

## 세팔로스포린 3'-퀴놀론의 물리화학적 성질, 안정성 및 체내약물동태

나성범\* · 공재양\* · 김완주\* · 지웅길

충남대학교 약학대학, \*한국화학연구소

(Received November 4, 1993)

### Physicochemical Properties, Stabilities and Pharmacokinetics of Cephalosporin 3'-Quinolone Dithiocarbamate

Sung-Bum La<sup>#</sup>, Jae-Yang Kong<sup>\*</sup>, Wan-Joo Kim<sup>\*</sup> and Ung-Kil Jee

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

<sup>\*</sup>Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon 305-606, Korea

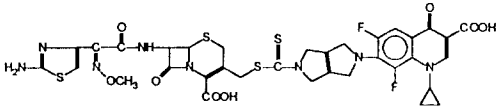
**Abstract**—A cephalosporin with an aminothiazolylmethoxyimino-type side chain at the 7 position and bicyclic quinolone dithiocarbamate at the 3' position was synthesized. It has broad and potent antibacterial activity *in vitro*. The antibacterial spectrum reflects contributions of both the cephalosporin moiety and the quinolone moiety. Thus, this compound was named DACD implying a dual-action cephalosporin derivative. In this paper, the physicochemical properties (lipid-water partition, pKa), stability and pharmacokinetics of DACD were determined and compared with cefotaxime 3'-norfloxacin dithiocarbamate (CENO). Stability tests were studied in pH 1.20, 6.80 and 8.00 buffers and in the presence of AB type human plasma, rat liver homogenate and its  $\beta$ -lactamase. The pharmacokinetic parameters of DACD were evaluated in mice after a single intravenous dose of 40 mg/kg. The results are as follows. The lipid-water partition coefficient of DACD was higher than that of CENO. The calculated pKa values of CENO and DACD, were  $6.82 \pm 0.03$ ,  $7.53 \pm 0.21$ , respectively. In the hydrolysis test, half-lives ( $t_{1/2}$ ) of CENO and DACD were 66.0 hr and 80.0 hr in pH 6.80 buffer, 190 hr and 91.4 hr in pH 8.00 buffer. CENO and DACD were rapidly hydrolyzed in human plasma and in rat liver homogenate. Half-lives ( $t_{1/2}$ ) of CENO and DACD were 1.29 hr and 1.15 hr in human plasma, 0.62 hr and 0.71 hr rat liver homogenate. In  $\beta$ -lactamase stability test, CENO and DACD were very stable to the  $\beta$ -lactamases obtained from three different strains. Half-life ( $t_{1/2}$ ) and areas under the curve (AUC) in mice were 2.33 hr and 15.97 (mg·h/l), respectively.

**Keyword** □ Dual-action cephalosporins, DACD, pKa, lipid-water partition coefficient, stability test, artificial gastric juice, artificial intestinal juice, human plasma, rat liver homogenate,  $\beta$ -lactamase stability, pharmacokinetics.

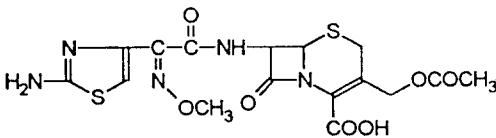
듀얼-액션 세팔로스포린으로 새롭게 합성한 DACD (Scheme 1)는 세포타ksam의 3'위치에 비싸이클릭 퀴놀론인 1-cyclopropyl-7[3,7-diazabicyclo[3.3.0]oct-1(5)-en-3-yl]-6,8-difluoro-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid(KR-10679)를 디치오카바메이트 형태로 한 후 결합시킨 화합물로서 그람 양성균과 그람 음성균 모두에 대한 폭 넓은 항균 스펙트럼과 우수한

항균력을 나타냈음을 보고하였다.<sup>1)</sup> 어떤 신약 후보물질은 신약으로 개발하기 위해서는 pKa, 유수분배계에 대한 안정성을 검토하고 체내동태 특성을 파악하는 것이 필요하다. 이에 저자들은 화합물의 물리화학적 성질을 측정하고자 세포타ksam(Scheme 2) 및 [6R-[6 $\alpha$ , 7B-(Z)]-7-[[[(2-amino-4-thiazolyl)methoxyimino]acetyl]amino]-3-[[[[4-(3-carboxyl-1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-quinolonyl)-1-piperazinyl]

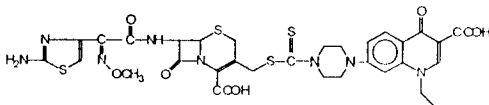
<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.



**Scheme 1**—Structure of [6R-[6 $\alpha$ , 7 $\beta$ (Z)]]-7-[[[(2-amino-4-thiazolyl)methoxyimino]-acetyl]amino]-3-[[[[7-(3-carboxyl-1-cyclopropyl-6,8-difluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-quinolonyl)-3,7-diazabicyclo[3.3.0]oct-1(5)-en-3-yl]thioxomethyl]thio]methyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-carboxylic acid (DACD).



**Scheme 2**—Structure of [6R-[6 $\alpha$ , 7 $\beta$ (Z)]]-3-(acetyloxymethyl)-7-[[[(2-amino-4-thiazolyl)methoxyimino]acetyl]amino]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid(cefotaxime).



