

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年11月21日(21.11.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/221122 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/341 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61K 31/381 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01) C07D 207/36 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) C07D 307/68 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/019133

(22) 国際出願日: 2019年5月14日(14.05.2019)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2018-093369 2018年5月14日(14.05.2018) JP

(71) 出願人: 国立大学法人名古屋大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 Aichi (JP).

(72) 発明者: 荒川 宜親 (ARAKAWA, Yoshichika); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 和知野 純一 (WACHINO, Jun-ichi); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 木村 幸司 (KIMURA, Kouji); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老

町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 金 万春 (JIN, Wan Chun); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 佐藤 綾人 (SATO, Ayato); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所 (SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜 T N K ビル Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,

(54) Title: β -LACTAMASE INHIBITOR

(54) 発明の名称: β -ラクタマーゼ阻害剤

[図2]

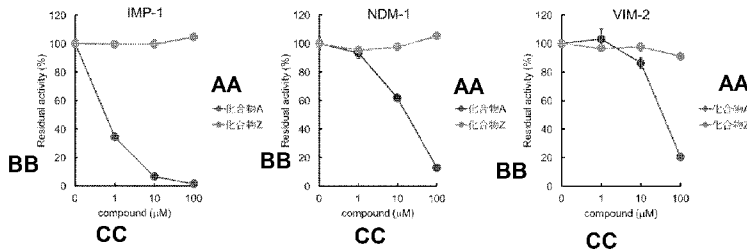


FIG. 2:
AA Compound
BB Residual activity (%)
CC Compound (μ M)

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a compound having a β -lactamase inhibitory activity. The problem is solved by a compound which is represented by general formula (1) that represents a compound in which a specific location of a 5-membered ring having flatness is substituted with a sulfamoyl group and a carboxyl group.

(57) 要約: β -ラクタマーゼ阻害活性を有する化合物を提供することを課題とする。該課題を、平面性を有する5員環の特定位置がスルファモイル基及びカルボキシ基に置換されてなる化合物に代表される一般式(1)で表される化合物により、解決する。



WO 2019/221122 A1

MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）

明 細 書

発明の名称： β -ラクタマーゼ阻害剤

技術分野

[0001] 本発明は、 β -ラクタマーゼ阻害剤等に関する。

背景技術

[0002] 細菌感染症に対しては、通常、抗菌薬の作用により原因菌を静菌又は殺菌するという治療方法が採られる。ところが、抗菌薬を用いることによって、その抗菌薬に対する薬剤耐性菌が出現することとなる。例えば、 β -ラクタム系抗菌薬に対しては、これを分解する活性を有する酵素（ β -ラクタマーゼ）を産生する耐性菌が存在する。これまで、新たに出現した β -ラクタマーゼ産生菌に対しては、新たな構造の β -ラクタム系抗菌薬が開発され、使用されてきた。このような中で、カルバペネム系抗菌薬が、最も新しい β -ラクタム系抗菌薬として使用されている。

[0003] しかし、カルバペネム系抗菌薬の使用により、該抗菌薬の分解活性を有する酵素（クラスB β -ラクタマーゼ、メタロ- β -ラクタマーゼ）を産生する耐性菌が出現し、問題になっている。該耐性菌は、カルバペネム系抗菌薬を含む多くの β -ラクタム系抗菌薬に耐性を示す。

[0004] β -ラクタム系抗菌薬耐性菌に対しては、その耐性機構の原因酵素である β -ラクタマーゼの阻害剤を適当な β -ラクタム系抗菌薬と併用することが、有効な対策の1つである（特許文献1～3）。しかし、クラスB β -ラクタマーゼに対しては、臨床的に用いることができる阻害剤は実用化されていない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2015-155435号公報

特許文献2：国際公開第2013/180197号

特許文献3：特表2015-512440号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

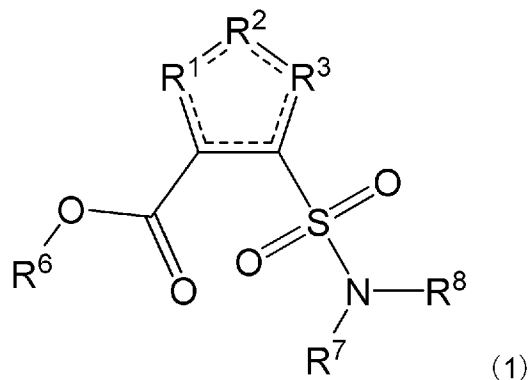
[0006] 本発明は、 β -ラクタマーゼ阻害活性を有する化合物を提供することを課題とする。好ましくは、本発明は、クラスB β -ラクタマーゼ阻害活性を有する化合物を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者は上記課題に鑑みて鋭意研究を進めた結果、平面性を有する5員環の特定位置がスルファモイル基及びカルボキシ基に置換されてなる化合物に代表される一般式(1)で表される化合物が、 β -ラクタマーゼ阻害活性を有すること、特にクラスB β -ラクタマーゼ阻害活性を有することを見出した。本発明者は、この知見に基づいてさらに研究を進めた結果、本発明を完成させた。即ち、本発明は、下記の態様を包含する。

[0008] 項1. 一般式(1) :

[0009] [化1]



[0010] [式中：R¹は-C(-R^A)-を示す。R²は-N(-R^B)_n-、-O-、又は-C(-R^A)-を示す。R³は、R²が-N(-R^B)_n-又は-O-の場合は-C(-R^A)-を示し、R²が-C(-R^A)-の場合は-S-を示す。R^Aは同一又は異なって、水素原子、ハロゲン原子、又はアミノ基で置換されていてもよい炭化水素基を示す。R^Bは水素原子、ハロゲン原子、置換されていてもよいアミノ基、又はアミノ基で置換されていてもよい炭化水素基を示す。nは、0又は1を示す。R⁶は水素原子又は炭化水素基を示す。R⁷及びR⁸は同一又は異なって、水素原子又は炭化

水素基を示し、或いは R^7 及び R^8 は互いに結合して隣接する窒素原子と共に環を形成する。実線と点線の二重線で表される結合は、単結合又は二重結合を示す。]

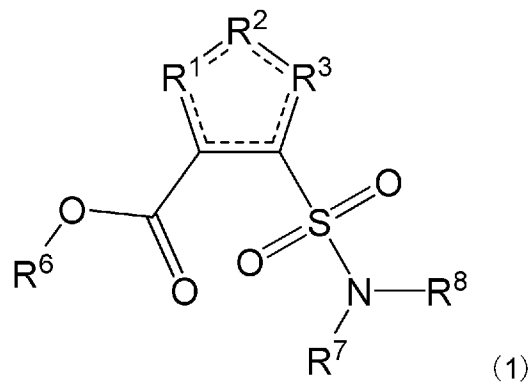
で表される化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物を含有する、 β -ラクタマーゼ阻害剤。

[0011] 項2. 前記 β -ラクタマーゼがクラスB β -ラクタマーゼである、項1に記載の阻害剤。

[0012] 項3. 前記 β -ラクタマーゼがクラスB1 β -ラクタマーゼである、項1又は2に記載の阻害剤。

[0013] 項4. 一般式(1) :

[0014] [化2]

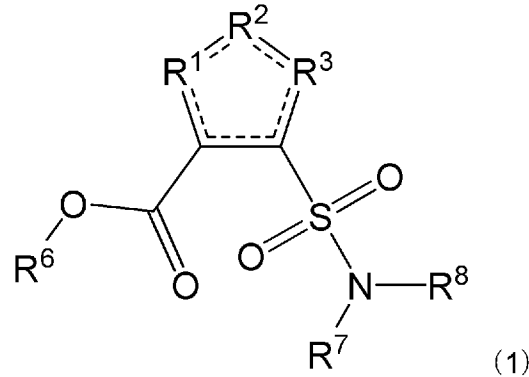


[0015] [式中： R^1 は $-C(-R^A)-$ を示す。 R^2 は $-N(-R^B)_n-$ 、 $-O-$ 、又は $-C(-R^A)-$ を示す。 R^3 は、 R^2 が $-N(-R^B)_n-$ 又は $-O-$ の場合は $-C(-R^A)-$ を示し、 R^2 が $-C(-R^A)-$ の場合は $-S-$ を示す。 R^A は同一又は異なって、水素原子、ハロゲン原子、又はアミノ基で置換されていてもよい炭化水素基を示す。 R^B は水素原子、ハロゲン原子、置換されていてもよいアミノ基、又はアミノ基で置換されていてもよい炭化水素基を示す。 n は、0又は1を示す。 R^6 は水素原子又は炭化水素基を示す。 R^7 及び R^8 は同一又は異なって、水素原子又は炭化水素基を示し、或いは R^7 及び R^8 は互いに結合して隣接する窒素原子と共に環を形成する。実線と点線の二重線で表される結合は、単結合又は二重結合を示す。]

で表される化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物を含有する、 β -ラクタム系抗菌化合物の抗菌効果の増強剤。

[0016] 項5. 一般式(1) :

[0017] [化3]



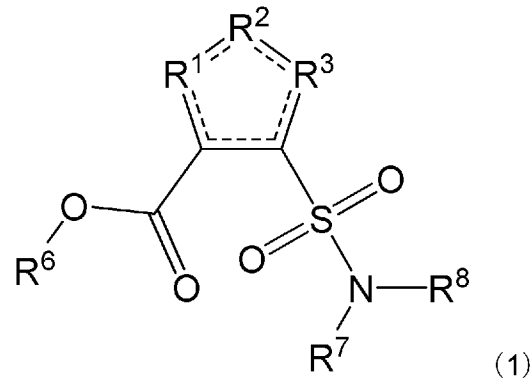
[0018] [式中：R¹は-C(-R^A)-を示す。R²は-N(-R^B)_n-、-O-、又は-C(-R^A)-を示す。R³は、R²が-N(-R^B)_n-又は-O-の場合は-C(-R^A)-を示し、R²が-C(-R^A)-の場合は-S-を示す。R^Aは同一又は異なって、水素原子、ハロゲン原子、又はアミノ基で置換されていてもよい炭化水素基を示す。R^Bは水素原子、ハロゲン原子、置換されていてもよいアミノ基、又はアミノ基で置換されていてもよい炭化水素基を示す。nは、0又は1を示す。R⁶は水素原子又は炭化水素基を示す。R⁷及びR⁸は同一又は異なって、水素原子又は炭化水素基を示し、或いはR⁷及びR⁸は互いに結合して隣接する窒素原子と共に環を形成する。実線と点線の二重線で表される結合は、単結合又は二重結合を示す。]

で表される化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物、並びに β -ラクタム系抗菌化合物を含有する、抗菌剤。

[0019] 項6. β -ラクタム系抗菌化合物を含有する、
一般式(1) :

[0020]

[化4]

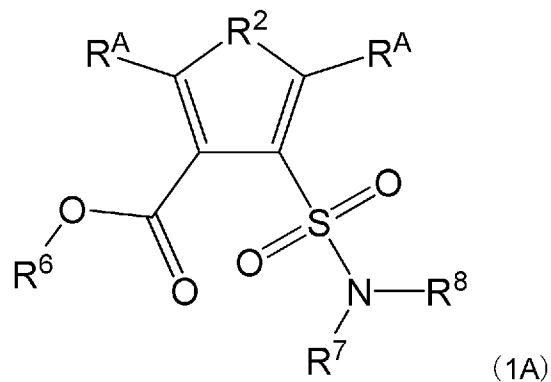


[0021] [式中：R¹は-C(-R^A)-を示す。R²は-N(-R^B)_n-、-O-、又は-C(-R^A)-を示す。R³は、R²が-N(-R^B)_n-又は-O-の場合は-C(-R^A)-を示し、R²が-C(-R^A)-の場合は-S-を示す。R^Aは同一又は異なって、水素原子、ハロゲン原子、又はアミノ基で置換されていてもよい炭化水素基を示す。R^Bは水素原子、ハロゲン原子、置換されていてもよいアミノ基、又はアミノ基で置換されていてもよい炭化水素基を示す。nは、0又は1を示す。R⁶は水素原子又は炭化水素基を示す。R⁷及びR⁸は同一又は異なって、水素原子又は炭化水素基を示し、或いはR⁷及びR⁸は互いに結合して隣接する窒素原子と共に環を形成する。実線と点線の二重線で表される結合は、単結合又は二重結合を示す。]

で表される化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物と併用投与されるように用いられる抗菌剤。

[0022] 項7. 一般式(1A)：

[0023] [化5]



[0024] [式中：R²は、-N(-R^B)-又は-O-を示す。R^Aは同一又は異なって、水素原子、アミノ基で置換されていてもよい直鎖状若しくは分岐鎖状アルキル基（但し、R²が-N(-R^B)-の場合は炭素数1~5であり、R²が-O-の場合は炭素数2~5である）、アミノ基で置換されていてもよい炭素数3~7の環状アルキル基、又はアミノ基で置換されていてもよいフェニル基を示す。R^Bは水素原子、直鎖状若しくは分岐鎖状アルキル基で置換されていてもよいアミノ基、又はアミノ基で置換されていてもよいアルキル基を示す。R⁶は水素原子を示す。R⁷及びR⁸は同一又は異なって、水素原子又はアルキル基を示し（但し、R⁷及びR⁸の両方がアルキル基である場合を除く）、或いはR⁷及びR⁸は互いに結合して隣接する窒素原子と共に環を形成する。]

で表される化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

[0025] 項8. R^Bで示されるアルキル基が炭素数1~4の直鎖状アルキル基である、項7に記載の化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

[0026] 項9. 項7又は8に記載の化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物を含有する、医薬。

[0027] 項10. 項7又は8に記載の化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物を含有する、試薬。

発明の効果

[0028] 本発明によれば、β-ラクタマーゼ阻害活性、特にクラスB β-ラクタマーゼ阻害活性を有する化合物を提供することができる。これを利用することにより、β-ラクタム環を有する既存のβ-ラクタマーゼ阻害剤、およびβ-ラクタム系抗菌化合物の抗菌効果の増強剤等を提供することができる。また、本発明の化合物は比較的毒性が低いので、より安全に使用することが可能である。

