

새로운 경구용 세팔로스포린의 약효평가

나성범[#] · 김완주* · 지웅길
충남대학교 약학대학, *한국화학연구소
(Received February 3, 1994)

Studies of Pharmacological Activity on New Oral Cephalosporins

Sung-Bum La[#], Wan-Joo Kim* and Ung-Kil Jee
College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea
*Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon 305-606, Korea

Abstract— β -Lactamase stability, chemotherapeutic activity, and pharmacokinetics of 7-[(Z)-2-(2-aminothiazole-4-yl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[4-(2-pyridyl)piperazinyl]thiocarbonylthiomethyl-3-cephem-4-carboxylic acid(CEN1), 7-[(Z)-2-(2-aminothiazole-4-yl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[4-(2-pyrimidyl)piperazinyl]thiocarbonylthiomethyl-3-cephem-4-carboxylic acid(CEN2), pivaloyloxymethyl-7-[(Z)-2-(2-aminothiazole-4-yl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[4-(2-pyridyl)piperazinyl]thiocarbonylthiomethyl-3-cephem-4-carboxylate(CEN1P), and pivaloyloxymethyl-7-[(Z)-2-(2-aminothiazole-4-yl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[4-(2-pyridyl)piperazinyl]thiocarbonylthiomethyl-3-cephem-4-carboxylate(CEN2P) were examined. CEN1, CEN2, CEN1P, and CEN2P were very stable to the β -lactamases obtained from three strains(*Enterobacter cloacae* P99, *Escherichia coli* TEM, and *Citrobacter freundii*). Chemotherapeutic activities(ED_{50}) of CEN2 and CEN2P against experimental systemic infections due to *Streptococcus pyogenes* 77A and *Escherichia coli* 078 were superior to those of CEN1 and CEN1P, respectively. The ED_{50} values of CEN1, CEN2 were 5.82 mg/kg, 0.89 mg/kg(s.c., *S. pyogenes* 77A) while those of CEN1P, CEN2P were 14.56 mg/kg, 6.40 mg/kg(p.o., *S. pyogenes* 77A), respectively. The pharmacokinetics of CEN1, CEN2, CEN1P, and CEN2P were investigated in mice and rats. In mice, peak blood levels of 1.25 μ g/ml were recorded within 20 min after oral administration of a single dose equivalent to 40 mg/kg CEN1P. C_{max} of CEN1P was much higher than that of CEN1 in mice and rats. Oral absorption of CEN2P was much higher than that of CEN2.

Keywords □ Oral cephalosporins, β -Lactamase stability, ED_{50} , Pharmacokinetics.

베타락탐 항생제의 항균력은 베타락탐 고리에 있으며 그 항균작용은 박테리아 세포벽의 합성과 유지 기능을 방해하는 것으로 박테리아는 동물세포의 표면과 달리 세포질막의 외측에 세포벽이 있다. 이 세포벽은 세포의 형태를 유지하고 외부에 대한 방어작용과 물질투과 및 대사조절 등의 기능을 하는데 세포벽의 기본구조는 펩티도글리칸으로 이루어져 있으며 이는 N-아세틸뮤라민 산과 N-아세틸글루코사민이

결합한 다당류에 5개의 아미노산으로 된 펩타이드가 가교된 것으로 세포와 주위환경에서 염분의 농도차이에 의한 삼투압에 유지될 수 있도록 망사 모양으로 연결되어 있다.¹⁾ 박테리아는 성장 및 분열을 하기 위해 N-아세틸뮤라민 펩타이드의 단위를 삽입하여 망사구조를 변형시켜 세포벽을 유지하게 되는데 베타락탐 항생제가 이 펩티도글리칸에 작용하여 그 기능을 저지시키는 것이다. 이때 베타락탐 고리가 개열되며 따라서 펩티도글리칸의 생합성이 억제되어 세포벽이 약해져서 세포가 용해된다.²⁾

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

^{*}현주소 : 한국과학기술연구원 의과학연구소

일반적으로 미생물에는 세포벽이 있으나 동물세포에는 세포벽이 없기 때문에 세포벽의 생합성에 작용하는 항생물질은 동물세포에는 작용하지 않는다. 이것이 약제의 선택독성으로 나타나게 된다. 그러나 많은 그람양성 및 그람음성 균주들은 투여된 항생제에 대해 강한 내성을 나타내기도 하는데 이 내성의 원인으로서는 그람음성균의 세포벽에 존재하는 porin을 통한 항생제의 침투가 쉽지 않거나³⁻⁵ 세포벽 합성의 주요 효소인 페니실린-결합단백질과의 결합이 어려워지는 경우^{6,7} 또는 항생제의 베타락탐고리를 가수분해시켜 항균력을 소멸시키는 β -lactamase를 이들 균이 생산해 내기 때문⁸으로 보고 있다. 이러한 β -lactamase의 생산은 내성의 가장 중요한 원인으로 지적되고 있는데 β -lactamase는 그람양성균과 그람음성균, blue-green algae와 yeasts 등에 의해 생산되어 광범위하게 존재하는데 β -lactamase의 활성은 Streptomyces계와 Nocardia를 포함한 actinomycetes 등 거의 모든 박테리아에서 나타나고 있다.^{9,10} 이때 생산된 β -lactamase는 항생제가 박테리아 안으로 침투하는 것을 방지하기 위하여 그람양성균에서는 세포외로 분비하며 그람음성균에서는 periplasmic space내에 농축되어 존재한다.¹⁰ 이 β -lactamase가 항생제와 작용하여 베타락탐 결합을 끊어 불활성화시킴으로서 항생제의 항균력을 감소 혹은 상실시키게 된다.¹¹ 따라서 중요한 것은 혈중농도가 치료농도 범위로 장시간 유지되면서 β -lactamase에 대한 안정성을 확보하는 일이다. 최근에 개발된 경구용 세팔로스포린은 C7위치의 치환체로 β -lactamase에 안정하고 세포에 대한 침투력이 향상된 2-아미노치아졸 알콕시이미노기에 대한 연구가 주류를 이루어 경구용 항생제로 C7위치에 2-아미노치아졸 카르복시메톡시이미노기와 C3 위치에 비닐기를 가진 세픽심¹²과 C7위치에 하이드록시이미노기를 가진 세프디니아¹³⁻¹⁵가 개발되었는데 그람음성균을 포함한 넓은 항균스펙트럼과 강력한 항균력을 나타냈다.