**Scheme 3**—Structure of [6R-[6 $\alpha$ , 7 $\beta$ (Z)]]-7-[[[(2-amino-4-thiazolyl)methoxyimino]-acetyl]amino]-3-[[[[4-(3-carboxyl-1-cyclopropyl-6 fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-quinolonyl)-1-piperazinyl]thio]methyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid (CENO).

thioxomethyl]methyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0] oct-2-ene-2-carboxylic acid(CENO, Scheme 3)를 비교물질로 하여 DACD의 pKa값과 유수분배계수를 측정하였으며 인공위액, 인공장액 및 pH 8.00 인산염 완충용액에서의 안정성을 측정하고 사람의 혈장과 흰쥐의 간 호모지네이트에서의 가수분해 정도를 HPLC분석법으로 정량하여 DACD의 체내흡수 후의 안정성을 *in vitro*상의 실험으로 실시하였으며 또한 DACD에 대해 3가지  $\beta$ -lactamase에 대한 안정성과

체내동태를 실험한 결과를 보고한다.

### 실험방법

#### 시약 및 기기

세포탁심은 Hoechst AG (Postfach, Frankfurt/M) 제품을, 세팔로리딘은 Sigma사(St. Louis, MO)제품을 사용하였고 HPLC분석용 메탄올과 아세트니트릴은 Merck사(D-6100 Darmstadt, FRC)제품, 사람혈장(AB형)은 적십자 혈액원(Korea)으로부터 공급받아 사용하였으며 Sephadex<sup>®</sup>G-150은 Pharmacia LKB (Biotechnology AB, Uppsala, Sweden)제품, fleisch extract broth와 Mueller-Hinton agar는 Difco Lab. (Detroit, MI)제품, 말 혈청은 Gibco Lab. Life Technol., Inc.(Madison, WI) 및 양의 혈액은 Korea Media사(Korea)제품을 사용하였고 기타 시약은 특급 혹은 1급을 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기로 UV/Visible 분광광도계(PU8800, Pye Unicam Ltd., York Street, Cambridge), 워터스 Associates 모델(펄프 모델 510, U6K 인젝과 카트리지 C<sub>18</sub>(내경: 8 mm, 길이: 10 cm, 입자크기: 5  $\mu$ m, Milford, MA)을 사용하여 UV  $\lambda_{254\text{nm}}$ 에서 측정하였다. 또한  $\beta$ -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.

#### 유수분배계수

유상과 수상의 제조는 유상으로 n-옥탄올 및 사염화탄소를 실험 전 0.2 M-염산완충용액(pH 1.20)과 0.2 M-인산염 완충용액(pH 6.50)으로 각각 포화시켰고 수상은 n-옥탄올과 사염화탄소로 미리 포화시켜 사용하였다. 시료의 제조는 세포탁심, CENO와 DACD 화합물 각각 일정량을 디메틸설폭사이드(DMSO) 2.0 ml를 가해 용해시키고 0.2 M-염산 완충용액과 0.2 M-인산염 완충용액을 가해 250 ml로 하여 각각의 약물의 농도를  $1.00 \times 10^{-4}$  M이 되도록 하였다. 실험은 마개

달린 시험관(부피: 15 ml)에 각 화합물 용액을 수상으로 5.0 ml씩 가하고 n-옥탄올과 사염화탄소를 유상으로 각각 5.0 ml씩 가한 다음 차광하 37±0.5°C에서 1시간동안 진탕하고 24시간 정치한 후 수상을 분취하여 각각의 화합물에 대한 최대흡수파장에서 흡광도를 측정하여 농도를 계산하였다.

### pKa측정

시료의 제조는 세포탁심, CENO와 DACD 화합물 일정량을 DMSO 2.0 ml를 가해 용해시키고 0.1N-염산용액 및 0.2 M-인산염완충용액(pH 6.50)을 가해 250 ml로 하여 각각의 약물농도를  $1.00 \times 10^{-4}$  M이 되도록 조절하였다. 실험은 각 화합물 용액을 마개달린 시험관에 수상으로 5.0 ml씩 가하고 유상으로 n-옥탄올과 사염화탄소를 5.0 ml씩 가한 다음 37±0.5°C에서 1시간동안 진탕하고 24시간 정치한 후 수상을 분취하여 수상의 pH를 즉시 측정하고 각각의 화합물에 대한 최대흡수파장에서 흡광도를 측정하여 농도를 계산하였다. 이때 세포탁심, CENO와 DACD는 약산성이므로 pKa값은 0.2 M-염산완충용액(pH 1.20)을 수상으로 사용한 것로부터 진분배계수(Pm)값을 얻고 0.2 M-인산염 완충용액(pH 6.50)을 수상으로 사용한 것로부터 겔보기분배계수 (Papp)값을 얻은 다음 (식 1)에 적용시켜서 pKa값을 산출하였다.

$$pKa = pH + 10g \frac{Papp}{Pm - papp} \quad (\text{식 1})$$

### pH의 변화에 따른 가수분해

세포탁심, CENO와 DACD 각각의 화합물을 DMSO 1.0 ml를 가해 용해시키고 메탄올 9.0 ml를 가해  $1.57 \times 10^{-2}$  M 농도로하여 스톡용액으로하여 사용하였다. 마개달린 시험관에 (제1액, pH 1.20), (제2액, pH 6.80) 및 약염기성인 0.2 M-인산염 완충용액(pH 8.00) 10.0 ml를 취하여 37±0.5°C로 유지시키고 각 약물의 스톡용액 100 μl를 가하여  $1.57 \times 10^{-4}$  M의 농도로써 반응시키면서 일정시간마다 반응용액을 취하여 직접 HPLC에 주입하여 측정하였다. 또한 피크의 높이를 동일한 조건으로 측정한 표준품과 비교하여 가수분해되지 않은 약물의 잔존량을 구하였으며 이때 사용된 HPLC조건은 다음과 같다.<sup>2,3)</sup> 세포탁심은 이동상으로 (트리에칠아민 : 빙초산 : 물 = 14 : 5.7 : 80.3 v/v%의

