薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
107 (10) 814-818 (1987)

半合成 β -ラクタム抗菌剤 (第5報¹⁾) 6-[(R)-2-[3-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-
3-(3-hydroxypropyl)-1-ureido]-2-phenylacetamido]penicillanic Acid
(AO-1100) の *in Vitro* における代謝とその
代謝産物に関する研究

大井信広,* 大沢康次, 根橋敏行, 青本文弥, 岡崎 彬
中外製薬株式会社, 探索研究所・応用研究所

Semisynthetic β -Lactam Antibiotics. V.¹⁾ Metabolism *in Vitro* of 6-[(R)-
2-[3-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-3-(3-hydroxypropyl)-1-ureido]-2-
phenylacetamido]penicillanic Acid (AO-1100) and
Surveys on the Metabolites

NOBUHIRO OHI,* YASUJI OHSAWA, TOSHIYUKI NEHASHI,
BUNYA AOKI and AKIRA OKAZAKI

Exploratory Research Laboratories and Applied Research Laboratories,
Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Takada 3-41-8,
Toshima-ku, Tokyo, 171, Japan

(Received May 8, 1987)

Metabolism of 6-[(R)-2-[3-(3,4-dihydroxybenzoyl)-3-(3-hydroxypropyl)-1-ureido]-2-phenylacetamido]penicillanic acid (AO-1100), a new ureidopenicillin having catechol moiety, was studied *in vitro*, using catechol-*O*-methyltransferase (COMT) prepared from the rat and rabbit livers.

Main two metabolites were detected by means of high performance liquid chromatography and identified as the monomethyl derivatives (M1, M2) of AO-1100 by the total synthesis. It was found that AO-1100 was metabolized easily by COMT prepared from the rat liver, and not easily by COMT from the rabbit liver. The metabolites (M1, M2) showed greatly reduced antibacterial activity against gram-negative bacteria including *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords—AO-1100 metabolism; catechol moiety; COMT; HPLC; metabolite synthesis; MIC

著者らによって新規に合成された 6-[(R)-2-[3-(3,4-dihydroxybenzoyl)-3-(3-hydroxypropyl)-1-ureido]-2-phenylacetamido]penicillanic acid (AO-1100) は日和見感染症の起炎菌の1つとされている緑膿菌に優れた治療効果を示すことが報告されている。²⁾ 一方, catechol 基は生体内の catechol-*O*-methyl-transferase (COMT)³⁾ によって一般にはその *m*-位の hydroxyl 基が methyl 化され methoxy 基に変換することが知られていることより, catechol 基を含有する AO-1100 も代謝を受けることが予想される。そこでラット及びウサギの肝臓 COMT を使用し AO-1100 の *in vitro* における代謝を検討した。その結果2種の主代謝物を確認し, それら代謝物が AO-1100 の monomethyl 体 (M1, M2) であることを別途合成により同定した。また AO-1100 はウサギよりラットの肝臓 COMT でより代謝を受けやすいことが判明した。なお monomethyl 体 (M1, M2) の抗菌活性についても測定したので併せて報告する。

AO-1100 のラット及びウサギ肝臓 COMT による代謝

Jcl/SD 系雄性ラット, Jw-CSK 雄性ウサギを使用し, 肝臓 COMT の調整は Chart 2 に従って行った。⁴⁾

酵素反応は 2 mM *S*-adenosylmethionine 0.1 ml, 0.1 M MgCl₂ 0.1 ml, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.8) 0.6 ml,

Chart 1

0.05 mM の AO-1100 0.1 ml を上記操作により調整した酵素液 0.1 ml に添加し, 37°C でラット肝臓を用いた場合 10 分間, ウサギ肝臓を用いた場合 30 分間インキューベートすることにより行われた. 反応後酵素は 5% trichloroacetic acid 0.5 ml で処理することにより失活させた. 次いで 1.0 M 酢酸緩衝液 (pH 4.8) 1.0 ml を加え振盪したのち上清を高速液体クロマトグラフ (HPLC) 用試料とした. HPLC による測定はカラムに μ -Bondapak C₁₈ を, 移動層には CH₃CN-H₂O-10% tetramethylammonium hydroxide (250 : 750 : 5) をリン酸で pH 3.0 に調整した液を用い, 流速は 1.3—2.0 ml/min, 検出には UV 254 nm を用いて行った. 得られたクロマトグラムを Fig. 1 に示す. AO-1100 はラット肝臓 COMT により主代謝産物である M1 と M2 にそれぞれ 45%, 40% 変換し, AO-1100 の残存率は 14% であった. 一方, ウサギ肝臓 COMT では M1 及び M2 への変換率はそれぞれ 5%, 6% と低く, 大部分は代謝を受けずに AO-1100 として残存していた (88%).