세팔로스포린계 항생제의 C3위치는 주로 흡수, 대사를 결정짓는 중요부위로 특히 세팔로스포린의 경구흡수도는 C3위치의 변화에 커다란 영향을 받으며 C4위치는 흡수에 관여하는 부위로 긴사슬의 에스테르 형성하는 프로드럭에 대한 연구가 진행되고 있다. 따라서 새로운 경구용 세팔로스포린을 개발하기 위한

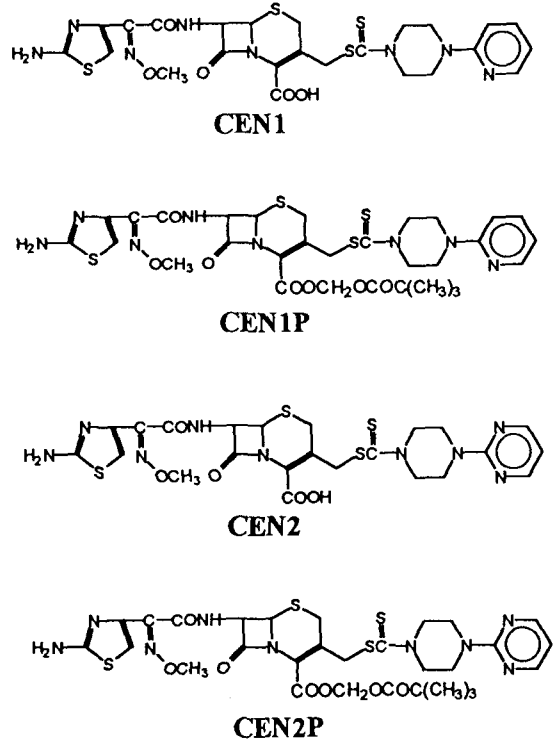


Fig. 1 - The chemical structures of 7-[(Z)-2-(2-aminothiazole-4-yl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[4-(2-pyridyl)piperazinyl]thiocarbonylthiomethyl-3-cephem-4-carboxylic acid(CEN1), 7-[(Z)-2-(2-aminothiazole-4-yl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[4-(2-pyrimidyl)piperazinyl]thiocarbonylthiomethyl-3-cephem-4-carboxylic acid(CEN2), pivaloyloxymethyl-7-[(Z)-2-(2-aminothiazole-4-yl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[4-(2-pyridyl)piperazinyl]thiocarbonylthiomethyl-3-cephem-4-carboxylate(CEN1P), and pivaloyloxymethyl-7-[(Z)-2-(2-aminothiazole-4-yl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[4-(2-pyrimidyl)piperazinyl]thiocarbonylthiomethyl-3-cephem-4-carboxylate (CEN2P).

목적으로 세포탁심의 C3위치를 변화시킨 CEN1, CEN2 및 이들의 피발로일옥시메틸 에스테르화합물들인 CEN1P와 CEN2P(Fig. 1)를 합성하였으며 CEN1과 CEN2에 대한 *in vitro*에서 6종의 그람양성균 및 14종의 그람음성균에 대한 최소발육저지농도를 측정된 결과 CEN1과 CEN2의 항균력이 세파클러보다 좋게 나타났고 세포탁심보다는 약간 낮은 항균력을 나타

냈으며 CEN2가 CEN1보다 동등 이상의 항균력을 나타내는 등 그람양성균과 그람음성균 모두에 대한 넓은 항균 스펙트럼과 좋은 항균력을 나타냈음을 보고하였다.¹⁶⁾ 또한 안정성 시험으로 CEN1, CEN2, CEN1P, CEN2P 화합물에 대하여 pH의 변화에 따른 가수분해, human plasma 및 흰쥐 간 호모지네이트에서의 가수분해 시험결과 CEN1 및 CEN2는 세포막의 경구투여시에 나타나는 산에 의한 가수분해의 문제점이 보완되었으며 혈장 및 간 호모지네이트에서는 CEN1P 및 CEN2P가 빠르게 가수분해가 진행되어 CEN1P 및 CEN2P가 체내에 흡수되어 곧 CEN1 및 CEN2로 대사되어 작용할 것으로 보고하였다.¹⁷⁾ 이에 저자 등은 기존의 제 1세대 세팔로스포린과 초기의 경구용 항생제들이 β -lactamase에 대한 불안정성 때문에 그람음성균에 항균력이 떨어지는 좁은 스펙트럼을 나타냈으며 특히 세팔로리딘은 β -lactamase에 의해 쉽게 가수분해되어 불활성화되기 때문에 세팔로리딘을 기준물질로 하여 새로운 항생제들에 대한 β -lactamase의 안정성을 비교실험 하였으며 *in vivo*에서의 항균력을 실험하기 위해 mice의 복강내로 시험균주를 감염시키고 새로운 항생제들을 피하주사 혹은 경구투여하여 ED₅₀값을 산출하였고 생체내 약물동태 시험으로 4종의 항생제들을 피하주사 및 경구적으로 투여한 다음 혈중농도와 pharmacokinetic parameter들을 얻어 서로 비교 검토하였다.