혼합용액) : 1N-초산 : 아세트니트린 : 물 = 1.2 : 2.8 : 130 : 866(v/v%)을 사용하였고 CENO는 이동상으로 아세트니트린 : 0.05 M-인산완충용액(pH 2.60) = 20 : 80(v/v%)을 사용하였으며 DACD는 아세트니트린 : 0.05 M-인산완충용액(pH 2.60) = 25 : 75(v/v%)을 사용하여 측정하였다.

### 사람 혈장에서의 가수분해

AB형의 사람 혈장을 0.05 M-인산염 완충용액(pH 7.40)을 써서 80%로 희석한 액<sup>4,5)</sup> 및 0.05 M-인산염 완충용액(pH 7.40)중에서의 약물의 가수분해를 다음과 같이 측정하여 서로 비교하였다. DACD의 분석은 HPLC로 분석하였으며 겔보기 1차속도 상수는 약물의 잔존량을 편대수 그래프에 나타내 그 기울기로부터 구하였다. 이 실험은 3회 반복하였다.

**0.05 M-인산염 완충용액(pH 7.40)에서의 가수분해**—마개달린 시험관에 0.05 M-인산염 완충용액(pH 7.40) 10.0 ml를 취하여 37±0.5°C로 유지시키고 약물의 스톡용액 50 μl를 가하여  $7.85 \times 1/10^{+5}$  M의 농도로써 반응시키면서 일정시간마다 반응용액 20 μl를 취하여 직접 HPLC에 주입하여 측정하였다. 또한 피크 높이를 동일한 조건으로 측정한 표준품과 비교하여 가수분해되지 않은 약물의 잔존량을 구하였다.

**80%-사람 혈장에서의 가수분해**—마개달린 시험관에 80%-사람 혈장용액 4.50 ml를 취하여 37±0.5°C로 유지시키고 세포탁심, CENO 및 DACD약물의 스톡용액 500 μl를 가하여  $1.41 \times 10^{-3}$  M의 농도로 하였다. 일정시간마다 이 용액 200 μl를 취하여 원심분리관에 넣고 에탄올 1.0 ml를 가하여 제단백하고 볼텍스 믹서로 서로 혼합해서 4500 rpm으로 2분동안 원심분리한 다음 여과한 용액 20 μl를 취해 직접 HPLC에 주입하여 측정하였다.

**흰쥐 간 호모지네이트에서의 가수분해**—시료의 제조는 Sprague-Dawley 흰쥐를 기절시키고 개복하여 간을 분리한 다음 차가운 생리식염수로 세척하고 종이수건으로 건조시켜 칭량하였다.<sup>6)</sup> 이를 가위로 세절하고 0.05 M-인산염 완충용액(pH 7.40)으로 20%(w/v)가 되도록 제조한 후 초음파 조직 균질기(out put : 100w)로 30분 동안 균질화시킨 다음 4°C에서 9000 rpm으로 60분간 원심분리하여 상등액을 얻어 4°C에서 보관하며 가수분해 시료원액으로 사용하였다. 가수분해실험은 마개달린 시험관에 제조한 간 호모지네이트의 상

등액 4.50 ml를 취하여  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지시키고 세포 탁심, CENO 및 DACD약물의 스톱용액 450  $\mu\text{l}$ 를 가하여  $1.41 \times 10^{-3} \text{ M}$ 의 농도로 하여 가수분해되지 않은 약물의 잔존량을 구하였다.

**$\beta$ -Lactamase에서의 가수분해**—시료의 제조로 세팔로리딘과 세포탁심은 0.1 M-소듐 인산염 완충용액(pH 7.00)에 용해시켜  $1.00 \times 10^{-3} \text{ M}$ 의 농도로 하였고 CENO 및 DACD는 DMSO를 용매로 사용하여  $1.00 \times 10^{-4} \text{ M}$ 의 농도로 희석하여 반응시켰다. 실험에 사용된 효소는 *Enterobacter cloacae* P99,<sup>7)</sup> *Escherichia coli* TEM<sup>8)</sup> 및 *Citrobacter freundii*<sup>9)</sup>이며 사용된 효소는 *Enterobacter cloacae* P99,<sup>7)</sup> *Escherichia coli* TEM<sup>8)</sup> 및 *Citrobacter freundii*<sup>9)</sup>이며 각 균주의 배양시간은 *Enterobacter cloacae* P99의 경우  $37^\circ\text{C}$ , 183 rpm에서  $\text{OD}_{578}$  0.726일 때 배양시간은 3.5시간, *Escherichia coli* TEM은  $\text{OD}_{578}$  0.755일 때 3.01시간이었고, *Citrobacter freundii*는  $\text{OD}_{578}$  0.726일 때 4.13시간이었으며 이때 균주를 회수하였다. 회수한 균주를 초음파 분쇄하여 각 균주에 대한  $\beta$ -lactamase *Citrobacter freundii*는 Sephadex<sup>R</sup> G-150으로 정제하여 얻은 원액을 니트로 세핀 실험을 하여  $\beta$ -lactamase를 확인한 후 실험에 사용하였다. 가수분해 실험은 세팔로리딘의  $E_{\text{max}}$ 에서 일정농도의 세팔로리딘에 대한 optical density(OD)를 측정하고<sup>10)</sup> 여기에 3종류의  $\beta$ -lactamase 일정량을 각각 가한 다음 실온에서 10분동안 반응시켜 변화된 OD값으로부터 세팔로리딘의 가수분해된 양을 계산하고 일정농도의 각각의 화합물에 대해  $\beta$ -lactamase와 10분동안 반응시켜 얻은 변화된 OD값을 세팔로리딘의 효좌에 의한 가수분해 양과 비교하여 상대적 가수분해 비를 계산하였다.