図面の簡単な説明

[0029] [図1]薬剤感受性試験（試験例1等）の試験方法の概要を示す。

[図2]試験例2のβ-ラクタマーゼ阻害活性測定試験の結果を示す。縦軸は、イミペネム残存分解活性を示し、横軸は被検物質の濃度を示す。各グラフの

上方に、使用したクラスB β -ラクタマーゼを示す。

[図3]試験例3の薬剤感受性試験の結果を示す。縦軸はMICを示し、横軸は、使用した抗菌薬と被検物質の種類（化合物A）及び濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を示す。各プロットそれぞれは、各被検菌株のデータを示す。

[図4]試験例4の薬剤感受性試験の結果を示す。縦軸はMICを示し、横軸は、使用した抗菌薬と被検物質の種類（化合物A）及び濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を示す。各プロットそれぞれは、各被検菌株のデータを示す。

[図5]試験例5のX線結晶構造解析により得られた、IMP-1と化合物Aとの複合体構造の模式図を示す。

[図6]試験例5のX線結晶構造解析により得られた、VIM-2と化合物Aとの複合体構造の模式図を示す。

[図7]試験例5のX線結晶構造解析により得られた、NDM-1と化合物Aとの複合体構造の模式図を示す。

[図8]試験例5のX線結晶構造解析により得られた、NDM-1と化合物Iとの複合体構造の模式図を示す。

[図9]試験例7の毒性評価試験結果を示す。縦軸は、生細胞を反映する吸光度を示し、横軸は被検物質の濃度を示す。横軸中、DMSOは被検物質を添加していない場合を示す。

[図10]試験例12の動物試験の結果を示す。縦軸は生存率を示し、横軸は実験用菌株（ β -ラクタマーゼ発現株）感染後の経過日数を示す。Aは被検物質（化合物A）を示す。

[図11]試験例13の動物試験において、実験用菌株としてIMP-1をコードするプラスミドが導入された大腸菌株を使用した場合の結果を示す。縦軸は生存率を示し、横軸は実験用菌株（ β -ラクタマーゼ発現株）感染後の経過日数を示す。Iは被検物質（化合物I）を示す。

[図12]試験例13の動物試験において、実験用菌株としてNDM及びVIMをコードするプラスミドが導入された細菌（*K. pneumoniae*）を使用した場合の結果を示す。縦軸は生存率を示し、横軸は実験用菌株（ β -ラクタマーゼ発現株）

感染後の経過日数を示す。Iは被検物質（化合物I）を示す。

[図13]試験例14の動物試験の結果を示す。縦軸は生存率を示し、横軸は実験用菌株（β-ラクタマーゼ発現株）感染後の経過日数を示す。X2dは被検物質（化合物X2d）を示す。

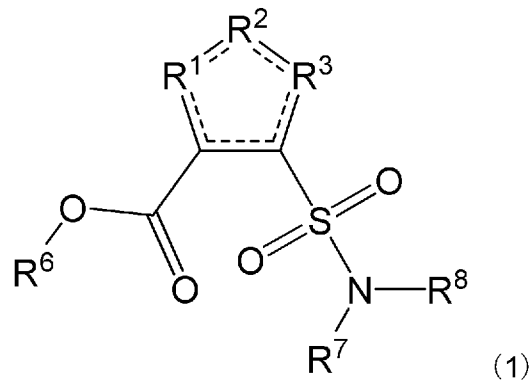
発明を実施するための形態

[0030] 本明細書中において、「含有」及び「含む」なる表現については、「含有」、「含む」、「実質的にからなる」及び「のみからなる」という概念を含む。

[0031] 1. 化合物

本発明は、その一態様において、一般式（1）：

[0032] [化6]



[0033] で表される化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物（本明細書において、これらを「本発明の化合物」と示すこともある。）に関する。以下にこれについて説明する。

[0034] <1-1. R¹、R²及びR³>

R¹は-C(-R^A)-を示す。R²は-N(-R^B)_n-、-O-、又は-C(-R^A)-を示す。R³は、R²が-N(-R^B)_n-又は-O-の場合は-C(-R^A)-を示し、R²が-C(-R^A)-の場合は-S-を示す。R²は好ましくは-N(-R^B)_n-である。

[0035] R^Aは同一又は異なって、水素原子、ハロゲン原子、又はアミノ基で置換されていてもよい炭化水素基を示す。本発明のある態様においては、好ましくは

、R^Aが炭化水素基である。

[0036] R^Aで示されるハロゲン原子としては、例えばフッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等が挙げられる。

[0037] R^Aで示される炭化水素基としては、特に制限されず、例えばアルキル基、アリール基等、さらにはこれらが任意に組み合わせられてなる基（例えば、アラルキル基、アルキルアリール基、アルキルアラルキル基）等が挙げられる。本発明のある態様においては、好ましくは、炭化水素基がアルキル基又はアリール基である。この態様において、R^Aが2つ存在する場合、好ましくは、2つのR^Aが両方アリール基である場合は除かれる。R^Aで示されるアルキル基には、直鎖状、分岐鎖状、又は環状（好ましくは直鎖状又は分岐鎖状、より好ましくは直鎖状）のいずれのものも包含される。該アルキル基（直鎖状又は分岐鎖状の場合）の炭素数は、特に制限されず、例えば1~12、好ましくは1~8、より好ましくは1~5、さらに好ましくは1~4、よりさらに好ましくは1~2である。該アルキル基（環状の場合）の炭素数は、特に制限されず、例えば3~7、好ましくは4~6である。一方で、本発明のある態様において、該アルキル基の炭素数の下限は、例えば2、3、4、5、6、7、8である。該アルキル基の具体例としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、sec-ブチル基、n-ペンチル基、ネオペンチル基、n-ヘキシル基、3-メチルペンチル基、n-ヘプチル基、n-オクチル基、n-ノニル基、n-デシル基、n-ウンデシル基、n-ドデシル基等が挙げられる。

[0038] R^Aで示されるアリール基は、特に制限されないが、炭素数が6~12のものが好ましく、6~12のものがより好ましく、6~8のものがさらに好ましい。該アリール基は、単環式又は多環式（例えば2環式、3環式等）のいずれでも有り得るが、好ましくは単環式である。該アリール基としては、具体的には、例えばフェニル基、ナフチル基、ビフェニル基、ペンタレニル基、インデニル基、アントラニル基、テトラセニル基、ペンタセニル基、ピレニル基、ペリレニル基、フルオレニル基、フェナントリル基等が挙げられ、好ましくはフ

エニル基が挙げられる。

[0039] R^A で示されるアラルキル基は、特に制限されないが、例えば直鎖状又は分岐鎖状の炭素数1~6（好ましくは1~2）のアルキル基の水素原子（例えば1~3つ、好ましくは1つの水素原子）が上記アリアル基に置換されてなるアラルキル基等が挙げられる。該アラルキル基としては、具体的には、例えばベンジル基、フェネチル基等が挙げられる。

[0040] R^A で示されるアルキルアリアル基は、特に制限されないが、例えば上記アリアル基の水素原子（例えば1~3つ、好ましくは1つの水素原子）が、直鎖状又は分岐鎖状の炭素数1~6（好ましくは1~2）のアルキル基に置換されてなるアルキルアリアル基等が挙げられる。該アルキルアリアル基としては、具体的には、例えばトリル基、キシリル基等が挙げられる。

[0041] R^A で示されるアルキルアラルキル基は、特に制限されないが、例えば上記アラルキル基の芳香環上の水素原子（例えば1~3つ、好ましくは1つの水素原子）が、直鎖状又は分岐鎖状の炭素数1~6（好ましくは1~2）のアルキル基に置換されてなるアルキルアラルキル基等が挙げられる。

[0042] R^A で示される炭化水素基がアミノ基で置換されている場合、そのアミノ基には、 $-NH_2$ のみならず、 $-NH_2$ の水素原子が炭化水素基で置換されてなる置換アミノ基も包含される。置換アミノ基における炭化水素基については、 R^A で示される炭化水素基と同様である。

[0043] R^B は水素原子、ハロゲン原子、置換されてもよいアミノ基、又はアミノ基で置換されていてもよい炭化水素基を示す。本発明のある態様においては、好ましくは、 R^B が水素原子又は炭化水素基であり、より好ましくは R^B が炭化水素基である。 R^B で示されるハロゲン原子、及び R^B で示されるアミノ基で置換されていてもよい炭化水素基については、 R^A についての上記記載と同様である。

[0044] R^B で示される置換されていてもよいアミノ基としては、例えば $-NH_2$ 、 $-NH_2$ の水素原子が炭化水素基で置換されてなる置換アミノ基等が挙げられる。炭化水素基については、 R^A で示される炭化水素基と同様である。

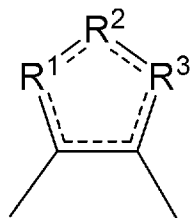
[0045] n は、0又は1を示す。本発明のある態様においては、好ましくは、 n が1であ

る。

[0046] <1-2. 5員環>

一般式 (1) 中、実線と点線の二重線で表される結合は、単結合又は二重結合を示す。該結合を含む、一般式 (1) 中の一般式 (A) :

[0047] [化7]



[0048] [式中：R¹、R²、及びR³は前記に同じである。]

で表される部分構造中の5員環は、特に制限されない。該5員環は、好ましくは平面性を有するものである。該5員環の具体例としては、フラン、ピロール、チオフェン等が挙げられ、より好ましくはフラン、ピロール等が挙げられ、さらに好ましくはピロールが挙げられる。

[0049] <1-3. R⁶>

R⁶は水素原子又は炭化水素基を示す。本発明のある態様においては、好ましくは、R⁶が水素原子である。R⁶で示される炭化水素基については、R^Aについての上記記載と同様である。

[0050] <1-4. R⁷及びR⁸>

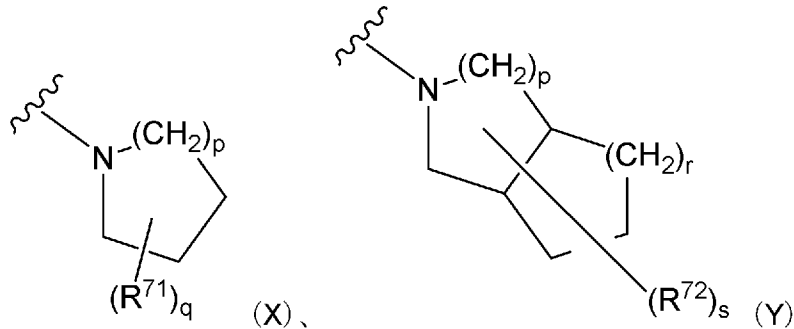
R⁷及びR⁸は同一又は異なって、水素原子又は炭化水素基を示し、或いはR⁷及びR⁸は互いに結合して隣接する窒素原子と共に環を形成する。本発明のある態様においては、好ましくはR⁷及びR⁸は同一又は異なって、水素原子又は炭化水素基を示し、より好ましくは、R⁷及びR⁸の内の少なくとも一方が水素原子であり、さらに好ましくはR⁷及びR⁸は共に水素原子である。

[0051] R⁷で示される炭化水素基、及びR⁸で示される炭化水素基については、R^Aについての上記記載と同様である。

[0052] R⁷及びR⁸が互いに結合して隣接する窒素原子と共に形成する環は、特に制限されず、例えば単環又は二環である。該環としては、例えば一般式 (X)、一

般式 (Y) :

[0053] [化8]



[0054] [式中： R^{71} 及び R^{72} 各々はアルキル基を示す。 p 及び r 各々は1~3の整数を示す。
。 q 及び s 各々は0又は1~3の整数を示す。]

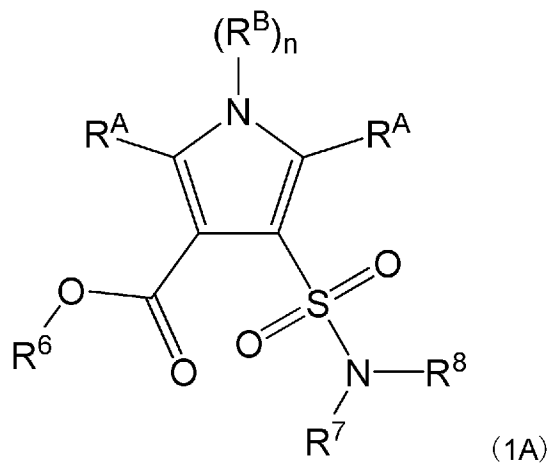
R^{71} 及び R^{72} で示されるアルキル基については、 R^A についての上記記載と同様である。 R^{71} 及び R^{72} 各々について、複数存在する場合は、同一の炭素原子に結合していてもよいし、互いに異なる炭素原子に結合していてもよい。

[0055] <1-5. 好ましい一般式 (1) 化合物>

本発明の一態様において、一般式 (1) の中でも、好ましくは一般式 (1A)

:

[0056] [化9]



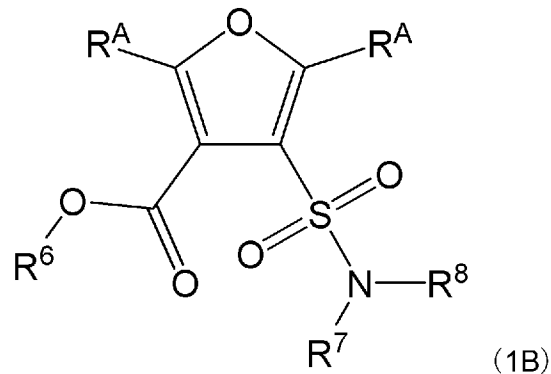
[0057] [式中： R^A 、 R^B 、 n 、 R^6 、 R^7 及び R^8 は前記に同じである。]

が挙げられる。

[0058] 本発明の別の態様において、一般式 (1) の中でも、好ましくは一般式 (

1B) :

[0059] [化10]



[0060] [式中： R^A 、 R^6 、 R^7 及び R^8 は前記に同じである。]

