녹이고 cyanoacetic acid (8.04 mg, 0.0945 mmol)을 가했다. Molecular sieve (4A, 100 mg)을 넣은 후 105 °C에서 1시간 동안 교반하였다. NHCO_3 포화 수용액을 가해 반응을 종결하고 물로 씻어준 후 유기층을 분리하여 무수 MgSO_4 를 사용해 건조한 후 농축하고 Column chromatography (SiO_2 , EtOAc : ethyl ether : MeOH = 10 : 10 : 1)하였다. EtOAc와 diethyl ether를 사용해 solidify하여 얻은 고체를 diethyl ether로 충분히 씻어주어 목적화합물 15.0 mg (47%)를 얻었다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 300\text{MHz})$: δ 7.46(dd, $J = 2.43, 2.47$, 1H), δ 7.16(dd, $J = 1.75, 1.76$, 1H), δ 6.94(t, $J = 9.10$, 1H), δ 6.37(m, 1H), δ 5.91(s, 1H), δ 4.03(t, $J = 8.98$, 1H), δ 3.79-3.63(m, 5H), δ 3.26(t, $J = 5.55$, 2H), δ 3.12(s, 1H), δ 2.30(s, 2H), δ 2.03(s, 1H), $^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3, 300\text{MHz})$ $\text{CDCl}_3, 300\text{MHz}$, δ 171.58, 157.49, 154.80, 154.22, 136.40, 136.27, 133.26, 133.12, 126.65, 124.07, 119.83, 119.78, 117.42, 114.34, 114.30, 108.10, 107.75, 94.29, 72.34, 49.65, 49.61, 48.09, 48.04, 42.30, 35.71, 33.22, 29.13, 25.42, 23.50,

제 3 절 항균활성 결과 (Minimum Inhibitory Concentration($\mu\text{g}/\text{ml}$))

No	Strain		<i>in vitro</i> MIC($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
			Linezolid	Vanco- mycin	KST 150A058	KST 150A080	KST 150A081	KST 150A082
1.	<i>S. aureus</i>	6538p	0.5	0.5	0.25	0.5	2	1
2.	<i>S. aureus</i>	giorgio	1	1	0.5	1	2	2
3.	<i>S. aureus</i>	77	0.5	1	0.5	0.5	1	1
4.	<i>S. aureus</i>	SA011	1	1	0.5	1	2	2
5.	<i>S. aureus</i>	SA015	1	1	1	1	2	2
6.	<i>S. aureus</i>	29213A	2	1	1	1	4	2
7.	<i>S. aureus</i>	Smith(13709)	1	1	1	1	4	2
8.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	241	0.5	2	0.5	0.5	2	1
9.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	K311	1	2	1	1	2	2
10.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	K364	1	0.5	1	1	2	2
11.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	K367	1	0.5	1	1	2	2
12.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	K372	1	0.5	0.5	1	2	2
13.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	K283	0.5	1	0.5	0.5	2	1
14.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	AMRA01-12	1	0.5	1	1	2	2
15.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	K392	1	0.5	0.5	1	2	2
16.	<i>S. epidermidis</i>	Q004	0.5	1	0.25	0.5	1	1
17.	<i>S. epidermidis</i>	Q027	1	0.5	0.5	0.5	2	2
18.	<i>S. epidermidis</i>	Q033	0.5	1	0.5	0.5	1	1
19.	<i>S. epidermidis</i> ^{MR}	887E	1	2	1	1	2	2
20.	<i>S. epidermidis</i> ^{MR}	R005	0.5	1	0.5	0.5	2	1
21.	<i>S. epidermidis</i> ^{MR}	R025	1	1	0.5	0.5	2	1
22.	<i>E. faecalis</i>	29212A	2	4	1	1	4	4
23.	<i>E. faecalis</i>	EFS004	2	1	1	1	4	4
24.	<i>E. faecalis</i> ^{Van A}	2009	2	>64	1	1	4	4
25.	<i>E. faecalis</i> ^{Van}	or2	2	64	1	1	2	4
26.	<i>E. faecalis</i> ^{Van}	2035	2	>64	1	1	2	4
27.	<i>E. faecalis</i> ^{Van}	2167	2	>64	1	1	4	4
28.	<i>E. faecalis</i> ^{Van}	2168	2	>64	1	1	4	4
29.	<i>E. faecium</i> ^{Van A}	2006	2	>64	1	1	2	2
30.	<i>E. faecium</i> ^{Van A}	2055	2	>64	1	1	4	4
31.	<i>E. faecium</i> ^{Van B}	2153	2	>64	1	1	2	2

in vitro antibacterial activities against bacterial strains(2)

No.	Strain		KST 150A083	KST 150A084	KST 150A085	KST 150A086	KST 150A087	KST 150A088
1.	<i>S. aureus</i>	6538p	8	16	2	1	2	8
2.	<i>S. aureus</i>	giorgio	16	16	4	1	2	16
3.	<i>S. aureus</i>	77	8	16	2	1	1	8
4.	<i>S. aureus</i>	SA011	16	32	8	2	4	16
5.	<i>S. aureus</i>	SA015	16	32	4	2	4	16
6.	<i>S. aureus</i>	29213A	16	32	8	2	4	32
7.	<i>S. aureus</i>	Smith(1370 9)	16	32	4	2	2	32
8.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	241	8	16	2	1	2	4
9.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	K311	16	32	4	2	2	16
10.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	K364	32	32	8	2	4	16
11.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	K367	32	32	8	2	4	16
12.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	K372	32	32	8	1	4	16
13.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	K283	16	16	4	1	2	8
14.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	AMRA01- 12	32	16	4	1	4	8
15.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	K392	32	32	8	1	4	16
16.	<i>S. epidermidis</i>	Q004	4	8	2	0.5	1	8
17.	<i>S. epidermidis</i>	Q027	4	16	4	1	2	16
18.	<i>S. epidermidis</i>	Q033	4	8	2	1	1	8
19.	<i>S. epidermidis</i> ^{MR}	887E	8	32	8	2	4	16
20.	<i>S. epidermidis</i> ^{MR}	R005	8	16	4	1	2	8
21.	<i>S. epidermidis</i> ^{MR}	R025	4	16	4	1	2	8
22.	<i>E. faecalis</i>	29212A	16	32	8	2	4	64
23.	<i>E. faecalis</i>	EFS004	16	32	8	2	4	32
24.	<i>E. faecalis</i> ^{Van A}	2009	16	32	8	2	4	64
25.	<i>E. faecalis</i> ^{Van}	or2	16	32	8	2	4	32
26.	<i>E. faecalis</i> ^{Van}	2035	16	32	8	2	4	32
27.	<i>E. faecalis</i> ^{Van}	2167	16	32	8	2	4	32
28.	<i>E. faecalis</i> ^{Van}	2168	16	32	8	2	4	32
29.	<i>E. faecium</i> ^{Van A}	2006	16	16	8	2	4	32
30.	<i>E. faecium</i> ^{Van A}	2055	16	32	8	2	4	32
31.	<i>E. faecium</i> ^{Van B}	2153	16	16	8	2	4	32

in vitro antibacterial activities against bacterial strains(3)

No.	Strain		KST	KST	KST	KST	KST
			150A089	150A090	150A091	150A092	150A093
1.	<i>S. aureus</i>	6538p	>64	8	0.5	0.5	1
2.	<i>S. aureus</i>	giorgio	>64	8	1	0.5	2
3.	<i>S. aureus</i>	77	>64	4	0.5	0.5	0.5
4.	<i>S. aureus</i>	SA011	>64	32	1	1	2
5.	<i>S. aureus</i>	SA015	>64	32	1	1	2
6.	<i>S. aureus</i>	29213A	>64	4	0.5	0.5	0.5
7.	<i>S. aureus</i>	Smith(13709)	>64	16	1	1	2
8.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	241	>64	4	0.5	0.5	0.5
9.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	K311	>64	32	1	1	2
10.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	K364	>64	32	1	1	2
11.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	K367	>64	32	1	1	2
12.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	K372	>64	32	1	1	2
13.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	K283	>64	16	1	0.5	2
14.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	AMRA01-12	>64	16	1	1	2
15.	<i>S. aureus</i> ^{MR}	K392	>64	16	1	1	2
16.	<i>S. epidermidis</i>	Q004	>64	4	0.5	0.5	0.5
17.	<i>S. epidermidis</i>	Q027	>64	8	1	0.5	1
18.	<i>S. epidermidis</i>	Q033	>64	8	1	0.5	1
19.	<i>S. epidermidis</i> ^{MR}	887E	>64	16	1	0.5	2
20.	<i>S. epidermidis</i> ^{MR}	R005	>64	8	1	0.5	1
21.	<i>S. epidermidis</i> ^{MR}	R025	>64	8	1	0.5	0.5
22.	<i>E. faecalis</i>	29212A	>64	16	1	1	2
23.	<i>E. faecalis</i>	EFS004	>64	8	1	1	2
24.	<i>E. faecalis</i> ^{Van A}	2009	>64	16	1	1	2
25.	<i>E. faecalis</i> ^{Van}	or2	>64	16	1	1	2
26.	<i>E. faecalis</i> ^{Van}	2035	>64	16	1	1	2
27.	<i>E. faecalis</i> ^{Van}	2167	>64	8	1	1	2
28.	<i>E. faecalis</i> ^{Van}	2168	>64	16	1	1	2
29.	<i>E. faecium</i> ^{Van A}	2006	>64	8	1	1	2
30.	<i>E. faecium</i> ^{Van A}	2055	>64	8	1	1	2
31.	<i>E. faecium</i> ^{Van B}	2153	>64	8	1	1	2

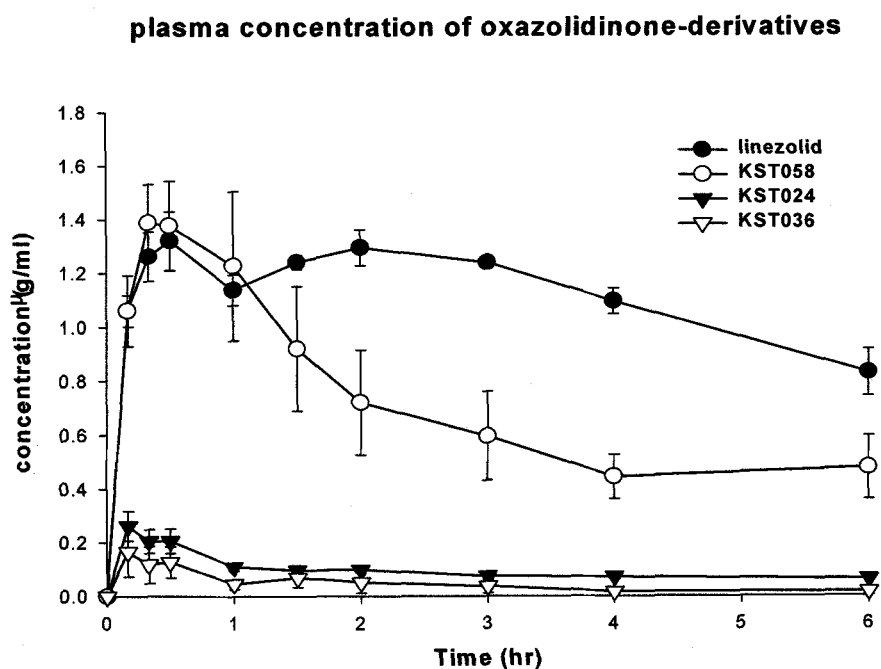
2. Pharmacokinetic parameters

합성된 화합물들 중 Linezolid보다 더욱 뛰어난 MIC($\mu\text{g}/\text{ml}$) 값을 가지는 몇 가지의 화합물을 선택하여 pharmacokinetic 분석을 실시하였다.

Compound	KST150A058	KST150A080	KST150A092	KST150A094
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)	97.04	209.08	-	-
T _{max} (min)	30	30	-	-
C _{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.56	1.30	-	-
T _{1/2} (min)	314.13	367.69	-	-

뛰어난 생체의 항균활성을 가지는 KST150A058과 KST150A080 는 위의 pharmacokinetic 분석에서도 매우 양호한 결과를 보였으며, 특히 KST150A080은 KST150A058보다 훨씬 좋은 결과를 보여 주고 있다.

아래의 결과는 KST150A058과 linezolid의 pharmacokinetic analysis 결과이다.



Single dose pharmacokinetic parameters for oxazolidinone antibiotics in male rats

Compound	Linezolid	KST150A058	KST150A024	KST150A036
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)	6.807	4.2398	0.565	0.288
T _{max} (min)	0.5	0.333	0.167	0.167
C _{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	1.321	1.389	0.263	0.165
T _{1/2} (min)	8.139	3.093	2.111	1.317

Each compound was dissolved in 50% PEG solution and orally administered to rats at a dose of 15mg/kg.

KST150A058은 Linezolid와 유사한 정도의 좋은 결과를 나타내었다. 위의 결과들로부터 KST150A080의 pharmacokinetic analysis결과가 linezolid보다 매우 좋은 값을 가지는 것을 비교하여 알 수 있다.

제 4절 피롤리디논 유도체 합성

현재 다제 내성(multidrug-resistant)을 지닌 그람양성균의 증가로 인한 기존 항생제의 효능저하가 크게 문제시 되고있다. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA), *Staphylococcus epidermidis*(MRSE), vancomycin-resistant enterococci(VRE), penicillin, cephalosporin-resistant streptococci 등의 강력한 내성을 지닌 내성균의 출현으로 기존 항생제의 효용이 저하되어 계속적인 새로운 형태의 항생제의 필요성이 과학자와 환자에게 대두되었다. VRE의 경우 대부분의 경우 다른 항생제에도 내성을 가짐이 발표 되었고, VRE에 감염된 환자의 치사율이 35%을 넘어가고 있다는 보고가 되고 있다. 또한 많은 종류의 MRSA isolates가 Vancomycin에게서만 감수성을 나타내고 있다. 특별한 경우 vancomycin에게도 내성을 지닌 이른 바 vancomycin-intermediates strains라 불리는 병원균이 미국과 일본에서 발견되었다. 다행히 vancomycin 치료법은 아직 이러한 환자에게 유용성이 남아있다. 그러나 vancomycin에 더욱 강력한 내성을 지닌 vancomycin-resistant *S.aureus* 병원균이 발견되고 있으며 vancomycin은 다른 항생제가 효력이 없을때 최후로 쓸수 있는 항생제로 여겨지고 있기 때문에 이에 대한 내성균의 확산은 재앙이라고 할 수 있다. 이러한 감염균이 제어되기 위해서는 새로운 내성기전을 가진 새롭고 강력한 항생제의 필요성이 증대되고 있다. 옥사졸리디논은 그람양성균에 잠재적인 항생능력을 지닌 전합성된 물질이다. Fig. 1에서 알 수 있듯이 옥사졸리디논계의 항생기전은 기존의 항생제와 다른 내성기전을 지닌다. 이것은 50S ribosomal subunit에 선

택적으로 결합하여 초기 단백질합성에서 박테리아 트랜스레이션(bacterial translation)을 효과적으로 방해한다. 이러한 독특한 내성기전 때문에 옥사졸리디논계 항생제는 기존의 항생제와 교차내성(cross-resistant)이 없다는 큰 장점을 가지고 있다. Phamacia & Upjohn은 효율적인 SAR(Structure Activity Relationship)을 통해 eperozolid(PNU-100592)와 linezolid(PNU-100766)을 개발하였다.

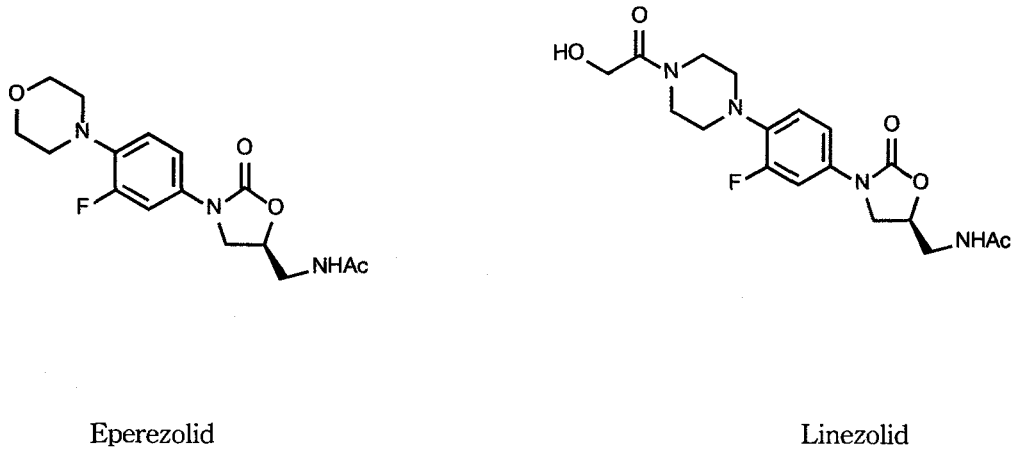


Fig. 1 대표적인 옥사졸리디논계 항생제

이러한 물질은 *in vitro*와 *in vivo*에서 *S. aureus*(MRSA), *S. epidermidis*(MRSE), enterococci(VRE) 등의 사람에게 중요한 그람양성균을 포함하여 넓은 범위에서 잠재적인 항생효과를 보여주었다. linezolid는 이미 상용화되었으며, 이에 따라 우리는 기존의 옥사졸리디논계 항생제보다 더욱 넓고 강력한 항생효과를 지닌 물질을 개발하기 위해 기존에 알려져 있는 Linezolid 구조의 각 부분의 역할 및 특성을 파악하고 효과적인 치환체를 도입하여 합성하였다.

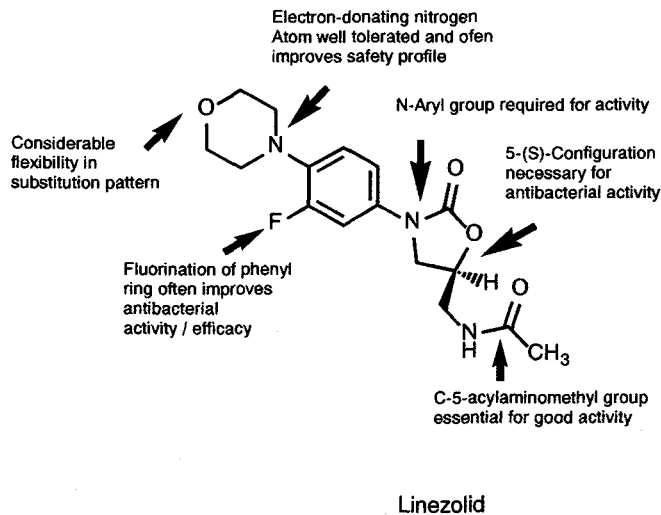


Fig. 2 Linezolid의 구조 및 각 부분의 성질

Fig. 3는 Linezolid 각 부분의 대한 SAR과 다양한 치환체를 도입하여 유도체를 합성하고 그 결과를 테스트함으로써 얻어진 대략적인 성질을 나타낸 그림이다. 이미 많은 유도체가 합성되어 테스트되었고 좋은 결과를 나타내는 여러 가지 옥사졸리디논 유도체가 발표되었다. 현재 기존의 linezolid를 대체할 만큼 뛰어난 물질을 개발하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, linezolid 또한 기존의 항생제와 마찬가지로 언젠가는 그에 내성을 지닌 균이 발견될 것으로 생각되어 지속적인 연구를 통해 다양한 옥사졸리디논계 항생제의 개발뿐만 아니라 또 다른 내성기전을 가진 새로운 항생제의 개발이 절실히 필요하다. Fig. 4에서 보이듯이 옥사졸리디논 항생제의 구조를 4개의 큰 링으로 구분하고 각 부분에 대한 새로운 치환체 도입이 시도되었다.

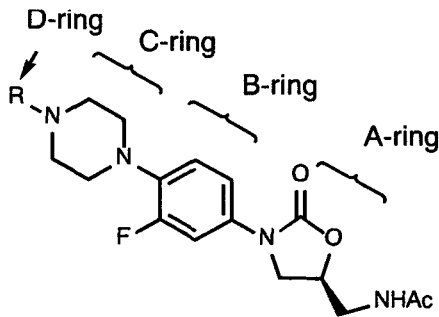


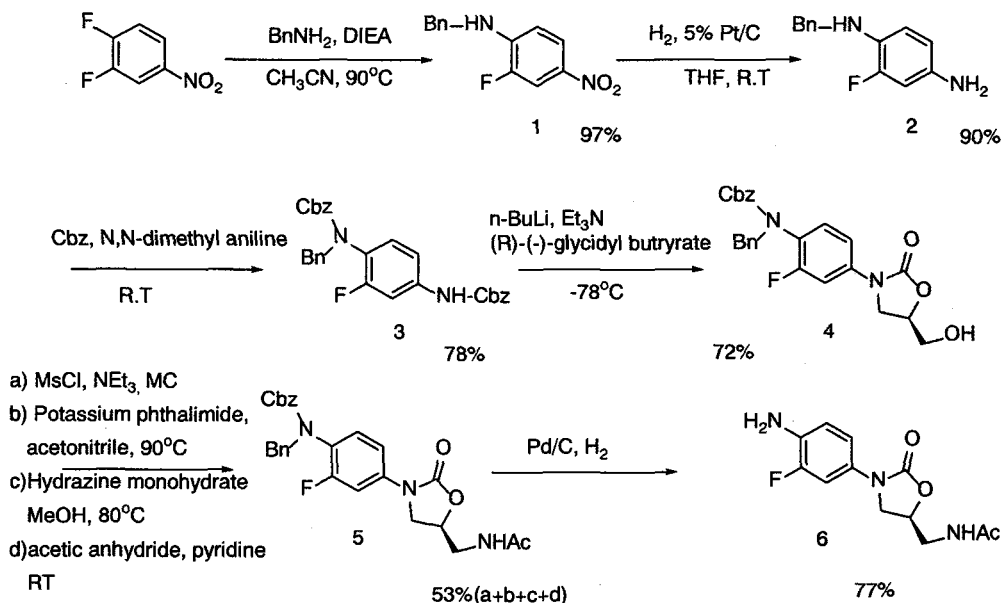
Fig. 3 옥사졸리디논 항생제의 일반구조와 분리

먼저 A-ring과 B-ring은 기존의 연구결과 옥사졸리디논이 새로운 기전의 항생제로 작용하는데 필수적으로 지니고 있어야 할 중요 구조이며 A-ring의 아세트 아마이드를 다른 치환기로 대체한 연구결과 중 설펜아마이드의 경우가 In vitro결과가 뛰어났지만 In vivo 실험에서의 독성문제가 제기 되었다. A-ring의 경우 옥사졸리디논과 비슷한 생화학적 성질을 지닌 피란링, 피롤리디논, 아이소옥사졸린등의 링으로 변화를 시도하여 기존의 옥사졸리디논과 비슷한 결과를 얻은 것들이 발표되었으며, B-ring의 경우 플로린의 위치 및 유무를 통한 변화를 시도한 경우가 발표되었고 가장 많은 새로운 치환체가 도입된 부분이 C와 D-ring이다. 이에 우리는 A, B-ring을 기본으로 하여 phenyl(B-ring)의 4번 위치에 1차 아민기를 도입하고 다양한 설펜아마이드나 피롤리디논과 같은 다양한 아마이드 계열 치환기를 가진 화합물을 설계 및 합성하여 약효 검색과정(MIC)을 통하여 항 후 신 약으로서의 개발 가능성이 큰 후보 가능한 화합물을 도출하는 것을 목표로 연구하였다.