**체내약물동태**—실험동물은 한국화학연구소 안정성 연구센터 실험동물에서 공급하는 SPF ICR 마우스 체중 20 g( $\pm 10\%$ )의 것을 사용하였으며 실험 24시간 전부터 절식시키고 물만 자유롭게 공급하였다. 항생제의 투여는 마우스 한 군당 4마리씩으로 하여 DACD 및 CENO를 각각 40 mg/kg과 100 mg/kg의 단위로 정맥주사, 피하주사 및 경구투여 하였다. 채혈은 약물 투여 후 일정시간 마다 헤파린 처리한 마이크로피펫 (Drummond<sup>R</sup>, Wiretrol 10  $\mu\text{l}$ )으로 꼬리 정맥에서 10

$\mu\text{l}$ 씩 채혈한 후 정량하기까지  $4^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다. 분석법은 bioassy법으로 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  $50^\circ\text{C}$ 를 유지시키면서 희석한 균액 1.0 ml와 양의 혈액 0.9 ml를 가해 잘 혼합한 후 4각형 멸균상자에 기포가 생기지 않도록 배지를 만들어 실온에서 응고시키고 진공 펀치로 구멍을 뚫었다. 표준용액의 제조는 DACD 및 CENO 각각 1.0 mg을 0.1 M- $\text{NaHCO}_3$  용액 혹은 0.5%-CMC용액 1.0 ml에 용해 또는 현탁시킨 다음 실험동물의 혈액으로 각각의 표준항생물질의 농도가 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 3.125, 1.563, 0.781, 0.390, 0.195( $\mu\text{g/ml}$ )가 되도록 계산희석하였다. 혈장 및 요중의 약물농도 분석은 평판배지의 시료공에 농도별로 1:2 연속희석법으로 희석한 표준항생물질 용액 10  $\mu\text{l}$ 씩을 취하고 시간별로 채혈한 혈액시료 10  $\mu\text{l}$ 씩을 각각의 정해진 위치에 가한 다음  $4^\circ\text{C}$ 에서 1시간 확산시켜 평판배지에 흡입시키고  $37^\circ\text{C}$ 에서 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. 혈중농도 추이의 분석으로 체내약물동태 변수들은 "Phakok calculation" 컴퓨터 프로그램<sup>11,12)</sup>으로 계산하였고 AUC는 선형사다리꼴 공식에 따라 0에서부터 6시간까지의 식 2로 계산하고 6시간 이후 무한대까지는 식 3으로 계산하여 얻은 값을 합산하여 AUC 값으로 하였으며  $V_{\text{dss}}$ 는 식 4에 의해 계산하였다. 여기에서 A, B,  $K_{12}$ ,  $V_p$ 는 각각 종래의 교과서와 동일한 의미로 사용하였다.

$$[\text{AUC}]_{t_n-1}^{t_n} = \frac{C_{n-1} + C_n}{2} (t_n - t_{n-1}) \quad (\text{식 } 2)$$

$$\text{AUC}_{6-\infty} = C_p \text{ last} / \lambda \text{ last} \quad (\text{식 } 3)$$

$$V_{\text{dss}} = V_p \left( 1 + \frac{K_{12}}{K_{21}} \right), \quad V_p = \frac{D_0}{A + B} \quad (\text{식 } 4)$$

DACD 및 CENO를 정맥주사한 후 얻어진 혈중농도 데이터는 오픈 2-컴파트먼트 모델에 따라 계산하였다.

노중 회수율 측정은 마우스 한 군당 4마리씩으로 하여 CENO 및 DACD를 각각 40 mg/kg의 용량으로 0.3 ml에 함유토록 하여 정맥내 투여한 다음 노 분석용 대사상자에 각 군당 4마리씩 넣고 절식시킨 가운데 물만 자유롭게 공급하였다. 24시간동안 노를 채취하여 총노량을 기록하고 그 중 일부를 취해 1:1, 1:10, 1:100으로 희석한 용액 10  $\mu$ 씩을 4각형 평판배지의 시료공에 가하였다. 이때 표준항생물질용액의 제조는 대조군에서 채취한 노로 각각의 항생제를 일정한 농도가 되도록 1:2 연속희석법으로 희석하여 평판배지에 각각 10 ml씩 가하고 4°C에서 1시간 확산시키고 37°C에서 18시간동안 배양하여 노중의 잔존항균력을 측정하였으며 표준항생물질의 검량곡선으로부터 실험약물의 노중농도를 산출하여 노중의 회수율을 계산하였다.

