

Cefazolin Butyrolactone Ester의 합성 및 생물약제학적 연구

이진환 · 조행남 · 최준식*

조선대학교 약학대학

(Received July 29, 2003; Revised September 30, 2003)

Synthesis and Biopharmaceutical Studies of Cefazolin Butyrolactone Ester, a Novel Prodrug of Cefazolin

Jin Hwan Lee, Haeng Nam Cho and Jun Shik Choi*

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

Abstract — A butyrolactone ester of cefazolin (CFZ-BTL) was synthesized by the esterification of cefazolin (CFZ) with α -bromo- γ -butyrolactone. The synthesis was confirmed by the spectroscopic analysis. The CFZ-BTL was more lipophilic than the CFZ when assessed by n-octanol/water partition coefficients at various pH. The CFZ-BTL itself did not show any anti-microbial activity *in vitro*, but after oral administration of CFZ-BTL to rabbits, exerted significant anti-microbial activity in serum samples when measured by the inhibition zone method in nutrient agar plates, due to conversion of CFZ-BTL to an active metabolite, probably CFZ, in the body. The CFZ-BTL was also converted into CFZ as confirmed by *in vitro* incubation study, with tissue homogenates (liver, blood and intestine) of rabbits. The liver showed the fastest conversion rate, probably via the hydrolysis mechanism. *In vivo* metabolism of CFZ-BTL to CFZ was also confirmed *in vivo* serum samples by HPLC. The oral bioavailability of CFZ-BTL in rabbits was 1.6-fold increased when compared to CFZ, resulting from followed by enhanced lipophilicity increased passive absorption in the intestine.

Keywords □ cefazolin butyrolactone ester, cefazolin, prodrug, partition coefficient, anti-bacterial activity, pharmacokinetic, bioavailability

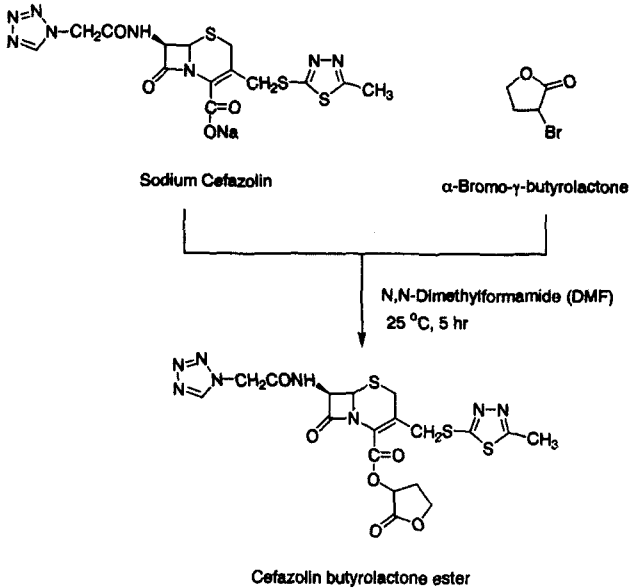
Cefazolin(이하 CFZ라 함)은 임상에서 패혈증, 폐렴, 기관지염, 만성 호흡기 감염의 2차 감염, 신우신염 및 방광염등에 사용되는데 1세대 세팔로스포린계 항생제이다. 그러나 CFZ는 경구투여시 위장관에서 흡수율이 낮기 때문에 임상에서는 근육 및 정맥주사로만 투여되고 있다. 대부분의 세팔로스포린계 항생제는 경구투여시 위장관에서 거의 흡수되지 않기 때문에¹⁻⁶⁾ 이들 약물 분자에 transport moiety를 도입한 prodrug을 만들어 위장관에서 흡수율을 증가시켜 경구투여가 가능하게 하고 또한 맛, 냄새, 용해도, 안정성 및 독성 등의 단점을 개선하고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다.

이와 같은 원리에 따라 β -락탐계 항생제인 암피실린에 대해서는 이미 탈암피실린, 바캄피실린 및 피밤피실린 같은 prodrug이 개발되어 있다.^{7,8)} 탈암피실린은 암피실린에 phthalidyl를 결합시킨 것으로 경구투여시 암피실린에 비해 생체이용률이 2.5~3배

증가하였으며,^{7,8)} 바캄피실린은 ethoxycarbonyloxyethyl기를 결합시킨 것으로 위장관 흡수가 빨라져 생체이용률이 암피실린에 비해 1.3~1.4배 증가하였고, 항균력도 증가하였다.⁹⁾ 또한 pivaloyloxymethyl기를 결합시킨 피밤피실린도 경구투여시 신속히 흡수되어 암피실린을 근육주사 했을 때와 거의 동일한 항균력을 보였다.¹⁰⁻¹²⁾ 이러한 현상은 일반적으로 암피실린을 phthalidyl, ethoxycarbonyloxyethyl 또는 pivaloyloxymethyl기로 ester화하면 지용성이 증대되고, 또한 세포막에 잘 분배되어 이들 화합물의 위장관 흡수가 증가되기 때문이라고 한다.¹³⁻¹⁸⁾ 또 piperacillin의 ethoxycarbonyloxyethyl ester도 암피실린의 prodrug의 경우와 마찬가지로 piperacillin보다 높은 흡수율을 보였다.¹⁹⁾

이와 같이 페니실린계 약물의 prodrug에 대해서는 그동안 많은 연구가 진행되어 왔으나,⁷⁻¹⁹⁾ 아직도 세팔로스포린계의 prodrug에 있어서는 성공한 예가 많지 않다.²⁰⁻²³⁾ Binderup 등²¹⁾은 cephaloglycin의 C₄-acetoxymethyl 및 ethoxycarbonyloxyethyl ester를 합성하여 사람에게 경구 투여했을 때 혈중농도가 cephaloglycin을 근육 주사했을 때보다도 높게 나타났다고 보고

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 062-230-6365 (팩스) 062-222-5414
(E-mail) jschoi@chosun.ac.kr



Scheme 1 - Synthesis of cefazolin butyrolactone ester.