[연구내용]

1. N-[3-(4-Amino-3-fluoro-phenyl)-2-oxo-oxazolidin-5-ylmethyl]-acetamide의 합성

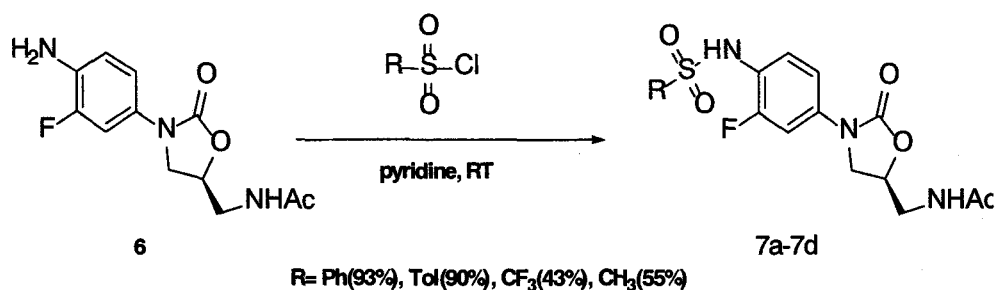
기존의 옥사졸리디논계 항생제의 핵심구조인 옥사졸리디논과 그 링에 카이럴하게 치환된 아세틸아마이드를 기본으로 하여 다양한 옥사졸리디논계의 유도체를 합성하고자 먼저 페닐기의 4번 위치에 1차 아민을 가진 구조를 Scheme 1과 같은 방법으로 합성하였다.



벤질아민을 Cbz 로 보호하고 최종 단계에서 Pd/C를 이용하여 효과적으로 환원하여 높은 수율로 1차 아민기를 가진 옥사졸리디논 유도체를 얻을 수 있었다. 3,4-Difluoronitrobenzene을 아세토나이트릴 용매에서 DIEA를 넣고 반응해 4번 위치의 fluorine에 benzyl amine을 치환시켜 화합물 1을 얻었고 나이트로기를 백금촉매를 이용해 1차 아민 형태인 2번 화합물로 만들고 아민기를 Cbz를 이용해 각각 3차아민과 2차아민으로 치환하여 3번 화합물을 합성하였다. -78°C 에서 $n\text{-BuLi}$ 을 이용하여 deprotonation 한 후 (R)-(-)-glycidyl butyrate을 첨가하고 상온에서 반응시켜 옥사졸리디논링을 가진 4번 화합물을 얻었다. 하이드록시 그룹을 mesylate 또는 tosylate하고 potassium phthalimide으로 치환하고 hydrazine을 이용해 1차 아민으로 치환한 후 pyridine 존재하에 acetic anhydride로 아세틸아마이드를 가진 5번 화합물을 만들고, Pd/C로 Cbz치환된 2차아민기를 1차아민으로 환원하여 최종 목표 화합물 6을 얻었다.

2. 설펜아마이드계 옥사졸리디논 화합물의 합성

Scheme 1에서 얻어진 화합물 6을 scheme 2와 같이 다양한 sulfonyl chloride계 화합물과 pyridine 용매하에서 반응하여 적절한 수율로 7a-7d의 설펜아마이드계 화합물을 얻었다. 각 얻어진 화합물은 silicagel column chromatography 정제하여 MIC 테스트하였다.

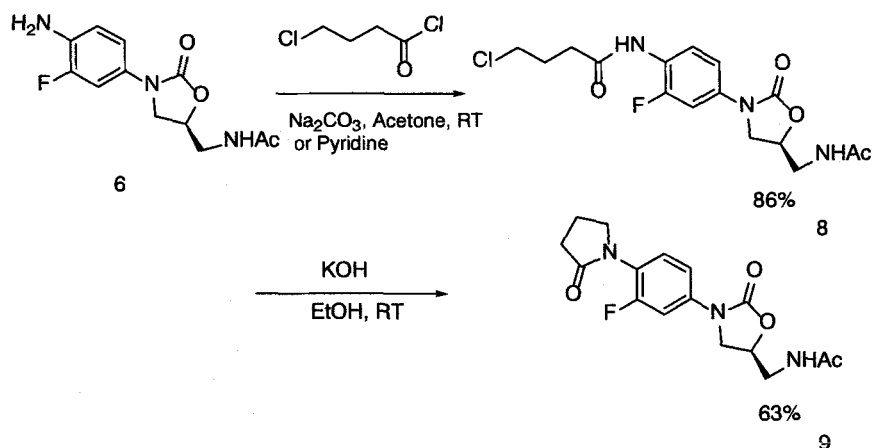


Scheme 2 설펜아마이드 치환된 옥사졸리디논 유도체 합성

3. 피롤리디논계 옥사졸리디논 화합물의 합성

가. 피롤리디논 치환된 옥사졸리디논 화합물의 합성

Scheme 1에서 얻어진 화합물 6을 4-Chloro-butryl chloride과 Acetone 용매하에서 반응시켜 높은 수율로 8번 화합물을 얻을 수 있었다. 이를 다시 에탄올에서 강염기인 KOH를 이용해 피롤리디논링을 가진 옥사졸리디논 화합물 8을 63%의 수율로 만들었다.

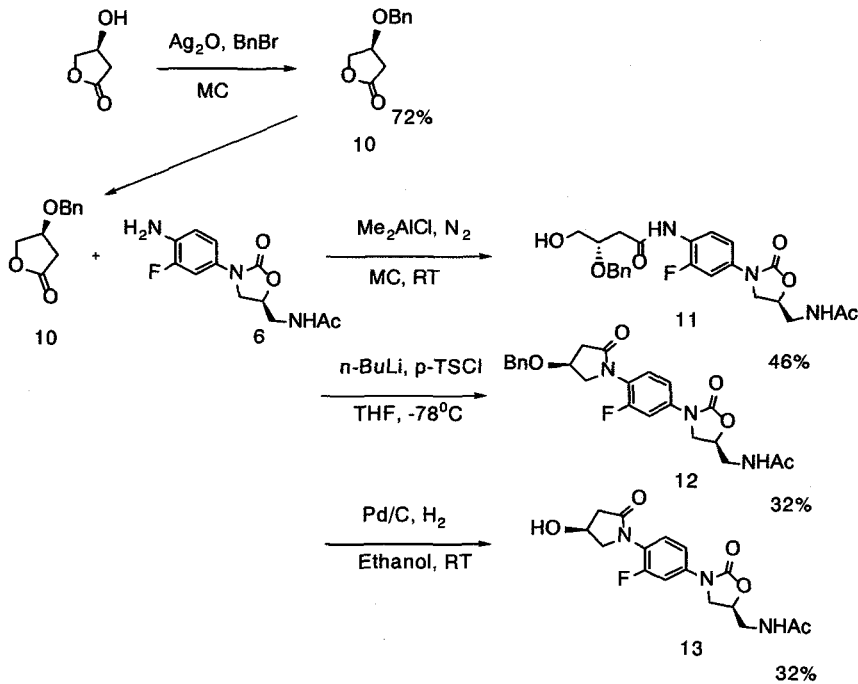


Scheme 3 피롤리디논 치환된 옥사졸리디논 유도체 합성

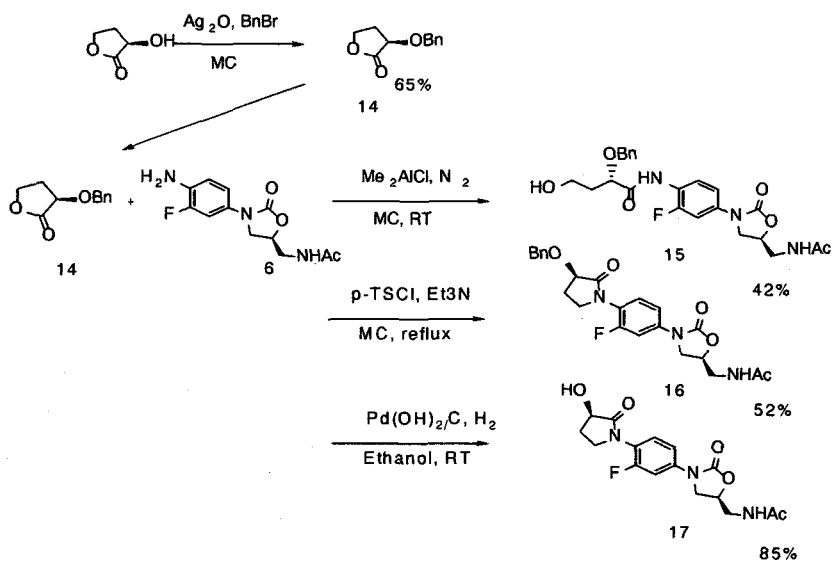
나. 다양한 치환기를 가진 피롤리디논계 옥사졸리디논의 합성

피롤리디논에 치환기를 도입하기 위해 먼저 피롤리디논 α , β 위치에 하이드록시기가 치환된 물질을 만들기로 하였다. 위 Scheme 2에서 방법과 같이하여 하이드록시 치환기를 가진 4-Chloro-2(or 3)-hydroxy-butyryl chloride 물질과 반응시켜 피롤리디논 링을 만들려

하였으나 출발물질의 합성이 용의치 않고 수율이 낮아 아래 Scheme 4와 같이 피롤리딘논에 하이드록시기가 치환된 물질을 출발물질로 하여 합성하였다. 먼저 하이드록시기를 실버옥사이드(I), 벤질브로마이드로 반응하여 화합물 10을 합성하고, 화합물 6과 MC용매 하에서 Me_2AlCl 넣고 상온에서 반응시켜 링이 풀린형태의 화합물 11를 수율 46%로 얻었다. 화합물 10을 -78°C 에서 $n\text{-BuLi}$ 로 알코올기와 아마이드기의 proton을 제거하고 $p\text{-TsCl}$ 넣고 상온에서 12시간 반응하여 화합물 12를 얻었다. 화합물 12를 Pd/C 와 수소로 benzyl기를 제거하여 피롤리딘논링에 하이드록시기가 치환된 최종 화합물 13을 얻었다.



Scheme 4 β -하이드록시 피롤리딘논 치환된 옥사졸리딘논 유도체의 합성



Scheme 5 α -하이드록시 피롤리딘논 치환된 옥사졸리딘논 유도체의 합성

위에서 간략히 설명된 Scheme 4의 방법으로 β 위치에 S구조로 치환된 하이드록시 이외에 R구조로 치환된 화합물 및 Scheme 5의 방법으로 피롤리딘은 α 위치에 각각 S,R의 형태의 치환기를 가진 화합물을 합성하였다. 알코올기가 치환된 물질을 이용해 다양한 치환체로의 변환이 가능하며 이를 통한 다수의 화합물을 합성하여 각각을 MIC테스트 함으로써 신약후보물질을 개발하고자 하였다.

[실험 방법]

1. Benzyl-(2-fluoro-4-nitro-phenyl)-amine의 합성 (1)

아세트나이트릴 12ml에 3,4-difluoronitrobenzene(0.7ml, 6.29mmol)를 녹인 후 DIEA(1.64 ml, 9.43mmol)와 benzylamine(0.82ml, 7.54mmol)를 넣고 반응시켰다. 오일베스에서 90℃로 6시간동안 반응 시킨후 상온으로 냉각하여 다시 16시간 동안 반응하였다. 감압농축하여 에틸아세테이트로 처리한 후 떠다니는 고체찌꺼기를 필터하고 다시 에틸아세테이트로 씻어주었다. 여과액과 합친후 감압농축하고 5% EtOAc/Hexane로 silicagel column chromatography로 정제한 후 다시 5% EtOAc/Hexane로 재결정하여 목적화합물을 수율 97%로 얻었다.

^1H MMR(CDCl_3 , 300MHz): δ 7.91(m, 2H), 7.36(m, 2H), 6.63(t, J = 8.53Hz, 1H), 5.09(s, 1H), 4.48(d, J =5.02Hz, 2H)

2. N-Benzyl-2-fluoro-benzene-1,4-diamine의 합성(2)

1에서 얻어진 Benzyl-(2-fluoro-4-nitro-phenyl)-amine(1g, 4.06mmol)을 THF(150ml)에 녹인 후 5% Pt/C(0.2g)을 넣고 Parr hydrogenator에서 6시간 반응시켰다. 셀라이트 필터 여과를 통해 촉매를 제거하고 여액을 감압농축하여 짙은오일형태로 목적화합물을 수율 90%(0.8g)로 얻었다.

^1H MMR(CDCl_3 , 300MHz): δ 7.28(m, 5H), 6.55-6.30(m, 3H), 4.26(s, 2H), 3.38(s, 2H)

3. Benzyl Benzyl(4-99benzyloxy)carbonylamino)-2-fluorophenyl)carbamate의 합성(3)

2에서 얻어진 N-Benzyl-2-fluoro-benzene-1,4-diamine(0.38g, 3.70mmol)을 THF에 녹인 후 benzyl chloroformate을 넣고 N,N-dimethyl aniline을 넣고 40분간 0℃에서 반응시키고 상온에서 다시 17시간 반응 한 후 감압농축하였다. MC와 차가운 1N HCl로 번갈아 3번 씻어준 후 다시 NaHCO_3 용액으로 씻어준다. MgSO_4 로 건조여과 한후 감압농축하고 10-15% EtOAc/Hexane silicagel column chromatography로 정제하여 목적화합물을 수율 78%로 얻었다.

^1H MMR(CDCl_3 , 300MHz): δ 7.33-7.16(m, 17H), 6.83-6.79(m, 2H), 5.15-5.12(m, 4H), 4.10-4.08(m, 2H)

4. Benzyl-[2-fluoro-4-(5-hydroxymethyl-2-oxo-oxazolidin-3-yl)-phenyl]-carbamic acid benzyl ester의 합성(4)

화합물 3(1.4g)을 질소기류하에 THF에 녹이고 -78℃에서 n-BuLi(1.81ml, 1.6M in hexane)를 서서히 첨가하였다. 한 시간 가량 반응시킨 후 (R)-glycidyl butyrate(0.42g) 30분간 서서히 적가하였다. 한 시간 다시 반응시킨 후 상온으로 온도를 천천히 상승시킨 후 24시간 반응하였다. 반응물을 20ml의 포화 ammonium chloride로 quench하고 에틸아세테이트, 포화 ammonium chloride와 물을 넣고 상 분리하여 추출하였다. 추출한 유기층을 NaCl용액으로 씻어준 후 MgSO_4 로 건조여과하여 목적화합물을 수율 72%로 얻었다.

^1H MMR(CDCl_3 , 300MHz): δ 7.47-7.02(m, 13H), 5.15-5.13(m, 2H), 4.78(s, 2H), 4.59(m,

1H), 3.85(m, 3H), 3.62(dd, J= 12.6Hz, 6.6, 1H)

5. {4-[5-(Acetylamino-methyl)-2-oxo-oxazolidin-3-yl]-2-fluoro-phenyl}-benzyl-carbamic acid benzyl ester의 합성(5)

a: 4에서 얻어진 화합물4(0.71g, 1.58mmol)를 NEt_3 (0.48ml, 3.47mmol)와 MC(25ml)에 넣은 후 Methane sulfonyl chloride(0.16ml, 2.05mmol)를 적가하고 0°C에서 반응 시켰다. 45분 간 교반하고 반응물을 물과 NaHCO_3 용액으로 씻어주고 다시 NaCl로 씻어주고 MgSO_4 로 건조여과하고 감압 농축하여 목적화합물을 수율 93%(0.86g)로 얻었다.

^1H MMR(CDCl_3 , 300MHz): δ 7.50-7.04(m, 13H), 5.15(m, 2H), 4.86(m, 1H), 4.81(s, 2H), 4.49-4.36(m, 2H), 4.08(t, J=9.15Hz, 1H), 3.89(dd, J=9.15, 6.32Hz, 1H), 3.08(s, 3H)

b: 위에서 얻어진 화합물 5a(0.52g)를 acetonitrile(20ml)넣고 potassium phthalimide(0.546g)를 첨가하였다. 반응물을 95°C에서 48시간동안 교반한 후 상온으로 냉각하고 떠나니는 고체입자들을 여과하고 아세토나이트릴로 다시 잘 씻어준다. 여액을 합친 후 감압농축하고 그 잔여물을 0.5% MeOH/ CHCl_3 로 silicagel column chromatography로 정제하여 수율 87%로 목적화합물을 얻었다.

c:위에서 얻어진 phthalimide(0.85g, 1.47mmol)화합물을 메탄올에 녹이고 hydrazine monohydrate(0.075g, 0.073mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 80°C에서 5시간 동안 반응시키고 상온으로 냉각시켰다. 16시간동안 상온에서 반응 시킨 후 3% sodium carbonate(25ml) 수용액을 넣고 EtOAc로 3번 추출하여 수율 87%로 목적화합물을 얻었다.

^1H MMR(CDCl_3 , 300MHz): δ 7.51-6.91(m, 13H), 5.23, 5.14(2s, 2H), 4.79(s, 2H), 4.58(m, 1H), 3.91(t, J= 8.70Hz, 1H), 3.76(t, J= 8.34Hz, 1H), 3.05(dd, J= 13.71, 3.93Hz, 1H), 2.88(dd, J= 13.71, 5.43Hz, 1H)

d:위에서 얻어진 화합물 5c(0.26g)을 0°C pyridine에 넣고 Acetic anhydride(2.8ml)를 적가하고 18시간동안 상온에서 반응시켰다. 물과 에틸아세테이트로 층분리하였다. EtOAc로 3번 추출하고 MgSO_4 로 건조여과 하고 감압농축하였다. 잔여물을 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (20:1)로 Silicagel column chromatography 정제하여 수율 90%(0.26g)을 얻었다.

^1H MMR(CDCl_3 , 300MHz): δ 7.48-7.01(m, 13H), 5.23, 5.14(2s, 2H), 4.80(s, 2H), 4.70(m, 1H), 3.93(t, 9.04Hz, 1H), 3.68(dd, J= 9.02, 6.98Hz, 1H), 3.43(m, 2H), 1.95(s, 3H)

6. N-[3-(4-Amino-3-fluoro-phenyl)-2-oxo-oxazolidin-5-ylmethyl]-acetamide의 합성(6)

위에서 얻어진 화합물 5(2.381g 4.84mmol)을 ethanol(150ml)에 넣고 10% Pd/C 0.5g을 첨가 한후 parr hydrogenator에서 7.5시간동안 반응하였다. 0.1g의 10% Pd/C를 더 넣은 후 15시간 더 반응시켰다. 반응종결 후 celite로 여과하고 여액을 감압농축하고 MeOH로 재결정하여 수율 77%(0.1g)로 최종 목적화합물을 얻었다.

^1H MMR(DMSO, 300MHz): δ 8.23(t, J=5.70Hz, 1H), 7.29(dd, J= 13.55, 2.42Hz, 1H), 6.95(dd, J= 8.6, 2.24Hz, 1H), 6.76(dd, J= 9.89, 8.74Hz, 1H), 5.04(s, 2H), 4.65(m, 1H), 4.65(m, 1H), 4.01(t, J= 8.95Hz, 1H), 3.64(dd, J= 8.98, 6.43Hz, 1H), 3.38(m, 2H), 1.84(s,

3H) ^{13}C NMR(DMSO, 75MHz): 170.82, 155.09, 149.24, 133.72, 133.55, 128.51, 128.45, 116.88, 116.80, 116.06, 116.03, 107.79, 107.48, 72.18, 48.56, 42.33, 23.30

7. N-[3-(4-Benzenesulfonylamino-3-fluoro-phenyl)-2-oxo-oxazolidin-5-ylmethyl]

-acetamide의 합성(7a)

위에서 얻어진 화합물 6(0.05g, 0.187mmol)을 pyridine용매하에서 benzyl sulfonyl chloride(0.04g, 1.1eq.)을 넣고 상온에서 1시간 가량 반응시킨 후 1N HCl과 물로 묽히고 감압농축한 후 Acetonitrile에 녹인 후 여과하였다. CHCl_3 와 물을 이용해 추출하고 MgSO_4 로 건조 여과 한 후 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (20:1)로 silicagel column chromatography로 정제하여 수율 93%로 목적화합물을 얻었다.

^1H MMR(DMSO, 300MHz): δ 10.12(s, 1H), 8.28(t, J=5.55Hz, 1H), 7.76-7.26(m, 8H), 4.75(m, 1H), 4.11(t, J= 9.0Hz, 1H), 3.74(dd, J= 9.0Hz, 6.54Hz, 1H), 3.45(m, 2H), 1.87(s, 3H)

8. N-[3-[3-Fluoro-4-(toluene-4-sulfonylamino)-phenyl]-2-oxo-oxazolidin-5-ylmethyl]

-acetamide 의 합성(7b)

7a의 방법으로 6과 Toluene sulfonyl chloride와 반응시켜 목적화합물을 수율 90%로 얻었다.

^1H MMR(DMSO, 300MHz): δ 9.98(s, 1H), 8.21(t, J=6.01Hz, 1H), 7.58-7.19(m, 3H), 4.70(m, 1H), 4.06(t, J= 9.99Hz, 1H), 3.67(dd, J= 9.01, 6.57Hz, 1H), 3.41(m, 2H), 2.36(s, 3H), 1.82(s, 3H)

9. N-[3-(3-Fluoro-4-methanesulfonylamino-phenyl)-2-oxo-oxazolidin-5-ylmethyl]

-acetamide의 합성(7c)

7a의 방법으로 6과 methane sulfonyl chloride와 반응시켜 목적화합물을 수율 55%로 얻었다.

^1H MMR(DMSO, 300MHz): δ 9.51(s, 1H), 8.24(t, J= 5.45Hz, 1H), 7.61-7.27(m, 3H), 4.73(m, 1H), 4.11(t, J=8.82Hz, 1H), 3.73(m, 1H), 3.41(m, 2H), 3.15(s, 3H), 1.83(s, 3H)

10. N-[4-[5-(Acetylamino-methyl)-2-oxo-oxazolidin-3-yl]-2-fluoro-phenyl]-4-chloro

-butyramide의 합성(8)

7a와 같은 방법 또는 Acetone용매하에서 Na_2CO_3 를 넣고 화합물 6과 4-chloro-butyric chloride를 반응시켜 목적화합물을 수율 86%로 얻었다.

^1H MMR(DMSO, 300MHz): δ 9.52(s, 1H), 8.02(t, J= 5.54Hz, 1H), 7.56(t, J= 8.87Hz, 1H), 7.34(dd, J= 13.25, 2.29Hz, 1H), 6.98(m, 1H), 4.50(m, 1H), 3.88(t, J= 8.92Hz, 1 H), 3.50(m, 3H), 3.19(t, J=5.41Hz, 2H), 1.82(m, 2H), 1.61(s, 3H)

11. N-[3-[3-Fluoro-4-(2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-phenyl]-2-oxo-oxazolidin-5-ylmethyl]

-acetamide의 합성(9)

위에서 얻어진 화합물 8(0.02g, 0.054mmol)를 화합물 6 (1.0eq)과 에탄올 용매에서

KOH(1.5eq)를 넣고 상온에서 1hr 반응시키고 감압농축한 후 CHCl₃과 포화NaCl수용액과 물로 각각 2번씩 추출하여 MgSO₄로 건조여과 하고 CHCl₃/MeOH (10:1)로 silicagel column chromatography로 정제하여 수율 63%로 목적화합물을 얻었다.