실험방법

시약 및 기기—본 실험에 사용된 시약으로 세포막 심은 Hoechst AG사(Postfach, Frankfurt/M.)제품, 세팔로리딘과 세파클러는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)제품을 사용하였고 Sephadex® G-150은 Pharmacia LKB(Biotechnology AB, Uppsala, Sweden)제품, fleisch extract broth와 Mueller-Hinton agar는 Difco Lab.(Detroit, Michigan)제품, 말 혈청은 Gibco Lab. Life Technol., Inc.(Madison, WI) 및 양의 혈액은 Korea media사(Korea)제품을 사용하였으며 기타 시약은 특급 혹은 1급을 사용하였다.

기기는 β -lactamase의 배양 및 정제를 위해 가시부 분광광도계(Spectronics 20D, Milton Roy Co., Rochester, NY), 초음파분쇄기(Ultrasonic Processor, W-

380, Heat system-Ultrasonics Inc., Farming Dale, NY), 냉동원심분리기(J2-21 M/E, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA), 연동식 펌프(모델 P-1, Pharmacia, Sweden), Single path 모니터 UV-1(optical unit와 control unit, Pharmacia, Sweden) 등을 사용하였다.

β -Lactamase에서의 가수분해—시료의 제조로 세팔로리딘과 세포막심은 0.1M-소듐 인산염 완충용액(pH 7.00)에 용해시키어 1.00×10^{-3} M의 농도로 하였고 CEN1, CEN2, CEN1P 및 CEN2P 화합물은 DMSO를 용매로 사용하여 1.00×10^{-3} M의 농도로 제조하였으며 가수분해 실험 때 0.1M-소듐 인산염 완충용액(pH 7.00)으로 1.00×10^{-4} M의 농도로 희석하여 반응시켰다. 실험에 사용된 효소는 *Enterobacter cloacae* P99,¹⁸⁾ *Escherichia coli* TEM¹⁹⁾ 및 *Citrobacter freundii*²⁰⁾에서 부터 직접 배양시키고 분리, 정제하여 사용하였다. 효소의 배양은 각각의 균주를 일정량씩 취해 fleish extract broth 100 ml에 접종하고 37°C에서 18시간 동안 교반시키면서 1차 배양시켰다. 2차배양은 각각의 균주들의 1차 배양액 20 ml씩을 취해 fleish extract broth 200 ml에 가해 배양시켰으며 각 균주의 배양시간은 *Enterobacter cloacae* P99의 경우 37°C, 183 rpm에서 OD₅₇₈ 0.726일때 배양시간은 3.5 시간, *Escherichia coli* TEM은 OD₅₇₈ 0.755일때 3.01 시간이었고 *Citrobacter freundii*는 OD₅₇₈ 0.726일때 4.13시간이었으며 이때 균주를 회수하여 4°C, 7000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 pellet을 0.02M-소듐 인산염 완충용액(pH 7.00)을 사용하여 회수하였다. β -Lactamase의 정제는 회수한 균주를 4°C에서 30 초씩 5회 초음파분쇄하고 4°C 18000 rpm에서 45분 동안 원심분리하여 각 균주가 생산한 β -lactamase를 분리하여 *Enterobacter cloacae* P99는 원액을 150배 희석하였고 *Escherichia coli* TEM과 *Citrobacter freundii*는 Sephadex® G-150으로 정제하여 얻은 원액을 니트로세핀 실험을 하여 β -lactamase를 확인한 후 실험에 사용하였다. 가수분해 실험은 세팔로리딘의 E_{max}에서 일정농도의 세팔로리딘에 대한 optical density(OD)를 측정하고²¹⁾ 여기에 3종류의 β -lactamase 일정량을 각각 가한 다음 실온에서 10분동안 반응시켜 변화된 OD값으로부터 세팔로리딘의 가수분해된 양을 계산하고 일정농도의 각각의 화합물에 대해 β -lacta-

mase와 10분동안 반응시켜 얻은 변화된 OD값을 세 팔로리딘의 효소에 의한 가수분해 양과 비교하여 상대적 가수분해 비를 계산하였다.

평균유효량(ED₅₀)의 측정—실험동물은 NMRI albino mice 체중 20 g(±10%) 범위의 것을 사용하였으며 실험균주는 그람양성균으로 *Staphylococcus pyogenes* 77A와 그람음성균으로 *Escherichia coli* 078을 사용하였다. LD₁₀₀의 산출은 실험동물 각 군을 6마리씩으로 하여 *Staphylococcus pyogenes* 77A와 *Escherichia coli* 078을 18시간 배양시킨 후 배양원액 및 배양원액의 10배씩 계단희석한 균주액 각각 0.3 ml를 mice의 복강내로 주사하여 패혈증을 유발시켜 24시간 내에 사망한 동물에 대한 투여량으로부터 LD₁₀₀을 계산하였다. ED₅₀의 실험은 실험동물 각 군을 6마리씩으로 하여 *Staphylococcus pyogenes* 77A 및 *Escherichia coli* 078 각 균주에 대한 LD₁₀₀의 10배량을 복강내 주사하여 감염시킨 다음 감염시킨 직후 및 4시간 경과 후 CEN1과 CEN2 각각 일정량을 피하주사하고 CEN1P 및 CEN2P는 경구로 투여한 후 대조군으로부터 항생물질 투여군을 10일동안 관찰하여 생존해 있는 동물의 수로부터 평균유효량을 계산하였다.