하였고, Wright²²⁾ 및 Wheeler 등²³⁾도 유사한 결과를 보고하였다. 국내에서도 Chough 등²⁴⁾이 합성한 cephalixin phthalidyl ester 와 Kim 등²⁵⁾이 합성한 cefoperazone phthalidyl ester, 또한 Lee 등²⁶⁾이 합성한 cefazolin phthalidyl ester 등은 모두 parent drug보다 위장관에서 흡수가 향상되었으며, Kang 등¹⁹⁾이 piperacillin에, Choi 등²⁷⁾이 cefoperazone에, Ahn 등²⁸⁾이 cefazolin에 pivaloyloxy methyl기를 붙여 합성한 이들 ester 화합물의 지용성이 크게 증대되었고, 가토에 경구 투여한 경우 생체이용률이 증가되었다.

이상의 연구 결과들로부터 세팔로스포린계 약물도 prodrug화 함으로서 경구투여가 가능할 것으로 사료되어 CFZ의 butyrolactone ester(이하 CFZ-BTL라 함)를 합성하여 TLC, IR 및 NMR-스펙트럼에 의해 확인한 후, 이 합성품에 대해 유/수 분배 계수 실험 및 가토에서 흡수와 배설에 대한 약물동태학적 실험을 수행하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험방법

시료, 시약 및 기기

CFZ-BTL은 Cefazolin sodium(Sigma Chem. Co.)과 α -Bromo- γ -butyrolactone(Aldrich Co.)를 사용하여 UV, IR, NMR로 순수하게 합성되었음을 확인하였다. 시약은 N,N-Dimethylformamide(DMF), diethylether, n-hexane, ammonium acetate, dimethylsulfoxide(DMSO), acetone, n-octanol, sodium iodide, sodium bicarbonate, ethylacetate, trichloroacetic acid(TCA), citric acid, sodium phosphate, potassium bromide, potassium chloride 등은 시판 특급품을 사용하였다. 기기는 NMR(Varian,

Unity plus 300 MHz, NMR Spectrometer), IR(Perkin-Elmer Model 783), HPLC system은 Absorbance detector(SHIMADZU SPD-10A) Auto injector(SHIMADZU SIL-10A) Liquid chromatograph(SHIMADZU LC-10AD)이었고, 등속주입 펌프(Sage Co. M210), UV 흡광도측정기(Shimadzu, Model UV-240), Homogenizer(Janke & Kunkel GmbH Co. T25-SL)를 사용하였다.

CFZ-BTL 합성

Cefazolin sodium 4.76 g(0.01 mole)을 N,N-Dimethylformamide (DMF) 20 ml에 용해시키고 α -bromo- γ -butyrolactone 1.65 ml(0.01 mole)을 가하여 25°C에서 5시간 교반하여 반응시킨 후 반응액을 빙수(500 ml)에 교반하면서 점적하여 결정을 석출시켰다. 이 생성된 결정을 여과하여 건조시킨 후, ethylacetate 200 ml를 가하고 이 용액을 3% sodium bicarbonate 용액으로 3회 세척하였다. 분취한 ethylacetate 층에 무수 sodium sulfate를 소량 가하여 탈수시킨 후 여과하여 여액을 감압 농축 하였다. 이때 생성된 물질을 ethylacetate 에 용해시킨 후 hexane 500 ml에 교반하면서 점적시켜 생성되는 미세한 결정을 여과하여 수득율 32%의 CFZ-BTL를 얻었다.

겉보기 유/수 분배 실험

유/수 분배 실험용 수상으로 사용한 pH 1.2, 2.0 완충액은 0.2 M KCl 용액에 0.2 M HCl 용액을 적절히 가하여 pH를 조절하였으며, pH 3.0, 4.0 및 5.6 완충액은 0.1 M citric acid 용액과 0.2 M Na_2HPO_4 용액으로 조제하여 유상으로 n-octanol과 섞은 후 하루 방치하여 상호 포화될 수 있도록 하였다. 분배 실험으로 는 우선 각 약물 CFZ 및 CFZ-BTL을 DMSO 2 ml에 녹인 후 미리 n-octanol로 포화시킨 pH 완충액 48 ml를 가하고 충분히 교반하여 각 약물 농도가 1×10^{-3} M이 되도록 하였다. 이것을 rotating cell(12×13 cm)에 가하고 여기에 수상을 포화시킨 n-octanol 50 ml를 기벽을 따라 가한 후 rotating cell을 25°C와 36°C의 수욕 상에서 50 rpm으로 회전시키면서 10, 20, 30, 60, 90, 120분 및 6시간에서 octanol층 0.5 ml씩을 취하여 이에 methanol 2 ml를 가한 후, CFZ는 272 nm에서, CFZ-BTL은 267 nm에서 각각 UV-spectrophotometer로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 검량선에서 유상의 약물농도를 측정하여 분배계수를 산출하였다. 이때 평행에 도달한 시간은 12시간까지 각 시간에서 농도를 측정할 결과 6시간 이내에서 충분히 평행에 도달됨을 알 수 있었다.

가수분해 실험

하룻밤 절식시킨 가토를 마취시킨 후 대퇴동맥에서 혈액을 채취하였으며, 간문맥을 따라 생리식염수를 관류시켜 혈액을 제거한 후 간을 절취하였고 또한 소장을 절취한 후 생리식염수로 세

척하였다. 절취한 간과 소장 각 2.5 g에 1.15% KCl/0.01 M 인산 완충액 (pH 7.6) 10 ml를 넣어 방냉 하에서 homogenizer를 이용하여 균질화 한 다음, 4°C에서 12,000 rpm로 20분간 원심 분리하여 상정액을 얻었으며 혈액도 같은 조건으로 원심 분리하여 냉장 보관하였다. CFZ-BTL 1.0 mg을 DMSO 0.5 ml에 용해하고 위의 상정액 5 ml를 가한 후 37°C에서 incubation하였다. 간은 5, 10, 30, 60분에서, 혈액 및 소장은 10, 30, 60, 120, 180분에서 각각 0.2 ml의 검액을 취해 HPLC로 CFZ 농도를 측정하여 산출하였다. 이때 HPLC 조건은 다음과 같았다. 컬럼은 μ -Bondapak C₁₈(4.6 mm × 25 cm, 5 μ m particle size)를, 이동상은 Acetate Buffer (pH 5.0)(Sodium Acetate 1.6, Acetic Acid 1.2, 2 N Sodium Hydroxide 7.0, H₂O 2000): 메탄올 혼합액(80:20, v/v)을 사용하였으며, 유속은 1.0 ml/min으로 그리고 검출은 272 nm에서 하였다.