### 결과 및 고찰

**유수분배계수**—세포탁심과 DACD의 경우 Table I에 나타난 바와 같이 수상의 pH가 1.20일때가 6.50일때보다 분배계수가 컸다. 그러나 CENO의 분배계수는 pH 6.50일때가 1.20일때보다 컸다. 3물질 모두 분배계수가 낮은 하지만 DACD가 나머지 두 물질보다 각 pH에서 공히 훨씬 큰 분배계수 값을 보였다. 이는 DACD가 지닌 비싸이클린퀴놀론이 CENO의 노르플록사신보다 지용성이 높은 때문으로 추정된다.

**pKa 측정**—세포탁심은 두 종류의 유상에서 pKa 7.50을 나타냈으며 CENO와 DACD의 pKa값은 각각 6.82와 7.53을 나타내 DACD에 대한 n-옥탄올상에서

의 pKa값이 CENO보다 약간 증가되어 나타났다. 이는 퀴놀론의 구조의 차이에 의한 것으로 생각된다.

**pH의 변화에 따른 가수분해**—세포탁심, CENO 및 DACD에 대한 pH 1.20, pH 6.80과 pH 8.00에서의 가수분해 실험은 시간이 경과함에 따라 가수분해되고 남은 잔존량을 HPLC로 측정하였는데 잔존율에 로그값을 취해 시간에 따라 플롯트해 본 결과 각 화합물의 가수분해는 1차속도식을 나타냈다. pH 1.20에서는 세포탁심보다 안정하였다(Fig. 1 및 Table II). pH 6.80에서는 실험에 사용된 3가지 화합물 모두에서

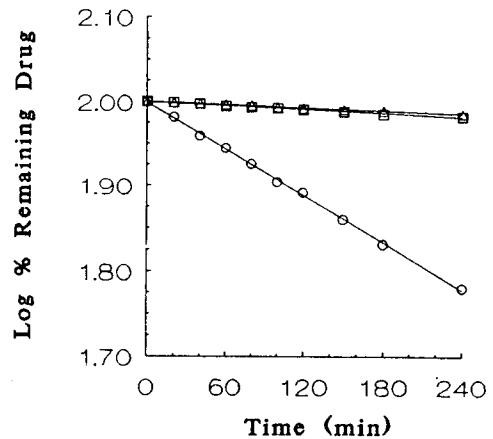


Fig. 1—First-order plot for the hydrolysis of cefotaxime, CENO and DACD in pH 1.20 buffer solution at 37°C.

○—Cefotaxime, □—CENO, △—DACD

Table II—Apparent first-rate constant (K) and half-life ( $t_{1/2}$ ) for the hydrolysis of cefotaxime, CENO and DACD in various pH solutions at 37°C

Compound	Solvent	K*( $\times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)
Cefotaxime	pH 1.20	21.3 $\pm$ 2.20	5.43 $\pm$ 0.33
	pH 6.80	2.42 $\pm$ 0.77	47.8 $\pm$ 4.92
	pH 8.00	3.61 $\pm$ 0.55	32.1 $\pm$ 2.89
CENO	pH 1.20	1.75 $\pm$ 0.51	66.0 $\pm$ 7.31
	pH 6.80	1.69 $\pm$ 0.42	68.4 $\pm$ 7.56
	pH 8.00	0.61 $\pm$ 0.77	190 $\pm$ 11.7
DACD	pH 1.20	1.44 $\pm$ 0.35	80.03 $\pm$ 9.09
	pH 6.80	1.32 $\pm$ 0.24	87.47 $\pm$ 7.55
	pH 8.00	1.26 $\pm$ 0.25	91.74 $\pm$ 7.99

Values are Mean  $\pm$  S.E.(n=3)

Table I—Lipid-water partition coefficient of cefotaxime, CENO and DACD

Compound	n-Octanol		CCl <sub>4</sub>	
	pH 1.20	pH 6.50	pH 1.20	pH 6.50
Cefotaxime	0.09 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.02
CENO	0.13 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.08
DACD	1.64 $\pm$ 0.03	1.50 $\pm$ 0.09	0.95 $\pm$ 0.07	0.38 $\pm$ 0.04

Values are Mean  $\pm$  S.D. (n=5)

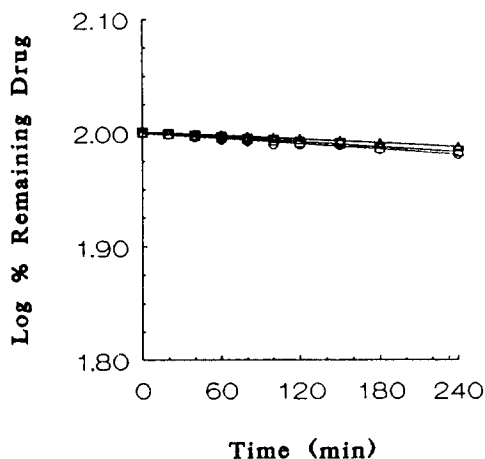


Fig. 2—First-order plot for the hydrolysis of cefotaxime, CENO and DACD in pH 6.80 buffer solution at 37°C.