¹H MMR(DMSO, 300MHz): δ 8.29(t, J= 5.60Hz, 1H), 7.65-7.36(m, 3H), 4.81(m, 1H), 4.19(t, J=9.27Hz, 1H), 3.78(m, 3H), 3.48(t, J=5.44Hz, 2H), 2.50(t, 8.17Hz, 2H), 2.22(m, 2H), 1.89(s, 3H)

12. 4-Benzyloxy-dihydro-furan-2-one의 합성(10)

(S)-(-)-β-Hydroxy-γ-butyrolactone(0.2g, 1.96mmol)을 MC용매하에 Ag₂O(I)(0.45g, 1.1eq)과 BnBr(0.37g, 1.1eq)을 넣고 상온에서 6시간 반응시킨 후 celite여과 하고 감압농축하고 Hexane/EA(4:1)로 silicagel column chromatography정제하여 수율 64%로 목적화합물 (10)을 얻었다.

¹H MMR(CDCl₃, 300MHz): δ 7.33(m, 5H), 4.52(s, 2H), 4.34(m, 3H), 2.64(m, 2H)

13. N-(4-[5-(Acetylamino-methyl)-2-oxo-oxazolidin-3-yl]-2-fluoro-phenyl)-3-benzyloxy-4-hydroxy-butyramide(11)의 합성

12의 방법으로 얻어진 화합물 10(0.01g, 0.052mmol)과 Me₂AlCl(0.014g, 0.052mmol) MC 용매하에 상온에서 1시간가량 반응시킨 후 화합물 6(1.0eq)를 MC에 녹여 0℃에서 적가한다. 다시 상온에서 6시간 반응시킨 후 pH 7 phosphate buffer solution으로 묽히고 물로 세척하고 포화 NaCl로 다시 씻은 후 MgSO₄로 건조여과하고 감압농축한 후 CHCl₃/MeOH(15:1) silicagel column chromatography로 정제하여 목적화합물을 수율 46%로 얻었다.

¹H MMR(DMSO, 300MHz): δ 9.76(s, 1H), 8.27(t, J=5.79Hz, 1H), 7.79(t, 8.90Hz, 1H), 7.57(dd, J=13.22, 2.30Hz, 1H), 7.25(m, 6H), 4.81(m, 1H), 4.72(m, 1H), 4.57(dd, J=32.30, 11.80Hz, 2H), 4.11(t, 9.08Hz, 1H), 3.89(m, 1H), 3.72(dd, J= 9.03, 6.52Hz, 1H), 3.51(t, J= 5.27, 2H), 3.42(m, 2H), 2.61(m, 2H), 1.84(s, 3H) ¹³C NMR(DMSO, 75MHz): 170.85, 170.62, 154.88, 152.97, 139.84136.56, 128.88, 128.23, 128.06, 125.79, 125.74, 122.32, 122.15, 114.18, 114.16, 106.43, 106.13, 78.41, 72.48, 71.93, 63.73, 48.08, 42.23, 23.29

14. N-(3-[4-(4-Benzyloxy-2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-3-fluoro-phenyl]-2-oxo-oxazolidin-5-ylmethyl)-acetamide(12)의 합성

13의 방법으로 얻어진 화합물 11(0.1g, 0.218mmol)을 THF에 녹인 후 질소기류하에서 온도를 -78℃로 낮춘 후 n-BuLi 3eq를 넣고 30분간 반응시켰다. p-TsCl 1당량을 THF에 녹여 10분간 적가하고 온도를 서서히 올려 상온에서 24시간 반응시켰다. 포화 NH₄Cl 수용액으로 묽히고 층분리하고 유기층을 모아 CHCl₃로 3번 추출하고 유기층을 모아 Na₂SO₄로 건조여과하고 감압농축하였다. CHCl₃/MeOH(10:1)로 silicagel column chromatography 정제하여 수율 32%로 목적화합물을 얻었다.

¹H MMR(DMSO, 300MHz): δ 8.25(t, J=5.64Hz, 1H), 7.58(dd, J=13.22, 2.15Hz, 1H), 7.45(t, J= 8.74Hz, 1H), 7.33(m, 6H), 4.74(m, 1H), 4.56(s, 2H), 4.35(m, 1H), 4.12(t, J=

9.05Hz, 1H), 4.03(m, 1H), 3.75(m, 2H), 3.42(t, J=5.49Hz, 2H), 2.82(dd, J=17.29, 6.45Hz, 1H), 2.49(m, 1H), 1.83(s, 3H)

15. N-{3-[3-Fluoro-4-(4-hydroxy-2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-phenyl]-2-oxo-oxazolidin-5-ylmethyl}-acetamide의 합성(13)

14의 방법으로 얻어진 화합물 12(0.031g, 0.07mmol)을 에탄올에 녹이고 수소로 압력을 가하고 Pd/C를 0.01g, 넣고 상온에서 12시간 반응하여 celite여과 하였다. 여액을 감압농축하고 CHCl₃/MeOH(20:1)로 silicagel column chromatography 정제하여 목적화합물을 수율 32%로 얻었다.

¹H MMR(DMSO, 300MHz): δ 8.25(t, J= 6.03Hz, 1H), 7.56(dd, J=13.35, 2.38Hz, 1H), 7.44(t, J=8.71Hz, 1H), 7.32(dd, J=8.78, 1.9Hz, 1H), 5.37(m, 1H), 4.73(m, 1H), 4.41(m, 1H), 4.12(t, J= 9.02Hz, 1H), 3.97(m, 1H), 3.74(dd, J= 9.02, 6.40Hz, 1H), 3.47(m, 1H), 3.41(m, 2H), 2.74(dd, J=16.98, 6.34Hz, 1H), 2.23(dd, J= 17.06, 2.20Hz, 1H), 1.96(m, 1H), 1.83(s, 3H)

16. 3-Benzyloxy-dihydro-furan-2-one의 합성(14)

(R)-(+)-α-Hydroxy-γ-butyrolactone(0.2g, 1.96mmol)을 MC용매하에 Ag₂O(I)(0.45g, 1.1eq)과 BnBr(0.37g, 1.1eq)을 넣고 상온에서 6시간 반응시킨 후 celite여과 하고 감압농축하고 Hexane/EA(4:1)로 silicagel column chromatography 정제하여 수율 65%로 목적화합물 (10)을 얻었다.

¹H MMR(CDCl₃, 300MHz): δ 7.37-7.30(m, 5H), 4.91(d, J=11.79Hz, 1H), 4.49(d, J=11.79Hz, 1H), 4.39(m, 1H), 4.17(m, 2H), 2.43(m, 1H), 2.27(m, 1H) ¹³C NMR(CDCl₃, 75MHz): 175.51, 137.41, 128.95, 128.55, 128.53, 72.90, 72.54, 65.89, 30.23

17. N-{4-[5-(Acetylamino-methyl)-2-oxo-oxazolidin-3-yl]-2-fluoro-phenyl}-2-benzyloxy-4-hydroxy-butamide의 합성(15)

16의 방법으로 얻어진 화합물 10(0.01g, 0.052mmol)과 Me₂AlCl(0.014g, 0.052mmol) MC용매하에 상온에서 1시간가량 반응시킨 후 화합물 6(1.0eq)를 MC에 녹여 0°C에서 적가한다. 다시 상온에서 6시간 반응시킨 후 pH 7 phosphate buffer solution으로 묽히고 물로 세척하고 포화 NaCl로 다시 씻은 후 MgSO₄로 건조여과하고 감압농축한 후 CHCl₃/MeOH(15:1) silicagel column chromatography로 정제하여 목적화합물을 수율 42%로 얻었다.

¹H MMR(DMSO, 300MHz): δ 9.55(s, 1H), 8.25(t, J=5.82Hz, 1H), 7.69(t, J=8.85Hz, 1H), 7.58(dd, J=13.02, 2.43Hz, 1H), 7.41-7.24(m, 6H), 4.73(m, 1H), 4.67(d, J=11.64Hz, 1H), 4.58(m, 1H), 4.48(d, J=11.64Hz, 1H), 4.13(m, 2H), 3.73(dd, J=9.04, 6.48Hz, 1H), 3.55(m, 2H), 3.43(t, J=5.40Hz, 2H), 1.91(m, 2H), 1.83(s, 3H) ¹³C NMR(DMSO, 75MHz): 172.04, 170.93, 156.91, 154.89, 153.67, 138.73, 137.25, 137.11, 129.11, 128.67, 128.51, 126.47, 121.57, 121.41, 114.18, 106.49, 106.15, 77.93, 72.52, 72.43, 57.82, 48.10, 42.25, 37.04, 23.28

18. N-{3-[4-(3-Benzyloxy-2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-3-fluoro-phenyl]-2-oxo-oxazolidin-5-ylmethyl}-acetamide의 합성(16)

17의 방법으로 얻어진 화합물 15 0.5g(1.08mmol)을 MC에 녹인 후 Et₃N을 10ml을 넣고 p-TsCl를 1.1당량(0.23g) 첨가하여 reflux하여 반응하였다. 24시간 반응 후 반응이 종결되면 1N HCl로 2번 씻어주고 다시 Na₂CO₃로 2번, 물로 씻어준 후 Na₂SO₄로 건조여과 하여 감압농축하였다. 최종 CHCl₃/MeOH(20:1) silicagel column chromatography로 정제하여 목적화합물을 수율 52%로 얻었다.

¹H MMR(CDCl₃, 300MHz): δ 7.54(dd, J=12.90, 2.39Hz, 1H), 7.42-7.29(m, 6H), 7.12(dd, J=8.99, 1.82Hz, 1H), 6.87(t, J=5.95Hz, 1H), 4.98(d, J=11.74Hz, 1H), 4.78(d, J=11.76Hz, 1H), 4.71(m, 1H), 4.29(t, J=7.60Hz, 1H), 3.97(t, J=8.93Hz, 1H), 3.75(m, 3H), 3.57(m, 2H), 2.48(m, 1H), 2.19(m, 1H), 1.97(s, 3H) ¹³C NMR(CDCl₃, 75MHz): 173.01, 171.81, 158.98, 155.67, 154.63, 138.54, 138.40, 138.03, 128.87, 128.59, 128.39, 128.32, 122.07, 121.91, 113.86, 107.41, 107.07, 77.06, 75.85, 72.59, 72.33, 47.80, 46.98, 46.92, 42.15, 27.67, 23.34

19. N-{3-[3-Fluoro-4-(3-hydroxy-2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-phenyl]-2-oxo-oxazolidin-5-ylmethyl}-acetamide의 합성(17)

18의 방법으로 얻어진 화합물 16(0.25g, 0.57mmol)을 에탄올에 녹이고 Pd(OH)₂/C를 120mg/mmol 넣고 70-80℃에서 24시간 반응하여 celite여과 하였다. 여액을 감압농축하고 CHCl₃/MeOH(8:1)로 silicagel column chromatography 정제하여 목적화합물을 수율 85%로 얻었다.

¹H MMR(DMSO, 300MHz): δ 8.25(t, J=5.88Hz, 1H), 7.57(dd, J=13.29, 2.34Hz, 1H), 7.46(t, J=8.75Hz, 1H), 7.33(dd, J=8.92, 2.05Hz, 1H), 5.75(m, 1H), 4.74(m, 1H), 4.30(m, 1H), 4.12(t, J=8.99Hz, 1H), 3.74(dd, J=9.11, 6.44Hz, 1H), 3.63(m, 2H), 3.41(t, J=5.44Hz, 2H), 2.41(m, 1H), 1.92(m, 1H), 1.83(s, 3H) ¹³C NMR(DMSO, 75MHz): 174.64, 170.87, 158.59, 139.17, 139.03, 128.80, 128.76, 122.47, 122.31, 114.58, 106.96, 106.62, 80.03, 72.57, 69.51, 48.08, 46.39, 42.22, 29.79, 23.29

[약효 검색 결과]

No.	strain	7a	7b	7c	7d	8	9	Linezolid
1	<i>S.aureus</i> 6538p	4	>64	>64	8	2	8	0.5
2	<i>S.aureus</i> giorgio	4	>64	>64	16	2	16	1
3	<i>S.aureus</i> 77	4	>64	>64	8	1	8	0.5
4	<i>S.aureus</i> SA011	8	>64	>64	16	4	16	2
5	<i>S.aureus</i> SA015	8	>64	>64	16	4	16	2
6	<i>S.aureus</i> 29213A	4	>64	>64	8	2	8	1
7	<i>S.aureus</i> Smith(13709)	4	>64	>64	16	4	16	2
8	<i>S.aureus</i> ^{MR} 241	4	>64	>64	8	2	8	0.5
9	<i>S.aureus</i> ^{MR} K311	4	>64	>64	8	4	8	1
10	<i>S.aureus</i> ^{MR} K364	32	>64	>64	16	4	16	1
11	<i>S.aureus</i> ^{MR} K367	32	>64	>64	16	4	16	1
12	<i>S.aureus</i> ^{MR} K372	32	>64	>64	16	4	16	1
13	<i>S.aureus</i> ^{MR} K283	4	>64	>64	8	2	16	1
14	<i>S.aureus</i> ^{MR} AMRA01-12	32	>64	>64	16	4	16	1
15	<i>S.aureus</i> ^{MR} K392	32	>64	>64	16	4	16	1
16	<i>S.epidermidis</i> Q004	2	>64	>64	8	1	8	0.5
17	<i>S.epidermidis</i> Q027	2	>64	>64	8	2	16	0.5
18	<i>S.epidermidis</i> Q033	2	>64	>64	8	2	16	0.5
19	<i>S.epidermidis</i> ^{MR} 887E	8	>64	>64	16	2	16	1
20	<i>S.epidermidis</i> ^{MR} R005	4	>64	>64	16	2	16	1
21	<i>S.epidermidis</i> ^{MR} R025	16	>64	>64	16	2	16	1
22	<i>E.faecalis</i> 29212A	8	>64	>64	32	4	32	2
23	<i>E.faecalis</i> EFS004	8	>64	>64	16	2	16	1
24	<i>E.faecalis</i> EFS008	8	>64	>64	32	4	16	2
25	<i>E.faecalis</i> ^{VanA} 2009	8	>64	>64	32	4	16	2
26	<i>E.faecalis</i> ^{Van} or2	8	>64	>64	32	4	16	2
27	<i>E.faecalis</i> ^{Van} 2035	8	>64	>64	32	4	16	2
28	<i>E.faecalis</i> ^{Van} 2167	8	>64	>64	32	2	16	2
29	<i>E.faecalis</i> ^{Van} 2168	8	>64	>64	32	2	16	2
30	<i>E.faecium</i> ^{VanA} 2006	8	>64	>64	32	2	16	2
31	<i>E.faecium</i> ^{VanA} 2055	8	>64	>64	32	2	16	1
32	<i>E.faecium</i> ^{VanB} 2153	8	>64	>64	32	2	16	1
33	<i>E.faecium</i> ^{VanB} 2164	8	>64	>64	16	2	16	1
34	<i>E.faecium</i> EFM009	8	>64	>64	32	4	32	1
35	<i>E.coli</i> 0536A	>64	>64	>64	>64	>64	>64	64
36	<i>S.typhimurium</i> 14028A	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
37	<i>K.Pneumoniae</i> 2011E	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
38	<i>K.aerogenes</i> 1976E	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
39	<i>P.vulgaris</i> 6059	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
40	<i>C.diversus</i> 2046	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
41	<i>S.marcescens</i> 1826E	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
42	<i>P.aeruginosa</i> 1912E	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
43	<i>P.aeruginosa</i> APSA01-03	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64

여 백

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

목 표	달 성 도 (%)	내 용
전임상 후보물질 도출	100 %	- 옥사졸리디논 후보물질 2종 대량합성 및 생체 내 활성 및 약동력학 검사 - KRQ-10018과 KRQ-23002의 대량합성 및 키랄 이성체 합성
후속대체 화합물 합성	100 %	-옥사졸리디논 유도체 20 여종 합성 및 활성 검색
생리활성 시험	100 %	항균력 시험 수행

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

옥사졸리디논 항생제 연구를 통해 신규 항생제 후보물질을 도출하였으며 옥사졸리디논 화합물은 기존의 시판되고 있는 대조물질 linezolid에 비해 MRSA 및 VRE등에 2-4배 정도 우수한 항균활성을 보이고 있고, 생체내 약동력학 연구결과 linezolid 보다 약간 낮은 정도의 우수한 후보물질을 도출하였다. 향후에는 약효가 우수한 화합물 중 약동력학 결과가 뛰어난 KST150A080의 cis - trans isomer를 분리하여 각각의 생리 활성을 검색하고 또한 생체내 및 독성 검사를 실시하여 신약으로 개발될수 있도록 계속 연구를 수행할 예정이다. 이와같은 연구 결과는 앞으로 많은 drug target에 접근할 수 있는 연구 수행방법을 제시할 수 있고, 신규 의약품 합성 및 개발연구에 도움이 될 것이다.

여 백

제 6장 참고문헌

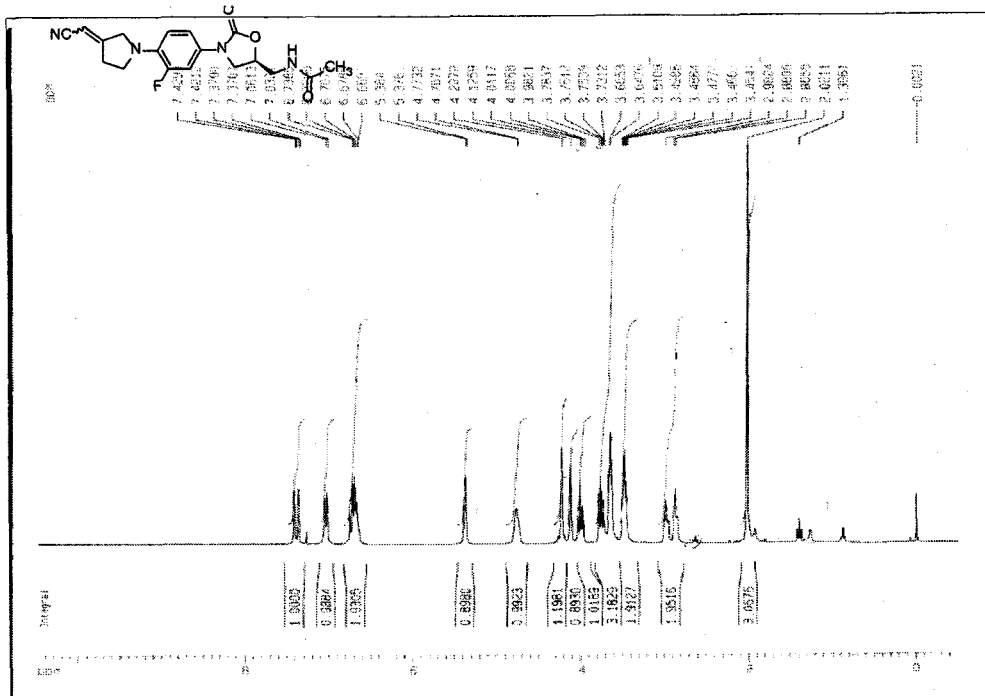
- 1) Voss, A., Doebbeling, B. The world-wide prevalence of methicillin-resistant *S. aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 1995, 5: 101-6
- 2) Yosida, R., Kaku, M., Kohno, S. et al. Trends in antimicrobial resistant *Streptococcus pneumoniae* in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 1995, 39: 1196-8
- 3) (a) Bloom, B. Back to frightening future. *Nature* 1992, 358: 538-9. (b) Culliton, B. Drug-resistant TB may bring epidemic. *Nature* 1992, 356: 473
- 4) Billot-Klein, D., Gutman, L., Collatz, E., Van Heijenoort, J. Analysis of peptidoglycan precursors in vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1992, 36: 1487-90
- 5) M. N. Swartz *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91: 2420-7 and references inhere.
- 6) M. N. Swartz *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91: 2420-7 and references inhere.
- 7) M. N. Swartz *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91: 2420-7 and references inhere.
- 8) M. N. Swartz *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91: 2420-7 and references inhere.
- 9) M. N. Swartz *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91: 2420-7 and references inhere.
- 10) M. N. Swartz *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91: 2420-7 and references inhere.
- 11) G. G. Hammond et al., *34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Antibacterial Activity* 1994, Abstract No. F62
- 12) M. S. Barrett et al., *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 1991, 14, 389
- 13) T. D. Gootz, et al., *32th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Antibacterial Activity*, 1992, Abstract No. 751
- 14) K. Sato et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992, 36, 1491
- 15) D. T. Chu et al., *34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Antibacterial Activity* 1994, Abstract No. F41
- 16) US 5,769,4
- 17) M. L. Nelson et al., *J. Med. Chem.*, 1993, 36, 370
- 18) M. L. Nelson et al., *J. Med. Chem.*, 1994, 37, 1355
- 19) P. E. Sum et al., *J. Med. Chem.* 1994, 37, 184
- 20) T. C. Barden et al., *J. Med. Chem.* 1994, 37, 3205

- 21) R. Wise et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994, 38, 1096
- 22) W. F. coldstein et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994, 38
- 23) N. J. Schneider et al., *35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Antibacterial Activity*, 1995, Abstract No. F243
- 24) T. I. Nicas et al., *35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Antibacterial Activity*, 1995, Abstract No. F248
- 25) WO 9525106
- 26) WO9613502
- 27) Françoise Texier-Boullet et al., *Tetrahedron Lett.*, **1982**, 23 (47), 4927-8
- 28) P. Kocienski et al., *J.Chem.Soc., Perkin trans 1*, **1994**, 1187
- 29) Genin, M. J.; Allwine, D. A.; Barbachyn, M. R. Emmert, D. E. *J. Med. Chem.* 2000, 43, 953-970
- 30) Gadwood, R. C.; shinabarger, D. A. *Annual reports in medicinal chemistry*, 35, 1999, 135
- 31) Jones, R. N.; Biedenbach D. J.; Andregg T. R. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 42(2002), 119-122
- 32) Tucker, J. A.; Allwine, D. A.; Greaga, K. C.; Barbachyn, M. R. *J. Med. Chem.*, 1998, 41, 3727-3735
- 33) Selvakumar, N.; Srinivas, D.; Khera, M. K. *J. Med. Chem.*, 2002, 45, 3953-3962
- 34) Coates, A.; Hu, Y.; Bax, R.; Page, C. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1, 2002, 895
- 35) Barbachyn, M. R.; Cleek, G. J.; Dolak, L. A.; Garmon, S. A. *J. Med. Chem.* 2003, 43, 284-302
- 36) Phillips, O. A.; Udo, E. E. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11, 2003, 35-41
- 37) Fung, H. B.; PharmD; Kirschenbaum, H. L. *Clinical Therapeutics*, 23, 2001, 356