が挙げられる。

[0061] 一般式 (1)、(1A)、(1B) において、好ましい態様は以下のとおりである：

R^2 は、 $-N(-R^B)-$ 又は $-O-$ を示す。

R^A は同一又は異なって、水素原子、アミノ基で置換されていてもよい直鎖状若しくは分岐鎖状アルキル基（但し、 R^2 が $-N(-R^B)-$ の場合は炭素数1~5であり、 R^2 が $-O-$ の場合は炭素数2~5である）、アミノ基で置換されていてもよい炭素数3~7の環状アルキル基、又はアミノ基で置換されていてもよいフェニル基を示す。

R^B は水素原子、直鎖状若しくは分岐鎖状アルキル基で置換されてもよいアミノ基、又はアミノ基で置換されていてもよいアルキル基を示す。

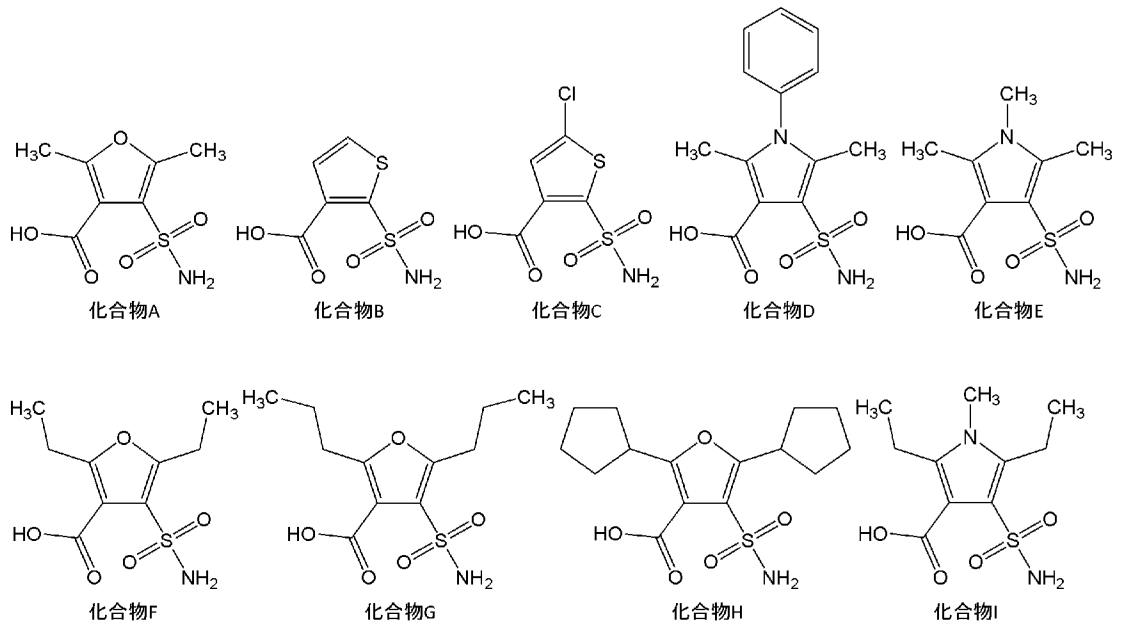
R^6 は水素原子を示す。

R^7 及び R^8 は同一又は異なって、水素原子又はアルキル基を示し（但し、 R^7 及び R^8 の両方がアルキル基である場合を除く）、或いは R^7 及び R^8 は互いに結合して隣接する窒素原子と共に環を形成する。

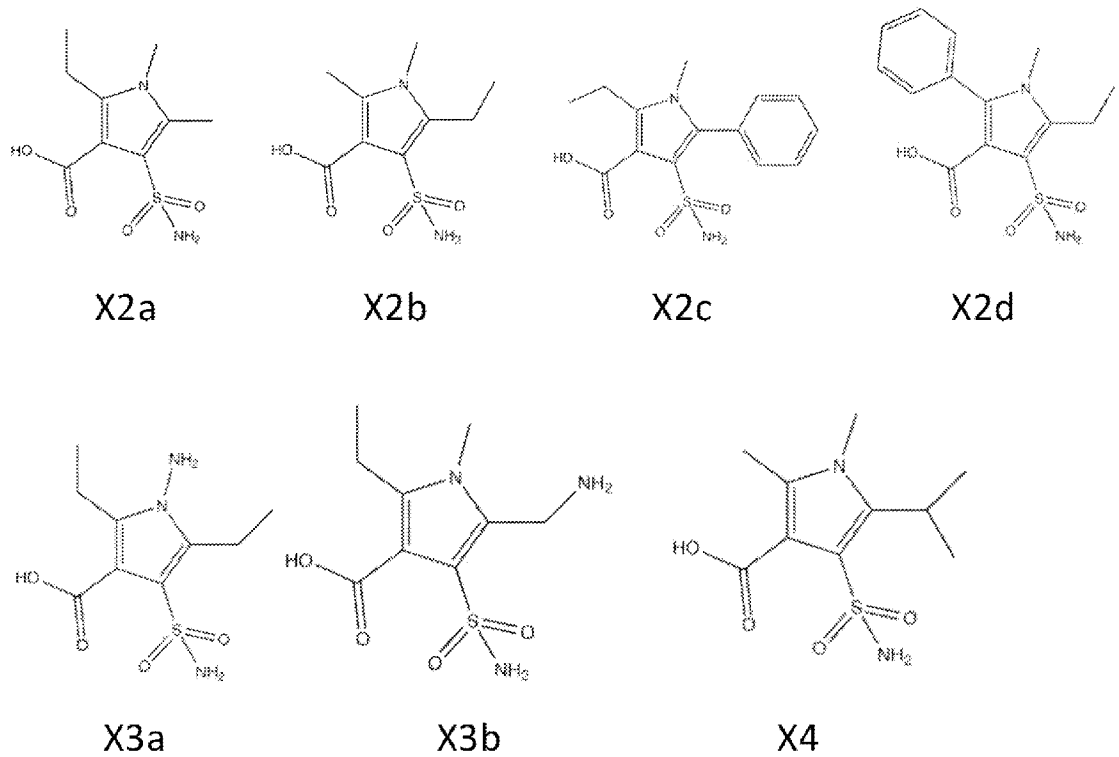
[0062] 一般式 (1) で表される化合物として、具体的には、例えば以下の化合物が挙げられる。

[0063]

[化11]



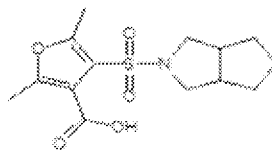
[0064] [化12]



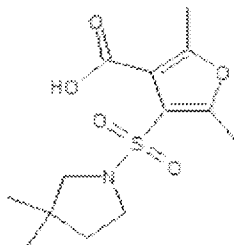
[0065]

[化13]

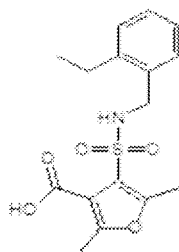
No.9-7



No.9-8



No.9-9



[0066] 上記化合物の中でも、好ましくは化合物E、化合物I、化合物X2d等が挙げられる。

[0067] <1-6. 異性体>

一般式(1)で表される化合物には、立体異性体及び光学異性体が含まれ、これらは特に限定されるものではない。

[0068] <1-7. 塩、水和物、溶媒和物>

一般式(1)で表される化合物の塩は、薬学的に許容される塩である限り、特に制限されるものではない。該塩としては、酸性塩、塩基性塩のいずれも採用することができる。酸性塩の例としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の無機酸塩； 酢酸塩、プロピオン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩、クエン酸塩、メタンサルホン酸塩、パラトルエンサルホン酸塩等の有機酸塩が挙げられ、塩基性塩の例としては、ナトリウム塩、及びカリウム塩等のアルカリ金属塩； 並びにカルシ

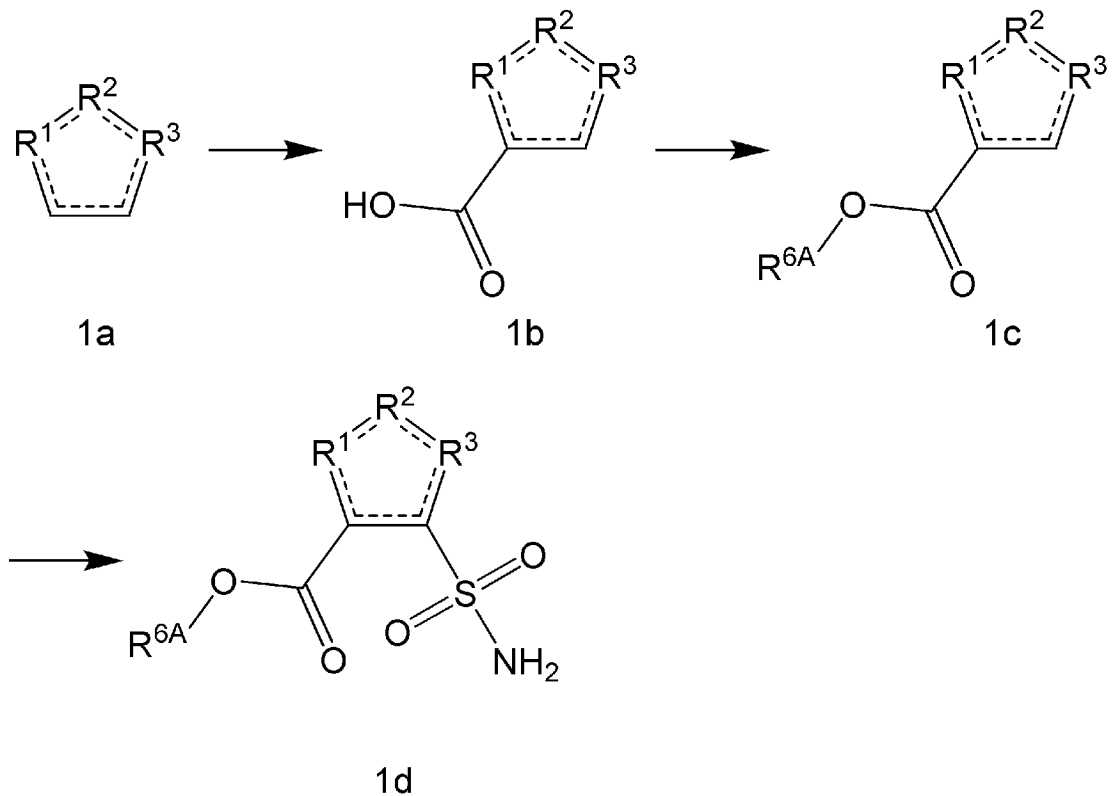
ウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩； アンモニアとの塩；
 モルホリン、ピペリジン、ピロリジン、モノアルキルアミン、ジアルキルア
 ミン、トリアルキルアミン、モノ（ヒドロキシアルキル）アミン、ジ（ヒド
 ロキシアルキル）アミン、トリ（ヒドロキシアルキル）アミン等の有機アミ
 ンとの塩等が挙げられる。

[0069] 一般式（1）で表される化合物は水和物、溶媒和物とすることもできる。溶
 媒としては、例えば、薬学的に許容される有機溶媒（例えばエタノール、グ
 リセロール、酢酸等）等が挙げられる。

[0070] 2. 製造方法

一般式（1）で表される化合物は、様々な方法で合成することができる。例
 えば、一般式（1）において R^6 が炭化水素基（ R^{6A} ）であり且つ R^7 及び R^8 が共に水
 素原子である場合の化合物（化合物1d）は、例えば以下の反応式：

[0071] [化14]



[0072] [式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^7 及び R^8 は前記に同じである。 R^{6A} は炭化水素基を示す。

]

に従って又は準じて、合成することができる。

[0073] また、一般式 (1) において R^6 が水素原子であり且つ R^7 及び R^8 が共に水素原子である場合の化合物 (化合物1e) は、例えば化合物1dのカルボキシ基の保護基である R^{6A} -を強塩基等を用いて脱保護することにより、得ることができる。

[0074] さらに、 R^7 及び R^8 の少なくとも一方が炭化水素基である化合物については、化合物1d又は化合物1eのアミノ基を炭化水素で置換することにより得ることができる。

[0075] また、これらの方法以外にも、一般式 (1) で表される化合物は、パール・クノール反応を利用して合成することもできる。すなわち、パール・クノール反応を利用する場合、適当なケトエステルとケトンとのカップリング物 (ジケトエステル) を酸又はアンモニア、第1級アミン等の存在下で反応させてフランやピロール (化合物1c) を合成し、その後は上記反応式に従って一般式 (1) で表される化合物を合成することができる。

[0076] R^A 、 R^B 等においてアミノ基が存在する場合は、例えば、パール・クノール反応により、化合物c上のアミノ基が必要に応じて適当な保護基 (例えばフタルイミド等) で保護された化合物 (化合物c') を得て、反応工程中の適当なタイミングで脱保護 (例えばヒドラジン等を用いて脱保護) することにより、一般式 (1) で表される化合物を合成することができる。

[0077] <2-1. 化合物1a→化合物1b>

本工程では、化合物1a、ハロゲン化アルミニウム、及び二酸化炭素を反応させることで、化合物1bを得ることができる。

[0078] ハロゲン化アルミニウムとしては、特に制限されないが、例えばハロゲン化アルキルアルミニウム、好ましくは塩化ジメチルアルミニウム等が挙げられる。

[0079] ハロゲン化アルミニウムの使用量は、収率、合成の容易さ等の観点から、通常、1モルの化合物1aに対して、0.5~1.5モルが好ましく、0.8~1.2モルがより好ましい。