○ Cefotaxime, □ CENO, △ DACD

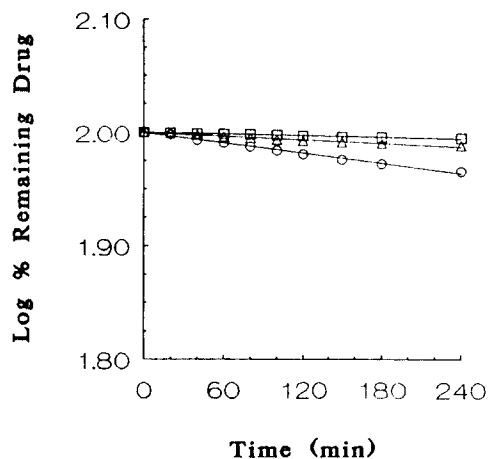


Fig. 3—First-order plot for the hydrolysis of cefotaxime, CENO and DACD in 0.2 M-phosphate buffer solution (pH 8.00) at 37°C.

○ Cefotaxime, □ CENO, △ DACD

매우 안정하게 나타났다(Fig.2 및 Table II). 0.2 M-인산염 완충용액(pH 8.00)에서는 CENO가 제일 안정하였고 다음으로는 DACD, 세포탁심의 순이었다(Fig. 3 및 Table II). 요컨대 세포탁심은 인공위액과 같은 강산성 용액에서 아세톡시메틸기의 불안정성<sup>13)</sup>에 기인하여 신속한 가수분해를 나타냈으나 중성-약알칼리성 부근에서는 대체적으로 안정한 양상을 보였다.

CENO 및 DACD는 실험에 사용된 용매조건에서 pH의 변화에 관계없이 매우 안정한 상태를 유지하였다.

**사람 혈장에서의 가수분해**—각 화합물의 잔존율을 시간에 따라 플롯트 해본 결과 Fig.4에 나타난 바와 같이 3화합물 모두가 1차속도식에 따라 신속히 가수분해 됨을 알 수 있었으며 그 가수분해 반감기 간에는 유의성 있는 차이는 없었다(Table III)로 부터 혈장 중에 이들 화합물의 가수분해 효소가 존재하기 때문으로 추정되었다.

**흰쥐 각 호모지네이트에서의 가수분해**—세포탁심, CENO 및 DACD에 대한 흰쥐 각 호모지네이트에서의 가수분해는 Fig.5에 나타난 바와 같이 세포탁심이 가장 신속하게 진행되었고 반감기는 0.10시간을 기록하였으며 CENO 및 DACD도 혈장에서의 가수분해 진행과정보다 훨씬 빠르게 진행되어 각각의 반감기는 0.62시간과 0.71시간을 나타냈다(Table III). 따라서 *in vitro* 상에서의 위 결과들을 토대로 생각할 때 DACD 화합물은 pH의 변화에는 큰 영향을 받지 않고 안정성을 유지하나 혈장내에서는 가수분해가 빠르게 진행되며 위장관에서 흡수되어 간을 통과할 때에는 더욱 빠르게 가수분해될 것으로 생각된다.

**β-Lactamase에서의 가수분해**—Table IV에 나타난 바와같이 3가지 β-lactamase에 대해 세포탁심은 매우 안정한 결과를 보이고 있으며 CENO와 DACD는 *En-*

Table III—Apparent first-order rate constant (K) and half-life ( $t_{1/2}$ ) for the hydrolysis of cefotaxime, CENO and DACD in 0.05 M-phosphate buffer solution (pH 7.40), 80%-human plasma and 20% (w/v)-rat liver homogenate at 37°C

Compound	Solvent	K*( $\times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)
Cefotaxime	PBS(pH 7.40)	0.14 ± 0.02	82.7 ± 6.97
	plasma	8.79 ± 1.47	1.31 ± 0.13
CENO	homogenate	112 ± 3.55	0.10 ± 0.03
	PBS(pH 7.40)	0.30 ± 0.06	38.6 ± 3.66
DACD	plasma	8.97 ± 0.25	1.29 ± 0.02
	homogenate	18.6 ± 1.16	0.62 ± 0.02
CENO	PBS(pH 7.40)	0.15 ± 0.03	76.0 ± 6.37
	plasma	10.1 ± 0.63	1.15 ± 0.04
DACD	homogenate	16.3 ± 1.49	0.71 ± 0.04

Values are Mean ± S.E.(n=3)

*terobacter cloacae* P99의  $\beta$ -lactamase에서 세포탁심보다 더 안정하여 0.5% 이하만 가수분해 진행되었을 뿐 *Escherichia coli* TEM와 *Citrobacter freundii*의  $\beta$ -lactamase에서는 전혀 가수분해가 진행되지 않았다. 이는 일반적으로 세팔로스포린의 C3위치에 아세톡시 메틸기를 가진 화합물들이 체내에 투여되었을 때 대사과정에서 가수분해가 일어나 데스아세틸세팔로스포린으로 되어 항균력이 1/10으로 감소한다는 보고<sup>14)</sup>를 토대로 할 때 DACD 및 CENO는 구조적으로 세

포탁심의 3'위치에  $\beta$ -lactamase에 영향이 없는 퀴놀린 부분이 존재하기 때문에 더욱 안정한 것으로 생각된다.