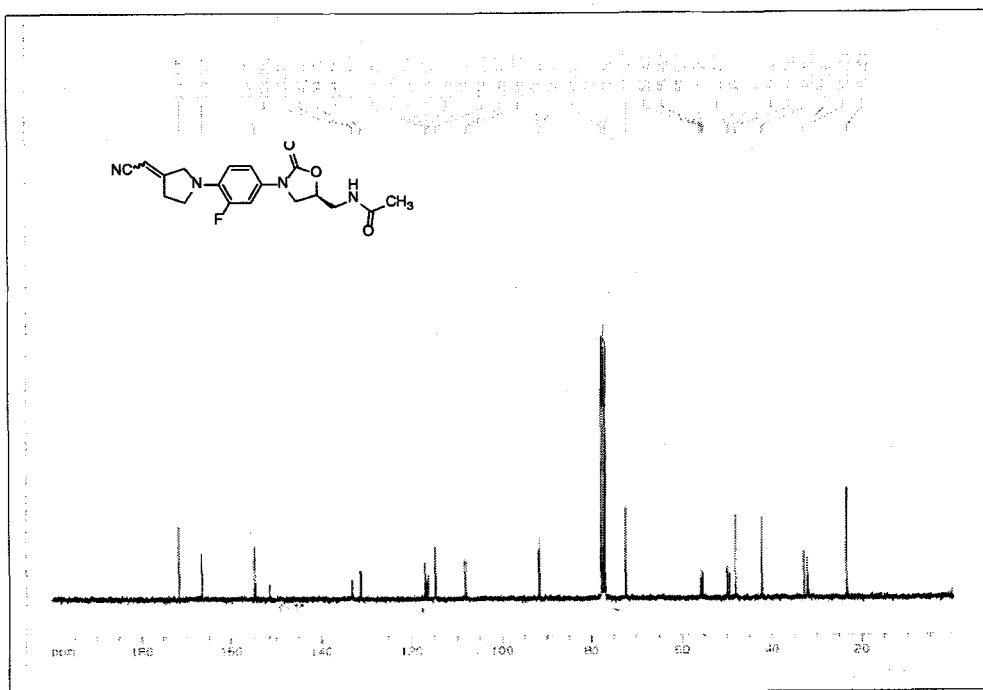
부 록

화합물의 Spectroscopic Data

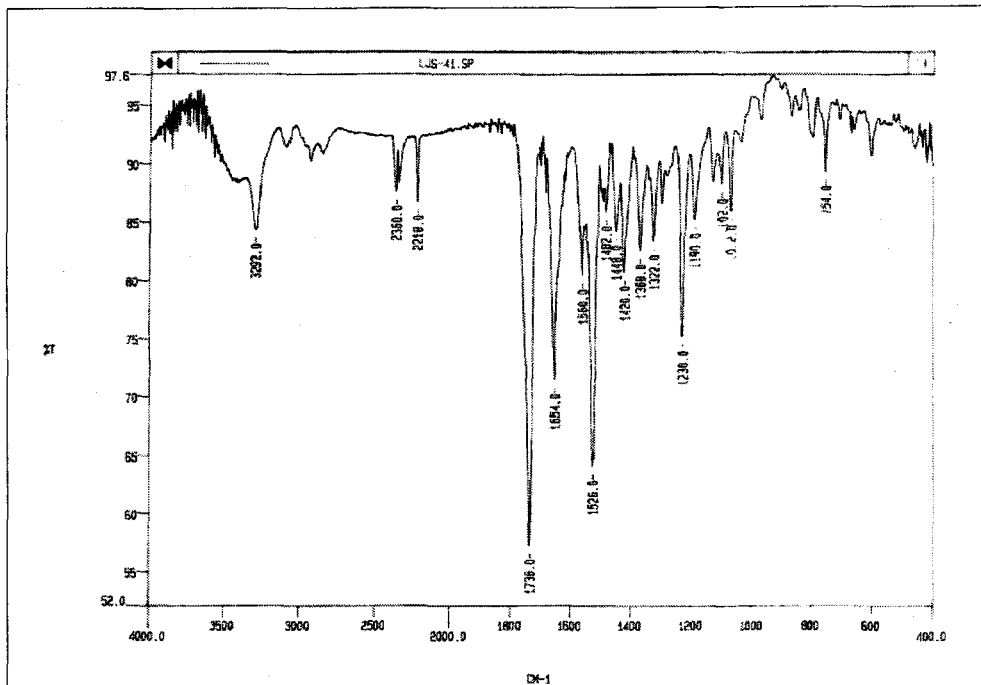
여 백



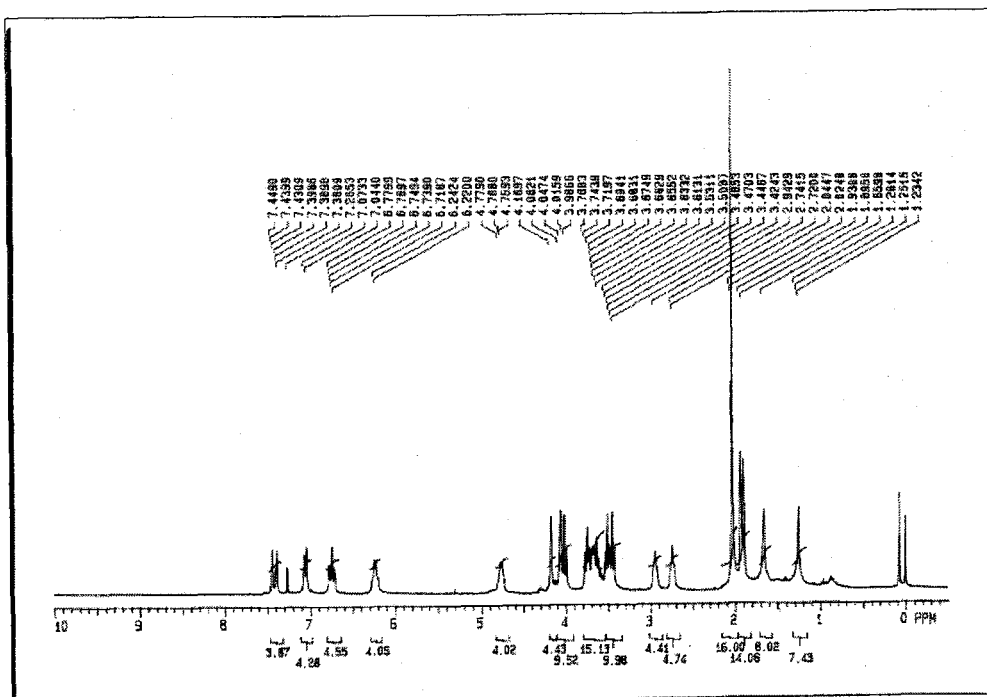
¹H NMR of KST150A080



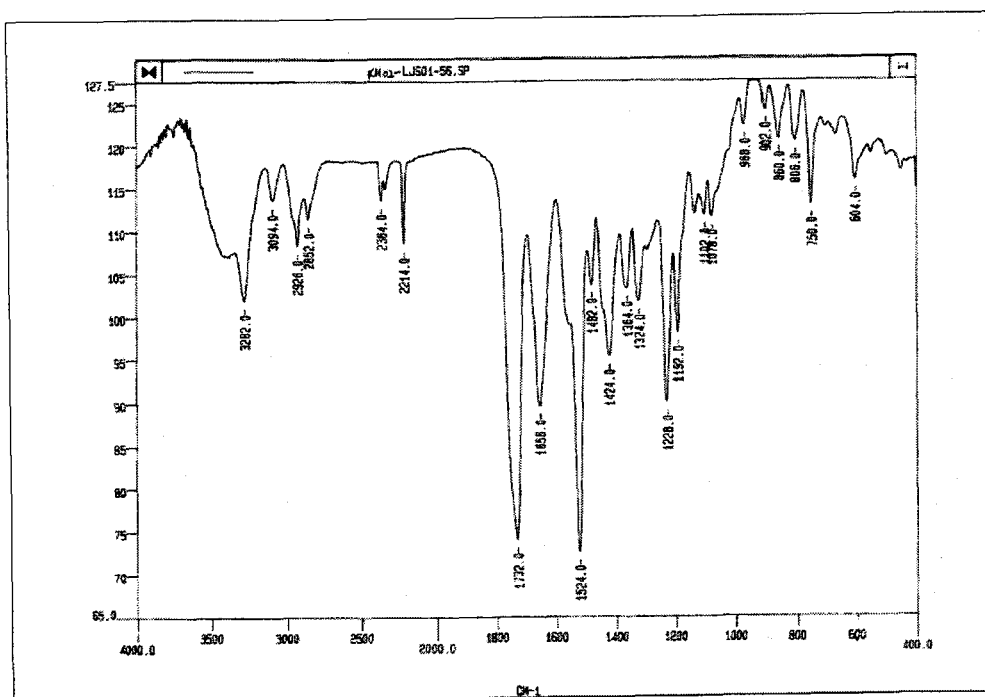
¹³C NMR of KST150A080



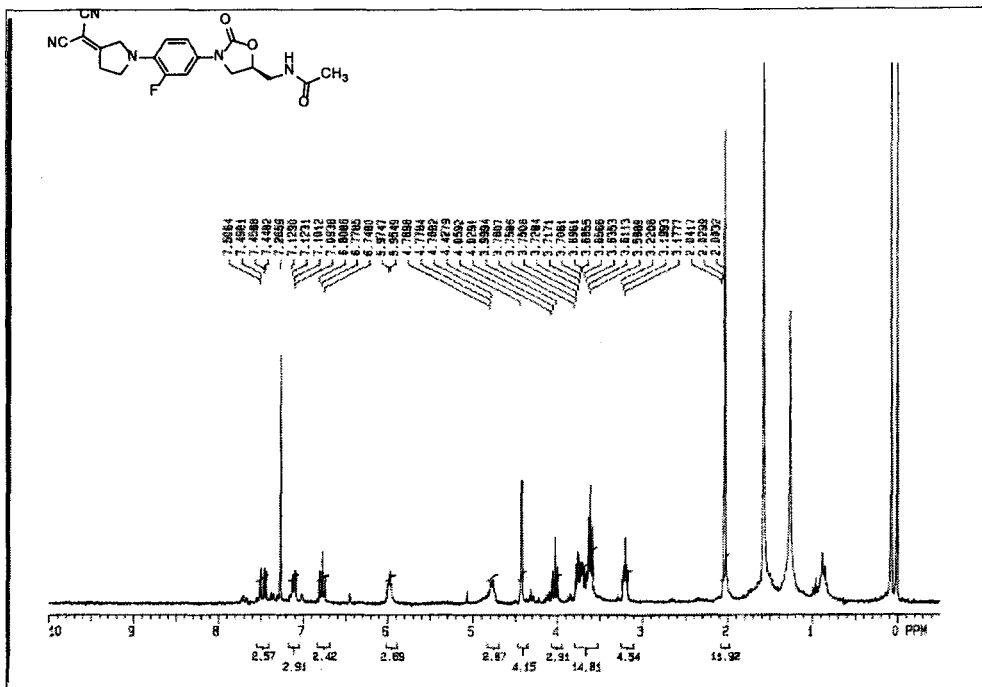
IR of KST150A081



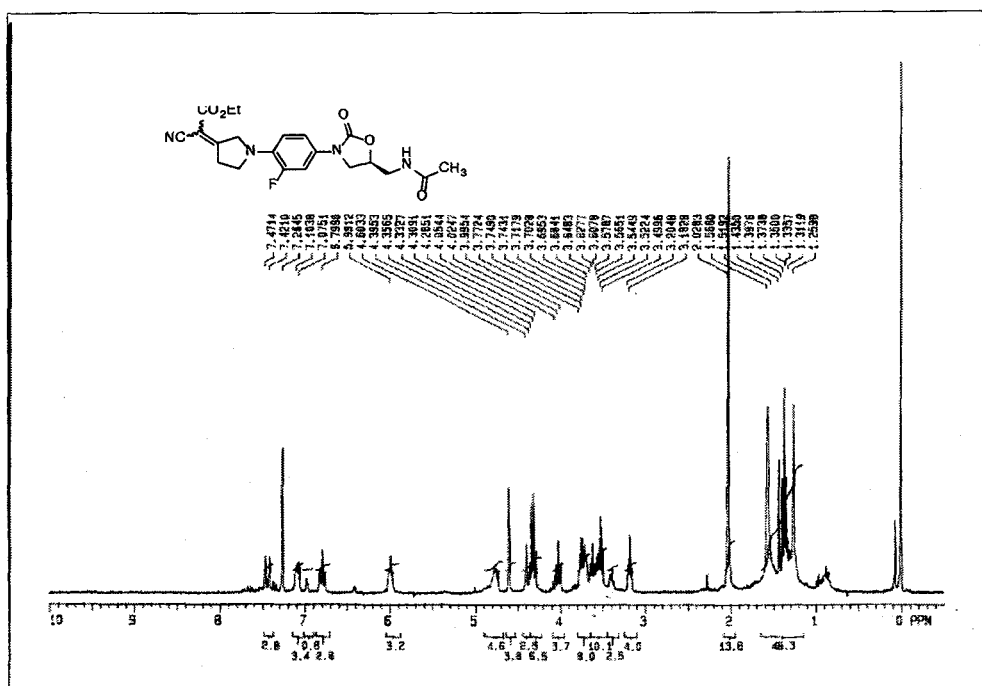
^1H NMR of KST150A082



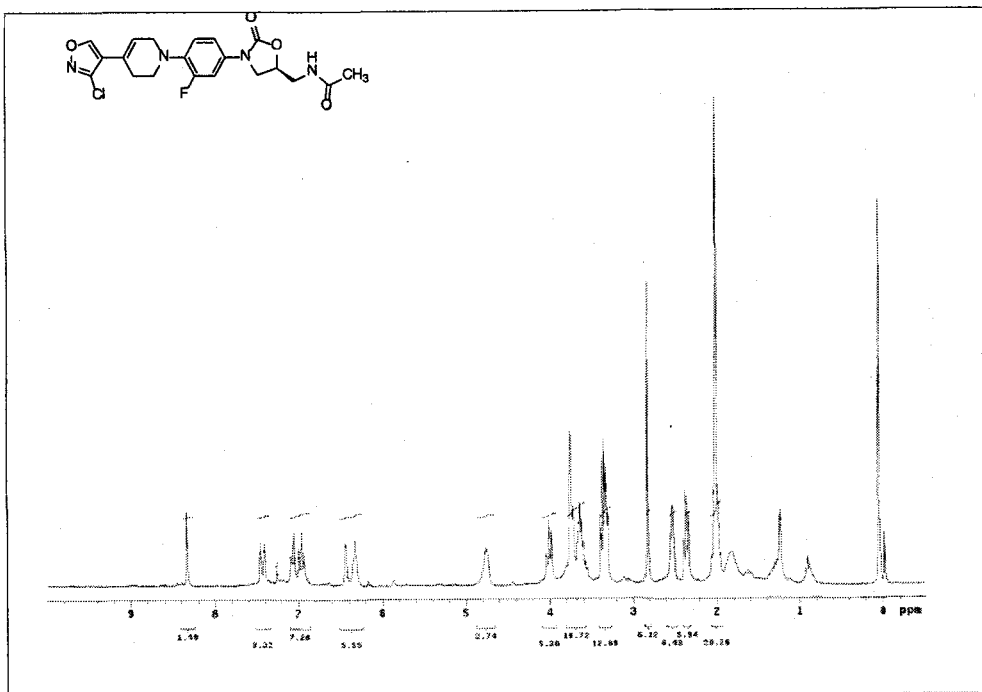
IR of KST150A082



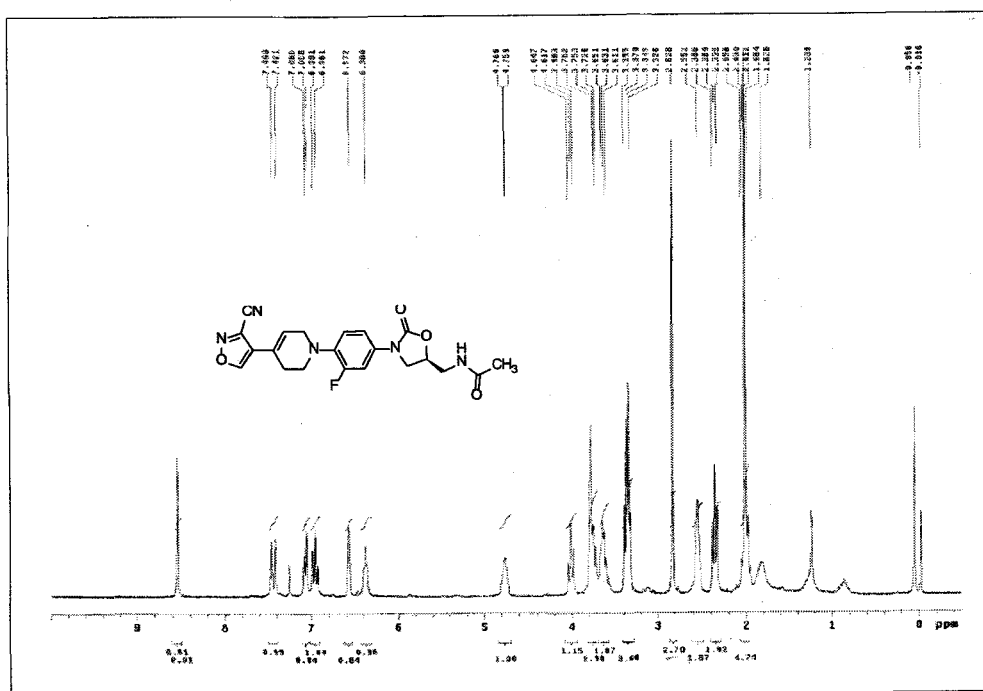
¹H NMR of KST150A083



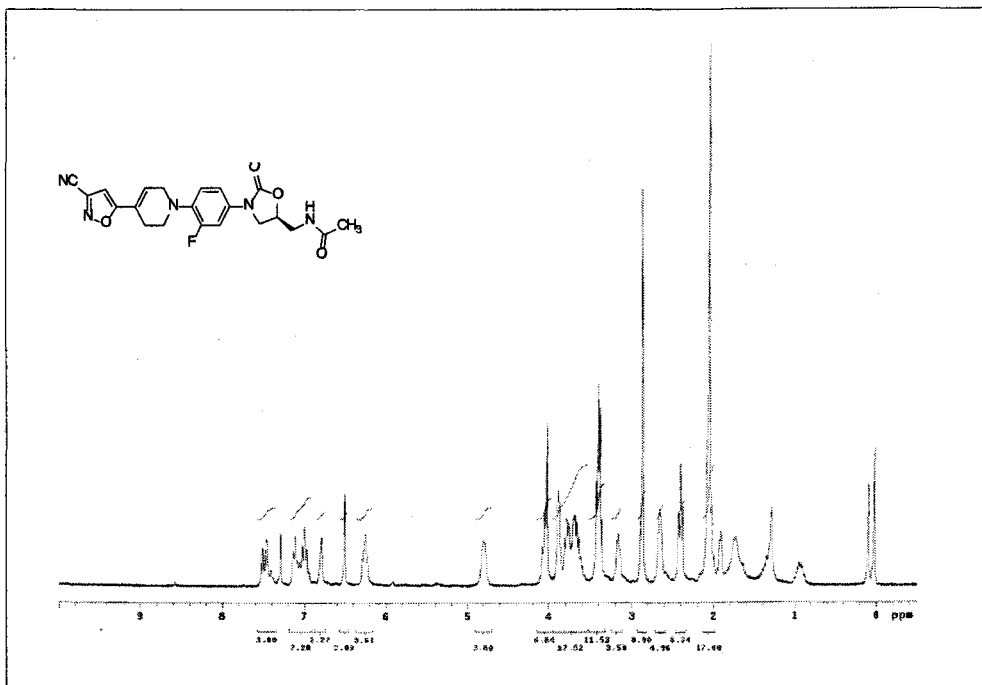
¹H NMR of KST150A084



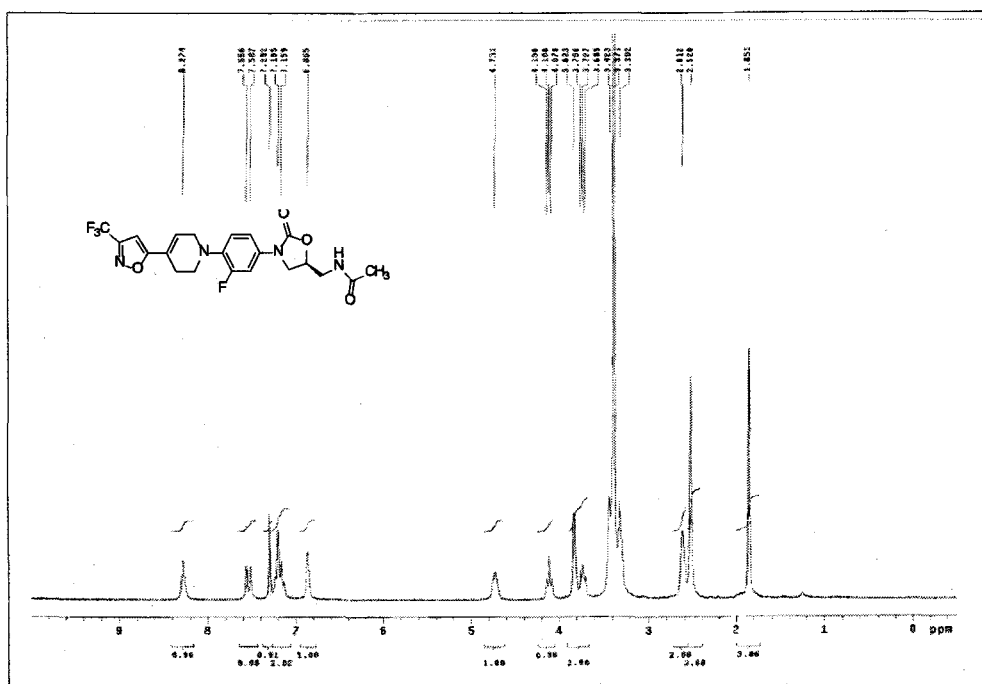
¹H NMR of KST150A085



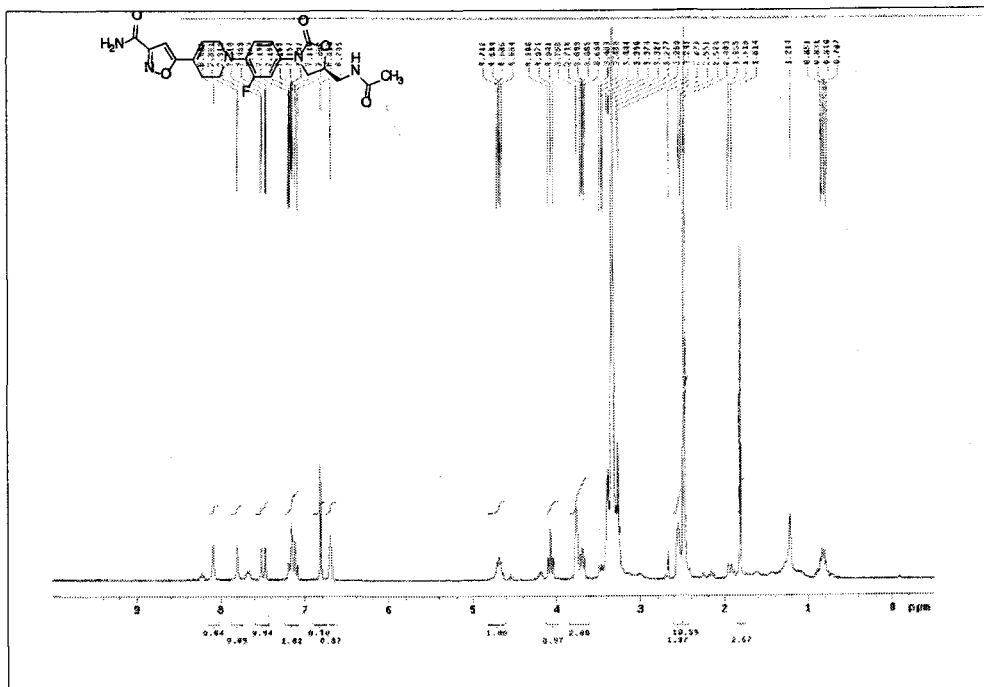
¹H NMR of KST150A086



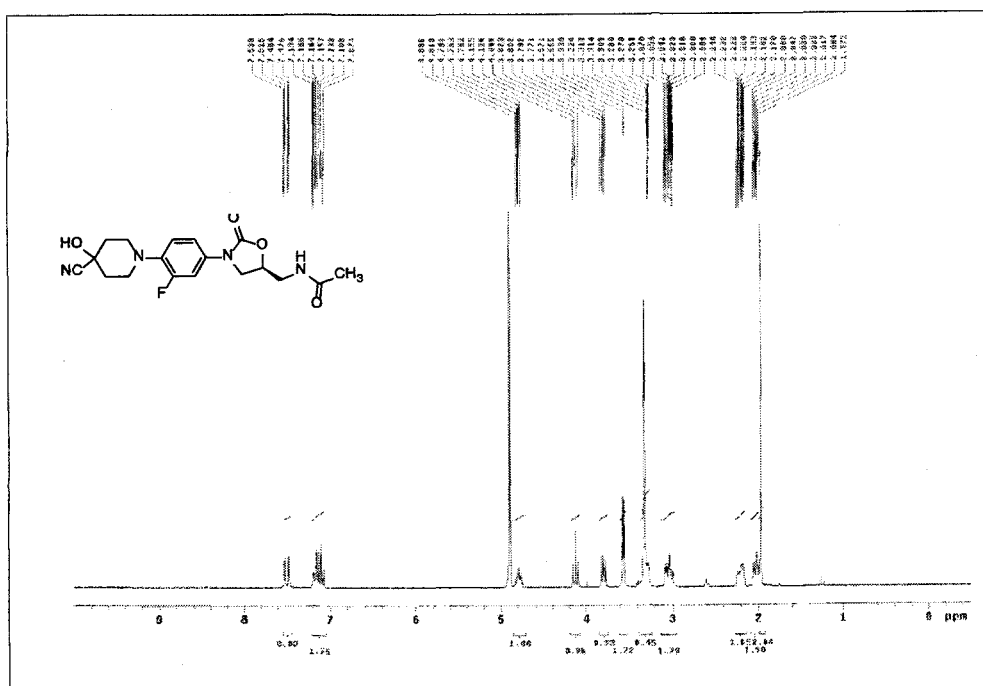
¹H NMR of KST150A087



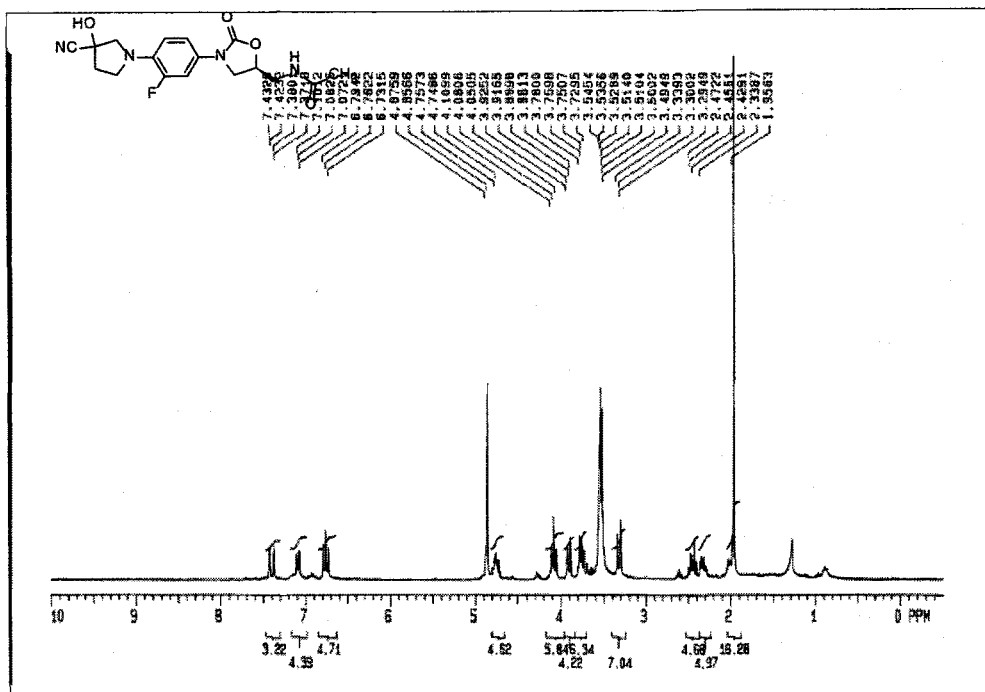
¹H NMR of KST150A089

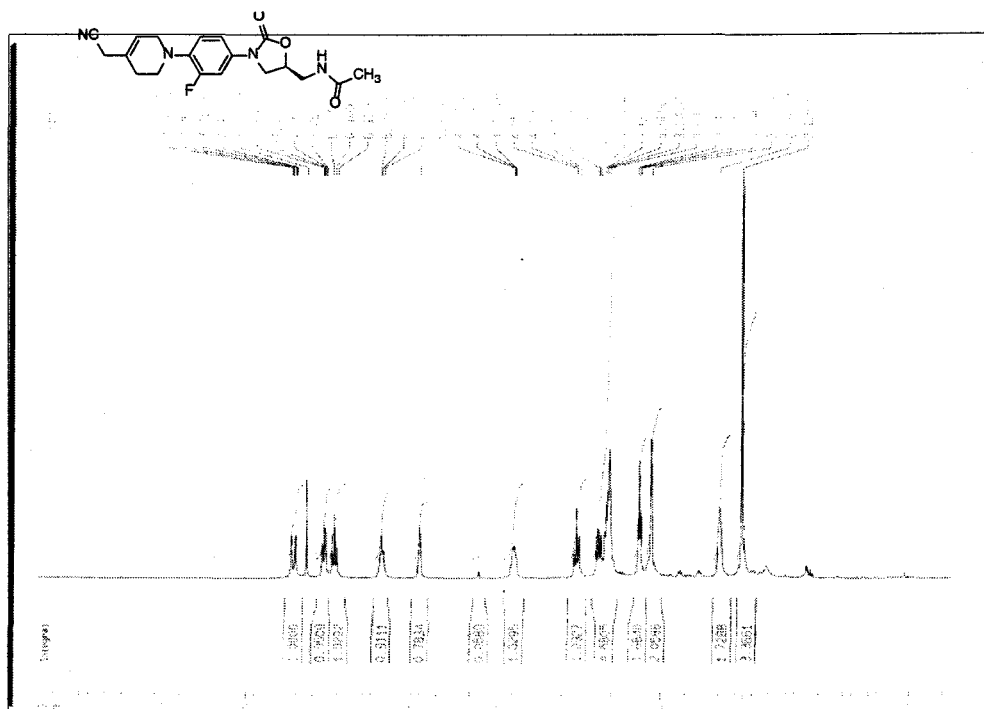


¹³C NMR of KST150A091

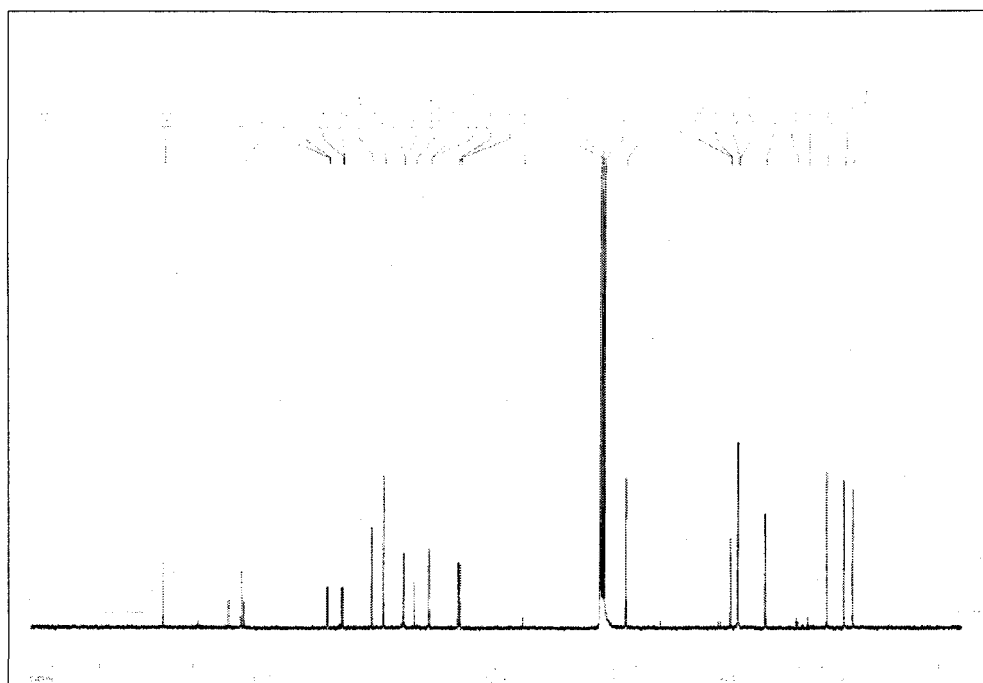


¹H NMR of KST150A092

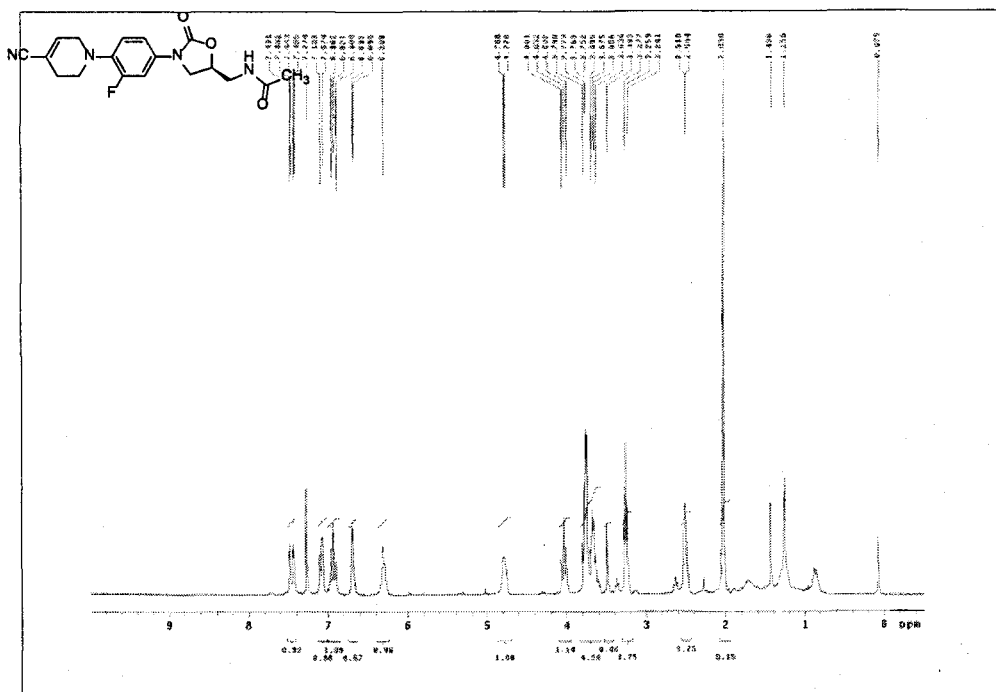




¹H NMR of KST150A096



¹³C NMR of KST150A096



¹H NMR of KST150A097

여 백

위탁연구 I

내성균에 대한 항균력 검색

2003. 6. 30.

연구 기관: 서울대학교 의과대학

연구책임자: 오 명 돈

여 백

제 출 문

한국과학기술연구원장 귀하

본 보고서를 “내성균생장저해물질 개발” 과제 (세부과제 “피페리딘계 옥사졸리디논 항생제 후보물질 창출”) 의 위탁연구 보고서로 제출합니다.

2003. 6. 30

주관연구기관명 : 서울대 의대

연구책임자 : 오 명 돈

연구 원 : 김 흥 빈

“ : 이 보 빈

여 백

요 약 문

I. 제 목 : 내성균에 대한 항균력 검색

II. 연구개발의 목적 및 필요성

황색포도구균은 균혈증, 골수염, 피부 및 연조직 감염 등을 일으키는 임상적으로 중요한 병원체이다. 여러 항균제에 다제내성을 가진 메티실린 내성균주가 늘어나고 최근에는 반코마이신에 조차 감수성이 저하된 균주가 발견되는 등 항균제 내성문제는 감염증의 치료에 많은 문제를 야기하고 있다. 본 연구에서는 국내 임상검체에서 분리된 황색포도구균을 대상으로 항균제 내성률을 알아보고 이를 바탕으로 경험적으로 사용할 수 있는 적절한 대체 항균제로 어떠한 것들이 가능한 지를 알아보려고 하였다. 또한, 비슷한 작용기전을 가지고 있으며 교차내성이 생길 수 있는 macrolide, lincosamide 항균제에 대한 감수성결과를 바탕으로 새로이 도입된 quinupristin/dalfopristin의 내성을 예측하고 내성기전 및 내성유전자의 분포를 확인하여 유용성을 평가하고자 하였다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

8개 대학 병원에서 분리된 황색포도구균 682주 (MSSA 243, MRSA 439)를 대상으로 27가지 항균제에 대한 감수성검사를 원판확산법으로 시행하였다. 최소억제농도는 microbroth 희석법으로 측정하였다. 유도형 및 구성형 내성을 보인 erythromycin 내성균주 중 MSSA 44균주, MRSA 60균주를 무작위로 추출하여 MLS_b 내성 혹은 streptogramin A 내성과 관련된 13가지 유전자에 대한 PCR을 시행하였다.

IV. 연구개발결과

메티실린 내성균주가 64% (439/682)를 차지하였으며, 병원에 따라 55~74%, 검체별로는 48~92%의 분포를 보였다. Vancomycin, teicoplanin, quinupristin/dalfopristin에 내성인 균주는 없었으며, fusidic acid, rifampin, arbekacin, netilmicin, trimethoprim/sulfamethoxazole 등의 항균제가 비교적 항균력이 우수하였다. MRSA 균주의 경우 대개 다제내성을 나타냈다. MSSA 균주의 37% (89/243), MRSA 균주의 97% (429/439)가 MLS_b 내성이었지만, 이들 내성 균주는 모두 quinupristin/dalfopristin에 감수성이었다. 하지만, MLS_b 내성균주중 구성형 (constitutive) 내성률은 MSSA에서 9% (21/243), MRSA에서 83% (367/439)였다. Erythromycin에 내성인 104균주 중 MRSA 55균주 (92%), MSSA 20균주 (45%)에서 *erm(A)* 유전자가 검출되었다. 하

지만, 표현형과 메티실린 내성에 따라 분류하였을 때 구성형 내성을 보인 MSSA 균주 중에서는 *erm(C)* 유전자 (8/14, 57%)가 가장 흔하게 검출되었다. 이에 반하여 *erm(B)*, *msr(A)*, *mef(A)*, *ere(A)/ere(B)* 유전자 등은 거의 혹은 전혀 검출되지 않았다. Streptogramin A 항균제에 대한 내성을 매개하는 *vgb*, *vgb(B)*, *vat(A)*, *vat(B)*, *vga(A)* *vga(B)* 등의 유전자는 하나도 발견되지 않았다.

V. 연구개발결과의 활용계획

국내에서 분리되는 황색포도구균의 내성양상을 파악하고 내성기전을 추정할 수 있으며, 황색포도구균 감염증이 발생한 경우 적절한 항균제를 선택함으로써 환자의 치료에 크게 도움이 될 것이다. MLS 항균제의 교차내성률 및 내성기전을 파악함으로써 quinupristin/dalfopristin 항균제를 중증 감염증의 치료를 위해 사용하는 경우 효과와 내성발현 여부를 예측할 수 있다.

한편, 본 연구에서 제시한 자료를 바탕으로 새로운 작용기전을 가진 항균물질을 개발하거나 기존에 개발된 항균제의 유용성을 예측하는 데 도움을 줄 수 있으리라 기대한다.

S U M M A R Y

(영 문 요약 문)

Staphylococcus aureus, one of the most frequently isolated pathogens in both hospitals and the community, has been particularly efficient at developing resistance to antimicrobials. As methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) has prevailed and furthermore as *S. aureus* with reduced susceptibility to vancomycin has emerged, the therapeutic options for treatment of *S. aureus* infections have become limited. In addition, genes conferring resistance to one of the macrolide-lincosamide-streptogramin (MLS) antibiotics may confer cross-resistance to others, because they have similar effects on bacterial protein synthesis. To update the current status of antibiotic resistance, clinical *S. aureus* isolates were collected from eight university-affiliated hospitals from June 1999 to January 2001. And also we investigated the frequency of MLS resistance in erythromycin-resistant *S. aureus* isolates. 