항균력 실험

CFZ-BTL의 항균력을 평가하기 위하여 균주는 시료에 감수성이 있는 것으로 알려진 그람 양성세균인 *Bacillus subtilis* ATCC 6633을 한국과학기술원 부설 유전자 은행에서 분양받아 사용하였다. 항균력 시험은 disk평판법(한국 항생물질 의약품 기준)에 따라 시행 하였다. 즉 시험균주의 균배양 및 검정 plate용으로 영양 천배지(Nutrient agar : peptone 5g, beef extract 3g, distilled water 1l)를 사용하였으며, *Bacillus subtilis*를 영양 천배지에 접종 도달한 후에 paper disk(8 mm 직경, Toyo Co.)에 시료 40 μ 씩을 적서 올려 놓고, 37±1°C에서 24시간 배양한 후 균발육억제환의 크기를 측정하였다.

시료는 먼저 *in vitro*에서 CFZ-BTL의 항균력을 측정하기 위하여, CFZ-BTL 1.0 mg을 DMSO 0.5 ml에 용해한 다음 CFZ-BTL 농도가 50 mcg/ml가 되도록 생리식염수로 희석한 다음 항균력시험을 하였다. *in vivo*에서 CFZ-BTL의 항균력은 약물동태학 실험과 같이 CFZ-BTL 170 mg/Kg(CFZ 150 mg/Kg에 해당하는 량)를 가토에 경구투여 후 0.5, 1, 2, 3, 4, 8 및 12시간에서 혈장을 채취하여 위에서 설명한 한국 항생물질 의약품 기준에 준하여 disk평판법에 따라 항균력 실험을 실시하였다.

약물동태학 실험

실험 동물 및 처치 - 일정한 조건하에서 사육한 체중 2.0 kg 선 후의 수컷 토끼를 물은 자유로이 공급하면서 24시간 절식시킨 후, 체중당 4 ml의 25% 우레탄 용액을 피하 주사하여 마취시킨 후 고정대에 고정하여 우측 대퇴동맥에 폴리에틸렌관(22gauge)을 삽입하여 혈액을 채취하였다. 그리고 채취한 혈액량 만큼의 생리식염수를 동속 주입 펌프를 통해 보충해 주었다.

약물투여 및 혈액채취 - CFZ-BTL의 약물동태학적 특성을 CFZ와 비교 평가를 하기 위하여 토끼 체중당 CFZ는 150 mg/kg을

그리고 CFZ-BTL은 170 mg/kg(CFZ 150 mg/kg 해당하는 량)을 약 10 ml의 증류수에 잘 현탁시킨 후 카테터를 통해 경구 주입하였다. 경구투여한 후 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 8 및 12시간에서 1 ml의 혈액을 채취하여 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 후 HPLC로 분석할 때까지 냉동고에 보관하였다.

혈청, 간 및 소장 조직 중 CFZ의 정량 - 가수분해 실험에서와 같이 처리한 혈청과 간 및 소장 조직 추출액 중 CFZ 농도는 Martin 등²⁹⁾의 방법을 약간 수정한 HPLC 방법으로 정량하였다. 혈청, 간 및 소장조직 추출액을 각각 0.2 ml 취한 후 6% TCA용액 0.2 ml를 가하여 제단백하고, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상정액을 얻은 후, 이것을 다시 0.45 μ m 멤브레인필터로 여과하여, 그 여과액 25 μ 를 HPLC에 주입하였다.

약물동태학적 분석

가토에 CFZ 및 CFZ-BTL을 각각 투여한 후 얻은 혈청농도-시간곡선을 1차속도 흡수와 1차속도 소실을 가정한 one-compartment model에 적용하여 약물동태학적 파라메타를 구하였다. 이때 MULTI program을 이용하여, Simplex method를 적용하여 AIC가 가장 낮을 때의 값을 출력하였다. 두 약물간의 측정치에 대한 유의성 검정은 unpaired Student's t-test로 하였으며, p<0.05인 경우를 유의성이 있는 것으로 하였다.

실험결과

CFZ-BTL의 확인

TLC - CFZ로부터 CFZ-BTL의 합성 과정 중 CFZ-BTL 생성을 확인하기 위해 반응물을 모세관을 사용하여 Silica gel 60F254로 만든 박층에 spot한 후, benzene : tetrahydrofuran : methanol 혼합용매(4:2:1, v/v/v)로 전개한 다음 자외선 등을 조사하여 확인한 결과, 합성품의 R_f값은 0.55이었다.

IR-Spectrum - IR (KBr, cm⁻¹) : IR-spectrum의 1784 cm⁻¹에서 β -lactam의 carbonyl기가, 1732 cm⁻¹에서 ester의 carbonyl기가, 1703 cm⁻¹에서 butyrolactone의 carbonyl기가 그리고 1624 cm⁻¹에서 -NHCO-기가 나타났다.

H¹-NMR spectrum - H¹-NMR(DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 2.35(1H, m, lactone-H), 2.67(4H, s, -CH₃, lactone-H), 3.66 and 3.72(2H, brs, -S-CH₂-), 3.83(1H, d, J=18 Hz, H-2), 3.89(1H, d, J=18 Hz, H-2), 4.22~4.30(2H, m, lactone-H), 4.42~4.53(1H, d, J=13.5 Hz, lactone-H), 5.18~5.19(1H, d, J=5 Hz, H-6), 5.30(2H, brs, -N-CH₂-), 5.71~5.79(1H, m, H-7), 9.51(1H, d, J=8.4 Hz, -CONH-), 9.54(1H, s, tetrazole-H).