- [0080] 二酸化炭素の使用量は、収率、合成の容易さ等の観点から、通常、1モルの化合物1aに対して、1~15モルが好ましい。
- [0081] 本工程は溶媒中で行うことが好ましい。溶媒としては、特に制限されないが、例えばトルエン等が挙げられる。溶媒は1種単独で、或いは2種以上を組み合わせて使用することができる。
- [0082] 本工程においては、上記成分以外にも、本発明の効果を損なわない範囲で、適宜添加剤を使用することもできる。
- [0083] 反応雰囲気は、通常、不活性ガス雰囲気（アルゴンガス雰囲気、窒素ガス雰囲気等）を採用し得る。反応温度は、加熱下、常温下及び冷却下のいずれでも行うことができ、通常、0~100℃（特に15~40℃）で行うことが好ましい。反応時間は特に制限されず、通常、3時間~48時間、特に8時間~24時間とすることができる。
- [0084] 反応終了後は、必要に応じて常法にしたがって精製処理をすることもできる。また、精製処理を施さずに次の工程を行うこともできる。
- [0085] <2-2. 化合物1b→化合物1c>
本工程では、化合物1b、 $R^{6A}-OH$ 、及びハロゲン化水素を反応させることで、化合物1cを得ることができる。
- [0086] $R^{6A}-OH$ の使用量は、収率、合成の容易さ等の観点から、通常、1重量部の化合物1bに対して、3~15重量部が好ましく、5~10重量部がより好ましい。
- [0087] ハロゲン化水素としては、特に制限されないが、好ましくは塩化水素が挙げられる。
- [0088] ハロゲン化水素の使用量としては、反応液中、1~6規定、好ましくは1.5~5規定となる程度である。
- [0089] 本工程では、通常は $R^{6A}-OH$ が溶媒として機能するが、さらに適当な溶媒を追加してもよい。溶媒は1種単独で、或いは2種以上を組み合わせて使用することができる。
- [0090] 本工程においては、上記成分以外にも、本発明の効果を損なわない範囲で、適宜添加剤を使用することもできる。

- [0091] 反応雰囲気は、通常、不活性ガス雰囲気（アルゴンガス雰囲気、窒素ガス雰囲気等）を採用し得る。反応温度は、加熱下、常温下及び冷却下のいずれでも行うことができ、通常、0～100℃（特に15～40℃）で行うことが好ましい。反応時間は特に制限されず、通常、3時間～48時間、特に8時間～24時間とすることができる。
- [0092] 反応終了後は、必要に応じて常法にしたがって精製処理をすることもできる。また、精製処理を施さずに次の工程を行うこともできる。
- [0093] <2-3. 化合物1c→化合物1d>
本工程では、化合物1c、ハロゲン化スルホニル酸、及び水酸化アンモニウムを反応させることで、化合物1dを得ることができる。この工程は、2段階で、即ち、化合物1cとハロゲン化スルホニル酸を反応させた後、得られた反応物と水酸化アンモニウムとを反応させることにより実行することもできる。
- [0094] ハロゲン化スルホニル酸としては、特に制限されないが、好ましくは塩化スルホニル酸等が挙げられる。
- [0095] ハロゲン化スルホニル酸の使用量は、収率、合成の容易さ等の観点から、通常、1モルの化合物1cに対して、3～20モルが好ましく、7～15モルがより好ましい。
- [0096] 水酸化アンモニウムの使用量は、収率、合成の容易さ等の観点から、通常、1重量部の化合物1cに対して、1～50重量部が好ましく、3～20重量部がより好ましい。
- [0097] 本工程は溶媒中で行うことが好ましい。溶媒としては、特に制限されないが、例えばアセトニトリル等が挙げられる。溶媒は1種単独で、或いは2種以上を組み合わせて使用することができる。
- [0098] 本工程においては、上記成分以外にも、本発明の効果を損なわない範囲で、適宜添加剤を使用することもできる。
- [0099] 反応雰囲気は、通常、不活性ガス雰囲気（アルゴンガス雰囲気、窒素ガス雰囲気等）を採用し得る。反応温度は、加熱下、常温下及び冷却下のいずれでも行うことができ、通常、0～40℃（特に0～5℃）で行うことが好ましい。

反応時間は特に制限されず、通常、30分間～10時間、特に1時間～5時間とすることができる。

[0100] 反応終了後は、必要に応じて常法にしたがって精製処理をすることもできる。また、精製処理を施さずに次の工程を行うこともできる。

[0101] 3. 用途

本発明の化合物は、 β -ラクタマーゼ阻害活性、 β -ラクタム系抗菌化合物の抗菌効果の増強活性等を有する。このため、本発明の化合物は、医薬、試薬等（本明細書において、「本発明の薬剤」と示すこともある。）の有効成分として、より具体的には、 β -ラクタマーゼ阻害剤、 β -ラクタム系抗菌化合物の抗菌効果の増強剤等の有効成分としての利用が可能である。また、本発明の化合物の β -ラクタマーゼ阻害活性、 β -ラクタム系抗菌化合物の抗菌効果の増強活性等を利用して、本発明の化合物及び β -ラクタム系抗菌化合物を含有する、抗菌剤、さらには β -ラクタム系抗菌化合物を含有する、本発明の化合物と併用投与されるように用いられる抗菌剤（これらも、本明細書において、「本発明の薬剤」と示すこともある。）、等を提供することもできる。

[0102] 本発明の薬剤の内、本発明の化合物を含有するものについては、本発明の化合物を含有する限りにおいて特に制限されず、必要に応じてさらに他の成分を含んでもよい。他の成分としては、薬学的に許容される成分であれば特に限定されるものではない。他の成分としては、薬理作用を有する成分のほか、添加剤も含まれる。添加剤としては、例えば基剤、担体、溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、浸透圧調整剤、吸収促進剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、増粘剤、保湿剤、着色料、香料、キレート剤等が挙げられる。

[0103] 本発明の化合物による阻害対象である β -ラクタマーゼとしては、 β -ラクタム環の開環を触媒する、任意の供給源に由来する酵素である限り特に制限されない。 β -ラクタマーゼ（EC3.5.2.6）は、最も一般的には細菌によって産生される酵素である。 β -ラクタマーゼは、 β -ラクタム環の加水分解

性開環を触媒し、ペニシリン系、ペナム系、ペネム系、セフェム系、セファロsporin系、カルバセフェム系、セファマイシン系、モノバクタム系、及びカルバペネム系などの β -ラクタム系抗菌化合物に細菌耐性を付与する原因である。 β -ラクタマーゼは、クラスA~Dに分類され、これらの中でも、本発明の化合物による阻害対象としては、クラスB β -ラクタマーゼが好ましく、クラスB1 β -ラクタマーゼがより好ましい。具体的には、例えばIMP-1、NDM-1、VIM-2、DIM-1、GIM-1、KHM-1、SIM-1、SPM-1、TMB-1、BcII、BlaB、CcrA、IND-7等が挙げられる。また、クラスB2やB3として、それぞれSFH-1やGOB-1等が挙げられる。

[0104] 本発明の化合物による抗菌効果の増強対象である β -ラクタム系抗菌化合物としては、特に制限されず、例えばペニシリン系抗菌化合物、セフェム系抗菌化合物、カルバペネム系抗菌化合物等が挙げられる。

[0105] ペニシリン系抗菌化合物の具体的な例としては、ベンジルペニシリン、フェネチシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、アンピシリン、シクラシリン、アモキシリン、タランピシリン、バカンピシリン、レナンピシリン、アスポキシリン、ピペラシリン、スルベニシリン、ピブメシリナム、スルタミシリン、フェノキシメチルペニシリン、カルベニシリン、アジドシリン、プロピシリン、エピシリン、チカルシリン、ピルベニシリン、アズロシリン、メズロシリン、並びに他の公知のペニシリン系抗菌化合物などが挙げられる。

[0106] セフェム系抗菌化合物の具体的な例としては、セファクロル、セファゾリン、セファトリジン、セファドロキシル、セファピリン、セファマンドール・ナフェート、セファラジン、セファレキシン、セファロチン、セフェピム、セフキシチン、セフキシム、セフジジム、セフジトレン、セフジニル、セフスロジン、セフセリス、セフゾプラン、セフタキシム、セフタジジム、セフタロリン、セフチアム、セフチゾキシム、セフチブテン、セフテゾール、セフテタム、セフトリアキソン、セフニシド、セフピラミド、セフピロム、セフブペラゾン、セフプロジル、セフペラゾン、セフポドキシム、セフミノ

クス、セフメタゾール、セフメノキシム、セフラジン、セフロキサジン、セフロキシム、ラタモキセフ、フロモキセフ、セフトロザン (CXA101、(6R, 7R) -3- [5-アミノ-4- [3- (2-アミノエチル) ウレイド] -1-メチル-1H-ピラゾール-2-イウム-2-イルメチル] -7- [2- (5-アミノ-1, 2, 4-チアジアゾール-3-イル) -2- [(Z) -1-カルボキシ-1-メチルエトキシイミノ] アセタミド] -3-セフェム-4-カルボン酸 硫酸水素塩) ならびに他の公知のセフェム系抗菌化合物等が挙げられる。

[0107] カルバペネム系抗菌化合物の具体的な例としては、イミペネム、パニペネム、メロペネム、ピアペネム、ドリペネム、エルタペネム、テビペネムなどがある。

[0108] ペニシリン系抗菌化合物、セフェム系抗菌化合物、及びカルバペネム系抗菌化合物以外の β -ラクタム系抗菌化合物の例としては、アズトレオナム、カルモナム、ロラカルベフ、ファロペネム、リチペネム等が挙げられる。

[0109] 本発明の薬剤の対象菌としては、グラム陰性菌、グラム陽性菌等を広く採用することができる。グラム陰性菌としては、例えば、腸内細菌科細菌 (例えば、エシェリヒア属菌、クレブシエラ属菌、サルモネラ属菌、赤痢菌属等)、アシネトバクター属菌、シュードモナス属菌 (例えば緑膿菌)、モラクセラ属菌、ヘリコバクター属菌、カンピロバクター属菌、アエロモナス属菌、ビブリオ属菌 (例えばコレラ菌、腸炎ビブリオ菌)、ヘモフィルス属菌 (例えばインフルエンザ菌)、ナイセリア属菌 (例えば淋菌、髄膜炎菌)、バクテロイデス属菌等が挙げられる。グラム陽性菌としては、例えば、ブドウ球菌属菌 (例えば黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌)、腸球菌 (例えばエンテロコッカス属菌)、レンサ球菌属菌 (例えばA群連鎖球菌、B群連鎖球菌、肺炎球菌、緑色連鎖球菌)、バシラス属菌 (例えばセレウス菌、炭疽菌)、クロストリジウム属菌 (例えば破傷風菌、ボツリヌス菌、ディフィシル菌)、コリネバクテリウム属菌 (例えばジフテリア菌)、リステリア属菌、ラクトバシラス属菌、ビフィドバクテリウム属菌、プロピオニバクテリウム属菌 (例えばニキビの原因となるアクネ菌)、放線菌等が挙げられる。これらの

中でも、好ましくはグラム陰性菌、より好ましくは腸内細菌科細菌、アシネトバクター属菌等が挙げられる。本発明の薬剤は、 β -ラクタマーゼを産生する対象菌に対して、その効果を発揮することができる。

[0110] 本発明の薬剤の使用態様は、特に制限されず、その種類に応じて適切な使用態様を採ることができる。本発明の薬剤は、その用途に応じて、例えば *in vitro* で使用する（例えば、培養細胞の培地に添加する。）こともできるし、*in vivo* で使用する（例えば、動物に投与する。）こともできる。

[0111] 本発明の薬剤を動物又は細胞に適用する場合の適用対象は特に限定されないが、哺乳動物では、例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウサギ、ブタ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、シカ等が挙げられる。また、細胞としては、動物細胞等が挙げられる。細胞の種類も特に制限されず、例えば血液細胞、造血幹細胞・前駆細胞、配偶子（精子、卵子）、線維芽細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、神経細胞、肝細胞、ケラチン生成細胞、筋細胞、表皮細胞、内分泌細胞、ES細胞、iPS細胞、組織幹細胞、がん細胞等が挙げられる。

[0112] 本発明の薬剤は、医薬、試薬等に適した任意の剤形、例えば錠剤（口腔内側崩壊錠、咀嚼可能錠、発泡錠、トローチ剤、ゼリー状ドロップ剤などを含む）、丸剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、ドライシロップ剤、液剤（ドリンク剤、懸濁剤、シロップ剤を含む）、ゼリー剤などの経口製剤形態や、注射用製剤（例えば、点滴注射剤（例えば点滴静注用製剤等）、静脈注射剤、筋肉注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤）、外用剤（例えば、軟膏剤、クリーム剤、パップ剤、ローション剤）、坐剤吸入剤、眼剤、眼軟膏剤、点鼻剤、点耳剤、リポソーム剤等の非経口製剤形態を採ることができる。

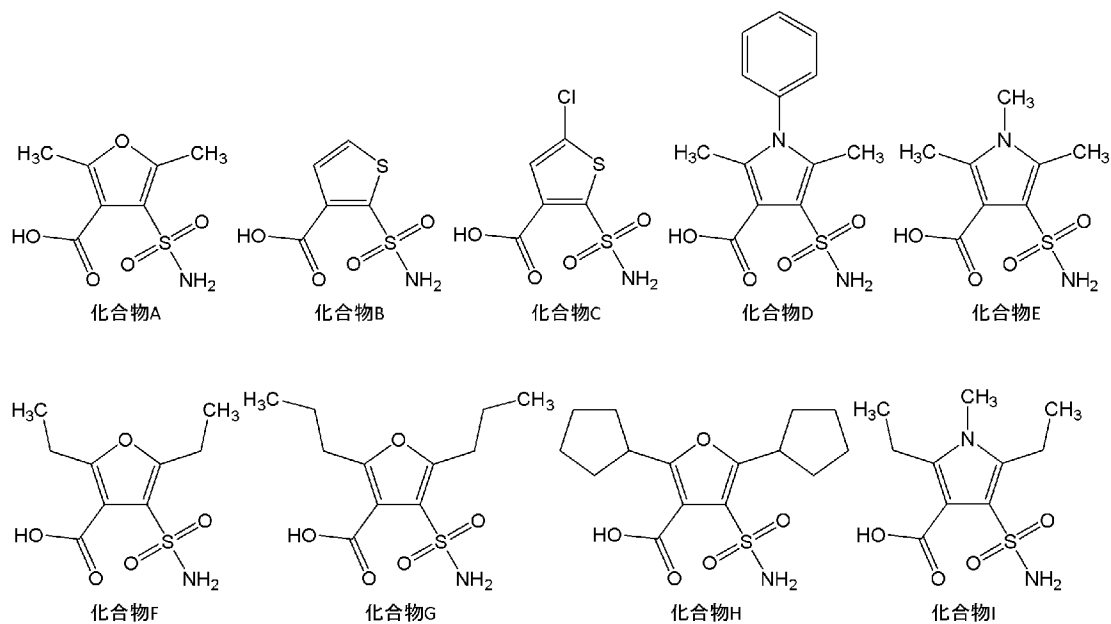
[0113] 本発明の薬剤の投与経路としては、所望の効果が得られる限り特に制限されず、経口投与、経管栄養、注腸投与等の経腸投与； 経静脈投与、経動脈投与、筋肉内投与、心臓内投与、皮下投与、皮内投与、腹腔内投与等の非経口投与等が挙げられる。