체내약물동태—실험동물은 NMRI albino 마우스 체중 20~30 g의 것과 Wister 흰쥐 체중 80~90 g의 것 및 SPF ICR 마우스 체중 20 g(±10%)의 것을 사용하였으며 실험 24시간 전부터 절식시키고 물만 자유롭게 공급하였다. CEN1, CEN2, CEN1P 및 CEN2P는 NMRI albino 마우스와 Wister 흰쥐를 대상으로 실험하였으며 종의 차이에 따른 변화를 검토하기 위해 CEN2와 CEN2P는 SPF ICR 마우스에 대해 실험하여 서로 비교하였다. 항생제의 투여는 마우스는 한 군당 4마리씩, 흰쥐는 한군당 3마리씩으로 하였으며 투여량은 마우스는 40 mg/kg, 흰쥐는 20 mg/kg의 단위로 하여 CEN1 및 CEN2는 피하주사와 경구투여하였으며 CEN1P 및 CEN2P는 경구투여하였다. 채혈은 약물투여 후 일정시간 마다 헤파린 처리한 마이크로피펫(Drummond®, Wiretrol 10 µl)으로 꼬리 정맥에서 10 µl씩 채혈한 후 정량하기까지 4°C에서 보관하였다. 분석법은 bioassay법으로 하였으며 이때 사용된 균주는 *Streptococcus pyogenes* 77A를 배양하고 적합하게 희석하여 사용하였다. 평판배지의 제조는 Mueller-Hinton agar 3.42 g에 증류수 81.0 ml를 가해 멸균시킨 다음 50°C를 유지시키면서 희석한 균액 1.0 ml와 양의

혈액 9.0 ml로 배지를 만들어 실온에서 응고시키고 진공편지로 구멍을 뚫었다. 표준용액의 제조는 세포탁심, CEN1, CEN2, CEN1P 및 CEN2P 각각 1.0 mg을 DMSO 1.0 ml에 용해시킨 다음 실험동물의 혈액으로 각각의 표준항생물질의 농도가 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.781, 0.390, 0.195(µg/ml)가 되도록 계단희석하였다. 혈장 및 요중의 약물농도 분석은 평판배지의 시료공에 농도별로 1:2 연속희석법으로 희석한 표준항생물질 용액 10 µl씩을 취하고 시간별로 채혈한 혈액시료 10 µl씩을 각각의 정해진 위치에 가한 다음 4°C에서 1시간 확산시켜 평판배지에 흡입시키고 37°C에서 18시간동안 배양시킨 후 표준항생물질 및 채혈한 시료에 대한 균의 발육저지원의 직경을 측정하여 표준항생물질의 농도와 배지상의 저지원의 직경으로부터 편대수 그래프 검량곡선을 만들고 검량곡선으로부터 각각 투여한 항생제의 혈중농도를 계산하였다. 혈장중 농도 추이의 분석으로 체내약물동태 변수들은 “Phakok calculation” 컴퓨터 프로그램^{22,23}으로 계산하였고 각각의 화합물을 경구 또는 피하주사로 투여한 후 얻어진 혈중농도-시간 데이터를 1-컴파트먼트 모델에 의해 (식 1)에 따라 계산하였다.

$$C_t = C_0 \cdot [e^{-ke(t-t_0)} - e^{-ka(t-t_0)}] \quad (\text{식 1})$$

이때 C_t는 시간 t에서의 농도, K_a는 흡수속도상수, K_e는 배설속도상수이며 t₀는 lag time이다. 최고혈중농도는 측정된 혈중농도 데이터중에서 가장 높은 수치로 선정하였으며 그때의 시간을 최고혈중농도 도달시간으로 하였다. AUC는 linear trapezoidal rule에 따라 0에서부터 4시간까지는 혈중농도 변화곡선을 시간에 따라 근사적분하여 산출하였으며 (식 2) 4시간 이후 무한대까지는 마지막 측정혈중농도에서 무한대까지의 면적을 아래 공식을 따라 계산하여 얻은 값을 합산하여 (식 3) AUC값으로 하였다.

$$AUC = \int_{t_{\text{last}}}^0 Cdt + \int_{t_{\text{last}}}^0 Cdt \quad (\text{식 2})$$

$$= \int_{t_{\text{last}}}^0 Cdt + \frac{t_{\text{last}}}{K_{el}} \quad (\text{식 3})$$

노중 회수를 측정은 마우스 한 군당 4마리씩으로 하여 CEN2, CEN2P 및 세파클러를 각각 40 mg/kg의 용량으로 0.3 ml에 함유토록 하여 피하주사 및 경구

투여한 다음 뇨 분석용 대사상자에 각 군당 4마리씩 넣고 절식시킨 가운데 물만 자유롭게 공급하였다. 24 시간동안 뇨를 채취하여 총 뇨량을 기록하고 그중 일부를 취해 1:1, 1:10, 1:100으로 희석한 용액 10 μ 씩을 4각형 평판배지의 시료공에 가하였다. 이때 표준항생물질용액의 제조는 대조군에서 채취한 뇨로 각각의 항생제를 일정한 농도로 되도록 1:2 연속희석법으로 희석하여 평판배지에 각각 10 μ 씩 가하고 4°C 에서 1시간 확산시키고 37°C 에서 18시간동안 배양하여 뇨중의 잔존항균력을 측정하였으며 표준항생물질의 검량곡선으로부터 실험약물의 뇨중농도를 산출하여 뇨중의 회수율을 계산하였다.

결과 및 고찰

β -Lactamase에서의 가수분해—3가지 효소에 대한 화합물들의 가수분해과정을 kinetic적인 면을 관찰하기 위해 10분동안 가수분해되는 과정을 연속적으로 측정된 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 *Enterobacter cloacae* P99에서 세팔로리딘은 10분 이내에 가수분해가 급격히 일어나 흡광도의 감소가 나타났으며 10분 이후 60분까지 10분 단위로 측정하였으나 10분 후에는 더 이상 현저한 가수분해의 진행은 관찰되지 않

았다. 또한 *Escherichia coli* TEM과 *Citrobacter freundii*도 비슷한 양상이었다(Fig. 3과 4). 세팔로리딘에 대한 각 화합물들의 상대적 가수분해 값은 Table I에 나타난 바와 같이 3가지 β -lactamase에 대해 안정한