물리화학적 실험

겉보기 유/수 분배 실험 - 유/수계면에서의 약물 분자의 이행

현상은 다음과 같은 가역 과정으로 요약할 수 있다.



이때, K_f 는 정반응 속도상수이고 K_b 는 역반응 속도상수이다. 여기서 수용액 층의 약물의 초농도를 $(Cw)_i$, 임의의 시간 t 에서의 n -octanol층의 약물농도를 $(Co)_t$, 계면 이행이 평형에 도달했을 때 n -octanol층의 약물 농도를 $(Co)_{eq}$ 라고 하면, 다음과 같은 식이 얻어진다.^{30,31)}

$$(Co)_t = \frac{(Cw)_i \cdot K_f}{K_f + K_b} (1 - e^{-(K_f + K_b)t}) \tag{2}$$

$$\log[(Co)_{eq} - (Co)_t] = \frac{(K_f + K_b)}{2.303} t + \log(Co)_{eq} \tag{3}$$

또, 시간 t 에 대해 $\log[(Co)_{eq} - (Co)_t]$ 를 plot하면 그 직선의 기울기로부터 $(K_f + K_b)$ 를 구할 수 있고, 이것을 다음 식에 대입하여 K_f 및 K_b 를 구할 수 있다.

$$K_f = \frac{(Co)_{eq}}{(Cw)_i} (K_f + K_b) \tag{4}$$

$$K_b = (K_f + K_b) - K_f \tag{5}$$

한편, 평형 상태에서의 분배계수 PC 는 K_f 와 K_b 를 써서 다음과 같이 구할 수 있다.

$$PC = \frac{K_f}{K_b} \tag{6}$$

본 실험에서 6시간 동안 혼합하여 구한 분배계수는 12시간 동안 혼합하였을 때의 분배계수와 차이가 없었다. 따라서 6시간의 혼합 후 구한 분배계수는 각 물질의 평형 분배계수임을 확인 하였다.

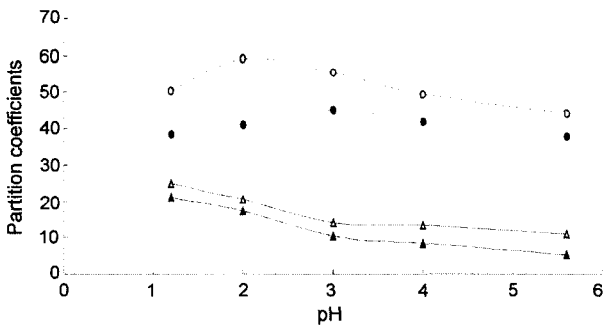


Fig. 1 - Apparent partition coefficients of cefazolin and cefazolin butyrolactone ester as a function of PH. key -●-; 25°C CFZ-BTL, -○-; 36°C CFZ-BTL, -▲-; 25°C CFZ, -△-; 36°C CFZ buffer solutions to n -octanol at each temperature.

CFZ는 pH 1.2~2.0 범위에서 분배계수가 높았으며, CFZ-BTL는 pH 2.0~3.0에서 분배계수가 가장 높았다. CFZ-BTL의 분배계수가 25 및 36°C에서 CFZ에 비해 5~50배 이상 높게 나타났다(Fig. 1).

가수분해

간 추출물에서 5분에서 CFZ-BTL이 5분에서 43.8%, 10분에서 65.5%, 30분에서 86.2%, 60분에서 98.0% 가수분해되었다. 혈액 및 소장에서는 각각 1시간에서 39.9, 20.8%, 2시간에서 64.6, 23.8%, 3시간에서 75.5, 31.5% 가수분해되어 혈액 및 장관의 효소에 의해서도 일부 분해됨을 알 수 있었다.

시간의 경과에 따라 가수분해되고 남은 CFZ-BTL의 잔존량을 로그값을 취해 시간에 따라 plot해 본 결과, 가수분해과정은 겉보기 1차 분해과정에 따랐으며 그 분해속도상수는 간 추출물에서는 0.0587 min^{-1} (반감기=11.8 min)로 가장 빨랐으며, 혈액 및 장관조직에서 각각 0.00768 (반감기=90.2 min), 0.00158 min^{-1} (반감기=438 min)이었다. 간에서의 가수분해속도가 혈액 및 소장 대비 각각 7.6, 37.2배나 빠름을 알 수 있었다. 이상에서 CFZ-BTL는 생체 내에서 쉽게 가수분해하며 특히 간에서 가장 빠름을 알 수 있었다(Fig. 2).

CFZ-BL의 항균력

CFZ-BTL 항균력을 *in vitro*에서 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 균주를 이용하여 발육저지면적으로 측정된 결과, prodrug자체는 항균력이 없었으나, CFZ-BTL를 투여한 토끼의 혈청은 항균력을 나타내었다(Fig. 3). 이로서 투여된 CFZ-BTL가 체내에서 가수분해되어 CFZ를 유리하고, 이것이 항균력을 나타냄을 알 수 있었다.

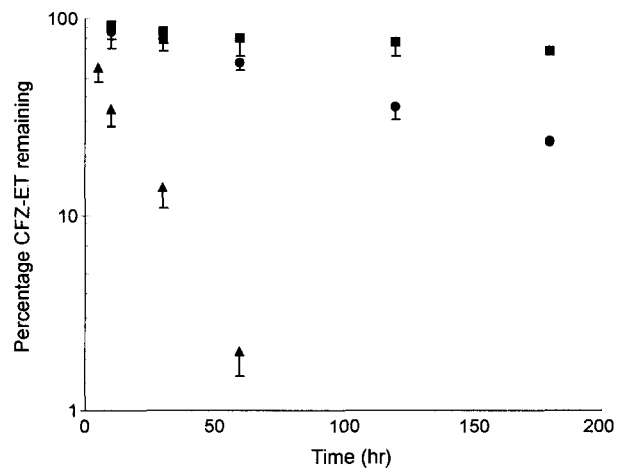


Fig. 2 - Apparent first-order degradation of cefazolin butyrolactone ester in rabbit's homogenates, liver (▲), blood (●), and intestine (■), Mean±S.D (n=5).