代謝物 M-1 及び M-2 の合成並びに抗菌活性

まず vanillic acid (1) 又は isovanillic acid (2) を酢酸中 pyridine 触媒下に無水酢酸と反応させ monoacetoxxy 体 (3, 4) を得た. 次いで酸ハライド法により 3, 4 を amide 化し *N*-(3-hydroxypropyl)-

benzamide 体 (5, 6) を得た. 5, 6 の脱 acetyl 化は, MeOH 中 28% アンモニア水溶液で処理することにより行った. このようにして得た monohydroxybenzamide 体 (7, 8) を triethylamine 存在下 3 モル当量の trimethylchlorosilane によって 7, 8 の phenol 性水酸基と hydroxypropyl 基を trimethylsilyl 基で保護すると同時に, amide proton を silyl 化して amide 基を活性化した. 次いでこの活性化された amide 体を trichloromethyl

Chart 2

Fig. 1. HPLC for the Determination of the Metabolites of AO-1100 by COMT

A) COMT prepared from rat liver was used; B) COMT prepared from rabbit liver was used.

Chart 3

chloroformate (TCF) と反応させ carbamoyl chloride (9, 10) とし, 更に silyl 化された ampicillin (ABPC) との反応により AO-1100 の monomethyl 体 (11, 12) へ導いた. 脱 trimethylsilyl 化は反応後冷水で処理することにより容易に行われた.

合成した penicillin 化合物 (11, 12) の HPLC における retention time は M-1 及び M-2 のそれと全く一致したことより, AO-1100 の代謝物はその methyl 体であると推定した. この結果は, Kitoh⁵⁾ らによって発表された [(6*R*,7*R*)-3-(1-carboxymethyl-1*H*-tetrazol-5-yl)-thiomethyl]-7-[(2*R*)-2-(4-hydroxyphenyl)acetamide]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid (E-0702) の代謝と一致していることが明らかになった. また代謝物である M-1 (11) 及び M-2 (12) の抗菌活性を Table I に示す.

TABLE I. Antibacterial Activities of AO-1100 and Its Metabolites

	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	AO-1100	11 (M-1)	12 (M-2)
<i>Staphylococcus aureus</i> 209p	0.78	0.4	≤ 0.4
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	0.4	1.56	1.56
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 3K25	0.4	100	100
<i>Proteus morganii</i> JU-244	1.56	6.25	12.5
<i>Enterobacter cloacae</i> FU-250	6.25	100	100
<i>Serratia marcescens</i> JU-180	0.4	50	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> J-272	0.4	>100	>100
<i>Ps. aeruginosa</i> KAN-2	0.2	100	>100
<i>Ps. aeruginosa</i> J-169	0.78	>100	>100

Agar plate dilution method: medium, HIA (Difco); inoculum size, $1 \mu\text{l}$ of 10^6 cells/ml; Incubation time, 18 h at 37°C .

実験の部

融点は柳本製 MP 型で測定 (未補正). 赤外吸収 (IR) スペクトルは日立製 EPI-G3 型を使用. ^1H 核磁気共鳴 (^1H -NMR) スペクトルは日立製 R-20A 型を使用し, 内部標準に tetramethyl silane を用いた.

4-Acetoxy-3-methoxybenzoic Acid (3) Vanillic acid (1) 24.5 g (0.15 mol) を Ac_2O 40 ml と AcOH 95 ml の混合液に懸濁し, ここへ触媒量の pyridine 0.5 ml を加え, 70°C で 3 時間攪拌した. 反応後氷水中に注ぎ析出する結晶を濾取し, EtOAc -*n*-hexane から再結晶して 3 26.2 g (80.1%) を無色結晶として得た. mp $148\text{--}149^\circ\text{C}$. Anal. Calcd $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_5$: C, 57.14; H, 4.80. Found: C, 57.08; H, 4.72.