- [0114] 本発明の薬剤中の有効成分の含有量は、使用態様、適用対象、適用対象の状態等に左右されるものであり、限定はされないが、例えば0.0001~100重量%、好ましくは0.001~50重量%とすることができる。
- [0115] 本発明の薬剤をヒトや動物に投与する場合の投与量は、薬効を発現する有効量であれば特に限定されず、通常は、有効成分の重量として、一般に経口投与の場合には一日あたり0.1~1000 mg/kg体重、好ましくは一日あたり0.5~500 mg/kg体重であり、非経口投与の場合には一日あたり0.01~100 mg/kg体重、好ましくは0.05~50 mg/kg体重である。上記投与量は、患者の年齢、病態、症状等により適宜増減することもできる。
- [0116] また、本発明の β -ラクタマーゼ阻害剤を β -ラクタマーゼ産生菌の検出に用いることもできる。たとえば、 β -ラクタム系抗菌化合物と本発明の β -ラクタマーゼ阻害剤との共存下で検査対象の菌を培養したときの増殖阻害の有無で β -ラクタマーゼ産生菌を検出することができる。すなわち、ディスク法や微量液体希釈法などに本阻害剤を用いることができる。

実施例

- [0117] 以下に、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。
- [0118] 1. 化合物の準備1
以下に示される化合物A~Iを準備した。
- [0119]

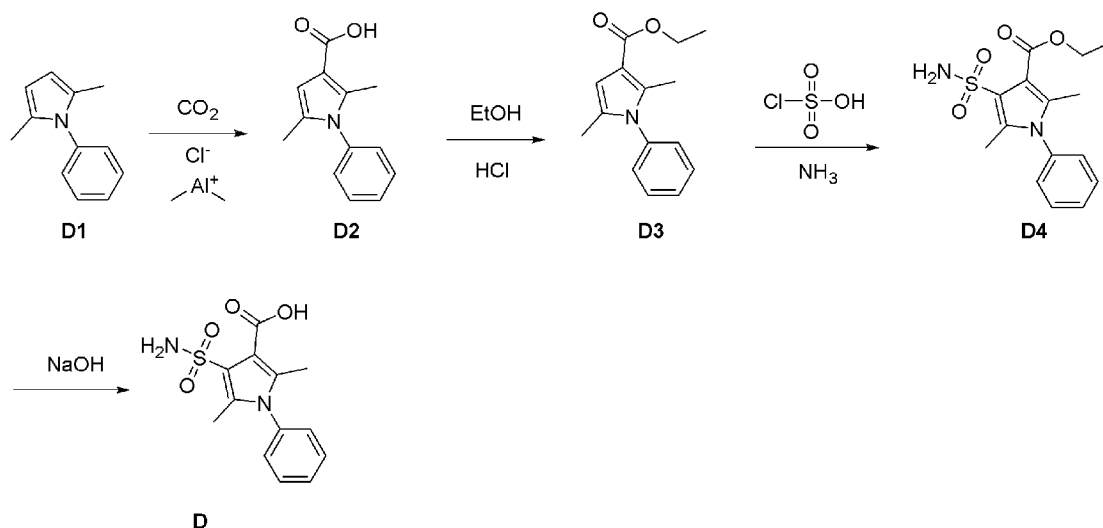
[化15]



[0120] 化合物A～CはEnamine社から購入した。化合物D～Iは以下の合成例1～6に従って合成した。

[0121] 合成例1. 化合物Dの合成

[0122] [化16]



[0123] 上記反応式に従って、化合物Dを合成した。具体的には以下のようにして合成した。

[0124] 乾燥トルエン (200mL) 中の2,5-ジメチル-1-フェニル-1H-ピロール (D1、5.10g、29.8mmol)、塩化ジメチルアルミニウム (2.74g、29.8mmol) およびCO₂

(10.0g、227mmol)を一晩攪拌した。混合物を水(200mL)でクエンチし、ジクロロメタン(200mL×3)で抽出した。有機層を無水Na₂SO₄で乾燥させ、減圧下で濃縮して、2,5-ジメチル-1-フェニルピロール-3-カルボン酸エチル(D2)を黄色の油状物として得た(2.73g、42.6%)。

[0125] HCl/EtOH(20.0mL、4.00N)中の2,5-ジメチル-1-フェニルピロール-3-カルボン酸(D2、2.73g、12.7mmol)の溶液を一晩攪拌した。溶液を真空下で濃縮した。混合物を10.0%NaHCO₃水溶液(100mL)でクエンチして、ジクロロメタン(100mL×3)で抽出した。有機層を無水Na₂SO₄で乾燥させ、減圧下で濃縮して、エチル2,5-ジメチル-1-フェニルピロール-3-カルボキシラート(D3)を黄色の油状物として得た(1.70g、55.2%)。

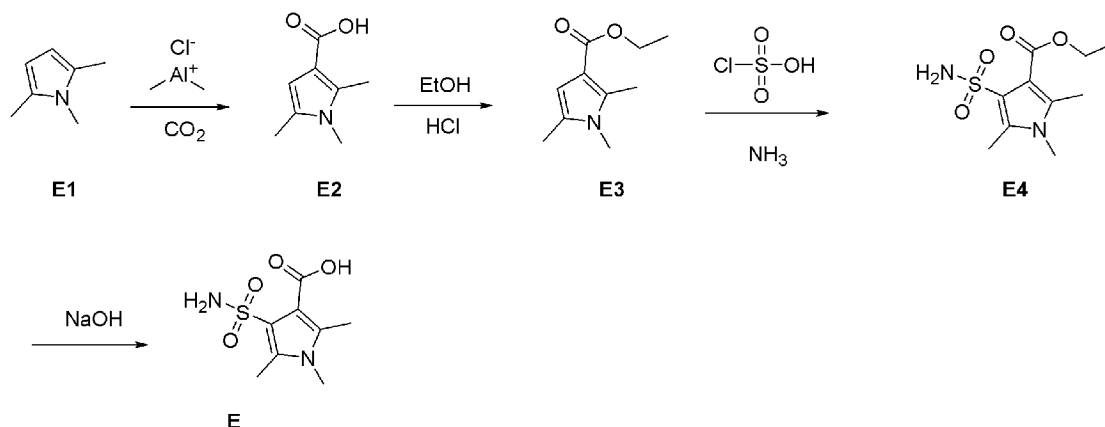
[0126] アセトニトリル(30.0mL)中の2,5-ジメチル-1-フェニルピロール-3-カルボン酸エチル(D3、1.70g、6.99mmol)の溶液に、0°Cでゆっくりと塩化スルホン酸(8.10g、69.8mmol)を添加した。溶液を2時間攪拌し、次いで水酸化アンモニウム(10.0mL)を添加した。溶液を1時間攪拌し、酢酸エチル(100mL×2)で抽出した。有機層を無水Na₂SO₄で乾燥させ、減圧下で濃縮して粗生成物を得て、これを分取HPLCで精製して、エチル2,5-ジメチル-1-フェニル-4-スルファモイルピロール-3-カルボキシラート(D4)を黄色油状物として得た(300mg、13.3%)。

[0127] MeOH(5.00mL)中のエチル2,5-ジメチル-1-フェニル-4-スルファモイルピロール-3-カルボキシラート(D4、300mg、0.932mmol)、NaOH(44.7mg、1.18mmol)および水(3.00mL)を16時間攪拌した。真空下でMeOHを除去した。残渣を酢酸エチル(10.0mL)および水(10.0mL)に加えた。混合物をHOAcでpH = 3~4に調整した。溶液を酢酸エチル(10.0mL×3)で抽出した。有機層を無水Na₂SO₄で乾燥させ、減圧下で濃縮して化合物Dを黄色固体として得た(20.5mg、7.48%)。

¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.98-2.00 (m, 1 H), 2.14 (s, 6 H), 7.08 (s, 1 H), 7.33-7.36 (m, 2 H), 7.58-7.61 (m, 3 H). MS Calcd.: 294; MS Found: 295.1([M+1]⁺).

[0128] 合成例2. 化合物Eの合成

[0129] [化17]

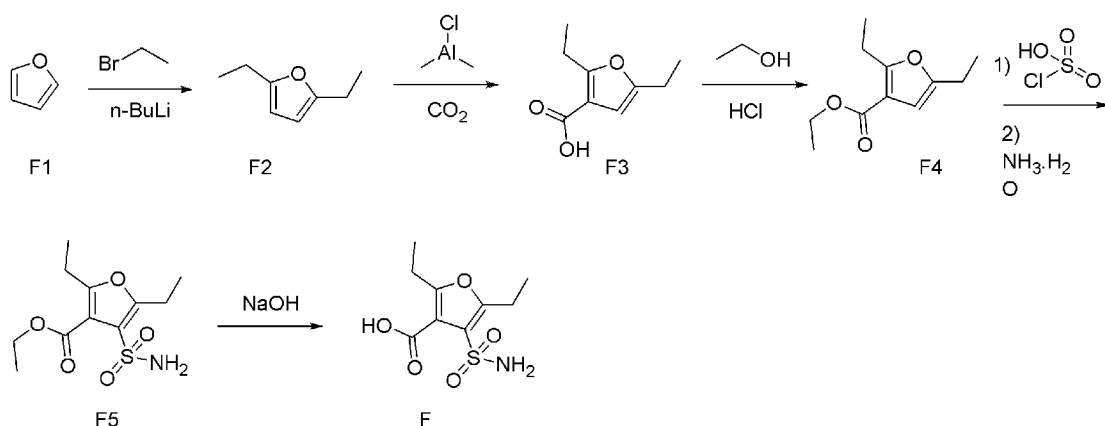


[0130] 上記反応式に従って、合成例1と同様にして化合物Eを合成した。化合物Eを黄色固体として得た（収量20.0 mg, 収率18.7 %）。

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 2.35 (d, J= 1.6 Hz, 2 H), 2.48 (d, J= 8.0 Hz, 6 H), 3.46 (s, 3 H). MS Calcd.: 232; MS Found: 233.1([M+1]⁺).

[0131] 合成例3. 化合物Fの合成

[0132] [化18]



[0133] 上記反応式に従って、化合物Fを合成した。具体的には以下のようにして合成した。

[0134] フラン (F1、16.0g、0.235mol) およびTMEDA (60.0g、0.517mol) の溶液を0℃で冷却し、N-ブチルリチウム（ヘキサン中2.50M、207mL、0.517mol）を滴下した。溶液を室温に戻し、1時間攪拌した。テトラヒドロフラン（150mL）中のブromoエタン（76.8g、0.705mol）を滴下した。反応物を室温で一晩攪拌

し、飽和塩化アンモニウム (300mL) でクエンチし、メチルtert-ブチルエーテル (500mL×2) で抽出した。有機層を1N HCl水溶液 (100mL×3) で洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥させ、減圧下で濃縮して、2,5-ジエチルフラン (F2) を黄色の油状物として得た (18.9g、64.9%)。

[0135] 乾燥トルエン (200mL) 中の2,5-ジエチルフラン (F2、17.0g、0.137mol)、ジメチルアルミニウムクロリド (152mL、0.9M、0.137mol) およびCO₂ (20.0g、0.454mol) の溶液を一晩攪拌した。混合物を水 (250mL) でクエンチし、ジクロロメタン (300mL×3) で抽出した。有機層を無水Na₂SO₄で乾燥させ、減圧下で濃縮して、赤褐色の固体として2,5-ジエチルフラン-3-カルボン酸 (F3) を得た (3.6g、15.7%)。

[0136] HCl/EtOH (36.0mL、2.00N) 中の2,5-ジエチルフラン-3-カルボン酸 (F3、3.6g、0.021mol) の溶液を一晩攪拌した。溶液を真空下で濃縮した。混合物を10.0%NaHCO₃水溶液 (100mL) でクエンチし、ジクロロメタン (100mL×2) で抽出した。有機層を無水Na₂SO₄で乾燥させ、減圧下で濃縮して、エチル2,5-ジエチルフラン-3-カルボキシレート (F4) を得た (2.67g、63.6%)。

[0137] アセトニトリル (30.0mL) 中のエチル2,5-ジエチルフラン-3-カルボキシレート (F4、2.50g、0.013mol) の溶液に、0°Cでゆっくりとスルホクロリド酸 (15.0g、0.130mol) を加えた。溶液を2時間攪拌し、次いで水酸化アンモニウム (50.0mL) を添加した。溶液を1時間攪拌した。溶液を酢酸エチル (100mL×2) で抽出した。有機層を無水Na₂SO₄で乾燥し、減圧下で濃縮して粗生成物を得、これをカラムで精製して、黄色固体として2,5-ジエチル-4-スルファモイルフラン-3-カルボン酸エチル (F5) を得た (880mg、25.1%)。

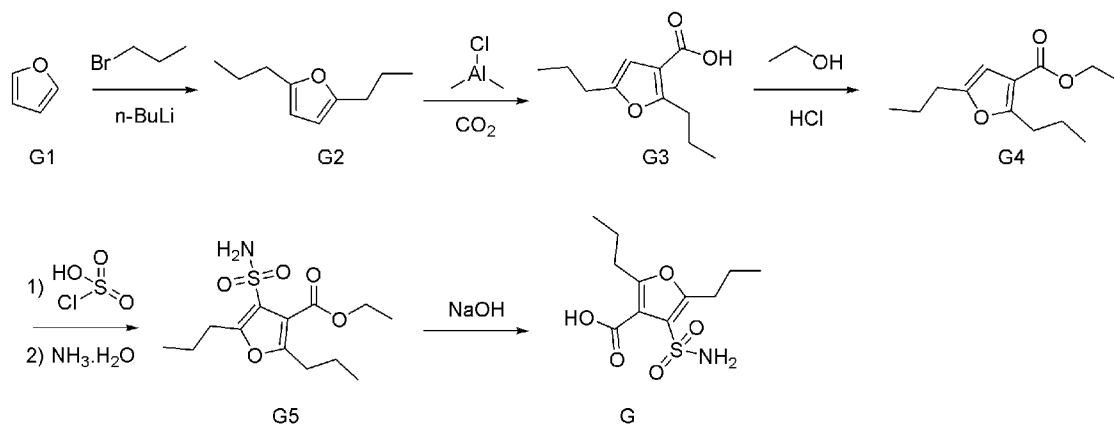
[0138] MeOH (10.0mL) 中のエチル2,5-ジエチル-4-スルファモイルフラン-3-カルボキシレート (F5、880mg、3.20mmol)、NaOH (640mg、16.0mmol) および水 (4.00mL) の溶液を、16時間攪拌した。真空下でMeOHを除去した。残渣に酢酸エチル (50.0mL) および水 (20.0mL) を添加した。混合物を水性HCl (1N) でpH = 3~4に調整した。溶液を酢酸エチル (40.0mL×3) で抽出した。有機層を無水Na₂SO₄で乾燥させ、減圧下で濃縮して化合物Fを黄色固体として得た

(120mg、15.2%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.66 (s, 2 H), 3.00–3.04 (m, 4 H), 1.24–1.30 (m, 6 H). MS Calcd.: 247; MS Found: 248.1($[\text{M}+1]^+$).