682 isolates of *S. aureus* were collected in a nationwide antibiotic resistance survey. Susceptibility tests against 27 antibiotics were performed by the disk diffusion method. Among a total of 682 isolates, the methicillin resistance rate was 64% (439/682) and most of the MRSA were resistant to multiple classes of antibiotics. 518 strains were erythromycin-resistant. 37% of the MSSA and 97% of the MRSA isolates were resistant to at least one of the MLS antibiotics whereas all were susceptible to quinupristin/dalfopristin. Rifampin, fusidic acid, trimethoprim/sulfamethoxazole, and arbekacin showed superior *in vitro* activity than the other antibiotics against MRSA. There were no strains with reduced susceptibility to vancomycin. 60 clindamycin-susceptible (30 MSSA, 30 MRSA) and 44 clindamycin-resistant isolates (14 MSSA, 30 MRSA) were selected at random from these strains, and 13 genes related to MLS resistance were detected in these isolates by the polymerase chain reaction. Of the 104 MSSA and MRSA strains tested, 98 harbored one or more *erm* gene. The most common was *erm(A)*, with *erm(C)* next *msr(A)*, *lnu(A)*, and *mef(A)* were rare and no resistance to streptogramin A was encountered. Data generated from this nationwide study could give valuable information for the selection of therapeutic alternatives.

여 백

목 차

제 1 장 서론	103
제 2 장 국내외 기술개발 현황	105
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	107
제 4장 연구개발목표 달성도 및 기대효과	115
제 5 장 참고문헌	117

여 백

C O N T E N T S

(영 문 목 차)

Ch 1. Introduction	103
Ch 2. Current Situations	105
Ch 3. Methods & Results	107
Ch 4. Accomplishments & Effects	115
Ch 5. Reference	117

여 백

제 1 장 서론

페니실린은 인류가 개발한 20세기 최대의 발명품이다. 페니실린이 개발됨으로써 그 동안 인류를 끊임없이 괴롭혀 온 세균성 감염질환의 공포로부터 벗어날 수 있게 되었다. 그러나, 처음에는 페니실린에 잘 듣던 세균들은 점차 내성을 띄게 되었다. 예를 들면, 포도구균의 50%는 불과 페니실린이 도입된 지 10년이 못되어 페니실린에 내성을 나타내게 되었으며, 이제 페니실린으로 치료할 수 있는 포도구균은 1%도 되지 못한다. 페니실린에 내성인 포도구균은 페니실린을 분해하는 효소를 생산하여 페니실린을 파괴함으로써 내성을 나타낸다. 이런 페니실린분해 효소를 생산하는 포도구균은 페니실린분해효소에 파괴되지 않는 페니실린(메티실린계 항균제)을 개발함으로써 치료가 가능하게 되었다.¹⁾ 그러나, 불행하게도 포도구균은 다시 메티실린에 대한 내성을 획득하게 되었으며,²⁾ 인류는 다시 메티실린에 내성인 포도구균을 치료할 수 있는 반코마이신을 개발하였다.

이러한 항균제 내성의 문제는 비단 포도구균에만 국한된 문제는 아니다. 지난 50년 동안의 항균제 개발사는 ‘인류의 항균제 개발’ 對 ‘세균의 내성 획득’ 사이에 끊임없는 경쟁의 역사라고 할 수 있을 것이다. 지난 50년 동안에는 인류 對 세균의 경쟁에서 인류가 항상 한발 앞서는 듯 하였다. 그러나 지난 몇 년 동안에 대두된 내성균 문제는 이제 이 경쟁에서 인류가 뒤지기 시작하였다는 것을 여실히 보여준다. 포도구균에 대한 치료에 있어서 최후의 보루라고 할 수 있는 반코마이신에 내성을 보이는 포도구균이 일본과 미국에서 출현하였으며,³⁻⁵⁾ 인류는 아직 이 균에 대한 치료제를 가지고 있지 않다. 페니실린에 내성인 폐구균, 반코마이신에 내성인 장구균, 그리고 여러 가지 세팔로스포린에 내성인 Klebsiella 등도 내성균이 등장하여 치료하기 어렵게 된 세균들이다. 만일에 반코마이신 내성 포도구균이 만연하게 된다면 인류는 다시 1940년대 이전의 시대, 즉 항균제가 없었던 시대로 되돌아가게 될 것이라는 우려의 목소리가 높다.

따라서, 본 연구에서는 국내 임상검체에서 분리된 황색포도구균을 대상으로 항균제 내성률을 알아보고 이를 바탕으로 메티실린내성균, 나아가서는 반코마이신에 감수성이 저하된 균주에서 경험적으로 사용할 수 있는 적절한 대체 항균제로 어떠한 것들이 가능한 지를 알아보고자 하였다. 또한, 새로 개발된 항균제가 내성균의 치료에 유효할 것인지를 평가하기 위하여 시험관내 감수성 검사를 시행하였다. 특히, 기존에 사용하던 항균제에 대한 내성을 가진 그람양성균에 효과가 있다고 알려진 새로운 약들이 국내에 도입되면서 quinupristin/dalfopristin, linezolid 등과 같이 반코마이신내성 장구균을 비롯한 그람양성균 감염증에 효과가 있는 것으로 입증된 항균제들이 사용가능하게 되었다. 하지만, 이미 국내 가축 등에서 분리된 반코마이신 내성 장구균 등에서는 quinupristin/dalfopristin에 내성을 나타내는 균주도 검출되고 있기 때문에 비슷한 작용기전을 가지고 있으며 교차내성이 생길 수 있는 macrolide, lincosamide 항균제

⁶⁻⁸⁾에 대한 감수성결과를 바탕으로 quinupristin/dalfopristin의 유용성에 대해 검토하고자 하였다. 또한, 이들 항균제에 대한 내성을 매개하는 유전자의 분포를 확인하여 국내에서 분리되는 황색포도구균에서 새로운 항균제에 대한 내성유전자가 광범위하게 분포하고 있는 지 확인하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

황색포도구균을 비롯한 각종 병원성 세균에 대한 내성률 자료는 각 병원별로, 혹은 일부 2·3차병원을 중심으로 어느 정도 알려져 있다. 하지만, 각 병원별로 감수성 시험을 하는 항균제의 종류가 다양하고 검사법이 표준화되어 있지 않으며 한 환자에서 분리된 여러 균주의 자료가 동시에 포함되어 있기 때문에 정확한 자료를 산출하기 어렵다. 따라서, 본 연구에서는 일정기간동안 전국 8개 대학병원에서 분리된 황색포도구균 100여 균주를 수집하였으며 한 환자로부터 분리된 균주가 여럿인 경우에는 한 균주만을 연구에 포함시켰다. 또한, 감염증의 치료를 위해 사용할 수 있는 항균제를 가능한 한 모두 포함하여 검사를 시행하였고, 이를 바탕으로 유용하게 사용할 수 있는 항균제를 파악함으로써 경험적 치료를 위한 근거를 마련하였다.