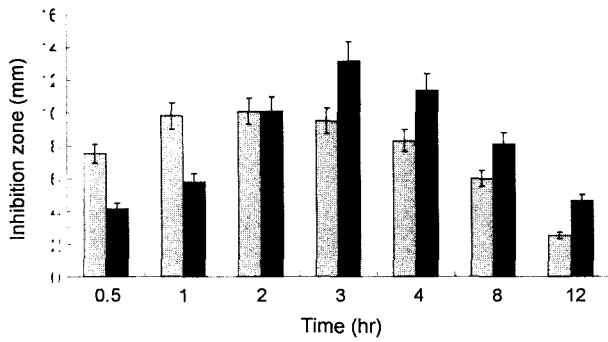


Fig. 3 - Comparison of inhibition zone diameter for *in vivo* serum samples at various time intervals following oral administration of cefazolin (□) (150 mg/kg) and cefazolin butyrolactone ester (■) (150 mg/kg as cefazolin) to rabbits. Mean±S.D (n=5).

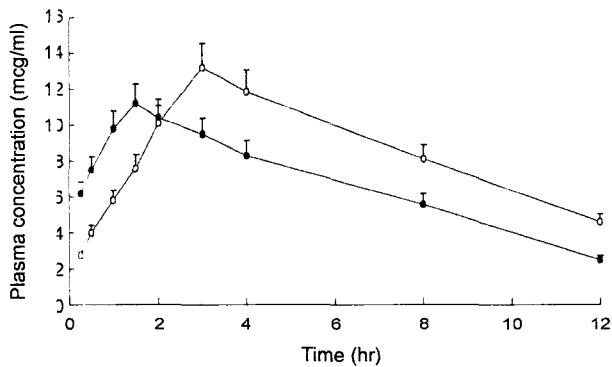


Fig. 4 - Serum concentration (mcg/ml) of cefazolin after oral administration of cefazolin (●) (150 mg/kg) and cefazolin butyrolactone ester (○) (150 mg/kg as cefazolin) to rabbits. Mean±S.D (n=5).

약물동태학 분석

기타 체중당 CFZ 150 mg/kg에 해당하는 CFZ 및 CFZ-BTL를 경구투여 한 후 혈청농도-시간곡선을 나타내었다(Fig. 4). 이들로부터 구한 약물동태학적 파라메타는 Table I에 나타내었다. CFZ 및 CFZ-BTL를 경구투여시 최고혈청농도(Cmax), 최고혈청농도 도달시간(Tmax) 및 혈청중농도곡선하면적(AUC)은 각각 10.9±2.4 및 13.6±3.3 mcg/ml(p<0.05), 1.4±0.3 및 3.8±0.9 hr, 그리고 90.1±19.3 및 140.4±52.5 hr·mcg/ml로 나타났다. CFZ 및 CFZ-BTL의 흡수속도정수(Ka)와 소실속도 정수(Ke)는 각각 2.14±0.054 및 0.362±0.082 hr⁻¹, 0.137±0.021 및 0.861

±0.036 hr⁻¹이었다. CFZ의 AUC를 100으로 했을 때 CFZ-BTL의 상대적 생체이용률이 1.56배 증가되었다.

고 찰

Cephalosporin의 경구흡수는 C-3 위치의 치환기에 따라 영향을 받는다. 대체로 Cephalosporin은 penicillin 보다 안정성은 좋으나 경구투여시 활성이 매우 낮다는 단점 가지고 있다. Cephalosporin의 경구흡수는 C-3 위치의 치환기에 따라 영향을 받는다. 경구용으로 개발된 cephalosporin 들은 C-3 위치에 acetoxymethyl, methyl, methoxy, chloro, vinyl기 등의 비교적 작은 분자량의 지용성인 치환기들을 가지고 있다. C-3 위치의 acetoxymethyl기를 극성인 chloro기나 methoxy기로 치환시키면 경구흡수성이 유지되면서 항균력은 증가된다고 한다.³²⁻³⁴⁾ cephalosporin의 구조적 특징은 cephaloglycin이 C-3 위치에 acetoxymethyl기를 가지고 있지만,²¹⁾ 대체적으로 C-3 위치에 heterocycle로 치환되어 있다. 과거에는 C-7 위치에 phenylglycyl기나 hydroxyphenylglycyl기를 도입하여 경구흡수성을 증가시키려는 시도가 많았다. 최근에는 이들 기 대신 항균력 및 세균에 대한 침투력이 강화된 aminothiazole 또는 β-lactamase에 대한 저항성이 증가된 methoxyimino기로 치환시키고, C-3 위치를 다양한 heterocycle로 치환하고, C-4 위치의 carboxyl기를 ester화시켜 줌으로서 carboxyl기를 가진 cephalosporin보다 안정화되며 경구흡수를 증가시킨다. ester로 prodrug화한 cephalosporin 항생제는 광범위 항균력 및 β-lactamase에 대한 저항성을 향상시킨다. C-4 위치의 carboxyl기를 변화시켜 만든 prodrug은 다음과 같은 조건을 충족시켜야 한다. 첫째, 경구투여된 후 위장관에서 흡수되고 둘째, 혈중에서 본래의 parent drug으로 전환되어야 한다. 한편 penicillin계 항생제의 prodrug에 대한 연구를 종합하여 간추려 보면 1970년에는 Daehne 등³⁵⁾이 ampicillin의 C-3 위치에 acyloxymethyl ester들을 도입하였는데 그 중 pivaloyloxymethyl ester 형태인 pivampicillin이 ampicillin보다 훨씬 경구흡수도가 좋았으며, 흡수 후 빠르게 가수분해되어 parent drug로 전환되어 혈액 및 조직에서 높은 농도를 나타냈다. 또한 ampicillin의 C-3 위치에 ethylisopropylcarbamate ester (bacampicillin),⁹⁾ phthalidyl ester(talampicillin),⁸⁾ (3-phthalidylidene) ethyl ester³⁶⁾와 (5-substituted 2-oxo-1,3-dioxolentyl) methyl