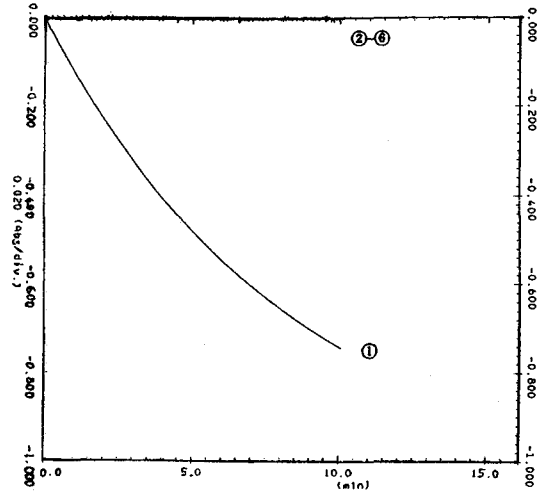


Fig. 3—Hydrolysis of cephaloridine, cefotaxime, CEN1, CEN2, CEN1P, and CEN2P by β -lactamase of *Escherichia coli* TEM.
① Cephaloridine, ② Cefotaxime, ③ CEN1, ④ CEN2, ⑤ CEN1P, ⑥ CEN2P

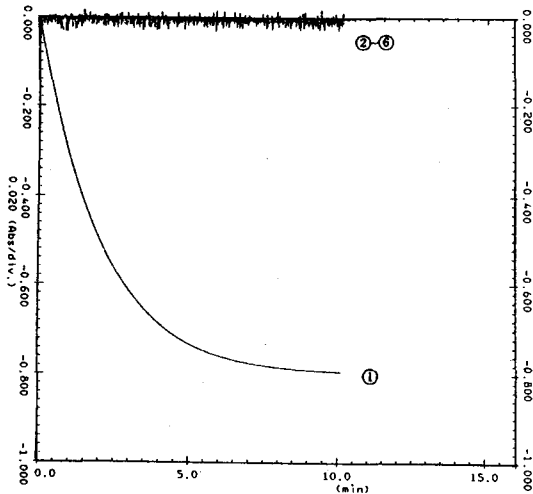


Fig. 2—Hydrolysis of cephaloridine, cefotaxime, CEN1, CEN2, CEN1P, and CEN2P by β -lactamase of *Enterobacter cloacae* P99.
① Cephaloridine, ② Cefotaxime, ③ CEN1, ④ CEN2, ⑤ CEN1P, ⑥ CEN2P

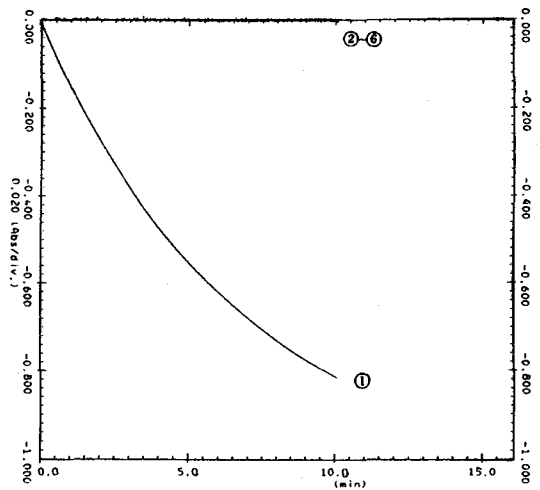


Fig. 4—Hydrolysis of cephaloridine, cefotaxime, CEN1, CEN2, CEN1P, and CEN2P by β -lactamase of *Citrobacter freundii*.
① Cephaloridine, ② Cefotaxime, ③ CEN1, ④ CEN2, ⑤ CEN1P, ⑥ CEN2P

Table I—Relative hydrolysis of cefotaxime, CEN1, CEN2, CEN1P, and CEN2P by β -lactamases

Compound	β -Lactamase from		
	<i>E. cloacae</i>	<i>PE. coli</i>	TEM, <i>C. freundii</i>
Cephaloridine	100.00(%)*	100.00	100.00
Cefotaxime	1.13	0.54	0.37
CEN1	0.88	0.40	0.25
CEN1P	0.13	0.13	0.00
CEN2	0.88	0.27	0.25
CEN2P	0.13	0.13	0.00

* The rates of hydrolysis were determined at 30°C with substrate concentrations of 100 μ M. The rates given are relative to an arbitrary value of 100 for cephaloridine.

Table II—Chemotherapeutic activity of CEN1, CEN1P, CEN2, and CEN2P against experimentally induced septicemia in mice

Compound	Organism	Median Effective Dose(ED ₅₀ , *mg/kg)	
		s.c.	p.o.
CEN1	<i>S. pyogenes</i> 77A	5.82	—
	<i>E. coli</i> O 78	4.00	—
CEN1P	<i>S. pyogenes</i> 77A	—	14.56
	<i>E. coli</i> O 78	—	>25.00
CEN2	<i>S. pyogenes</i> 77A	0.89	—
	<i>E. coli</i> O 78	0.13	—
CEN2P	<i>S. pyogenes</i> 77A	—	6.40
	<i>E. coli</i> O 78	—	14.30

*ED₅₀: dose in mg/kg affording protection against lethal infection in 50% of treated mice.

결과를 보이고 있으며 CEN1, CEN2, CEN1P 및 CEN2P 화합물들이 세포탁심 보다 동등이상의 안정성을 나타냈다. 이는 일반적으로 세팔로스포린의 C3위치에 아세톡시메틸기를 가진 화합물들이 체내에 투여되었을 때 대사과정에서 가수분해가 일어나 데스아세틸 세팔로스포린으로 되어 항균력이 1/10으로 감소한 것²⁴⁾과 세포탁심의 C3' 위치에 β -lactamase에 영향이 없는 부분이 존재할 때 β -lactamase에 안정했다는 보고²⁵⁾를 토대로 할 때 세포탁심의 C3' 위치의 아세톡시메틸기보다 피리딜피페라진기와 피리미딜피페라진기가 구조적으로 더 안정한 것으로 생각된다.