**체내 약물동태**—CENO 및 DACD를 40 mg/kg과 100 mg/kg의 용량으로 정맥주사, 피하주사 및 경구 투여하고 체내약물동태를 측정된 결과 Fig. 6과 Table V에 나타난 바와 같이 40 mg/kg의 용량으로 정맥주사한 후 혈장농도를 측정하여 시간에 따라 그래프로 나타냈을 때 두 화합물은 비슷한 소실양상을 나타냈다. CENO는 반감기가 2.08시간, 6시간까지의 곡선아래면적이 143.20(mg·h/l), 노중회수율은 13.81%를 나타낸 반면 DACD는 반감기가 0.92시간, 6시간까지의 곡선 아래면적은 나타냈다. 그러나 Christenson<sup>15)</sup> 등이 Ro 23-9424에 대해 20 mg/kg의 용량으로 정맥투여하고 측정된 체내약물동태 인자들 중 곡선아래면적은 각각 마우스에서 7.4, 흰쥐에서 19, 개에서 45, 바본에서 75(mg·h/l)를 나타냈으며 *in vitro*와 *in vivo*에서의 항균력은 베타락탐부분과 퀴놀론부분에 기인하여 강력하게 나타났다고 보고하였다. 또한 Ro 23-9424 화합물의 마우스에서의 반감기는 13분으로 DACD화합물이 더 길게 나타났고 곡선아래면적도

**Table IV**—Relative hydrolysis of cefotaxime, CENO and DACD by  $\beta$ -lactamases

Compound	$\beta$ -Lactamase from		
	<i>E. cloacae</i> P99	<i>E. coli</i> TEM	<i>C. freundii</i>
Cephaloridine	100(%)* <sup>1</sup>	100	100
Cefotaxime	1.13	0.54	0.37
CENO	0.25	0.00	0.00
DACD	0.50	0.00	0.00

\*<sup>1</sup>: The rates of hydrolysis were determined at 30°C with substrate concentrations of 100  $\mu$ M. The rates given are relative to an arbitrary value of 100 for cephaloridine.

**Table V**—Pharmacokinetic parameters of CENO and DACD in mice

Compound	Route	Dose (mg/kg)	t <sub>1/2</sub> $\alpha$ (h)	t <sub>1/2</sub> $\beta$ (h)	C <sub>max</sub> (mg/l)	T <sub>max</sub> (h)	AUC <sub>0-∞</sub> (mg·h/l)	Vd <sub>ss</sub> (ml)	U.R. (%)
CENO	i.v.	40	0.19	2.08	—	—	143 ± 33.7	7.62	13.81
		100	0.11	3.08	—	—	190 ± 0.14	32.3	—
	s.c.	40	—	—	3.24 ± 0.42	0.54 ± 0.16	7.79 ± 1.06	—	—
		100	—	—	6.75 ± 0.45	0.67 ± 0.08	17.63 ± 2.79	—	—
	p.p.	100	—	—	N.D.	N.D.	N.D.	—	—
		100	—	—	N.D.	N.D.	N.D.	—	—
DACD	i.v.	40	0.10	0.92	—	—	16.0 ± 1.92	40.3	0.40
		100	0.19	2.33	—	—	35.7 ± 0.55	118	—
	s.c.	40	—	—	N.D.	N.D.	N.D.	—	—
		100	—	—	N.D.	N.D.	N.D.	—	—
	p.o.	100	—	—	N.D.	N.D.	N.D.	—	—
		100	—	—	N.D.	N.D.	N.D.	—	—

Values are Mean ± S.E. in mice(n=4)

U.R.: % of dose excreted in urine

N.D.: Under detection limit

투여용량을 고려할 때 DACD가 조금 높게 나타났다. CENO와 DACD를 각각 100 mg/kg으로 정맥주사했을 때 CENO의 곡선아래면적이 190.4(mg·h/l) DACD는 35.72(mg·h/l)로 용량을 증가시켰을 때에도 결과는 유사한 양상을 보였다. 그리고 SPF ICR 마우스에 대해 CENO와 DACD를 40 mg/kg의 용량으로 경구 투여하고 꼬리정맥으로부터 혈액을 취해 bioassay한 결과 억제면적을 관찰할 수 없었다. 이는 두 화합물 모두 0.1 M-NaHCO<sub>3</sub> 용액으로 용해시켜 투여하였고 투여시 각 화합물의 pH가 약알칼리성이었음을 고려할 때 경구로 투여하고난 후 마우스의 위액으로 인해 용해된 화합물이 pH변화로 용해도가 저하되고 따라서 화합물이 결정으로 석출되므로 흡수가 거의 일어나지 않은 것이 주 원인으로 생각된다. CENO와 DACD를 각각 0.5%-CMC와 0.1 M-NaHCO<sub>3</sub> 용액에 현탁 혹은 용해시켜 마우스에 40 mg/kg과 100 mg/kg으로 피하주사하고 혈중농도를 측정된 결과 DACD에서는 검출되지 않았으나 CENO에서는 100 mg/kg으로 피하주사하고 혈중농도를 측정된 결과 DACD에서는 검출되지 않았으나 CENO에서는 0.5%-CMC, 100 mg/kg으로 투여했을 때 6시간까지의 곡선아래면적이 7.95(mg·h/l)를 기록하였으며 0.1 M-NaHCO<sub>3</sub> 용액, 40 mg/kg으로 투여했을 때 곡선아래면적이 7.79(mg·h/l)로 나타나 0.5%-CMC를 사용하였을 때 보다 곡선아래면적이 2배 이상 증가되어 나타났다.