[0139] 合成例4. 化合物Gの合成

[0140] [化19]

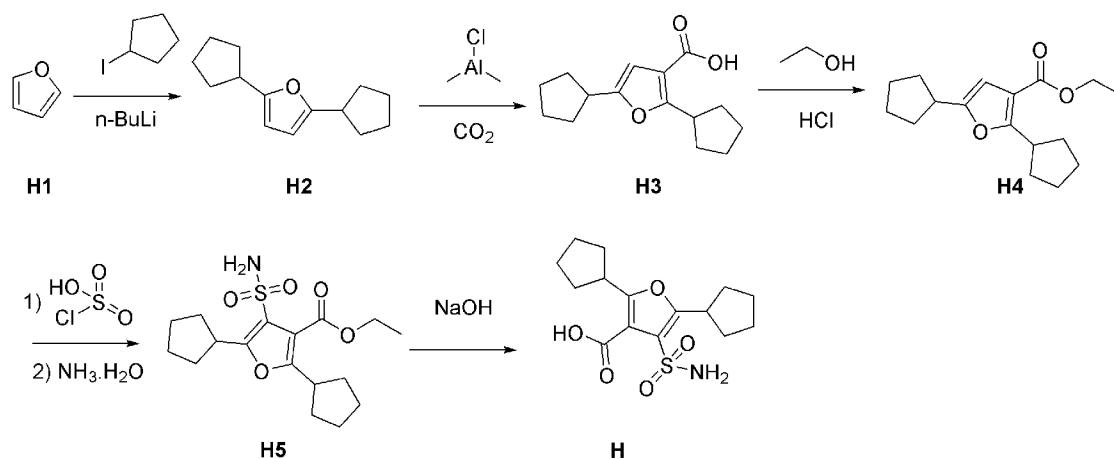


[0141] 上記反応式に従って、合成例3と同様にして化合物Gを合成した。化合物Gを黄色固体として得た (収量0.130 g, 収率13.0%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 2.92–2.99 (m, 4 H), 1.66–1.76 (m, 4 H), 0.94–0.99 (m, 6 H). MS Calcd.: 275; MS Found: 276.0($[\text{M}+1]^+$).

[0142] 合成例5. 化合物Hの合成

[0143] [化20]

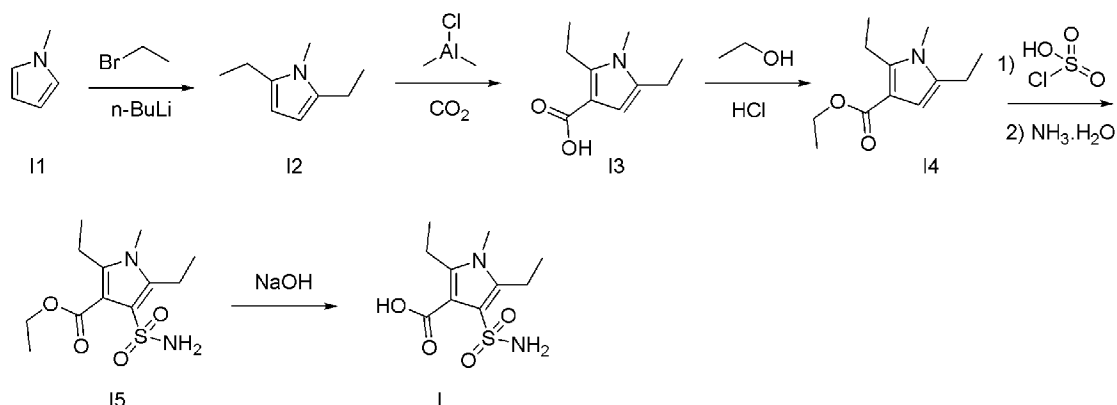


[0144] 上記反応式に従って、合成例3と同様にして化合物Hを合成した。化合物Hを黄色固体として得た (収量0.135 mg, 収率18.3%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 1.45–2.12 (m, 16 H), 3.83–3.95 (m, 2 H). M S Calcd: 327; MS Found: 326.0($[\text{M}-1]^-$).

[0145] 合成例6. 化合物Iの合成

[0146] [化21]



[0147] 上記反応式に従って、合成例1と同様にして化合物Iを合成した。化合物Iを黄色固体として得た（収量110 mg，収率11.1%）。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 3.45 (s, 3 H), 2.88–2.94 (m, 4 H), 1.04–1.11 (m, 6 H). MS Calcd.: 260; MS Found: 261.1($[\text{M}+1]^+$).

[0148] 2. 化合物の解析1

各化合物について、活性、複合体構造、毒性等を解析した（試験例1～7）。

[0149] 試験例1. 薬剤感受性試験1

96穴あるいは384穴U底プレート、ミューラーヒントン液体培地、抗菌薬（セフトジジム[CAZ]、イミペネム[IPM]、メロペネム[MPM]、ドリペネム[DPM]、ピアペネム[BPM]）を用いて、薬剤感受性試験測定用プレートを作製した。96穴等U底プレートA系列左端のウェル1に抗菌薬が最大濃度含まれるように調整し、右隣のウェル2は抗菌薬濃度が1/2に、さらにその右隣のウェル3は抗菌薬濃度1/4となるよう、1/2抗菌薬希釈系列をウェル11まで作製した。ウェル12は抗菌薬を含まないブランクウェルとした。B及びC系列にもA系列同様に抗菌薬の希釈系列を作製した。さらに、B及びC系列には、それぞれ被験物質（化合物A）を10 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 添加した（図1）。

[0150] 被検菌として、クラスB β -ラクタマーゼ (MBL (メタロー β -ラクタマーゼ) : IMP-1、NDM-1、又はVIM-2) をコードするプラスミドが導入された細菌 (pBCSK (+) / E. coli DH5 α) を用いた。ミューラーヒントン培地を用いて、被験菌を 10^8 cfu/mLに調整した。さらに、ミューラーヒントン培地を用いて被験菌を10倍に希釈した (10^7 cfu/mL)。これを5 μ l採取し、薬剤感受性試験測定用プレートに接種した。35°Cで1晩培養し、目視にて被験菌の発育を確認した。被験菌の発育が確認されなかったウェルの中で、最も低い抗菌薬濃度を含むウェルを、最小発育阻止濃度 (minimal inhibitory concentration) 値とした (図1)。

[0151] 結果を表1に示す。表1中、MBLsの列は、被検菌が産生するクラスB β -ラクタマーゼを示し、Empty vectorはクラスB β -ラクタマーゼを産生させていないことを示す。

[0152] [表1]

MBLs	Sub class	MIC (μ g/mL)					
		CAZ	CAZ +化合物A (10 μ g/ml)	CAZ +化合物A (50 μ g/ml)	MPM	MPM +化合物A (10 μ g/ml)	MPM +化合物A (50 μ g/ml)
IMP-1	B1	256	2	1	0.5	0.031	0.031
NDM-1	B1	>1,024	256	64	16	0.25	0.063
VIM-2	B1	4	1	0.5	0.063	0.031	0.031
Empty vector	---	0.25	0.25	0.25	0.016	0.016	0.016

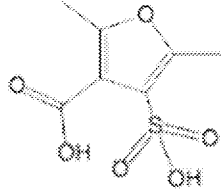
[0153] 表1に示されるように、化合物Aの添加により、 β -ラクタマーゼ産生菌に対する抗菌薬のMICが低下することが分かった。

[0154] 試験例2. β -ラクタマーゼ阻害活性測定試験

各種クラスB β -ラクタマーゼ (IMP-1、NDM-1、又はVIM-2 : 最終濃度 10 nM)、イミペネム (最終濃度 100 μ M)、被験物質 (化合物A、化合物Z = 下記に示す : 最終濃度 0、1、10、100 μ M) を HEPES バッファー中で混和した。吸光度298 nm、30°C条件下におけるイミペネム分解活性 (Δ abs/min) を測定し

た。被験物質未添加時のイミペネム分解活性を100%とし、各々被験物質添加時のイミペネム残存分解活性をプロットした。

[0155] [化22]



化合物 Z

[0156] 結果を図2に示す。図2に示されるように、化合物Aは β -ラクタマーゼを阻害することが分かった。

[0157] 試験例3. 薬剤感受性試験2

被検菌として、クラスB β -ラクタマーゼを産生する腸内細菌科細菌の各種株を使用する以外は、試験例1と同様にして行った。

[0158] 結果を図3に示す。図3に示されるように、化合物Aの添加により、 β -ラクタマーゼ産生腸内細菌科細菌に対する抗菌薬のMICが低下することが分かった。

[0159] 試験例4. 薬剤感受性試験3

被検菌として、クラスB β -ラクタマーゼを産生するアシネトバクターの各種株を使用する以外は、試験例1と同様にして行った。

[0160] 結果を図4に示す。図4に示されるように、化合物Aの添加により、 β -ラクタマーゼ産生アシネトバクターに対する抗菌薬のMICが低下することが分かった。

[0161] 試験例5. X線結晶構造解析

<IMP-1と被験物質との複合体構造解析>

IMP-1を産生する大腸菌[pET9a- Δ IMP-1/E. coli BL21 (DE3)]を液体培養し、遠心操作より菌体を回収した。菌体を超音波にて破碎後、超遠心操作により可溶性画分と不溶性画分を分離した。可溶性画分を陽イオン交換カラム、疎水相互作用カラム、ゲル濾過カラムの順に通し、IMP-1を精製した。限外濾過カラムを使用し、精製したIMP-1をHEPES バッファーに置換の後、濃縮した

。精製したIMP-1 (15 mg/mL)とリザーバー溶液[100 mM HEPES (pH 7.5)、200 mM Sodium acetate、25% PEG3350]を混和し、20°Cでインキュベーションすることにより、IMP-1の結晶を得た。IMP-1結晶を、被験物質（化合物A）を溶解した上記リザーバー溶液に浸潤することで、IMP-1と被験物質との複合体結晶を作製した。複合体結晶をシンクロトロンに持ち込み、X線放射光を照射し回折データの回収を行った。公開されているIMP-1の構造情報を使用し、分子置換法にて位相を決定した。精密化にはRefmac5を、モデル構築にはcootを使用した。

[0162] <VIM-2と被験物質との複合体構造解析>

VIM-2を産生する大腸菌[pET29a-VIM-2/E. coli BL21 (DE3)]を液体培養し、遠心操作より菌体を回収した。菌体を超音波にて破碎後、超遠心操作により可溶性画分と不溶性画分を分離した。可溶性画分を陰イオン交換カラム、疎水相互作用カラム、ゲル濾過カラムの順に通し、VIM-2を精製した。限外濾過カラムを使用し、精製したVIM-2をTris-HClバッファーに置換の後、濃縮した。精製したVIM-2 (15 mg/mL)とリザーバー溶液[200 mM Magnesium Formate、25% PEG3350]を混和し、20°Cでインキュベーションすることにより、VIM-2の結晶を得た。VIM-2結晶を、被験物質（化合物A）を溶解した上記リザーバー溶液に浸潤することで、VIM-2と被験物質との複合体結晶を作製した。複合体結晶をシンクロトロンに持ち込み、X線回折データの回収を行った。公開されているVIM-2の構造情報を使用し、分子置換法にて位相を決定した。精密化にはRefmac5を、モデル構築にはcootを使用した。

[0163] <NDM-1と被験物質との複合体構造解析>

NDM-1を産生する大腸菌[pET28a-NDM-1/E. coli BL21 (DE3)]を液体培養し、遠心操作より菌体を回収した。菌体を超音波にて破碎後、超遠心操作により可溶性画分と不溶性画分を分離した。可溶性画分をニッケルカラム、陰イオン交換カラム、ゲル濾過カラムの順に通し、NDM-1を精製した。限外濾過カラムを使用し、精製したNDM-1をTris-HClバッファーに置換の後、濃縮した。精製したNDM-1 (40 mg/mL)とリザーバー溶液[100 mM Bis-Tris (pH 6.1)、20

0 mM Ammonium Sulfate、25% PEG3350]を混和し、20°Cでインキュベーションすることにより、NDM-1の結晶を得た。NDM-1結晶を、被験物質（化合物A、又は化合物I）を溶解した上記リザーバー溶液に浸潤することで、NDM-1と被験物質との複合体結晶を作製した。複合体結晶をシンクロトロンに持ち込み、X線回折データの回収を行った。公開されているNDM-1の構造情報を使用し、分子置換法にて位相を決定した。精密化にはRefmac5を、モデル構築にはcootを使用した。

[0164] <結果>

結果を図5～8に示す。図5～8に示されるように、被検物質は、IPM-1、VIM-2、NDM-1と、そのスルファモイル基及びカルボキシ基を介して相互作用することが分かった。一方、これらの基が連結されている側と反対側（一般式(1)のR¹、R²及びR³側）と、IPM-1、VIM-2、及びNDM-1の間には一定の空間があり、この反対側の構造は自由度が高いと考えられた。