평균유효량의 측정—Table II에 나타난 바와 같이

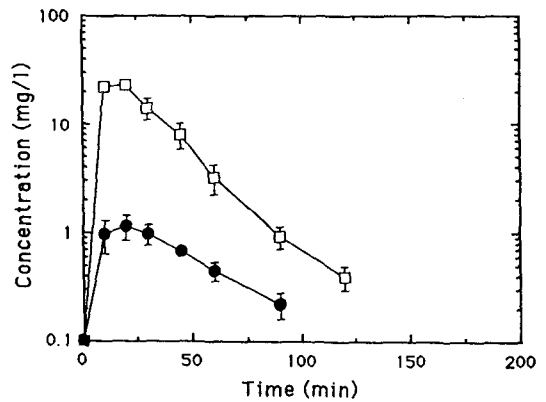


Fig. 5—Mean blood levels of CEN1 and CEN1P in mice(n=4) after a single subcutaneous or oral dose of 40 mg(potency)/kg body weight. □—CEN1 s.c., ●—CEN1P p.o.

Staphylococcus pyogenes 77A에서의 ED₅₀은 CEN2가 CEN1보다 낮은 값을 나타냈으며 이는 CEN2P가 CEN1P보다 낮은 ED₅₀값을 나타내 같은 결과를 나타낸 반면 4종의 화합물 모두에서 세포탁심의 ED₅₀값²⁶⁾ 보다는 높게 나타났다. 또한 *Escherichia coli* 078 균주에 대해서도 비슷한 결과를 나타내 *in vitro*에서 CEN1 및 CEN2의 MIC값이 CEN2가 CEN1보다 강력하게 나타난 것¹⁶⁾과 일치하고 있다. 따라서 이는 모약물의 ED₅₀값이 좋을 때 그의 프로드럭을 경구투여했을 때에도 같은 결과를 나타내는 것과 일치하고 있다. Seartazzini 등²⁷⁾은 경구용 세팔로스포린 항생제에 대한 oral activity와 ED₅₀값 사이의 관계를 수식화하여 나타낸 R지수가 1~0.3 정도이면 경구용 제제로서의 가능성이 있음을 보고하였다. 따라서 CEN1의 R지수가 0.47이었고 CEN2의 R지수는 0.16으로 나타나 R지수를 기준으로 하였을 때 CEN2보다 CEN1이 더 경구용 제제로서의 개발 가능성이 있는 것으로 예측된다.

체내약물동태—NMRI albino mice를 대상으로 CEN1은 40 mg/kg의 용량으로 피하주사 및 경구투여하고, CEN1P는 40 mg/kg을 경구투여하고 체내약물동태를 측정된 결과 Fig. 5과 Table III에 나타난 바와 같이 각 화합물의 혈중농도를 측정하여 시간에 따라 그래프로 나타냈을 때 CEN1의 경구투여 때에는 감지되지 않았는데 이는 경구흡수도가 낮기 때문으로 사료된다. CEN1P는 Cmax가 1.25 mg/l로 나타났으며

Table III—Pharmacokinetic parameters of CEN1, CEN1P, CEN2, and CEN2P in mice

Dose: 40 mg(potency)/kg

Compound	Route	$t_{1/2}$ (h)	C_{max} (mg/l)	T_{max} (h)	$AUC_{0-\infty}$ (mg.h/l)
CEN1	s.c.	$0.23 \pm 0.02^*$	28.64 ± 4.54	0.23 ± 0.03	13.42 ± 2.58
	p.o.	—	—	—	—
CEN1P	p.o.	0.33 ± 0.11	1.25 ± 0.32	0.31 ± 0.10	1.01 ± 0.05
CEN2	s.c.	0.27 ± 0.06	26.76 ± 2.18	0.30 ± 0.04	17.41 ± 2.31
	p.o.	0.34 ± 0.09	0.46 ± 0.04	0.47 ± 0.14	0.60 ± 0.23
CEN2P	p.o.	0.57 ± 0.27	0.96 ± 0.12	0.37 ± 0.01	1.26 ± 0.20

* Values are Mean \pm S.D. in mice(n=4)

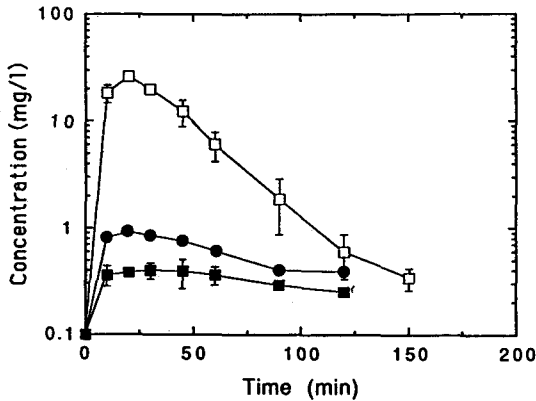


Fig. 6—Mean blood levels of CEN2 and CEN2P in mice(n=4) after a single subcutaneous or oral dose of 40 mg(potency)/kg body weight.

—□— CEN2 s.c., —■— CEN2 p.o.,
—●— CEN2P p.o.

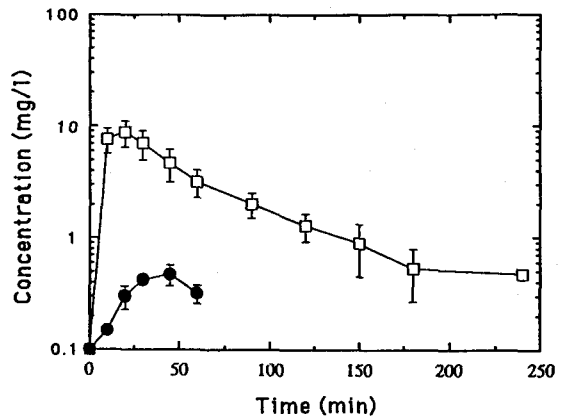


Fig. 7—Mean blood levels of CEN1 and CEN1P in rats(n=3) after a single subcutaneous or oral dose of 20 mg(potency)/kg body weight.