Table I - Pharmacokinetic parameters of cefazolin and cefazolin butyrolactone ester in rabbits

Pharmacokinetic parameters						
Sample	Cmax (mcg/ml)	Tmax (hr)	AUC (hr·mcg/ml)	Ka (hr ⁻¹)	Kel (hr ⁻¹)	F (%)
CFZ	10.9±2.4	1.4±0.3	90.1±19.3	2.14±0.054	0.137±0.021	100
CFZ-BTL	13.6±3.3**	3.8±0.9**	140.4±52.5**	0.362±0.082**	0.186±0.0036	156

Mean±S.D (n=5), Significantly different from the CFZ (**p<0.01). F; Relative bioavailability to oral CFZ.

ester(KBT-1585)³⁷⁾를 도입한 prodrug도 ampicillin보다 훨씬 잘 흡수되었다. 그리고 Clayton 등³⁸⁾은 carbenicillin의 C-3 위치에 α -carboxy ester들을 도입한 결과 간에서 가수분해가 잘되고 혈중농도도 높게 나타났음을 보고했고, Tsuji 등³⁹⁾은 carfecillin과 carindacillin의 C-3 ester에 대한 위장관 흡수율을 측정하였는데 이들이 parent drug보다 훨씬 증가된 장관 흡수율을 보였다.

Cephalosporin에 대한 prodrug로는 Chauvette 등⁴⁰⁾이 cephalothin의 C-4 위치의 carboxyl기를 경구적으로 active한 유도체를 만들고자 esterfication을 하였으며, Binderup 등²¹⁾은 cephaloglycin의 acetoxymethyl, butyrolactone ester를 도입하여 mouse에 경구투여했을 때 이들이 parent drug인 cephaloglycin보다 C_{max} 가 3~6배 증가되었음을 보고하였고, Wheeler 등²³⁾은 cephalexin에 acetoxymethyl, butyrolactone과 phthalidyl ester들을 합성하여 쥐에 경구투여하였을 때, 위장관에서 약물이 흡수되는 정도가 parent drug보다 3~4배가 되고, 혈중농도도 prodrug이 상승된 수치를 나타냈는데 그 중 pivaloyloxymethyl ester의 prodrug이 가장 높은 혈중농도를 나타냈다고 보고하였다. 이러한 현상은 일반적으로 parent drug이 phthalidyl, butyrolactone 및 pivaloyloxymethyl ester화됨으로서 지용성이 증대되고, 또한 세포막에 잘 분배됨으로 이들 화합물의 위장관 흡수가 증가되었기 때문으로 보고되고 있다.¹³⁻¹⁹⁾ 대부분의 약물은 소화관내로 약물이 흡수되기 위해서는 먼저 소화관내에서 용해되어야 하며, 용해된 약물이 흡수부위의 pH에서 비해리형(분자형)으로 존재하는 비율이 클수록 흡수되기 쉽다. 흡수부위에서 비해리형으로 존재하는 비율은 그 흡수부위의 pH와 pKa로 결정된다. 또한 pKa(해리상수)가 같은 정도의 약물의 경우에는 약물간의 흡수율의 차이는 용해된 약물의 지용성에 크게 의존하고 지용성이 큰 약물일수록 흡수되기 쉽다. 이 지용성의 지표로 유수분배계수가 이용되고 있다.

본 연구에서 합성한 CFZ-BTL가 겔보기 유/수 분배 실험에서 CFZ에 비해 지용성이 대폭 증가했음을 알 수 있었는데, 이것은 butyrolactone기에 의한 것으로⁹⁾ 이에 의해 CFZ-BTL의 위장관 흡수가 증가되어 CFZ 투여시 보다 혈청 CFZ 농도를 증가시킨 결과를 얻은 것으로 생각된다. 경구투여된 약물은 장관벽을 통해 혈액으로 흡수되어 혈중에 존재하는 nonspecific esterase를 포함한 많은 효소에 의해 대사를 받게 되며, 간은 약물 대사효소가 존재하므로 많은 종류의 약물분자를 신속히 대사시킬 수 있는 약물 대사의 주요부위이기 때문에 간초회통과로 인해 대사를 받게 된다. 본 연구에서 CFZ-BTL이 생체내로 흡수된 후의 혈청을 HPLC로 분석한 결과 CFZ-BTL를 검출할 수 없었다. 이는 CFZ-BTL가 위장관 및 간을 통과하면서 non-specific esterase에 의해 parent drug인 CFZ로 가수분해됨을 나타내 주는 것으로 추정되었다.^{41,42)} 또한 항균력 실험에서도 CFZ-BTL는 *in vitro*상에서 항균력을 나타내지 않은 반면, 이를 경구 투여한 혈청에서는 항균력을 나타

내었는데, 이 결과도 CFZ-BTL가 체내에서 가수분해되어 CFZ를 유리하고 이것이 항균력을 나타내고 있음을 보여준다. Pharmacokinetics는 약물의 물리 화학적 성질 및 투여방법이 약물의 혈중농도 이행에 영향을 미치게 되며, 생체이용율을 약물평가의 지표로 한다. 따라서 경구투여 한 후 평균 혈중농도와 pharmacokinetic parameter들을 비교 검토하였다. 그 결과 CFZ-BTL을 투여하였을 때가 CFZ를 투여하였을 때 보다 생체이용율(AUC)이 1.6배 높았다. 이상의 결과들을 종합하여 볼 때 CFZ-BTL는 CFZ에 비해 지용성이 증가되었으며, 흡수 후 신속히 parent drug인 CFZ로 가수분해되는 바람직한 prodrug이라고 판단되었다.