전세계적으로 항균제 내성률, 특히 메티실린 내성률이 매우 높은 편에 속하는 우리나라에서 각종 항균제에 대한 내성률을 확인할 수 있을 뿐만 아니라 표현형에 따라 내성기전을 유추할 수 있기 때문에 이를 바탕으로 새로운 항균제를 개발하거나 사용할 때 도움이 될 것으로 생각한다. 또한, 최근들어 메티실린 내성균, 나아가 반코마이신에 내성인 황색포도구균의 치료를 위해 사용할 수 있는 항균제의 개발 및 발견에 관심이 높아지고 있다. 하지만, 새로운 항균제가 도입된다 하더라도 기존의 항균제와 교차내성을 가진다면 효용성을 기대할 수 없기 때문에 이를 매개하는 내성기전 및 내성유전자를 확인하여 효과를 예측할 수 있고 나아가 새로운 기전의 항균제를 개발하는 데 도움이 될 것으로 생각한다.

여 백

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구방법

1. 대상균주

1999년 6월부터 2001년 1월까지 8개 대학병원에서 각각 일정한 기간동안 분리된 황색포도구균 100여 균주씩을 수집하였다. 한 환자에서 연속하여 분리된 경우에는 한 균주에 대해서만 실험을 시행하였다. 수집된 균주들은 모두 catalase, coagulase 등의 검사를 다시 시행하여 *S. aureus* 균종임을 확인하였다.

2. 항균제 감수성 검사^{9,10)}

총 27개의 항균제에 대한 항균제 감수성 검사를 원판확산법으로 시행하였다. 억제대의 크기에 따른 감수성 여부는 NCCLS 지침에 따라 판정하였으며, NCCLS 기준이 없는 항균제 (SM, NEO, ABK 등)에 대해서는 제조회사의 기준에 따랐다. 내성률은 전체 균주중에서 중등도 내성 (intermediate)을 나타낸 균주와 내성 (resistant)인 균주의 비율로 하였다.

최소억제농도는 NCCLS에서 추천하는 microbroth dilution 방법에 따라 측정하였다.

3. 내성유전자 검색¹¹⁻¹³⁾

일부 균주를 대상으로 MLSb 교차내성 및 streptogramin 내성과 관련된 것으로 알려진 13개의 유전자 (*erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *msr(A)*, *mef(A)*, *ere(A)*, *ere(B)*, *lnu(A)*, *vgb*, *vat(A)*, *vat(B)*, *vga(A)*, and *vga(B)*)를 PCR법으로 검출하였다. 각각의 유전자에 대한 표준균주는 Joyce Sutcliffe (*S. aureus* RN1389, *S. pyogenes* AC1 (pAC1)-02C1061, *S. aureus* RN4220 (pE194), *S. aureus* RN4220 (pAT10), *S. pneumoniae* 02J1175), Gerard Lina (*S. aureus* HM1055, *S. aureus* CR580(Tn1545), *S. aureus* HM290-1, *S. aureus* RN4220, *S. haemolyticus* BM4610/*S. aureus* BM4611, *S. aureus* BM3002, *S. aureus* N950736), Nevine El Solh (*S. aureus* BM3093-pIP680, *S. aureus*-pIP1633), Patrice Courvalin (*E. coli* BN2195, *E. coli* BN2570) 등으로부터 분양받아 사용하였다. 각 유전자별 primer sequence, reaction cycle, 표준균주 등은 표 1과 같다.

표 1. Primer sequences, PCR conditions and control strains used for the detection of MLS resistance determinants

Target genes	Primer sequences	Product (bps)	Number of cycles (conditions)	Control strains
<i>erm(A)</i>	5' GTT CAA GAA CAA TCA ATA CAG AG 3' 5' GGA TCA GGA AAA GGA CAT TTT AC 3'	421	30(30 s at 94 °C 30 s at 52 °C 1 min at 72 °C)	<i>S. aureus</i> HM1055 <i>S. aureus</i> RN1389

	5' TCT AAA AAG CAT GTA AAA GAA 3' 3' TGA TTA TAA TTA TTT GAT AGC TTC 5'	645	35(1 min at 93°C 1 min at 52°C 1 min at 72°C)	
<i>erm(B)</i>	5' CCG TTT ACG AAA TTG GAA CAG GTA AAG GGC 3' 5' GAA TCG AGA CTT GAG TGT GC 3'	359	30(30 s at 94 °C 30 s at 55 °C 1 min at 72°C)	<i>S. aureus</i> CR580 <i>S.</i> <i>pyogenes</i> AC1(pAC1)–02C1061
	5' GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA 3' 5' AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC 3'	639	35(1 min at 93°C 1 min at 52°C 1 min at 72°C)	
<i>erm(C)</i>	5' GCT AAT ATT GTT TAA ATC GTC AAT TCC 3' 5' GGA TCA GGA AAA GGA CAT TTT AC3'	572	30(30 s at 94 °C 30 s at 52 °C 1 min at 72 °C)	<i>S. aureus</i> HM290-1 <i>S. aureus</i> RN4220 (pE194)
	5' TCA AAA CAT AAT ATA GAT AAA 3' 5' GCT AAT ATT GTT TAA ATC GTC AAT 3'	642	35(1 min at 93°C 1 min at 52°C 1 min at 72°C)	
<i>msr(A)</i>	5' GCA AAT GGT GTA GGT AAG ACA ACT 3' 5' ATC ATG TGA TGT AAA CAA AAT 3'	399	35(1 min at 93°C 1 min at 52°C 1 min at 72°C)	<i>S. aureus</i> RN4220 (pUL5054)
	5' GGC ACA ATA AGA GTG TTT AAA GG 3' 5' AAG TTA TAT CAT GAA TAG ATT GTC CTG TT 3'	940	25(1 min at 94°C 1 min at 50°C 90 s at 72°C)	<i>S. aureus</i> RN4220(p AT10)
	5' TAT GAT ATC CAT AAT AAT TAT CCA ATC 3' 5' AAG TTA TAT CAT GAA TAG ATT GTC CTG TT 3'	595	25(1 min at 94°C 1 min at 50°C 90 s at 72°C)	
<i>ere(A)</i>	5' AAC ACC CTG AAC CCA AGG GAG G 3' 5' CTT CAC ATC CGG ATT CGC TCG A 3'	420	30(1 min at 94°C 1 min at 54°C 1 min at 72°C)	<i>E.coli</i> Bn2195
<i>ere(B)</i>	5' AGA AAT GGA GGT TCA TAC TTA CCA 3' 5' CAT ATA ATC ATC ACC AAT GGC A 3'	546	30(1 min at 94°C 1 min at 54°C 1 min at 72°C)	<i>E.coli</i> Bn2570
<i>mef(A)</i>	5' AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC 3' 5' TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG 3'	348	30(90 s at 93°C 90 s at 52°C 90 s at 72°C)	<i>S.</i> <i>pneumoniae</i> 02J1175
<i>vga(A)</i>	5' CCA GAA CTG CTA TTA GCA GAT GAA 3' 5' AAG TTC GTT TCT CTT TTC GAC G 3'	470	30(30 s at 94°C 30 s at 54°C 1 min at 72°C)	<i>S. aureus</i> BM3002
<i>vgb</i>	5' ACT AAC CAA GAT ACA GGA CC 3' 5' TTA TTG CTT GTC AGC CTT CC 3'	734	30(1 min at 94°C 1 min at 53°C 2 min at 72°C)	<i>S. aureus</i> BM3093
<i>vat(A)</i>	5' CAA TGA CCA TGG ACC TGA TC 3' 5' CTT CAG CAT TTC GAT ATC TC C 3'	619	30(30 s at 94°C 30 s at 52°C 60 s at 72°C)	<i>S. aureus</i> BM3002 <i>S. aureus</i> BM3093
<i>vat(B)</i>	5' CCC TGA TCC AAA TAG CAT ATA TCC 3' 5' CTA AAT CAG AGC TAC AAA GTG 3'	602	30(30 s at 94°C 30 s at 52°C 60 s at 72°C)	<i>S. aureus</i> N950736 <i>S. aureus</i> BM12235

<i>lnu(A)</i>	5' GGT GGC TGG GGG GTA GAT GTA TTA ACT GG 3' 5' GCT TCT TTT GAA ATA CAT GGT ATT TTT CGA TC 3'	323	30(30 s at 94°C 30 s at 57°C 1 min at 72°C)	<i>S. haemolyticus</i> BM4610 <i>S. aureus</i> BM4611
<i>vga(B)</i>	5' TCT CTC AAT TAG AAG AAC C 3' 5' TTA TCT ATT CGT GTT TCC 3'	348	30(1 min at 94°C ; 1 min at 50 °C 1 min at 72°C)	<i>S. aureus</i> BM12235
<i>16S rRNA</i>	5' GGA ATT CAA A[T/G, 1:1]G AAT TGA CGG GGG C 3' 5' CGG GAT CCC AGG CCC GGG AAC GTA TTC AC 3'	479	30(45 s at 94°C 45 s at 50°C 1 min at 72°C)	-

제 2 절 연구수행 내용 및 결과

1. 내성균주의 수집

총 682균주에 대하여 항균제 감수성 검사를 시행하였다. 각 병원별로 수집된 균주 수는 평균 86 (62-99)주였다. 대상균주가 분리된 임상검체별 비율은 그림 1과 같다. 농양에서 분리된 경우가 199균주 (29%)로 가장 많았으며, 다음으로 객담을 포함한 호흡기분비물 (152균주, 22%), 혈액 (137균주, 20%) 등의 순이었다.

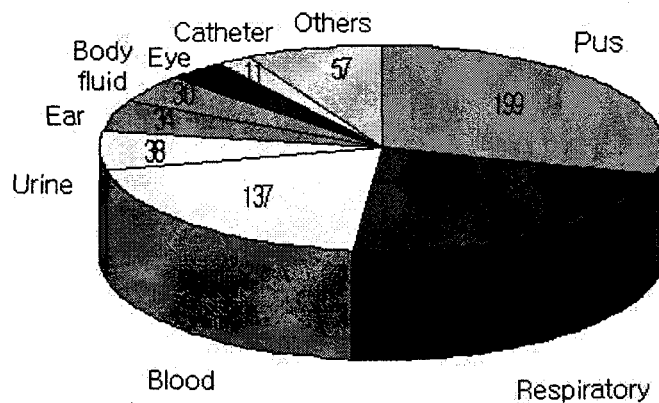


그림 110. Sources of *Staphylococcus aureus* isolates

2. 항균제 감수성 검사

메티실린 내성균주가 64% (439/682)를 차지하였으며, 병원에 따라 55~74%, 검체별로는 48~92%의 분포를 보였다. 각각의 항균제에 대한 내성률은 표 2와 같았다. Vancomycin, teicoplanin, quinupristin/dalfopristin에 내성인 균주는 없었으며, fusidic acid, rifampin, arbekacin, netilmicin, trimethoprim/sulfamethoxazole 등의 항균제가 비교적 항균력이 우수하였다. MRSA 균주의 경우 대개 다제내성을 나타냈다.

㉔ 2. Antibiotic resistance profiles of 243 methicillin-susceptible and 439 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from tertiary hospitals, as determined by disk diffusion.

	MSSA				MRSA			
	S ^a	I ^a	R ^a	Res% ^b	S ^a	I ^a	R ^a	Res% ^b
Penicillin	219	-	24	90.1	0	-	439	100
Amoxicillin/ clavulanic acid	239	-	4	1.6	7	-	432	98.4
Cefazolin	243	0	0	0	10	2	427	97.8
Cefuroxime	238	5	0	2.1	2	13	424	99.6
Cefotaxime	236	5	2	2.9	2	15	422	99.5
Imipenem	243	0	0	0	38	2	399	91.4
Erythromycin	154	32	57	36.7	10	1	428	97.7
Azithromycin	147	39	57	39.5	12	2	425	97.3
Clindamycin	215	16	12	11.5	69	7	363	84.3
Quinupristin/ dalfopristin	243	0	0	0	439	0	0	0
Vancomycin	243	-	-	0	439	-	-	0
Teicoplanin	243	0	0	0	439	0	0	0
Ofloxacin	237	3	3	2.4	27	1	411	93.8
Sparfloxacin	240	0	3	1.2	27	4	408	93.8
Tetracycline	190	9	44	21.8	46	11	382	89.5
Trimethoprim/ sulfamethoxazole	240	2	1	1.2	400	10	29	8.9
Rifampin	241	2	0	0.8	360	23	56	18.0
Fusidic acid	166	1	76	31.7	377	8	54	14.1
Gentamicin	175	0	68	28.0	22	1	416	95.0
Arbekacin	240	2	1	1.2	384	49	6	12.6
Amikacin	215	23	5	11.6	46	69	324	89.5
Tobramycin	173	3	67	28.8	9	0	430	97.9
Streptomycin	134	104	5	44.9	302	99	38	31.3
Neomycin	221	6	16	9.1	163	3	273	62.9
Netilmicin	240	1	2	1.2	362	19	58	17.5
Kanamycin	163	2	78	32.9	7	0	432	98.4

^a The number of isolates; S, susceptible; I, intermediate; R, resistant

^b Res%, resistance rate (calculated by the number of intermediate and resistant isolates over the total number)

8개의 아미노글리코사이드 항균제에 대한 내성률은 그림 2와 같았다. 아미노글리코사이드 항균제 중 적어도 1가지 이상의 항균제에 대하여 내성을 나타낸 균주가 86% (588균주)를 차지하였으며, GM/AMK/TOB/KM에 모두 내성을 나타낸 균주도 MSSA와 MRSA에서 각각 10% (25/243), 88% (386/439)를 차지하였다. Gentamicin 등의 항균제에 비하여 netilmicin이나 arbekacin의 내성률은 낮게 나타났다. 8가지 항균제에 대한 내성유무에 따라 표현형을 나누면

모두 31가지로 구분되었다. 이중 빈도에 따라 몇 가지 형을 중심으로 살펴보면 표 3과 같다.

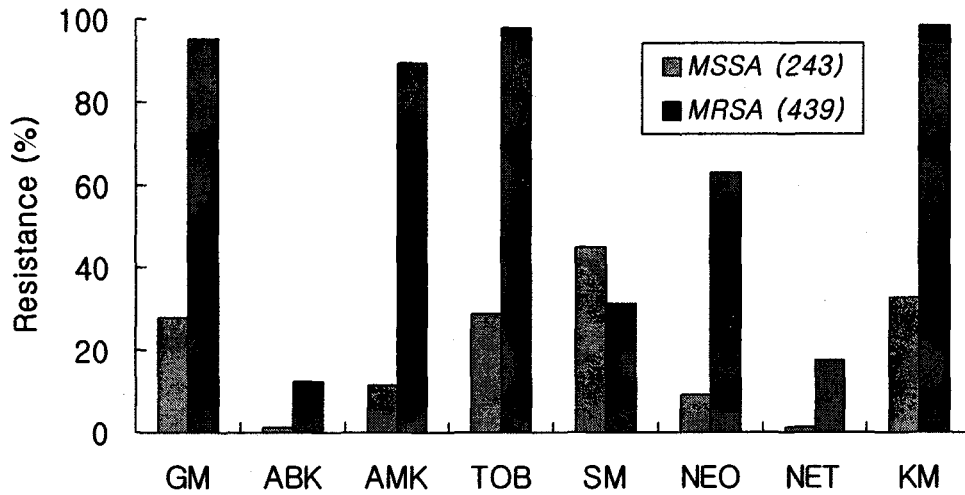


그림 111. Resistance rates against 8 aminoglycoside antibiotics

표 3. Phenotypic resistance patterns against 8 aminoglycosides

	<i>Resistance Patterns</i>								<i>Number of</i>		
	KM	TOB	GM	AMK	NEO	NET	ABK	SM	MSSA	MRSA	Total
1	R	R	R	R	R	S	S	S/R	5	210	215
2	R	R	R	R	S	S	S	S/R	17	99	116
3	S	S	S	S	S	S	S	S	93	1	94
4	S	S	S	S	S	S	S	R	68	5	73
5	R	R	R	S	S/R	S	S	S/R	43	28	71
6	R	R	R	R	S	R	R	S/R	2	33	35
7	R	R	R	R	R	R	R	R	1	21	22
8	R	R	R	R	R	R	S	S/R	0	13	13
9	R	R	R	R	S	R	S	S/R	0	10	10
10	R	R	R	R	R	S	R	R	0	1	1
11	other patterns								14	18	32
Total									243	439	682

58균주 (MSSA 3균주, MRSA 55균주)는 아베카신에 중등도 내성 (51균주) 혹은 내성 (7균주)을 나타냈다. 2균주에서 아베카신의 최소억제농도가 2~4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 측정되었으며, 나머지 균주들에서는 8~128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 분포를 보였다.(그림 3)

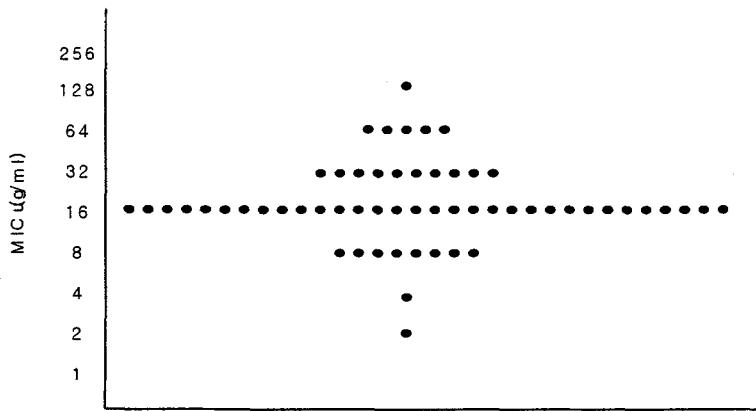


그림 112. Distribution of arbekacin MICs for 58 isolates

3. MLS 항균제 내성의 표현형 분류

리보솜에 작용하여 단백질합성을 저해하는 공통적인 작용기전을 갖는 MLS_b 항균제는 서로 교차내성을 보이는 것으로 알려져 있다. MSSA 균주의 37% (89/243), MRSA 균주의 97% (429/439)가 MLS_b 내성이었다. 이들 내성 균주는 모두 quinupristin/dalfopristin에 감수성이었다. 하지만, MLS_b 내성균주중 구성형 (constitutive) 내성률은 MSSA에서 9% (21/243), MRSA에서 83% (367/439)였다. (표 4)

표 4. Phenotypic prevalence of MLS_b resistance

	MSSA	MRSA	Remarks
EM(R) CLM(S)	68 (28%)	62 (14%)	Inducible
EM(R) CLM(R)	21 (9%)	367 (83%)	Constitutive
EM(S) CLM(R)	7 (3%)	3 (1%)	
EM(S) CLM(S)	147 (60%)	7 (2%)	
Total	243	439	

4. 내성유전자 검출

유도형 및 구성형 내성을 보인 erythromycin 내성균주 중 MSSA 44균주, MRSA 60균주를 무작위로 추출하였다. 또한, erythromycin 감수성인 10균주를 대조균으로 추출하여 PCR을 시행하였다. Erythromycin에 내성인 104균주 중 MRSA 55균주 (92%), MSSA 20균주 (45%)에서 *erm*(A) 유전자가 검출되었다. 하지만, 표현형과 메티실린 내성에 따라 분류하였을 때 구성형 내성을 보인 MSSA 균주 중에서는 *erm*(C) 유전자 (8/14, 57%)가 가장 흔하게 검출되었다. 이에 반하여 *erm*(B) 유전자는 거의 검출되지 않았다. Efflux에 의해 내성을 매개하는 *msr*(A) 유전자는 MSSA 균주에서 주로 분리된 반면 (7/44, 16%), *mef*(A) 유전자는 MRSA 1균주에서만 발견되었다. Macrolide-inactivating enzyme을 생성하는 *ere*(A)/*ere*(B) 유전자는 전혀 검출되지 않았다. 하지만, streptogramin A 항균제에 대한 내성을 매개하는 *vgb*, *vgb*(B), *vat*(A),

vat(B), *vga(A)* *vga(B)* 등의 유전자는 하나도 발견되지 않았다. 표현형에 따른 유전자의 분포는 표 5와 같다.

표 5. Distribution of genes conferring resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin in 114 *S. aureus* isolates, by phenotype and methicillin resistance

Genes	MSSA		MRSA	
	Inducible	Constitutive	Inducible	Constitutive
<i>ermA</i>	13	5	24	26
<i>ermA</i> + <i>ermB</i>	1	-	1	-
<i>ermA</i> + <i>ermC</i>	-	-	1	2
<i>ermA</i> + <i>mefA</i>	-	-	-	1
<i>ermA</i> + <i>msrA</i> + <i>lnuA</i>	1	-	-	-
<i>ermC</i>	9	8	3	-
<i>ermC</i> + <i>lnuA</i>	-	-	1	1
<i>ermB</i>	1	-	-	-
<i>msrA</i>	4	1	-	-
<i>msrA</i> + <i>lnuA</i>	1	-	-	-
Total	30	14	30	30

여 백

제 4장 연구개발목표 달성도 및 기대효과

전국적으로 국내 8개 대학병원으로부터 임상검체에서 분리된 황색포도구균을 수집하였다. 800여 균주 중 한 환자로부터 분리된 동일한 균주를 제외한 682균주에 대해 항균제 감수성 검사를 시행하였다.

감염증의 치료를 위해 사용가능한 항균제 중 27개의 항균제를 선별하여 감수성 검사를 시행하였다. 황색포도구균 (*Staphylococcus aureus*)은 모든 연령에 걸쳐 다양한 감염증-피부 및 연조직 감염, 골관절염 뿐만 아니라 카테터관련 감염증, 균혈증, 심내막염 등의 침습성 감염증-과독소매개 증후군을 유발하는 중요한 병원균이다. 따라서, 이처럼 임상적으로 중요한 황색포도구균의 치료를 위해 사용가능한 거의 모든 항균제에 대해 내성률을 보고한 적은 거의 없으며, 국내 분리균주의 내성양상을 파악하고 내성기전을 추정하는 데 큰 도움이 될 것이다. 또한, 황색포도구균 감염증이 발생한 경우 적절한 항균제를 선택함으로써 환자의 치료에 크게 도움이 될 것이라 생각한다.

또한, 현재 국내에 도입되어 사용하고 있는 quinupristin/dalfopristin 항균제의 항균력을 예측하고 평가하기 위하여 단순히 내성률만을 파악한 것이 아니라 내성의 표현형에 따라 내성을 매개하는 유전자의 분포를 확인하였다. 따라서, 이를 바탕으로 중증 감염증의 치료를 위해 사용하는 경우 효과와 내성발현 여부를 예측할 수 있다.

한편, 본 연구에서 제시한 자료를 바탕으로 새로운 작용기전을 가진 항균물질을 개발하거나 기존에 개발된 항균제의 유용성을 예측하는 데 도움을 줄 수 있으리라 기대한다.