—□— CEN1 s.c., —●— CEN1P p.o.

약물의 소실형태는 CEN1의 피하주사 때와 비슷한 양상을 나타내고 있다. 그러나 평균혈중농도는 CEN1의 피하투여 때보다 낮은 값을 나타냈다. 또한 약물의 흡수는 약물분자가 용해된 다음 약물분자의 친유성에 따라 생체막에서 지질용해도가 좌우되는데 Fig. 6에서 나타난 바와 같이 CEN2와 CEN2P를 경구투여했을 때 두 약물이 생체내에서 용해된 다음 각 약물분자가 지니는 지용성은 CEN2보다 CEN2P가 높기 때문에 흡수가 잘되고 따라서 평균혈중농도가 높게 나타남이 관찰되었다.

Wister rat에 대해 CEN1 및 CEN2를 20 mg/kg 용량으로 피하주사 및 경구투여하고 혈중농도를 측정 한 결과 Fig. 7과 8에 나타난 바와 같이 CEN1 및 CEN2는 경구흡수도가 낮기 때문에 감지되지 않았으

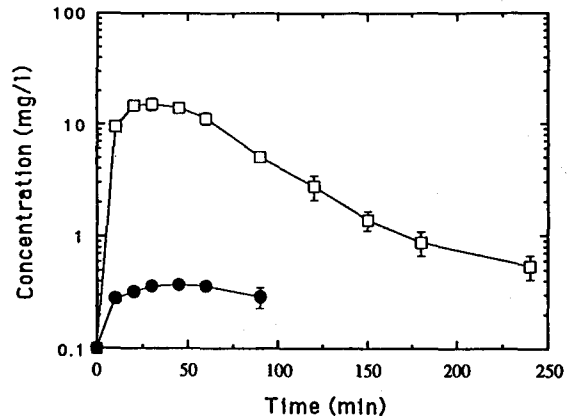


Fig. 8—Mean blood levels of CEN2 and CEN2P in rats(n=3) after a single subcutaneous or oral dose of 20 mg(potency)/kg body weight.

—□— CEN2 s.c., —●— CEN2P p.o.

Table IV—Pharmacokinetic parameters of CEN1, CEN1P, CEN2, and CEN2P in rats

Dose: 20 mg(potency)/kg					
Compound	Route	t _{1/2} (h)	C _{max} (mg/l)	T _{max} (h)	AUC _{0-∞} (mg.h/l)
CEN1	s.c.	0.54±0.08*	9.86±2.82	0.21±0.00	8.24±2.20
	p.o.	—	—	—	—
CEN1P	p.o.	0.19±0.05	0.49±0.02	0.53±0.08	0.37±0.11
CEN2	s.c.	0.48±0.11	16.30±0.71	0.54±0.12	18.00±1.03
	p.o.	—	—	—	—
CEN2P	p.o.	0.38±0.02	0.40±0.05	0.62±0.11	0.56±0.01

* Values are Mean±S.D. in rats(n=3)

나 CEN1P 및 CEN2P 화합물의 Cmax는 각각 0.40 mg/l과 0.49 mg/l를 나타냈다. 그러나 CEN1 및 CEN2 화합물의 피하주사 후의 혈중농도에 비해 Cmax 및 AUC값이 낮게 나타났고 CEN2P가 CEN1보다 AUC값이 크게 나타났(Table IV).

ICR계 mice를 사용하여 CEN2 및 CEN2P에 대한 체내약물동태를 측정하여 NMRI albino mice와의 종의 차이에 의한 변화를 비교하고 각 약물에 대한 요중 회수율을 측정된 결과 서로 다른 mice에 의한 체내 약물동태는 큰 차이가 없었고 CEN2 및 CEN2P의 요중회수율은 각각 0.03%와 0.45%를 나타냈다.

결 론

새로운 경구용 세팔로스포린계 항생제인 CEN1, CEN2와 이 화합물들의 피발로일옥시메칠 에스텔인 CEN1P, CEN2P를 합성하고 세포탁심을 비교물질로 하여 4종의 화합물에 대한 β-lactamase에 대한 가수 분해 속도를 측정하기 위해 3종류의 효소, 즉 *Enterobacter cloacae* P99, *Escherichia coli* TEM 및 *Citrobacter freundii*에서부터 직접 배양, 분리, 정제하여 실험 하였으며 화합물의 평균유효량 측정 및 생체내 활성을 검토하기 위해 체내약물동태를 실험한 결과 다음과 같은 결론에 도달하였다.

CEN1 및 CEN2의 항균효과는 유지되면서 3가지 균주가 생산해 내는 β-lactamase에 대해 매우 안정하여 세팔로스포린의 C3위치 아세톡시메칠기의 가수 분해에 의한 항균력 감소의 단점을 보완할 수 있었으며 CEN1의 R지수는 0.47이었고 CEN2의 R지수는 0.16으로 나타나 R지수를 기준으로 하였을 때 CEN2 보다 CEN1이 더 경구용 제제로서의 개발 가능성이

있는 것으로 예측된다. 그러나 생체내 약물동태에서 CEN1과 CEN2의 경구투여시 AUC값이 낮았으며 이들의 피발로일옥시메칠 에스텔 화합물들은 AUC값이 CEN1과 CEN2보다 증가하여 생체이용율을 증가시켰으나 기존의 개발된 경구용 세팔로스포린에 비해 AUC값의 현저한 증가를 관찰할 수 없었기 때문에 AUC값을 증가시키기 위한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구 수행에 도움을 주신 Hoechst AG(Frankfurt, FRG)의 Dr. D. Isert와 Dr. G. Seibert, 한국화학연구소 의약활성연구실의 공재양 박사님과 방중숙 씨께 감사드립니다.