결 론

위장관에서 흡수가 개선된 cefazolin(CFZ)의 prodrug을 개발할 목적으로 C-4 에스테르인 cefazolin butyrolactone ester(CFZ-BTL)를 합성하여 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Sodium cefazolin과 α -bromo- γ -butyrolactone를 25°C에서 반응시켜 cefazolin butyrolactone ester의 백색 분말을 얻어 TLC, IR, NMR을 분석하여 합성되었음을 확인하였다.
2. pH 1.2~5.6의 완충액 및 n-octanol을 이용한 겔보기 유/수 분배 실험으로 CFZ-BTL가 CFZ에 비해 지용성이 대폭 증가하였음을 알 수 있었다.
3. 생체내에서 CFZ-BTL의 가수분해과정은 겔보기 1차 분해 과정에 따랐으며 그 분해속도상수는 간 추출물에서는 0.0587 min^{-1} (반감기=11.8 min)로 가장 빨랐으며, 혈액 및 장관 내에서 각각 0.00768 (반감기=90.2 min), 0.00158 min^{-1} (반감기=438 min)이었다.
4. 항균력실험으로 CFZ-BTL 자체는 항균력을 나타내지 않는 반면 경구투여 후 얻은 혈청은 항균력을 나타내는 것으로 보아, CFZ-BTL는 생체 내에서 parent drug인 CFZ로 가수분해된 후 항균력을 나타내는 CFZ의 prodrug임을 알 수 있었다.
5. 가토 경구투여 실험에서 CFZ에 비해 CFZ-BTL의 최고혈중농도(C_{max})는 10.9 ± 2.4 에서 $13.6 \pm 3.3 \text{ mcg/ml}$ 로 높아졌고, 최고혈중농도 도달시간(T_{max})은 1.4 ± 0.3 에서 $3.8 \pm 0.9 \text{ hr}$ 로 지연되었다. 혈청중농도곡선하면적(AUC)은 90.1 ± 19.3 에서 $140.4 \pm 52.5 \text{ hr} \cdot \text{mcg/ml}$ 으로 유의성있게($p < 0.01$) 증가하여 상대적 생체이용률이 1.6배 증가하였다.
6. CFZ-BTL은 CFZ의 위장관 흡수를 개선할 수 있는 경구용 prodrug으로서 개발가능성이 있을 것으로 사료된다.

문 헌

- 1) Neu, H. C. : Clinical uses of cephalosporins. *Lancet*. 2, 252

- (1982).
- 2) Carzone, P., Lyon, J. and Yu, V. L. : Third generation and investigational cephalosporins. *Drug Intell. Clin. Pharm.* **2**, 448 (1983).
 - 3) Schumacher, G. E. : Pharmacokinetic and microbiologic evaluation of dosage regimens for newer cephalosporins and penicillin. *Clin. Pharm.* **2**, 448 (1983).
 - 4) Hudley, M. N. and Nightingale, C. H. : Effect of protein binding on the pharmacology of cephalosporin, Philadelphia. *Francis & Taylor Wood Institute for the History of Medicine* 227 (1982).
 - 5) Nightingale, C. H., Greene, D. S. and Quintiliani, R. : Pharmacokinetics and clinical uses of cephalosporin antibiotics. *J. Pharm. Sci.* **64**, 1899 (1975).
 - 6) Biogard, J. M., Comete, F. and Pinget, M. : Pharmacokinetics of cephalosporin antibiotics. *Antibiot. Chemother.* **25**, 123 (1978).
 - 7) Clayton, J. P., Cole, M., Elson, S. W. and Ferres, H. : BRL.8988 (clampicillin), well absorbed oral form of ampicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **5**, 670 (1974).
 - 8) Clayton, J. P., Code, M., Elson, S. W., Ferres, H., Hanson, J. C. and Sutherland, R. : Preparation, hydrolysis, and oral absorption of lactonyl esters of penicillins. *J. Med. Chem.* **19**, 1385 (1976).
 - 9) Rozenzweig, M., Staquet, M. and Klastersky, J. : Antibacterial activity and pharmacokinetics of bacampicillin. *Clin. Pharmacol. Ther.* **19**, 592 (1975).
 - 10) Daehne, W. E., Frederiksen, E., Gundersen, E., Morch, H. J. and Godtfredson, W. O. : Acyloxymethyl esters of ampicillin. *J. Med. Chem.* **13**, 607 (1970).
 - 11) Jensen, G. N. and Russell, T. J. : Some novel penicillin derivatives. *J. Chem. Soc.* **21**, 132 (1965).
 - 12) Cho, J. C. K., Foltz, E., Wallick, H. and Kwan, K. C. : Pharmacokinetics of pivapicillin and ampicillin in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* **16**, 35 (1974).
 - 13) Alhaider, A. A., Selassie, C. D., Chua, S. O. and Lien, E. J. : Measurements of ionization constants and partition coefficients of guanazole prodrugs. *J. Pharm. Sci.* **71**, 89 (1982).
 - 14) Houston, J. B., Upshall, D. G. and Bridges, J. W. : Further studies using carbamate ester as model compounds to investigate the role of lipophilicity in the gastrointestinal absorption of foreign compounds. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **195**, 57 (1975).
 - 15) Fansch, C. and Clayton, J. N. : Lipophilic character and biological activity of drugs. *J. Pharm. Sci.* **62**, 1 (1973).
 - 16) Houston, J. B., Upshall, D. G. and Bridges, J. W. : A reevaluation of the importance of partition coefficients in the gastrointestinal absorption of nutrients. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **189**, 244 (1974).
 - 17) Tsuji, A., Miyamoto, E., Terasaki, T. and Yamana, T. : Carbenicillin prodrugs. *J. Pharm. Sci.* **71**, 4 (1982).
 - 18) Tsuji, A., Miyamoto, E., Kagami, I., Sakaguchi, H. and Yamana, T. : G. I. absorption of β -lactam antibiotics : Kinetic assessment of competing absorption and degradation in G. I. tract. *J. Pharm. Sci.* **67**, 1701 (1987).
 - 19) Kang, S. A. : Studies on oral absorption of piperacillin pivaloyloxymethyl ester. *J. Kor. Pharm. Sci.* **18**, 49 (1988).
 - 20) Saikawa, I., Takano, S., Momono, K., Takakura, I. and Yoshida, C. : Studies on β -lactam antibiotics for medicinal purpose. *Yakugaku Zasshi.* **99**, 929 (1979).
 - 21) Binderup, E., Godtfredsen, W. O. and Roholt, K. : Orally active cephalolycin esters. *J. Antibiotics.* **24**, 767 (1971).
 - 22) Wright, W. E., Wheeler, W. J., Frogge, V. D. and Finley, D. R. : Orally active esters of cephalosporin antibiotics. synthesis and biological properties of the acetoxyethyl ester of cefamandole. *J. Antibiotics.* **32**, 1155 (1979).
 - 23) Wheeler, W. J., Preston, D. A., Wright, W. E., Huffman, G. W. and Howard, D. P. : Orally active esters of cephalosporin antibiotics. synthesis and biological properties of aminoacyloxymethyl esters of 7-[D-(-)-mandel-amino]-3-[(1-ethyl-1H-tetrazo-5-yl)thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylic acid. *J. Med. Chem.* **22**, 657 (1979).
 - 24) Chough, Y. S., Choo, Y. S. and Yang, J. I. : Availability of cephalexin phthalidyl ester as a cephalexin prodrug. *Yakhak Hoeji.* **24**, 11 (1980).
 - 25) Kim, J. K., Choi, S. H., Park, G. B. and Choi, Y. W. : Pharmaceutical studies of cefoperazone phthalidyl ester, a novel prodrug of cefoperazone. *J. Kor. Pharm. Sci.* **17**, 183 (1987).
 - 26) Lee, J. H. and Kim, G. N. : Synthesis and biopharmaceutical studies of cefazolin phthalidyl ester prodrug. *J. Kor. Pharm. Sci.* **23**, 61 (1993).
 - 27) Choi, Y. W., Park, G. B., Choi, S. H. and Kim, J. K. : Oral absorption of cefoperazone pivaloyloxymethyl ester. *J. Kor. Pharm. Sci.* **18**, 197 (1988).
 - 28) Ahn, S. Y., Lee, J. H., Choi, J. H. and Burm, J. P. : Synthesis and biopharmaceutical studies of cefazolin pivaloyloxymethyl ester. *J. Kor. Pharm. Sci.* **22**, 39 (1992).
 - 29) Martin, C. F., Takahashi, L. T., Worsley, J. L., Hagemeyer, C. J. and Hall, L. K. : Analysis of sodium cefazolin in ophthalmic ointment by high performance liquid chromatography. *J. Chromato.* **402**, 376 (1987).
 - 30) Schumacher, G. E. and Nagwekar, J. B. : Kinetic and thermodynamic aspects of *in vitro* interface transfer of sulfonamides II. *ibid.* **63**, 245 (1974).
 - 31) Tsuji, A., Kubo, O. and Yamana, T. : Physicochemical properties of beta-lactam antibiotics: oil water distribution. *ibid.* **66**, 1675 (1977).
 - 32) Chauvette, R. R. and Pennington, P. A. : Chemistry of