同様の操作で 3-acetoxy-4-methoxybenzoic acid (4) を isovanillic acid (2) から 54.4% の収率で得た. ただし再結晶溶媒は EtOAc で行った. mp $217\text{--}218^\circ\text{C}$. Anal. Calcd $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_5$: C, 57.14; H, 4.80. Found: C, 57.20; H, 4.69.

***N*-(3-Hydroxypropyl)-4-hydroxy-3-methoxybenzamide (7)** 3 2.50 g (12 mmol) を CH_2Cl_2 20 ml に懸濁し, ここへ SOCl_2 3 ml と触媒量の dimethylformamide (DMF) を加え 1 時間還流した. 過剰の SOCl_2 と溶媒を留去し, 残留物を *n*-hexane で処理して 3 の粗酸クロライドを得, 次の反応に供した. 3-Aminopropanol 0.89 g (12 mmol) と Et_3N 2.64 g (26 mmol) を CH_2Cl_2 30 ml に加え, さらに氷冷攪拌下に trimethylchlorosilane 2.84 g (26 mmol) を加えた. 30 分間還流したのち上記の酸クロライドを含有する CH_2Cl_2 溶液 (20 ml) を $0\text{--}5^\circ\text{C}$ で加え, 同温度で 1 時間攪拌した. 反応液を冷飽和食塩水中に注ぎ, 有機層を分取, 飽和食塩水で洗滌後 MgSO_4 で乾燥した. 溶媒を留去し, 残留物に *n*-hexane を入れ粉碎して, *N*-(3-hydroxypropyl)-4-acetoxy-3-methoxybenzamide (5) の粗結晶を 2.93 g (92.0%) 得た. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3460, 3270, 1765, 1620, 1545. NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.69 (2H, quintet, $J=7$ Hz), 2.23 (3H, s), 3.0—3.7 (4H, m), 3.80 (3H, s), 4.46 (1H, br s), 7.0—7.7 (3H, m), 8.50 (1H, t, $J=6$ Hz). 次いでこの粗 5 2.9 g (11 mmol) を MeOH 30 ml に溶解し, 氷冷攪拌下に 28% アンモニア水溶液 2 ml を加えた. 室温にて 3 時間攪拌したのち溶媒を留去し, 残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, MeOH と CHCl_3 の混液 (20 : 1 v/v) で展開, 溶出して 7 1.22 g (50.1%) を無色結晶として得た. mp $76\text{--}77^\circ\text{C}$. Anal. Calcd $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_4$: C, 58.66; H, 6.71; N, 6.22. Found: C, 58.64; H, 6.64; N, 6.16. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3460, 3290, 1635, 1595, 1540, 1510. NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.69 (2H, quintet, $J=7$ Hz), 3.1—3.7 (4H, m), 3.80 (3H, s), 4.45 (1H, br s), 6.6—7.5 (3H, m), 8.19 (1H, t, $J=6$ Hz), 9.40 (1H, br s).

同様の操作で *N*-(3-hydroxypropyl)-3-acetoxy-4-methoxybenzamide (6) (78.6%) を無色ゴム状物質として得た. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3310, 1755, 1620, 1540. NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.68 (2H, quintet, $J=7$ Hz), 2.24 (3H, s), 3.1—3.7 (4H, m), 3.79 (3H, s), 4.29 (1H, br s), 7.0—8.0 (3H, m), 8.35 (1H, t, $J=6$ Hz).

次いで粗 6 の脱アセチル化反応及び精製を同様の操作で行い, *N*-(3-hydroxypropyl)-3-hydroxy-4-methoxybenzamide (8) (37.3%) を無色結晶として得た. mp $117\text{--}118^\circ\text{C}$. Anal. Calcd $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_4$: C, 58.66; H, 6.71; N, 6.22. Found: C, 58.53; H, 6.65; N, 6.31. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3540, 3320, 3200, 1610, 1570, 1540, 1520. NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.67 (2H, quintet, $J=7$ Hz), 3.1—3.7 (4H, m), 3.79 (3H, s), 4.42 (1H, t, $J=5$ Hz), 6.8—7.5 (3H, m), 8.17 (1H, t, $J=6$ Hz), 9.08 (1H, s).