문 헌

- 1) La, S. B.: Preparation and Evaluation of New Oral Cephalosporin Prodrugs, *In Symposium on "Recent Drug Delivery System"*, *Kor. Soc. Pharm.*, 65-79 (1993).
- 2) Richmond, M. H.: β-Lactam antibiotics the background to their use as therapeutic agents, Paddon and Books Ltd. (1981).
- 3) Nikaido, H.: Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**, 1831-1836 (1989).
- 4) Nikaido, H. and Vaara, M.: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability, *Microbiol. Rev.*, **49**, 1-32 (1985).
- 5) Chung, S. S.: Mechanism of Antimicrobial Drug

- Resistance, *J. Korean Soc. Chemother.*, **11**, 17-26 (1993).
- 6) Tomasz, A.: The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria, *Ann. Rev. Microbiol.*, **33**, 113-137 (1979).
 - 7) Spratt, B. G.: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K-20, *Proc. Nat'l. Acad. Soc. USA*, **72**, 2999-3003 (1975).
 - 8) Noguchi, J. K. and Gill, M. A.: Sulbactam: a β -lactamase inhibitor, *Clin. Pharm.*, **7**, 37-51 (1988).
 - 9) Neu, H. C. and Fu, K. P.: Clavulanic acid, a novel inhibitor of β -lactamases, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **14**, 650-655 (1978).
 - 10) Neu, H. C.: Carbapenems: special properties contributing to their activity, *Am. J. Med.*, **78(suppl. 6A)**, 33-40 (1985).
 - 11) Sykes, R. B. and Mathew, M.: The β -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2**, 115-157 (1976).
 - 12) Yamanaka, H., Chiba, T., Kawabata, K., Takasugi, H., Masugi, T. and Takaya, T.: Studies on β -lactam antibiotics. IX. Synthesis and biological activity of a new orally active cephalosporin, cefixime(FK027), *J. Antibiot.*, **38**, 1738-1751 (1985).
 - 13) Mine, Y., Kamimura, T., Watanabe, Y., Tawara, S., Matsumoto, Y., Shibayama, F., Kikuchi, H. and Takaya, T.: *In vitro* antibacterial activity of FK482, a new orally active cephalosporin, *J. Antibiot.*, **41**, 1873-1887 (1988).
 - 14) Mine, Y., Yokota, Y., Wakai, Y., Kamimura, T., Tawara, S., Shibayama, F. and Kikuchi, H.: *In vitro* antibacterial activity of FK482, a new orally active cephalosporin, *J. Antibiot.*, **41**, 1888-1895 (1988).
 - 15) Sakamoto, H., Hirose, T., Nakamoto, S., Hatano, K., Shibayama, F., Kikuchi, H. and Mine, Y.: Pharmacokinetics of FK482, a new orally active cephalosporin, in animals, *J. Antibiot.*, **41**, 1896-1905 (1988).
 - 16) La, S. B., Jung, M. H., Kim, W. J. and Jee, U. K.: Synthesis and Antibacterial Activities of New Oral Cephalosporins, *YAKHAK HOEJI*, **37**, 295-305 (1993).
 - 17) La, S. B., Kim, W. J. and Jee, U. K.: Physicochemical Properties and Degradation of New Oral Cephalosporins, *YAKHAK HOEJI*, in press (1994).
 - 18) Minami, S., Yotsuji, A., Inoue, M. and Mitsuhashi, S.: Induction of β -Lactamase by Various β -Lactam Antibiotics in *Enterobacter cloacae*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **18**, 382-385 (1980).
 - 19) Minami, S., Inoue, M. and Mitsuhashi, S.: Purification and Properties of Cephalosporinase in *Escherichia coli*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **18**, 77-80 (1980).
 - 20) Tajima, M., Takenouchi, Y., Sugawara, S., Inoue, M. and Mitsuhashi, S.: Purification and Properties of Chromosomally Mediated β -Lactamase from *Citrobacter freundii* GN7391, *J. Genet. Microbiol.*, **121**, 449-456 (1980).
 - 21) Samuni, A.: A Direct Spectrophotometric Assay and Determination of Michelis Constants for the β -Lactamase Reaction, *Analytical Biochem.*, **63**, 17-26 (1975).
 - 22) Klessel, N., Limbert, M., Seeger, K., Seibert, G., Winkler, I. and Schrunner, E.: Cefodizime, an aminothiazolyl cephalosporin. II Comparative studies on the pharmacokinetic behavior in laboratory animals, *J. Antibiot.*, **37**, 901-909 (1984).
 - 23) Limbert, M., Isert, D., Klesel, N., Markus, A., Seeger, K., Seibert, G. and Schrunner, E.: Antibacterial activities *in vitro* and *in vivo* and pharmacokinetics of cefquinome(HR IIIV), a new broad-spectrum cephalosporin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 14-19 (1991).
 - 24) Selwyn, S.: THE BETA-LACTAM ANTIBIOTICS: Penicillins and Cephalosporins in Perspective, Hodder and Stoughton Ltd. (1980).
 - 25) La, S. B., Kong, J. Y., Kim, W. J. and Jee, U. K.: Physicochemical Properties, Stabilities and Pharmacokinetics of Cephalosporin 3'-Quinolone Dithiocarbamate, *YAKHAK HOEJI*, **37**, 638 (1993).
 - 26) Utsui, Y., Inoue, M. and Mitsuhashi, S.: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of CS-807, a new oral cephalosporin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **31**, 1085 (1987).
 - 27) Scartazzini, R. and Bickel, H.: New orally active cephalosporins, *Heterocycles*, **7**, 1165-1188 (1977).