- cephalosporin antibiotics. 3-methoxy-and 3-halo-3-cephems. *J. Med. Chem.* **18**, 403 (1975).
- 33) Ryan, C. W., Simon, R. L. and Heyningen, E. M. : Chemistry of cephalosporin antibiotics. XIII. Desacetoxycephalosporins. The synthesis of cephalexin and some analogs. *J. Med. Chem.* **12**, 310 (1969).
- 34) Chauvette, R. R., Pennington, P. A., Ryan, C. W., Cooper, R. D. G., Lose, F. L., Wright, I. G., Van Heyningen, E. M. and Huffman, G. W. : Chemistry of cephalosporin antibiotics. XXI. conversion of penicillins to cephalexin. *J. Org. Chem.* **36**, 1259 (1971).
- 35) Daehne, W. V., Frederiksen, E., Gundersen, E., Lund, F. and Petersen, H. J. : Acyloxymethyl esters of ampicillin. *J. Med. Chem.* **13**, 607 (1970).
- 36) Sakamoto, F., Ikeda, S. and Tsukamoto, G. : Studies on Prodrugs. I. Preparation and characterization of acyloxyallyl esters of ampicillin. *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 2698 (1984).
- 37) Sakamoto, F., Ikeda, S. and Tsukamoto, G. : Studies on Prodrugs. II. Preparation and characterization of (5-substituted-2-xo-1,3-dioxolen-4-yl) methyl esters of ampicillin. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 2241 (1984).
- 38) Clayton, J. P., Cole, M., Elson, S. W., Hardy, K. D., Mizen, L. W. and Sutherl, R. : Preparation, hydrolysis and oral absorption of α -carboxy esters of carbenicillin. *J. Med. Chem.* **18**, 172 (1975).
- 39) Tsuji, A., Miyamoto, E., Terasaki, T. and Yamana, T. : Carbenicillin prodrugs :stability kinetics of α -phenyl and α -indanyl esters in aqueous solution. *J. Pharm. Sci.* **68**, 1259 (1979).
- 40) Chauvette, R. R. and Flynn, E. H. : Chemistry of cephalosporin antibiotics. V. Amides and esters of cephalothin. *J. Med. Chem.* **9**, 741 (1966).
- 41) Shiobara, Y., Tachibana, A., Watanabe, H. and Sado, T. : Phthalidyl D- α -aminobezyl penicillinate hydrochloride, A new orally ampicillin ester. *J. Antibiotics.* **27**, 665 (1974).
- 42) Tachibana, A., Komiya, M., Shiobara, C., Yano, K. and Maeno, H. : Absorption, distribution, metabolism and excretion of talampicillin hydro-chloride. *J. Infectious Dis.* **49**, 709 (1975).
- 43) Lee, J. H., Choi, J. S., Burm, J. P., Ko, O. H., Choi, H. K., Park, J. Y. and Kim, E. C. : Synthesis and biopharmaceutical studies of ceftazole phthalimidyl ester. *Intrn. J. Chosun Univ.* **1**(3), 531 (1998) 531.