여 백

제 6 장 참고문헌

1. Lowy, F. D. (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine* **339**, 520-532.
2. Jevons, M. P. (1961). "Celbenin"-resistant staphylococci. *British Medical Journal* **1**, 124-6.
3. Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T., & Tenover, F. C. (1997) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **40**, 135-136.
4. Tenover, F. C, Biddle, J. W., & Lancaster, M. V. (2001) Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases* **7**, 327-332.
5. Centers for Disease Control and Prevention. (2002) *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States, 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **51**, 565-567.
6. Leclercq, R., & Courvalin, P. (1991) Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**, 1267-1272.
7. Hansen, J. L., Ippolito, J. A., Ban, N., Nissen, P., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2002) The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Molecular Cell* **10**, 117-128.
8. Schlunzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., *et al.* (2001) Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* **413**, 814-821.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2000). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically-Fifth Edition: Approved Standard M7-A5*. NCCLS, Wayne, PA.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2000). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests-Seventh Edition: Approved Standard M2-A7*. NCCLS, Wayne, PA.
11. Lina, G., Quaglia, A., Reverdy, M. E., Leclercq, R., Vandenesch, F., & Etienne, J. (1999) Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 1062-1066.

12. Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-kamradt, A., & Wondrack, L. (1996) Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 2562-2566.
13. Werner, G., Cuny, C., Schmitz, F. J., & Witte, W. (2001) Methicillin-Resistant, quinupristin-dalfopristin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced sensitivity to glycopeptides. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 3586-3590.

위탁연구 II

신규 중간체로서의 새로운 5고리 화합물 합성

2003. 6. 30.

연구 기관: 서울대학교 약학대학

연구책임자: 천 문 우

여 백

제 1장 서론(연구개발의 목적 및 필요성)

Cephalosporin계의 우수한 항균력을 갖는 항생제의 개발은 주로 semi synthesis에 의한 3' 위치에 치환할 중간체의 합성에 의존한다고 할 수 있다. 대표적인 4세대 항생제로 분류되는 cefirome의 개발은 중간체로 pyridine 유도체인 2,3-cyclopentenopyridine의 개발로 가능했고 Lucky에서는 pyridine유도체들의 개발에 성공 하였기에 신의약 합성을 가능케 하였다. 본 연구실에서는 이러한 점에 착안하여 그 동안 학문적으로만 개발하여 오던 5 and/or 6 헥테로고리 화합물의 합성방법을 이용하여 중간체로 적당한 물질을 검색, 합성하고자 한다. 또한 본 연구실에서는 수년간에 걸쳐 5 헥테로고리 화합물 합성 연구로 기술이 축적되어 있으며 현재도 계속 수행중이다. 또한 현재 4세대 항생제로 불리는 cefa계 항생제들은 실험실내에서의 합성은 가능하지만 대량 합성의 기술 문제도 다 해결이 되어있지 않은 상태이며, 임상 실험에서는 생체내에 작용하는 독성, 정확한 약리 작용 및 지속력등의 결과가 정확히 조사되어 있지 않은 상태다. 그러므로 국내 각 분야에서 독립적으로 개발되어온 합성 방법과 약리적 조사방법 및 축합 방법을 조율하는 interdisciplinary를 통하면 학계 및 연구소와 산업체가 공동보조로 세계적으로 뒤떨어지지 않는 신약을 빠른 시일 내에 발명이 가능 할 것으로 기대된다.

여 백

제 2장 국내외 기술개발 현황

Cephalosporin계 항생제는 타항생제에 비하여 비교적 넓은 항균 범위를 갖고, 또한 부작용이 적을 뿐 아니라 높은 항균력을 갖기 때문에 세계적으로도 그 시장 규모가 크다. 이런 장점으로 시장 규모는 계속 확대될 전망이다. 하지만 우리 나라에서 사용되는 대부분 cefa계 항생제는 수입에 의존하고 있는 실정이다. 장기적으로 국내에서도 기술 축적이 선행되어야만 국제 항생제 시장에서 살아남을 수 있고, 전략적으로 국제 경쟁력을 갖출 수 있다.

제 3장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1절 연구개발 목표

Cephalosporin계의 우수한 항균력을 갖는 항생제의 개발은 주로 semi synthesis에 의한 3' 위치에 치환할 중간체의 합성이 중요한 과정이라 할 수 있다. 4-thioarabitol ring 및 ribitol ring을 가진 3급 amine 유도체를 3' 위치에 도입할 새로운 중간체로 합성한다. 즉 4-thioarabitol 및 ribose ring의 4위치에 dimethylamino 및 diethylamino group을 가진 새로운 형태의 5고리 화합물을 합성한다.

제 2절 연구방법

- 가. D-xylose를 출발 물질로 하여 중간체인 bicyclic 유도체(scheme 1 의 5)를 얻고 이로부터 thioarabitol 유도체를 얻는다.
- 나. Thioarabitol로부터 수과정을 거쳐 thioarabitol, ring의 5번 위치의 hydroxyl group을 3급 amine으로 변환 시킨다.
- 다. D-ribose를 출발물질로 하여 1 위의 hydroxyl group을 없앤 ribitol 유도체를 얻고 수과정을 거쳐 5번 위치의 hydroxyl group을 3급 amine으로 변환시킨다.

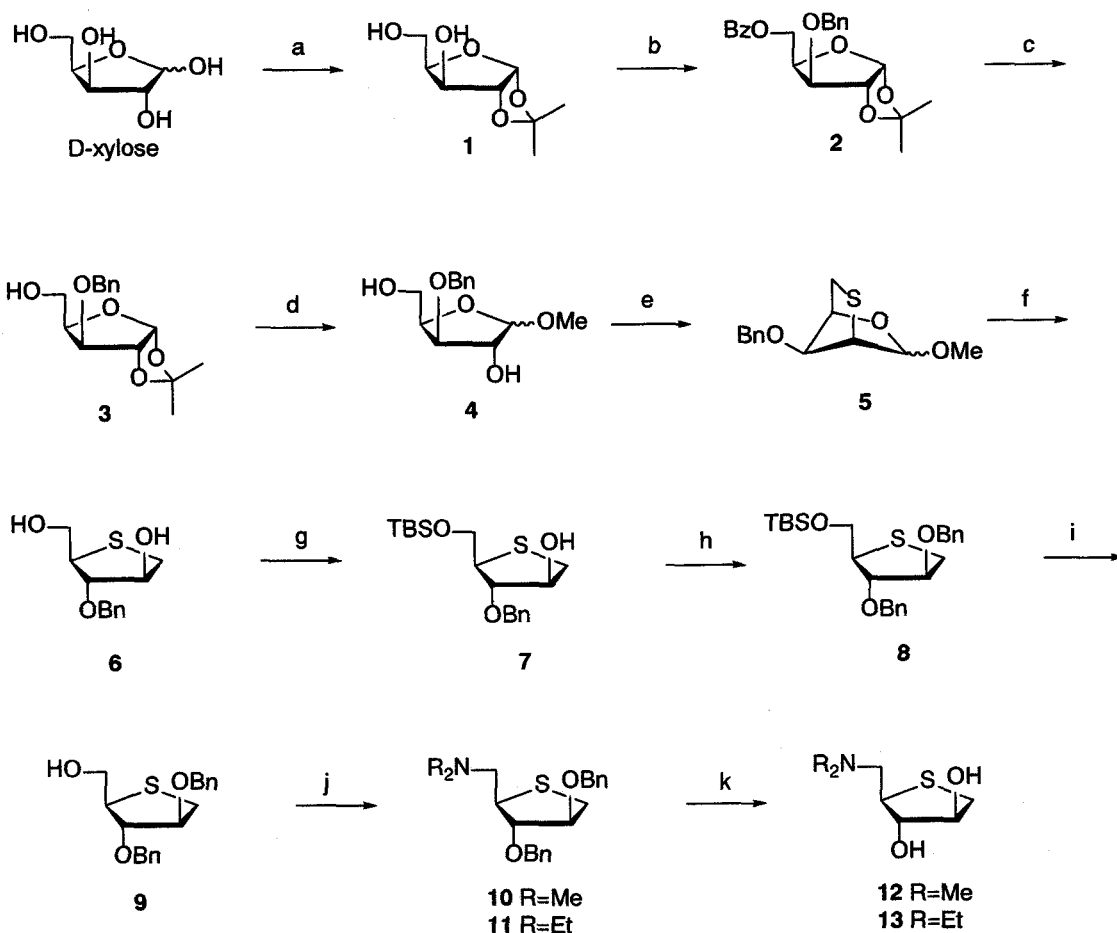
제 3절 연구개발 수행내용 및 결과

가. D-xylose의 1,2 위치를 acetonide형으로 보호하고 benzoyl 및 benzyl화 하여 5번 위치의 benzoyl group을 제거한 후 thiobicyclic 유도체를 얻어 환원하여 thioarabitol 유도체를 얻었다.

나. 상기 thioarabitol 유도체로부터 수과정에 의해 3급 amine을 얻었다.

다. D-ribose의 1번 위치를 methoxy, 2, 3번을 acetonide 5번 위치를 benzoyl화 한 후 2, 3번 위치를 deprotection, 이것을 환원하여 ribitol 유도체를 얻고 수과정에 걸쳐 ribitol의 3급 amine 유도체를 얻었다.

Scheme



a) i. acetone, copper sulfate, c-H₂SO₄ ii. 0.1N HCl, 80%; b) i. BzCl, TEA, CH₂Cl₂, -15°C, ii. BnBr, NaH, TBAI, THF, 85%; c) NaOMe, MeOH/CH₂Cl₂, 97%; d) 5% HCl/MeOH, 95%; e) i. MsCl, pyridine, ii. Na₂S·9H₂O, DMF, 100°C, 78%; f) i. 4M HCl, THF, ii. NaBH₄, 90%; g) TBDMSCl, imidazole, DMF, 93%; h) BnBr, NaH, TBAI, THF, 85%; i) TBAF, THF, 95%; j) i. Tf₂O, Et₃N, CH₂Cl₂, ii. R₂NH, CH₂Cl₂, R=Me(60%), Et(63%); k) BBr₃, CH₂Cl₂ 12(80%), 13(83%)

화합물 1의 합성

D-Xylose (25g, 166.52mmol) 및 무수 copper sulfate (25g)에 무수 acetone (700ml)를 가한 후 c-H₂SO₄ (3ml)를 가하였다. 상온에서 24시간 저온 후 silver carbonate (5g)를 가하여 중화하였다. 용매를 제거한 후 THF (600ml)를가하여 녹인 후 0.1 N HCl (50ml)를 가한

후 상온에서 6시간 저었다. 여기에 saturated NaHCO₃ 용액을 가한 후 유기층을 추출하고 무수 MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 제거하고 얻은 잔사를 silica gel column chromatography (hexane:ethyl acetate= 1:1)법으로 분리하여 기름모양의 화합물 1 (25g, 80%)를 얻었다.

화합물 2의 합성

화합물 1 (20g, 105.16mmol)에 무수 CH₂Cl₂ (500ml)를 가하여 녹인 후, Et₃N (44ml, 315.47mmol) 및 benzoyl chloride (13.4ml, 115.67mmol)를 -15℃에서 가하였다. 같은 온도에서 4시간 저어준 후 ice-water (500ml)를 가한 후 유기층을 추출하고 saturated NaHCO₃ 용액으로 씻어주었다. 유기층을 무수 MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 제거하고 얻은 잔사를 무수 THF (500ml)를 가하여 녹인 후, 0℃에서 TBAI (5g) 및 NaH (60% dispersion in mineral oil, 4.62g, 115.67mmol)에 무수 THF (300ml)를 가하여 얻은 suspension에 서서히 가하였다. 같은 온도에서 1시간 저은 후 benzyl bromide (14ml, 115.67mmol)를 서서히 가하였다. 5시간 저은 후 ice-water (500ml)를 가한 후 유기층을 추출하고 saturated NaHCO₃ 용액으로 씻어주었다. 유기층을 무수 MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 제거하고 얻은 잔사를 silica gel column chromatography(hexane:ethyl acetate= 10:1)법으로 분리하여 기름모양의 화합물 2 (32g, 80%)를 얻었다.

화합물 3의 합성

화합물 2 (5g, 13.01mmol)에 MeOH (60ml)를 가하여 녹인 후 cat. NaOMe를 가하였다. 상온에서 1시간 저은 후 용매를 제거하여 얻은 잔사를 silica gel column chromatography (hexane:ethyl acetate= 4:1)법으로 분리하여 기름모양의 화합물 3 (3.84g, 97%)을 얻었다.

화합물 4의 합성

화합물 3 (3.84g, 12.62mmol)에 5% HCl (in MeOH, 60ml)을 가하여 녹인 후 상온에서 12시간 저었다. 용매를 제거하여 얻은 잔사를 silica gel column chromatography (hexane:ethyl acetate= 1:1)법으로 분리하여 기름모양의 화합물 4 (3.05g, 95%)를 얻었다.

화합물 5의 합성

화합물 4 (6.13g, 24.1mmol)에 무수 pyridine (60ml)를 가하여 녹인 후, MsCl (5.60ml, 72.4mmol)을 가하고 상온에서 1시간 저었다. 여기에 ice-water (10ml)를 가한 후 용매를 제거하여 얻은 잔사를 EtOAc (50ml)를 가하여 녹인 후 saturated NaHCO₃ 용액으로 씻어주었다. 유기층을 무수 MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 제거하여 기름 모양의 액체를 얻었다. 여기에 무수 DMF (100ml) 및 sodium sulfide (8.68g, 36.2mmol)를 가한 후 100℃에서 1시간 저었다. 용매를 제거하고 얻은 suspension을 EtOAc/water로 추출한 후 유기층을 무수 MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 제거하여 얻은 잔사를 silica gel column chromatography (hexane:ethyl acetate= 5:1)법으로 분리하여 기름모양의 화합물 5 (4.75g, 78%)를 얻었다.

화합물 6의 합성

화합물 5 (9.50g, 37.7mmol)에 THF (300ml) 및 4M HCl (100ml)를 가하여 녹인 후 1시간

저었다. 여기에 saturated NaHCO₃ 용액 및 EtOAc (200ml)를 가한 후 유기층을 추출하였다. 용매를 제거하고 얻은 잔사를 MeOH (100ml)를 가하여 녹인 후 0℃에서 NaBH₄ (1.43g, 37.7mmol)를 가하였다. 같은 온도에서 1시간 저은 후 AcOH를 가하여 중화한 후 celite pad로 여과하였다. 용매를 제거하고 얻은 잔사를 saturated NaHCO₃ 용액 및 EtOAc (200ml)를 가한 후 유기층을 추출하였다. 유기층을 무수 MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 제거하여 얻은 잔사를 silica gel column chromatography (hexane:ethyl acetate= 1:2)법으로 분리하여 기름모양의 화합물 6 (8.18g, 90%)을 얻었다.

화합물 7의 합성

화합물 6 (2.42g, 10.01mmol) 및 imidazole (2.1g, 30.00mmol)을 무수 DMF (50ml)에 녹인 후 0℃에서 TBSCl (1.45g, 15.31mmol)를 가하고 상온에서 15분 저었다. 여기에 cold water (100ml)를 가한 후 EtOAc (100ml×2)를 가하여 유기층을 추출하고 MgSO₄로 건조하였다. 용매를 제거하여 얻은 잔사를 silica gel column chromatography (hexane:ethyl acetate= 10:1)법으로 분리하여 기름모양의 화합물 7 (3.44g, 97%)을 얻었다.

화합물 8의 합성

화합물 7 (1.01g, 2.82mmol)에 무수 THF (50ml)를 가하여 녹인 후, 0℃에서 TBAI (0.5g) 및 NaH (60% dispersion in mineral oil, 0.124g, 3.102mmol)에 무수 THF (30ml)를 가하여 얻은 suspension에 서서히 가하였다. 같은 온도에서 1시간 저은 후 benzyl bromide (0.37ml, 3.102mmol)를 서서히 가하였다. 5시간 저은 후 ice-water (500ml)를 가한 후 유기층을 추출하고 saturated NaHCO₃ 용액으로 씻어주었다. 유기층을 무수 MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 제거하고 얻은 잔사를 silica gel column chromatography (hexane:ethyl acetate= 20:1)법으로 분리하여 기름모양의 화합물 8 (1.17g, 85%)을 얻었다.

화합물 9의 합성

화합물 8 (1.17g, 2.64mmol)에 무수 THF (30ml)를 가하여 녹인 후, TBAF (1M in THF, 2.9ml, 2.9mmol)을 가하여 상온에서 30분 저었다. 용매를 제거하고 얻은 잔사를 silica gel column chromatography (hexane:ethyl acetate= 20:1)법으로 분리하여 기름모양의 화합물 9 (0.83g, 95%)를 얻었다.

화합물 10의 합성

화합물 9 (1.5g, 4.5mmol) 및 Et₃N (1.27ml, 9.08mmol)을 무수 CH₂Cl₂ (30ml)에 녹인 후 0℃에서 trifluoromethanesulfonic anhydride (0.99ml, 5.90mmol)를 가하였다. 같은 온도에서 20분 저은 후 saturated NaHCO₃ 용액을 가한 후 유기층을 추출하고 무수 MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 제거하여 기름모양의 액체를 얻었다. 여기에 무수 CH₂Cl₂ (50ml)를 가하여 녹인 후에 NHMe₂ (2M in THF, 9.07ml, 18.16mmol)를 가하고 상온에서 12시간 저었다. 용매를 제거하고 얻은 잔사를 silica gel column chromatography (hexane:ethyl acetate= 20:1)법으로 분리하여 기름모양의 화합물 10 (0.973g, 60%)을 얻었다.

화합물 11의 합성

화합물 10의 합성법과 같다. 화합물 9 (1.3g, 3.93mmol)로부터 화합물 11 (0.96g, 63%)를 얻었다.

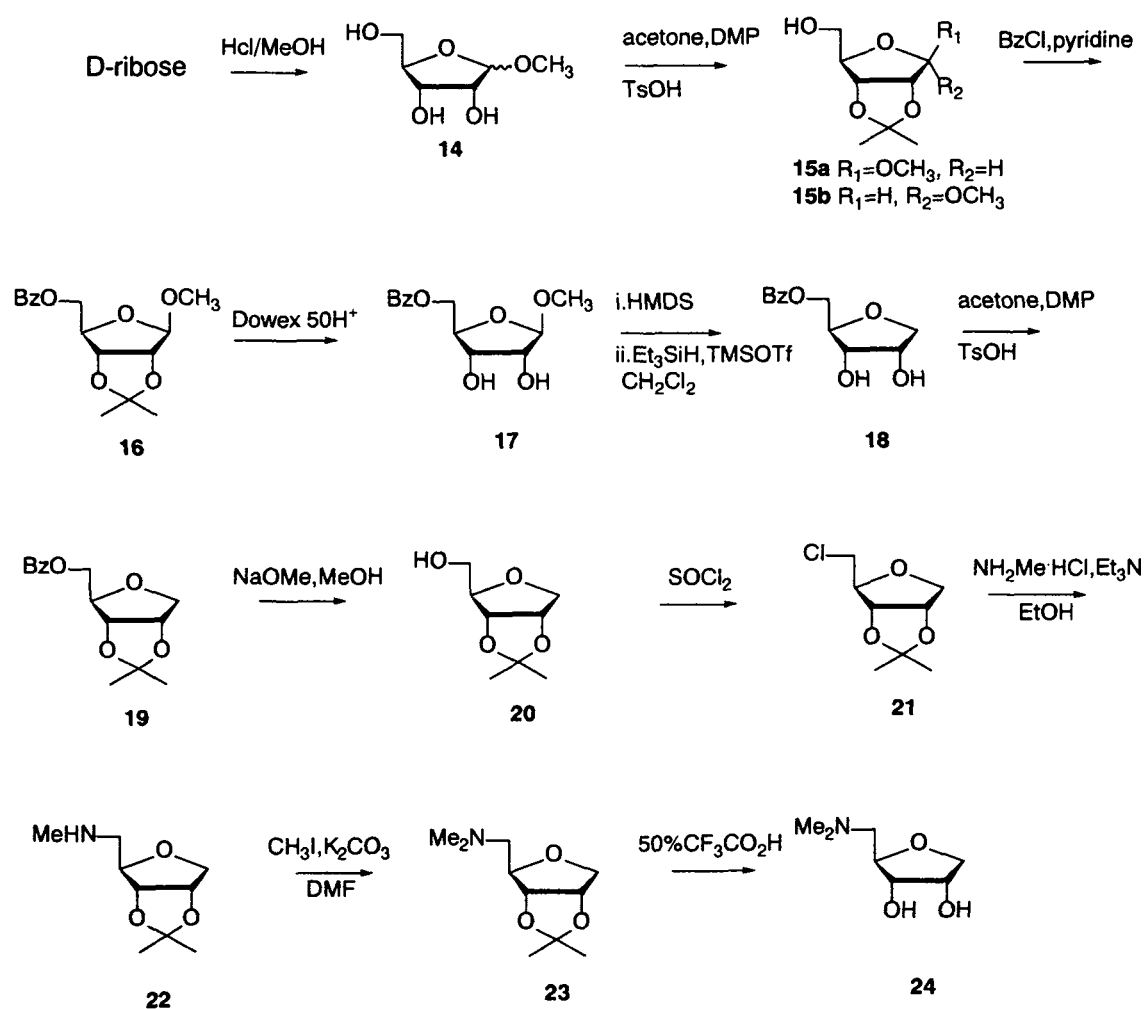
화합물 12의 합성

화합물 10 (0.97g, 2.72mmol)에 무수 CH_2Cl_2 (50ml)를 가하여 녹인 후 -78°C 에서 BBr_3 (1M, 5.4ml, 5.4mmol)를 가하였다. 가X은 온도에서 2시간 저은 후 MeOH (1ml) 및 pyridine (3ml)를 가하고 용매를 제거한 후 얻은 잔사를 silica gel column chromatography (methylene chloride:MeOH= 30:1)법으로 분리하여 화합물 12 (0.39g, 80%)를 얻었다.

화합물 13의 합성

화합물 12의 합성법과 같다. 화합물 11 (0.96g, 2.49mmol)로부터 화합물 13 (0.42g, 83%)을 얻었다.

Scheme



화합물 14의 합성

D-Ribose (2g)을 MeOH (50ml)에 녹이고 MeOH (12ml)에 acetyl chloride (0.8ml)를 녹인

용액을 가하였다. 상온에서 5시간 저어준 후 Et₃N으로 중화하고 용매를 제거한 후 얻은 잔사를 silica gel column chromatography (methylene chloride:MeOH= 7:1)법으로 분리하여 화합물 14 (2.1g)를 얻었다.

화합물 15a 와 15b의 합성

화합물 14 (2.1g)를 acetone(100ml)에 녹이고 TsOH (0.1g)과 DMP (3ml)를 가하고 상온에서 6시간 저어주었다. Et₃N으로 중화하고 용매를 제거한 후 얻은 잔사를 EtOAc 와 water로 추출하였다. 유기층을 무수 MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 제거하고 얻은 잔사를 silica gel column chromatography (hexane:ethyl acetate= 1:1)법으로 분리하여 기름모양의 화합물 15a (2.0g) 과 화합물 15b (0.5g)를 각각 얻었다.

화합물 16의 합성

화합물 15a (2.5g)를 pyridine (15ml)에 녹이고 0℃에서 benzoyl chloride (1.37ml)를 가한 후 상온에서 4시간 저어주었다. 용매를 감압 농축 후 잔사를 EtOAc 와 water로 추출하였다. 유기층을 brine으로 씻고 무수 MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 제거하고 얻은 잔사를 silica gel column chromatography (hexane:ethyl acetate=9:1)법으로 분리하여 기름모양의 화합물 16 (3.4g)을 얻었다.

화합물 17의 합성

화합물 16 (2.6g)을 MeOH (30ml)에 녹이고 Dowex 50H+ resin (0.4g)을 가한 후 3일간 저어주었다. Filtration후 용매를 감압 농축하고 더 이상의 정제 과정 없이 다음 반응으로 진행하였다.