## 결 론

새로운 듀얼-액션 세팔로스포린인 DACD에 대해 세포탁심과 CENO를 비교물질로 하여 화합물의 물리화학적 성질로 유수분배계수와 pKa를 측정하고 안정성 시험으로 pH의 변화에 따른 가수분해, 사람 혈장 및 흰쥐 각 호모지네이트에서의 가수분해,  $\beta$ -lactamase에서의 가수분해 및 화합물의 생체내 활성을 검토하기 위해 체내 약물동태를 실험한 결과 다음과 같은 결론에 도달하였다.

*In vitro*상의 실험에서 DACD의 유수분배계수는 비교물질보다 컸으며 *pH* 1.20, *pH* 6.80 및 *pH* 8.00 용액내에서 가수분해가 진행되지 않아 DACD는 물리화학적으로 안정한 상태를 유지하였고 혈장 및 각 호모지네이트에서는 빠르게 가수분해가 진행되므로

DACD가 체내에 흡수된 후 곧 베타락탐 부분과 퀴놀린부분으로 대사되어 작용할 것으로 예측할 수 있었다. 또한 3가지 준주가 생산해내는  $\beta$ -lactamase에 대해 DACD가 매우 안정하므로 세팔로스포린의 C3 위치 아세톡시메틸기의 가수분해에 의한 항균력 감소의 단점을 보완할 수 있었으며 DACD의 체내약물동태에서 화합물을 마우스에 정맥투여하고 얻은 반감기 및 곡선 아래면적이 Ro 23-9424 화합물보다 크게 나타나 보다 나은 체내약물동태를 나타내므로써 DACD의 개발 가능성을 시사하고 있다.

## 문 헌

- 1) La, S.B., Jung, M.H., Kim, W.J. and Jee, U.K.: Synthesis and Antibacterial Activity of Cefotaxime 3'-Quinolone Dithiocarbamate, *YAKHAK HOEJI*, **37**, 136 (1993).
- 2) Tsuji, A., Miyamoto, E., Hashimoto, N. and Yamana, T.: GI Absorption of  $\beta$ -Lactam Antibiotics II: Deviation from pH-Partitionypothesis in Penicillin Absorption through *In Situ* and *In vitro* Lipoidal Barriers, *J. Pharm. Sci.*, **67**, 1705 (1978).
- 3) Tsuji, A., Miyamoto, E., Kubo, O. and Yamana, T.: GI Absorption of  $\beta$ -Lactam Antiviotics III: Kinetic Evidence for *In Situ* Absorption of Ionized Species of Monobasic Penicillins and Cefazolin from the Rat Small Intestine and Structure-Absorption Rate Relationships, *J. Pharm. Sic.*, **68**, 812 (1979).
- 4) Granneman, G.R. and Sennello, L.T.: Precise High-Performance Liquid Chromatographic Procedure for the Determination of Cefsulodin, a New Antipseudomonal Cephalosporin Antibiotic, in Plasma, *J. Pharm. Sci.*, **71**, 1112 (1982).
- 5) Jungbluth, G.L. and Juslo, W.J.: Ion-Paired Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Assay for Determination of Ceftriaxone in Human Plasma and Urine, *J. Pharm. Sci.*, **78**, 968 (1989).
- 6) Noto, T., Nehashi, T., Endo, H., Saito, M., Matsubara, S., Harada, Y., Suzuki, S., Ogawa, H. and Koyama, K.: Ceftezole, a new Cephalosporin C Derivative I. *In Vitro* and *In Vitro* Antimicrobial Activity, *J. Antibiot.*, **29**, 1058 (1976).



- 7) Minami, S., Yotsuji, A., Inoue, M. and Mitsuhashi, S.: Induction of  $\beta$ -Lactamase by Various  $\beta$ -Lactam Antibiotics in *Enterobacter cloacae*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **18**, 382 (1980).
- 8) Minami, S., Inoue, M. and Mitsuhashi, S.: Purification and Properties of Cephalosporinase in *Escherichia coli*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **18**, 77 (1980).
- 9) Tajima, M., Takenouchi, Y., Sugawara, S., Inoue, M. and Mitsuhashi, S.: Purification and Properties of Chromosomally Mediated  $\beta$ -Lactamase from *Citrobacter freundii* GN7391, *J. Genet. Microbiol.*, **121**, 449 (1980).
- 10) Samuni, A.: A Direct Spectrophotometric Assay and Determination of Michaelis Constants for the  $\beta$ -Lactamase Reaction, *Analytical Biochem.*, **63**, 17 (1975).
- 11) Klesel, N., Limbert, M., Seeger, K., Seiber, G., Winkler, I. and Schrunner, E.: Cefodizime, and aminothiazolyl cephalosporin. II Comparative studies on the pharmacokinetic behavior in laboratory animals, *J. Antibiot.*, **37**, 901 (1984).
- 12) Limbert, M., Isert, D., Klesel, N., Markus, A., Seeger, K., Seibert, G. and Schrunner, E.: Antibacterial activities *in vitro* and pharmacokinetics of cefquinome (HR IIIV), a new broad-spectrum cephalosporin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 14 (1991).
- 13) 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 (1993).
- 14) Selwyn, S., ed., THE BETA-LACTAM ANTIBIOTICS: Penicillins and Cephalosporins in Perspective, Hodder and Stoughton, Ltd. (1990).
- 15) Christenson, J.G., Chan, K.K., Cleeland, R., Holzkecht, B.D., Farrish, H.H., Jr., Patel, I.H. and Specian, A.: Pharmacokinetics of Ro 23-9424, a Dual-Action Cephalosporin, in Animals, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **34**, 1895 (1990).