[0165] 試験例6. 薬剤感受性試験4及び阻害定数(Ki)測定試験1

薬剤感受性試験は、被検物質として化合物A～C及びE～Iを用いる以外は、試験例1と同様にして行った。

[0166] 阻害定数(Ki)測定試験は次のようにして行った。各種メタローβ-ラクタマーゼ（最終濃度 10 nM）を用い、阻害定数(Ki)を測定した。基質であるイミペネムの濃度、阻害剤となる被験物質（化合物A～E）の濃度をそれぞれ変化させ、各ポイントにおける吸光度298 nm、30°C条件下のイミペネム分解活性(Δabs/min)を測定した。測定値をラインウェーバー・バークプロットの式にフィットし、Kiを算出した。

[0167] 結果を表2に示す。表2中、最左列は、被験物質を示し、Noneは被検物質を添加しない場合を示す。

[0168]

[表2]

compounds	Inhibition constant K_i (μM)			MIC (mg l^{-1})		
	IMP-1	NDM-1	VIM-2	IMP-1	NDM-1	VIM-2
None				meropenem 1	meropenem 64	ceftazidime 16
B	34.1	7.68	15.5	meropenem 0.5	meropenem 16	ceftazidime 16
C	19.1	19.3	2.29	meropenem 0.5	meropenem 64	ceftazidime 16
A	0.22	9.82	2.80	meropenem 0.06	meropenem 16	ceftazidime 16
F	0.30	0.92	1.01	meropenem 0.03	meropenem 0.25	ceftazidime 16
G	0.38	0.29	0.46	meropenem 0.13	meropenem 1	ceftazidime 32
H	1.27	0.18	0.76	meropenem 0.5	meropenem 2	ceftazidime 32
E	1.23	9.08	0.42	meropenem 0.13	meropenem 4	ceftazidime 4
I	2.14	0.84	0.02	meropenem 0.03	meropenem 0.25	ceftazidime 1
D	7.51	10.2	20.8	meropenem 1	meropenem 16	ceftazidime 32

[0169] 表2に示されるように、化合物A~C及びE~Iの添加により、 β -ラクタマ

ーゼ産生菌に対する抗菌薬のMICが低下すること、及びβ-ラクタマーゼ活性が阻害されることが分かった。

[0170] 試験例7. 毒性評価試験

HeLa細胞に各種濃度の被験物質（化合物A）又はスタウロスポリンを添加し、MTTアッセイキット（Promega cat no. G4000）を用いて生細胞をカウントした。

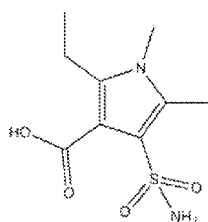
[0171] 結果を図9に示す。図9に示されるように、化合物Aの毒性は極めて低いことが分かった。

[0172] 試験例8. 復帰突然変異試験（Ames試験）

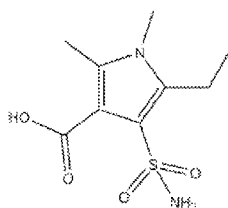
被検物質（化合物A）を被検物質として、Ames試験をUBE科学分析センターに委託して行った。その結果、化合物AはAmes試験陰性であることが分かった。

[0173] 3. 化合物の準備2

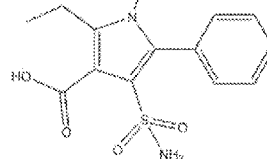
[0174] [化23]



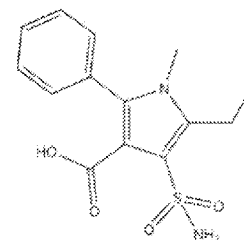
X2a



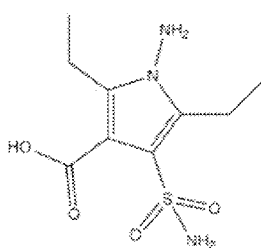
X2b



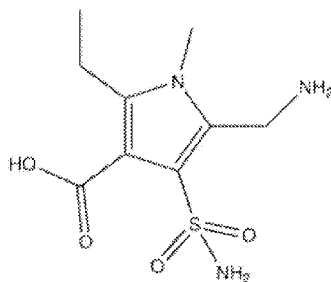
X2c



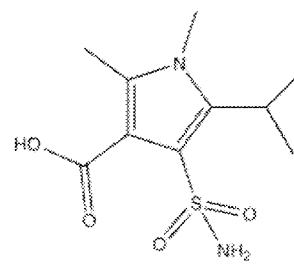
X2d



X3a



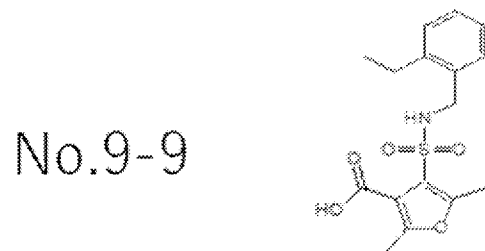
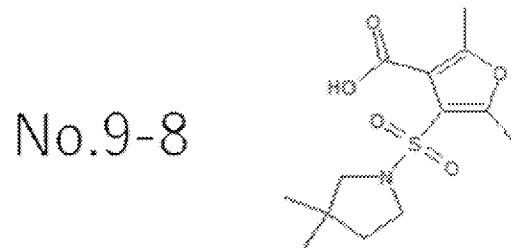
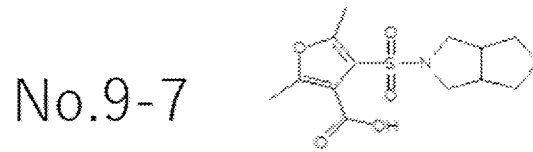
X3b



X4

[0175]

[化24]



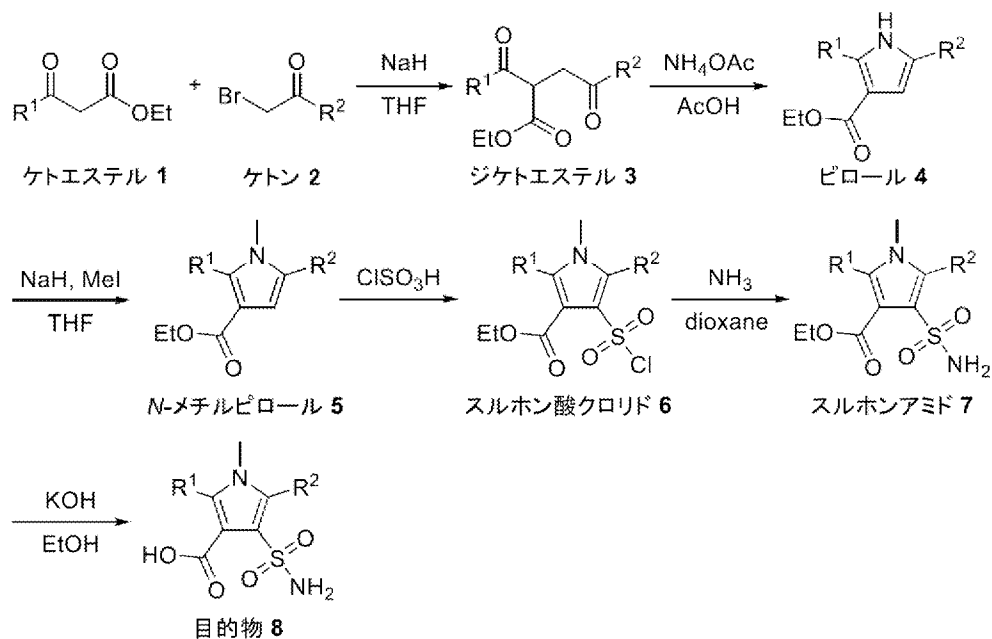
[0176] 化合物X2a、X2b、X2c、X2d、X3a、及びX4を以下の合成例7～8に従って合成した。化合物X3bは以下の合成例9に従って合成することができる。化合物No. 9-7、No. 9-8、及びNo. 9-9はナミキ商事株式会社から購入した。

[0177] 合成例7. 化合物X2a、X2b、X2c、X2d、及びX4の合成

下記の合成ルートにより目的物8（化合物X2a、X2b、X2c、X2d、及びX4）を合成した。

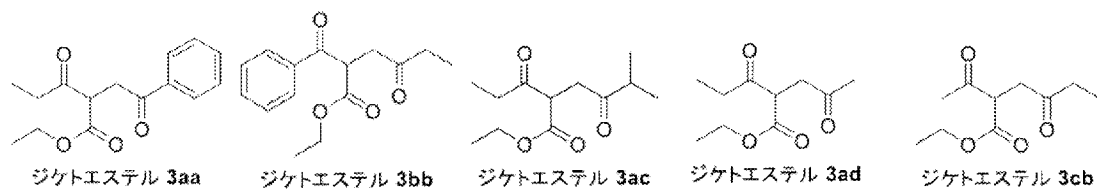
[0178]

[化25]

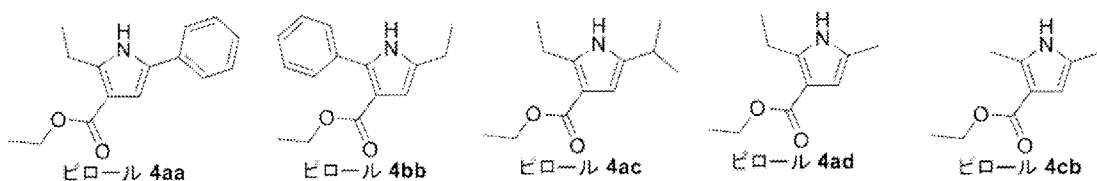


[0179] 目的物8、及び原料（ジケトエステル3等）の具体的な構造を以下に示す。番号は、上記合成ルートに対応する。また、番号の後に示される2文字のアルファベットが同じ化合物は、同一の合成ルート上の化合物であることを示す。すなわち、化合物X2a（ピロール8ad）の合成ルート上の化合物は、番号の後に示される2文字のアルファベットが「ad」である化合物である。

[0180] [化26]

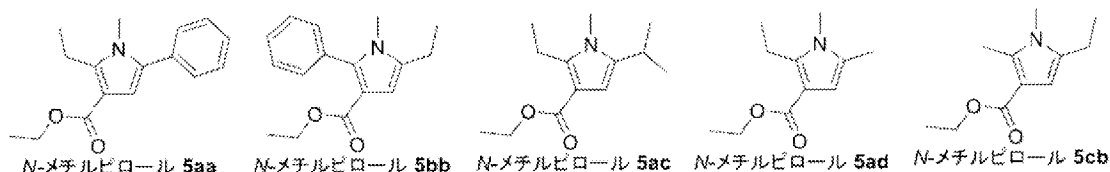


[0181] [化27]



[0182]

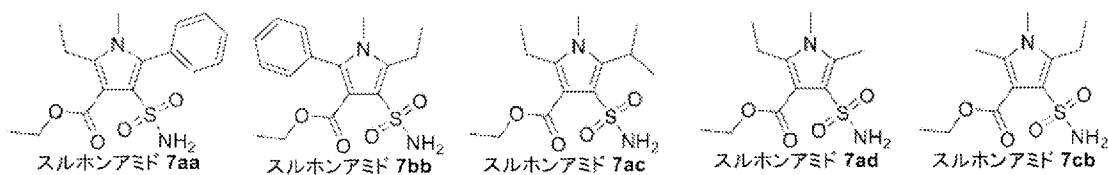
[化28]



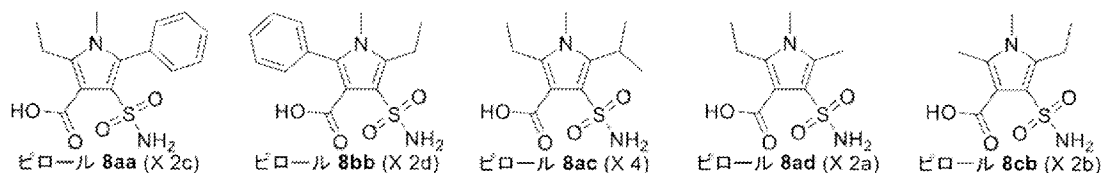
[0183] [化29]



[0184] [化30]



[0185] [化31]

[0186] 合成例7-1. 化合物X2a (ピロール8ad) の合成

3-オキソ吉草酸エチル1a とプロモアセトン2d のカップリングを行い、ジケトエステル3ad を合成した。即ち、撹拌子を備えた50 mL 三口フラスコに、窒素雰囲気下で水素化ナトリウム (60% in 流動パラフィン, 960 mg, 24.0 mmol, 1.20 eq.) 及びTHF (35 mL) を加え、氷冷した。次いで得られた灰色懸濁に、3-オキソ吉草酸エチル1a (2.85 mL, 20.00 mmol) をシリンジを用いてneat で滴下した。この時発泡を確認した。氷浴にてさらに30分撹拌した後、プロモアセトン2d (3.00 g, 22.00 mmol, 1.10 eq.) のTHF溶液 (15 mL) を素早く加えた。さらに1時間後にTLCで分析 (UV、リンモリブデン酸) したところ、原料1aの消失と1つの新たなスポットの生成が確認された (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル= 9/1、R_f 値: 0.3)。そこで反応混合物に

飽和塩化アンモニウム水溶液及び酢酸エチルを加えて反応を停止した。2層を分離した後、水層を酢酸エチルで抽出し、合わせた有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。乾燥剤をろ別後、ろ液を減圧下濃縮したところ橙色油状物質4.33 g が得られ、得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製した（計2回、使用シリカゲル（1）（2）（各150 g））。溶出として、（1）ヘキサン/酢酸エチル= 9/1（2 L）→1/1（700 mL）、（2）ヘキサン/酢酸エチル= 4/1（2 L）を使用した。目的物のフラクションを濃縮した結果、目的のジケトエステル3ad を2.50 g（収率62%）、淡黄色液体で得た。