화합물 18의 합성

화합물 17 (1.5g)에 HMDS (15ml)와 ammonium sulfate (10mg)을 가하고 2시간 reflux하였다. HMDS를 제거하고 CH₂Cl₂ (20ml)에 녹이고 Et₃SiH (2.7ml)와 TMSOTf (3.2ml)를 가한 후 3시간 저어주었다. 이것을 saturated NaHCO₃ 용액과 CH₂Cl₂로 추출 후 유기층을 무수 MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 제거하고 얻은 잔사를 silica gel column chromatography (hexane:ethyl acetate=1:1)법으로 분리하여 기름모양의 화합물 18 (1.0g)을 얻었다.

화합물 19의 합성

화합물 18 (2.0g)을 acetone (50ml)에 녹이고 TsOH (0.1g)과 DMP (3ml)를 가하고 상온에서 6시간 저어주었다. Et₃N으로 중화하고 용매를 제거한 후 얻은 잔사를 EtOAc 와 water로 추출하였다. 유기층을 무수 MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 제거하고 얻은 잔사를 silica gel column chromatography (hexane:ethyl acetate= 3:1)법으로 분리하여 기름모양의 화합물 19 (2.2g)를 얻었다.

화합물 20의 합성

화합물 19 (2.2g)를 MeOH (20ml)에 녹이고 28% NaOMe in MeOH (3ml)를 가하고 상온에서 3시간 저어주었다. 용매를 제거하여 얻은 잔사를 silica gel column

chromatography(hexane:ethyl acetate= 2:1)법으로 분리하여 기름모양의 화합물 20 (1.4g)을 얻었다.

화합물 21의 합성

화합물 20 (1.4g)에 thionyl chloride (10ml)를 가하고 3시간 가열하면서 저어주었다. 용매를 감압 농축하여 얻은 잔사에 toluene을 가하고 다시 한번 감압 농축하였다. 이것을 silica gel column chromatography (hexane:ethyl acetate= 4:1)법으로 분리하여 기름모양의 화합물 21 (1.2g)을 얻었다.

화합물 22의 합성

화합물 21 (1.2g)을 EtOH (20ml)에 녹이고 Et₃N (0.85ml) 와 methylamine hydrochloride (0.5g)을 가한 후 50℃에서 6시간 저어 주었다. 용매를 제거한 후 얻은 잔사를 saturated NaHCO₃ 용액과 CH₂Cl₂로 추출 후 유기층을 무수 MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 제거하고 얻은 잔사를 silica gel column chromatography (hexane:ethyl acetate=2:1)법으로 분리하여 기름모양의 화합물 22 (1.0g)를 얻었다.

화합물 23의 합성

화합물 22 (1.0g), potassium carbonate (1.47g)와 methyl iodide(0.7ml)를 무수 DMF (15ml)에 녹이고 상온에서 7시간 저어 주었다. 여기에 EtOAc를 가하고 water, 5% sodium thiosulfate와 brine으로 씻어주고 유기층을 무수 MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 제거하고 얻은 잔사를 silica gel column chromatography (hexane:ethyl acetate=3:1)법으로 분리하여 기름모양의 화합물 23 (0.86g)를 얻었다.

화합물 24의 합성

화합물 23 (0.86g)에 50% CF₃COOH (15ml)를 가하고 상온에서 6시간 저어주었다. 용매를 제거하여 얻은 잔사를 silica gel column chromatography (methylene chloride:MeOH= 10:1)법으로 분리하여 화합물 24 (0.62g)를 얻었다.

여 백

위탁연구 III

조합화학을 통한 Erythromycin 유도체의 합성

2003. 6. 30.

연구 기관: 경희대학교 약학대학

연구책임자: 정 진 현

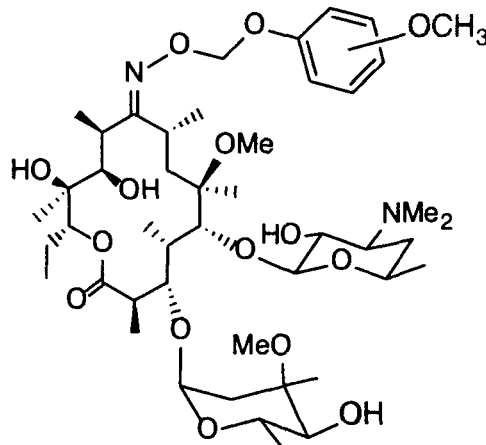
여 백

제 1 장 서 론

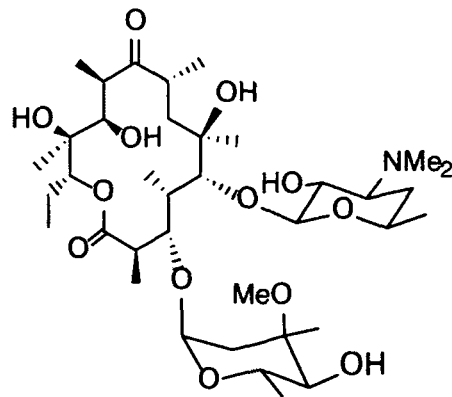
1. 연구 개발의 목적과 필요성

Erythromycin의 임상학적인 이용은 다른 항생제에 비해 적용되는 스펙트럼도 넓고 발효에 의해 다른 항생제에 비해 그리 고가라 할 수 없기 때문에 많이 쓰여왔고 그동안 경구용에 효율적이지 못했던 점만 보안한다면 그의 개발성과는 매우 밝다.

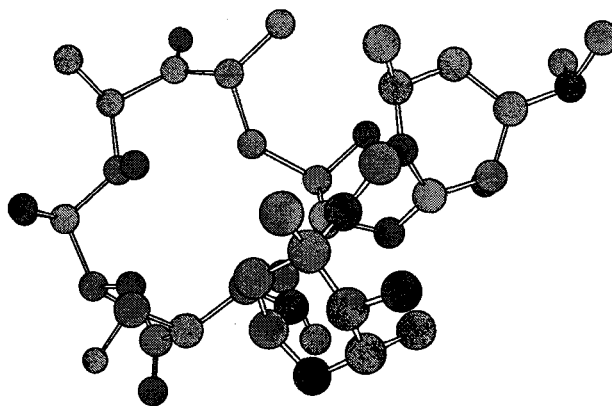
Erythromycin의 유도체 합성으로 산에서 강하고 경구투여가 쉬울 수 있는 후보물질을 찾아내고 이를 조합화학 기술을 응용하여 효과적인 접근을 해 보고자한다. 다음 그림에서 보듯이 9번 ketone에 functional group을 hydrophobic 하게 조성시켜 화합물군을 만들어 쉽게 검색하는 방법을 개발하고 6번 methoxy 등과 같이 산에서 안정도를 높이고 당의 hydroxyl group에 hydrophobic한 그룹을 도입하여 산안정도 및 경구용으로 가능할 수 있는 유도체군을 합성하여 검색할 수 있게 한다. 이러한 비슷한 전략으로 당의 hydroxyl group에 ethyl succinyl chloride를 붙인 erythromycin ethylsuccinate도 개발되어 있다.



(그림 1) Erythromycin의 유도체의 구조



Erythromycin



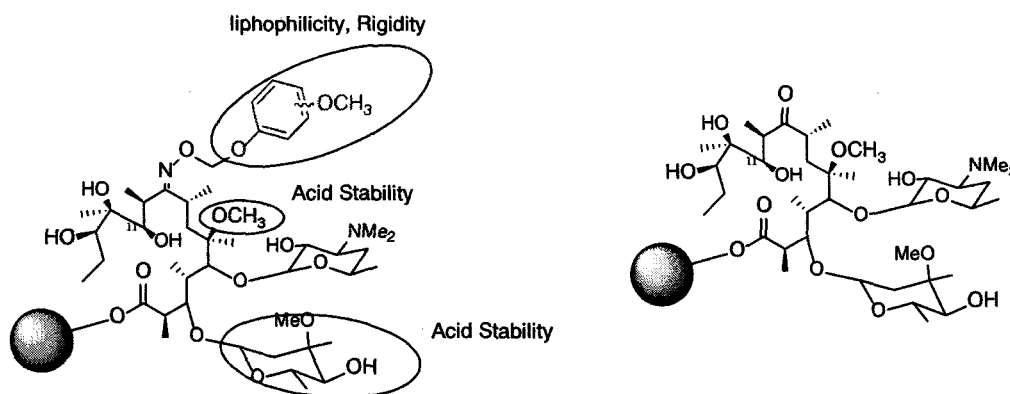
Erythromycin의 MM2 energy minimized structure

2. 연구 개발의 범위

Erythromycin의 유도체 합성으로 산에서 강하고 경구투여가 쉬울 수 있는 후보물질을 찾아내고 이의 유도체를 조합화학 기술을 응용하여 더 나은 후보물질을 도출하는 일로 라이브러리를 만들기 위해 macrocyclization을 초점으로 효율적인 방법과 조건을 확립하였다.

다음 그림에서 보듯이 9번 ketone에 functional group을 hydrophobic 하게 조성시켜 화합물군을 만들어 쉽게 검색하는 방법을 개발하고 6번 methoxy 등과 같이 산에서 안정도를 높이고 당의 hydroxyl group에 hydrophobic한 그룹을 도입하여 산안정도 및 경구용으로 가능할 수 있는 유도체군을 합성하여 검색할 수 있게 한다. 이러한 비슷한 전략으로 당의 hydroxyl group에 ethyl succinyl chloride를 붙인 erythromycin ethylsuccinate도 개발되어 있다.

본 과제에서는 linear intermediate에서 hydroxyl group과 끝에 있는 carboxylic group을 효과적으로 macrocyclization하는 방법을 개발하였다. 이는 고체상에서 반응을 시켜 라이브러리를 만들 때 가장 주요한 과정이 된다. 이로 인해 자동화 반응을 적용하여 쉽게 많은 유도체를 얻을 수 있다.



Scheme 1: Lactonization을 통한 다환링 형성반응

제 2 장 국내외 기술 개발 현황

Woodward와 Corey에 의해 전합성이 알려져 있지만 실제 제약회사에서는 발효에 의한 방법과 그 물질에서 몇 가지 공정을 거쳐 Erythromycin 유도체를 생산하고 있다. Abbott 회사의 Leonard Katz 그룹은 eryF gene에서 mutant가 된 유도체를 합성생산하기도 하였다.(1) 국내에서는 KIST의 김중협 박사팀의 연구가 알려져 있고 몇몇 회사가 외국으로부터 원료를 수입하여 판매하고 있다. 현 단계에서 경구용으로 쓰일 수 있는 유도체를 만들고 있다. 전합성을 제약회사에서는 행하지 않지만 경구용으로 쓰일 수 있는 유도체를 합성하는 노력이 이루어지고 있다.

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

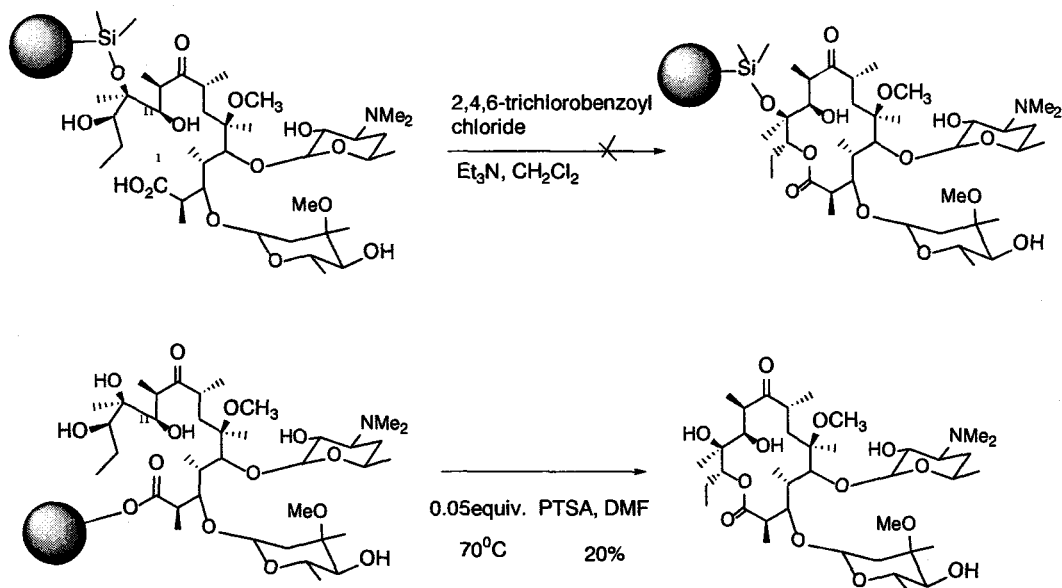
위에서 언급한 것처럼 전합성을 고체상에서 진행하는데는 실험실적으로는 가능할 수도 있으나 발효에 의한 합성법이 경제적이라는 판단아래 현재 진행했던 전합성 과정을 일단 solution phase에서 하도록 하고 발효에서 얻은 Erythromycin으로부터 고체상 반응으로 유도체합성에 먼저 중점을 두고자 한다.

처음부터 Woodward와 Corey(2)방법에 의해 발표된 합성전략에 준하여 유도체합성을 고체상에서 시도하였다. 위에서 소개한 것처럼 전합성을 고체상에서 진행하는데는 실험실적으로는 가능할 수도 있으나 발효에 의한 합성법이 경제적이라는 판단아래 현재 진행했던 전합성 과정을 일단 solution phase에서 하도록 하고 발효에서 얻은 Erythromycin으로부터 고체상반응으로 유도체합성을 먼저 중점을 두고자 한다. 그림 1의 유도체구조에서 3급 hydroxyl group을 acid stability를 높이기 위해 methoxy group으로 바꾸는 반응도 진행이 안되었다. 일단 erythromycin의 lactone ester를 가수분해하여 linear chain화합물로 만들고 고체상 반응에서 유도체를 합성하기 위해 현재 가수분해조건을 찾고 있다. 위의 methoxy 전환반응이 쉽지 않을 것은 MM2 energy minimized structure에서도 보듯이 3급 hydroxyl group은 입체적으로 매우 접근하기 힘든 공간에 있기 때문에 더욱이 linear chain에서 도입하는 것이 바람직할것으로 판단된다.

Erythromycin의 유도체 합성으로 산에서 강하고 경구투여가 쉬울 수 있는 후보물질을 찾아내고 이를 조합화학 기술을 응용하여 효과적인 접근을 하였다. 다음 그림에서 보듯이 9번 ketone에 functional group을 hydrophobic 하게 조성시켜 화합물군을 만들어 쉽게 검색하는 방법을 개발하고 6번 methoxy 등과 같이 산에서 안정도를 높이고 3번 hydroxyl group에 당의 functional group을 변화시켜 산안정도 및 경구용으로 가능할 수 있는 유도체군을 합성하여 검색할 수 있게 한다. 많은 유도체를 만들 때 고체반응상에서 반응을 시키고 macrocyclization(3)하면 high-diluted condition을 안 해도 분자간 반응보다 분자내반응이 우선되는 고체상 반응의 특성으로 보통 반응농도에서 반응을 진행시킬 수 있었다.

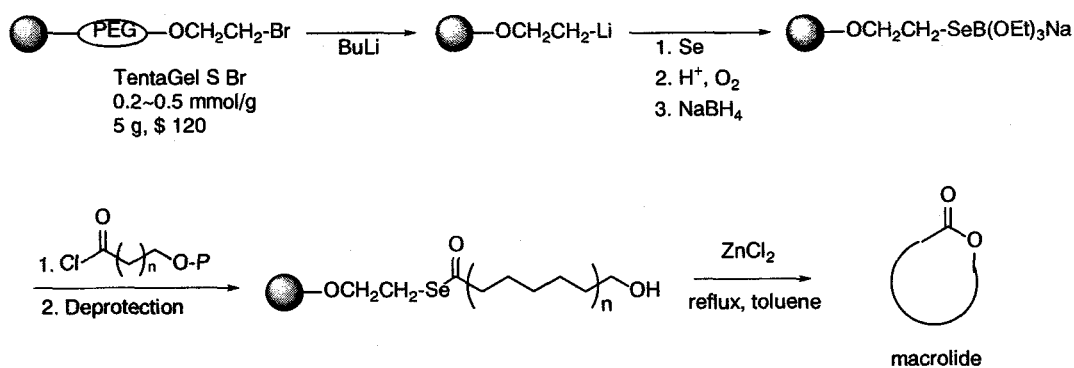
고체상 반응으로 high-dilution을 할 필요가 없는 첫 번째 장점, 고체상에서 기질을 때리는 과정을 동시에 진행시키는 두 번째 장점이 있다. 처음 전략은 다음과 같이 13번 탄소를 polymer에 연결할 시도를 하였으나 끝에 있는 carboxylic acid를 활성화 시키는 데

효율이 안 좋아 전략을 바꾸었다.



Scheme 2: Wang resin을 이용한 Macrolactonization

위의 연구를 토대로 seleno ester를 macrolactonization(5)에 응용하여 환이 형성되면서 polymer resin에서 떨어져 분리작업이 필요없는 traceless linker를 사용하여 Macrolactonization에 이용하였다. mg scale로 성공을 했으나 큰 규모의 반응은 더 연구 할 필요가 있다.



Scheme 3: Selenoester를 이용한 Macrocyclization

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

지금 현재로서도 많은 유도체의 합성이 고체상에서 효과적으로 진행 될 수 있는 것을 보여주고 있다. 비록 여기에는 한 가지 유도체의 합성을 보여 주고 있지만 다른 유도체도 같은 방법으로 적용 할 수 있을 것이다. 앞으로 더 발전한다면 최종적으로는 macrocyclization하면서 resin polymer에서 떨어질 수 있게 하는 전략을 사용할 예정이다. 즉 이것은 고체상 반응으로 high-dilution을 할 필요가 없는 첫 번째 장점, 고체상에서 기질을 떼는 과정을 동시에 진행시키는 두 번째 장점이 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

Macrocyclization reaction은 macrocyclic compound의 합성에 가장 걸림돌이 되는 반응으로 유도체를 많이 만들어 SAR 내지 개선된 hit을 찾으려면 매우 중요한 주제가 된다. Selenoester를 이용한 macrocyclization 이 이를 개선하는 한 중요한 방법론이 될 것으로 기대된다.

제 6 장 참고문헌

- (1) Weber, J.M., Leung, J.O., Swanson, S.J., Idler, K.B., and MaAlpine, J.B. *Science*, 252: 114-117 (1991).
- (2) Corey, E.J., Trybulski, E.J., Melvin, L.S., Nicolaou, K.C., Secrist, J.A., Lett. R., Shelrake, P.W., Falck, J.R., Brunelle, D.J., Haslanger, M.F., Kim, S., and Yoo, S. *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 4618 (1978)
- (3) Arnold, L.D., Assil, H.I., and Vederas, J.C. *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 3973 (1989).
- (4) Farrall, M.J. and Frechet, J.M.J., *J. Org. Chem.*, 41, 3877 (1976).
- (5) Woolard, F.X., Partsch, J. and Ellman, J.A., *J. Org. Chem.*, 62, 6102 (1997).
- (6) Pierfausto Seneci, *Solid-phase synthesis and combinatorial technologies*, John-Wiley & Sons, 2000.

여 백

특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업명	중사업명	중점국가연구개발사업			
	세부사업명	생리활성화합물질개발사업			
과제명		피페리딘계 옥사졸리디논 항생제 후보물질 창출			
연구기관		한국과학기술연구원	연구책임자	김중협	
총연구기간		2001년. 8월. 15일. ~ 2003년. 5월. 14일. (21개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)		정부출연금	민간부담금	합계	
		617,000 천원	105,000 천원	722,000 천원	
기술분야					
참여기업		일동제약, 화일약품, 이연제약			
협동연구기관		한국화학연구원, 일동제약중앙연구소, 화일약품연구소			
위탁연구기관		서울대 의과대학, 서울대 약학대학, 경희대 약학대학			
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)		1. 기업화 ()	2. 기술이전()	3. 후속연구추진(V)	4. 타사업에 활용 ()
		5. 선행 및 기초연구()	6. 기타목적활용 (교육연구)()	7. 활용중단(미활용)()	8. 기타()

특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.

첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부.
2. 기술요약서 1부

2003 년 6 월 30 일

연구책임자 : 김 중 협 (인)
연구기관장 : 원장직무대행 금 동 화 (직인)

과학기술부장관 귀하

여 백

[첨부1]

연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

화합물 설계 및 합성 그리고 생리활성 검사를 통해 신규 항생제 후보물질 1개 이상을 도출한다.

2. 연구수행결과 현황 (연구종료시점까지)

가. 특허 (실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허공고번호 출원(등록)번호	공고일자 출원(등록)	발명자 (출원인)	출원국	비고
새로운 메틸리덴피페리디닐 옥사졸리디논 유도체 및 그 제조방법	출원 02-66268		고훈영 외	한국	
새로운 메틸리덴피페리디닐 옥사졸리디논 유도체 및 그 제조방법	심사중	2002-10-29	고훈영 외	미국	
이소옥사졸릴 메틸렌 옥사졸리디논 유도체 및 이의 제조방법	등록 333492		고훈영 외	한국	
이소옥사졸릴 카르보닐 옥사졸리디논 유도체 및 그의 제조방법	등록 333493		고훈영 외	한국	

나. 프로그램 등록목록

프로그램 명칭	등록번호	등록일자	개발자	비고

다. 노하우 내역

라. 발생품 및 시작품 내역

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적(필요시 별지사용)

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명	SCI게재여부
Bioorganic. Med. Chem. Lett.	Synthesis and in vitro activity of new methylenepiperidinyl and methylenepyrrolidinyl oxazolidinone antibacterial agents	2003 in press		Elsevier	영국	o
계: 건수						

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

학술회의 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명
대한화학회	Synthesis and Antibacterial Activities of New Series of Oxazolidinone Compounds	2002년 10월	90	대한화학회	한국
계: 건수					

3. 연구성과

옥사졸리디논 항생제 연구를 통해 40 여종의 피페리딘계 옥사졸리디논 화합물을 합성 생리활성 검사를 하였고, 이들 화합물 중 KST150A058과 KST150A080 화합물은 기존의 시판되고 있는 대조물질 linezolid에 비해 MRSA 및 VRE등에 2-4배 정도 우수한 항균활성을 보이고 있고, 생체내 약동력학 연구결과 linezolid 보다 약간 낮은 정도의 특성을 보이고 있어 향후 이 화합물들은 좀 더 활성검사와 독성검사를 통해 신규 의약품으로의 개발 가능성이 있다.

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

현재 도출된 후보물질은 우수한 항균효과와 약동력적 성질들을 갖고 있기 때문에 향후 좀 더 활성검사 및 독성검사를 거친후 신규 의약품으로서의 개발이 가능하다고 생각되어진다.

5. 기대효과

옥사졸리디논 항생제 연구를 통해 신규 항생제 후보물질을 도출하였으며 옥사졸리디논 화합물은 기존의 시판되고 있는 대조물질 linezolid에 비해 MRSA 및 VRE등에 2-4배 정도 우수한 항균활성을 보이고 있고, 생체내 약동력학 연구결과 linezolid 보다

약간 낮은 정도의 우수한 후보물질을 도출하였다. 이와같은 연구 결과는 앞으로 많은 drug target에 접근할 수 있는 연구 수행방법을 제시할 수 있고, 신규 의약품 합성 및 개발연구에 도움이 될 것이다.

6. 문제점 및 건의사항(연구성과의 제고를 위한 제도·규정 및 연구관리 등의 개선점을 기재)