6[(*R*)-2-[3-Hydroxy-3-methoxybenzoyl]-3-(3-hydroxypropyl)-1-ureido]-2-phenylacetamido]penicillanic Acid (11)

7 11.5 g (51 mmol) と trimethylchlorosilane 21.4 ml (0.17 mol) を tetrahydrofuran (THF) 350 ml に懸濁し、ここへ Et₃N 23.5 ml (0.17 mol) を滴下。1 時間 60—65°C で加熱したのち、0—5°C に冷却し攪拌下に trichloromethyl chloroformate 3.4 ml (28 mmol) を滴下。室温で 30 分間次いで 30°C で 2 時間攪拌してカルバモイルクロライド (9, 10) を含有する反応混合物を得、これを次の反応に供した。無水アンピシリン 22.3 g (64 mmol) を EtOAc 240 ml に懸濁し、ここへ trimethylchlorosilane 17.8 ml (0.14 mol) を化え、さらに内温を 5—10°C に保ちながら Et₃N 19.5 ml (0.14 mol) を加えた。1.5 時間同温度で攪拌したのみ、上記のカルバモイルクロライドを含有する反応混合物を 0—5°C で加え 1 時間室温で攪拌。反応後氷水中に注ぎ有機層を分取、冷飽和 NaHCO₃ 水 300 ml で抽出。さらに水層を 2 N HCl で pH 2.5 に調整し、EtOAc 400 ml で 2 回に分けて再抽出。飽和 NaCl 水で洗滌し、MgSO₄ で乾燥後、溶媒を留去し残留物を *n*-hexane で処理し粗 11 20.4 g を得た。この粗 11 を冷 5% NaHCO₃ 56 ml に溶解したのち、Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーに付し、冷水、冷 25% 含水アセトンの順で目的物を溶離。目的物を含むフラクションを集め、2N HCl で pH を 2.5 に調整したのち EtOAc で抽出。冷食塩水で洗滌し、MgSO₄ で乾燥後、溶媒を留去し残留物を *n*-hexane で処理して 11 15.0 g (49.0%) を白色粉末として得た。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3700—2200, 1780, 1680, 1510. NMR (DMSO-*d*₆) δ : 1.2—2.0 (2H, m), 1.40 (3H, s), 1.52 (3H, s), 3.2—3.4 (4H, m), 3.70 (3H, s), 4.19 (1H, s), 5.3—5.7 (3H, m), 6.6—7.5 (8H, m), 9.09 (1H, d, *J*=7 Hz), 9.19 (1H, d, *J*=7 Hz),

同様の操作で 6-[(*R*)-2-[3-(3-hydroxy-4-methoxybenzoyl)-3-(3-hydroxypropyl)-1-ureido]-2-phenylacetamido]-penicillanic acid (12) を 45.0% の収率で得た。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3700—2200, 1780, 1685, 1510. NMR (DMSO-*d*₆) δ : 1.3—2.0 (2H, m), 1.40 (3H, s), 1.52 (3H, s), 3.2—4.0 (4H, m), 3.74 (3H, s), 4.18 (1H, s), 5.3—5.7 (3H, m), 6.7—7.5 (8H, m), 9.05 (1H, d, *J*=7 Hz), 9.15 (1H, d, *J*=7 Hz).

引用文献

- 1) 第 4 報: N. Ohi, B. Aoki, T. Shinozaki, K. Moro, T. Kuroki, T. Noto, T. Nehashi, M. Matsumoto, H. Okazaki, I. Matsunaga, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 1903 (1987).
- 2) N. Ohi, B. Aoki, K. Moro, T. Kuroki, T. Noto, T. Nehashi, M. Matsumoto, H. Okazaki, I. Matsunaga, *J. Antibiotics*. (Tokyo), **39**, 242 (1986).
- 3) J. W. Daly, J. Axelrod, B. Witkop, *J. Biol. Chem.*, **235**, 1155 (1960).
- 4) J. Axelrod, R. Tomchick, *J. Biol. Chem.*, **233**, 702 (1958).
- 5) K. Kitoh, T. Horie, K. Iwama, Y. Tomono, S. Ida, F. Sagama, *Prog. Abstr. Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.*, 21th Chicago Abstr., 1981, p. 119.