[0187] Paal-Knorr ピロール合成により、ジケトエステル3ad からピロール4ad を合成した。即ち、撹拌子を備えた100 mL 一口フラスコに、ジケトエステル3ad（2.50 g, 12.49 mmol）、酢酸アンモニウム（9.63 g, 124.9 mmol, 10.00 eq.）及び酢酸（40 mL）を加え、混合物を80 °Cにて撹拌した。3時間後にTLCで分析（UV、リンモリブデン酸）したところ、原料3ad（展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル= 4/1、Rf 値：0.3）の消失及び原料の上に1つの新たなスポット（Rf 値：0.4）の生成が確認された。そこで反応混合物を室温まで放冷し、減圧下濃縮した。次いで得られた褐色油状物質を酢酸エチル及び蒸留水で希釈し、2層を分離した後、水層を酢酸エチルで抽出した。合わせた有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。乾燥剤をろ別し、ろ液を減圧下濃縮したところ、目的のピロール4ad を2.11 g（収率93%）、褐色液体で得た。

[0188] ヨウ化メチルでピロール4ad をアルキル化し、N-メチルピロール5ad を合成した。即ち、撹拌子を備えた100 mL 一口フラスコに、ピロール4ad（2.11 g, 11.63 mmol）、ヨウ化メチル（3.6 mL, 57.83 mmol, 4.97 eq.）及びTHF（45 mL）を加え、氷冷した。次いで得られた褐色溶液に、水素化ナトリウム（60% in 流動パラフィン, 698 mg, 17.44 mmol, 1.50 eq.）を加えたところ、発泡を確認した。30分後にTLCで分析（UV、リンモリブデン酸）したところ、原料4ad が残存していた。更に撹拌を続け、62時間後にTLC分析で消失

を確認した。反応混合物に蒸留水を加えて反応を停止し、ジエチルエーテルで抽出した。合わせた有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。乾燥剤をろ別し、ろ液を減圧下濃縮したところ、赤褐色油状物質2.80 g が得られ、得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（50 g 使用、直径30 mm、高さ190 mm）にて精製した。溶出液として、ヘキサン/酢酸エチル= 9/1（650 mL）を使用した。目的物のフラクションを濃縮した結果、N-メチルピロール5ad を1.72 g（収率76%）、褐色液体で得た。

[0189] N-メチルピロール5ad のクロロスルホン化を行い、スルホン酸クロリド6ad を合成した。即ち、攪拌子を備え、十分に窒素置換した100 mL 一口フラスコに、クロロ硫酸（5.9 mL, 88.76 mmol, 10.05 eq.）を加えて氷浴で攪拌した（発煙注意）。そこにN-メチルピロール5ad（1.72 g, 8.83 mmol）を少しずつ加えた後、密閉して室温まで昇温した（褐色透明溶液）。1 時間30 分後、TLC で分析（UV、リンモリブデン酸）したところ、原料5ad（展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル=9/1、Rf 値：0.7）の消失と新たなスポット（Rf 値：0.35）の生成が確認された。氷冷した蒸留水に氷冷した反応混合物をゆっくり滴下したところ、淡褐色固体が析出した。生じた固体を塩化メチレンで溶解させ、2 層を分離後、水層を塩化メチレン抽出し、合わせた有機層に硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。乾燥剤をろ別し、ろ液を減圧下濃縮したところ、スルホン酸クロリド6ad を1.75 g（収率68%）、褐色固体で得た。

[0190] スルホン酸クロリド6ad をアンモニア/ジオキサン溶液と反応させ、スルホンアミド7ad を合成した。即ち、攪拌子を備えた100 mL 一口フラスコに、スルホン酸クロリド6ad（1.75g, 5.97 mmol）及び0.5 M アンモニア/ジオキサン溶液（36.00 mL, 18.00 mmol, 3.01 eq.）を加え、室温下にて攪拌した。2 6 時間30 分後、TLC で分析（UV、リンモリブデン酸）したところ、原料6ad（展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル=1/1、Rf 値：0.6）の消失と新たなスポット（Rf 値：0.3）の生成が確認された。減圧下濃縮し、得られた粗生成物を冷ヘキサン/酢酸エチル=1/1 でケーキ洗浄し、固体を回収して乾燥したと

ころ、目的のスルホンアミド7ad を1.50 g (収率92%)、褐色固体で得た。

[0191] スルホンアミド7ad のエステルを塩基性条件で加水分解し、目的とするピロール化合物8ad (X 2a) を合成した。即ち、攪拌子を備えた100 mL 一口フラスコに、スルホンアミド7ad (Lot.4188163, 1.41 g, 5.13 mmol) 及び2 M 水酸化カリウム/エタノール溶液 (50.0 mL, 100.0 mmol, 19.48 eq.) を加え、80 °Cにて攪拌した。3 時間30 分後、TLC で分析 (UV、リンモリブデン酸) したところ、原料7ad (展開溶媒：酢酸エチルのみ、Rf 値：0.75) の消失と新たなスポット (Rf 値：0.5) の生成が確認された。反応混合物を室温まで放冷し、酢酸 (6 mL) 加えて冷蔵庫に静置した。翌日析出した結晶を桐山オートでろ過し、蒸留水 (10 mL) でケーキ洗浄を行ったところ、固体が溶解したので再度減圧下濃縮し、析出した固体を蒸留水 (10 mL) でケーキ洗浄を行った。残った固体を50 °Cにて減圧下乾燥したところ、褐色固体を687 mg 得た。得られた褐色固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (シリカゲル157 g 使用) にて精製した。溶出液として、クロロホルム/メタノール= 9/1 (2.1 L) ⇒4/1 (75 mL) ⇒メタノールのみ (300 mL) を使用した。検討2.6.1 において目的物の極性が高く、収量が低かったため、ここではメタノール単独まで極性を上げた。それぞれのフラクションを濃縮した結果、低極性褐色固体を112 mg、高極性褐色固体を504 mg 得た。得られた固体の一部を重DMSO で希釈して¹H 及び¹³C NMR を測定した結果、高極性褐色固体が目的のピロール8ad (X2a) であることを確認した (収率40%、HPLC 純度98.5%)。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.06 (t, J = 6.0 Hz, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.94 (q, J = 6.0Hz, 2H), 3.42 (s, 3H), 3.5-9.0 (bs, 3H); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 11.0, 14.3, 30.5, 48.0, 108.9, 121.4, 130.5, 140.4, 168.0; MS Calcd.: 245.06; MS Found: 245.03 ([M-1]⁻)。

[0192] 合成例7-2. 化合物X2bの合成

合成例7-1と同様にして化合物X2bを合成した。化合物X2bを淡褐色固体として得た (収率33%、HPLC 純度95.9%)。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.06 (t, J = 6.0 Hz, 3H), 2.41 (s, 3H), 2

.92 (q, J = 6.0 Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 6.91 (bs, 2H, -SONH₂); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 11.4, 14.8, 17.3, 30.2, 109.8, 120.8, 135.1, 136.5, 165.4; MS Calcd.: 245.06; MS Found: 245.05 ([M-1]⁻).

[0193] 合成例7-3. 化合物X2cの合成

合成例7-1と同様にして化合物X2cを合成した。化合物X2cを淡褐色固体として得た (収率13%、HPLC 純度96.0%)。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.16 (t, J = 6.0 Hz, 3H), 2.95 (q, J = 6.0 Hz, 2H), 3.24 (s, 3H), 6.84 (bs, 2H, -SONH₂), 12.8 (bs, 1H, -COOH); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 14.0, 18.1, 31.9, 108.6, 123.1, 128.1, 128.8, 131.3, 131.6, 135.1, 142.2, 166.6.; MS Calcd.: 307.08; MS Found: 307.09 ([M-1]⁻).

[0194] 合成例7-4. 化合物X2dの合成

合成例7-1と同様にして化合物X2dを合成した。化合物X2dを淡黄色固体として得た (収率24%、HPLC 純度99.3%)。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.14 (t, J = 6.0 Hz, 3H), 2.98 (q, J = 5.6 Hz, 2H), 3.27 (s, 3H), 7.10 (bs, 2H, -SONH₂), 7.32 (m, 2H), 7.41 (m, 3H), 12.3 (bs, 1H, -COOH); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 14.5, 31.8, 39.5, 121.3, 128.3, 128.4, 128.5, 131.1, 132.2, 136.7, 136.8, 160.0; MS Calcd.: 307.08; MS Found: 307.03 ([M-1]⁻).

[0195] 合成例7-5. 化合物X4の合成

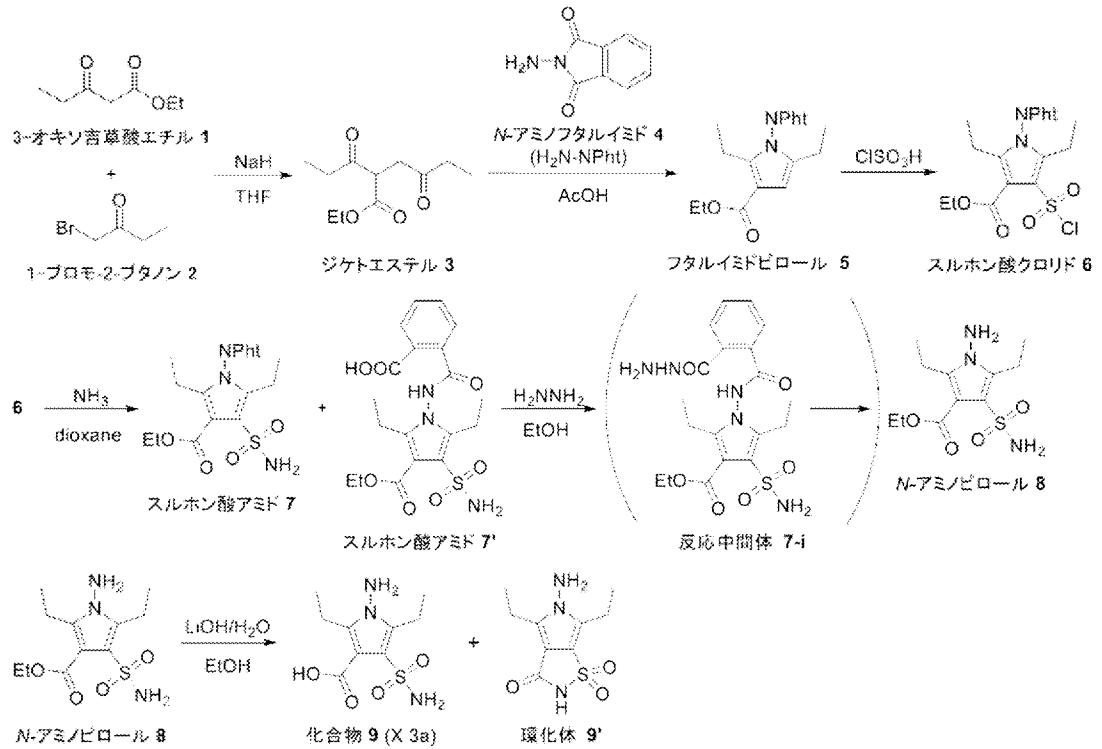
合成例7-1と同様にして化合物X4を合成した。化合物X4を淡黄色固体として得た (収率24%、HPLC 純度87.5%)。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.06 (t, J = 6.0 Hz, 3H), 1.27 (d, J = 6.0 Hz, 6H), 2.83 (q, J = 6.0 Hz, 2H), 2.90 (m, 1H), 3.60 (s, 3H), 4.27 (bs, 1H, -COOH), 6.95 (bs, 2H, -SONH₂); MS Calcd.: 273.09; MS Found: 273.06 ([M-1]⁻).

[0196] 合成例8. 化合物X3aの合成

[0197]

[化32]



[0198] 上記反応式に従って、化合物X3aを合成した。具体的には以下のようにして合成した。

[0199] 3-オキソ吉草酸エチル1と1-ブロモ-2-ブタノン2のカップリングを行い、ジケトエステル3を合成した。即ち、温度計及び攪拌子を備えた30 mL二口ナスフラスコに、窒素雰囲気下で水素化ナトリウム (60% in 流動パラフィン, 13.9 mg, 3.48 mmol, 1.20 eq.) 及びTHF (5.5 mL) を加え、氷冷した。次いで得られた灰色懸濁液に3-オキソ吉草酸エチル1 (418 mg, 2.90 mmol) を滴下した。この時発泡及び発熱を確認 (0.7 °C→12.5 °C)。氷浴にて30分攪拌することで透明溶液となった反応液に、1-ブロモ-2-ブタノン2 (482 mg, 3.48 mmol, 1.10 eq.) のTHF溶液 (2.0 mL) を滴下し、氷浴にて攪拌を続けた。反応液は透明溶液から白濁液となった。滴下2時間後にTLCで分析 (UV、リンモリブデン酸) したところ、3-オキソ吉草酸エチル1の残存と新たなスポットが確認された (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル=9/1、R_f値: 0.3)。反応液を室温まで昇温し、さらに2.5時間攪拌した。同様にTLCで分析したが、3-オキソ吉草酸エチル1は室温昇温前と比べ、スポットの濃さから、反応は進行して

いると思われるが消失は確認されなかった。反応液を氷冷後、飽和塩化アンモニウム水溶液 (20 mL) 及び酢酸エチル (20 mL) を加え反応を停止した (発熱あり: 0.8 °C → 15.7 °C)。2層を分離した後、水層を酢酸エチル (30 mL) で2回抽出し、合わせた有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液 (40 mL) で洗浄し、硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。乾燥剤をろ別後、ろ液を減圧下濃縮したところ黄色油状物質894 mgが得られ、得られた粗生成物を山善製中圧分取液体クロマトグラフ (シリカゲル) にて精製した。溶出液として溶出液として酢酸エチル/ヘキサン0% (3分、グラジエント10分) ⇒10% (27分) を使用した。目的物のフラクションを濃縮し、40 °Cで1時間真空乾燥することで、原料1が22.3 mg (3.6wt%) 混在したジケトエステル3を624 mg、無色透明液体で得た (混合物中のジケトエステル3の重量602 mg、収率97%)。

[0200] N-アミノフタルイミド4を用いてPaal-Knorrピロール合成を行い、フタルイミドピロール5を合成した。即ち、攪拌子とジムロート冷却器を備えた10 mLナスフラスコに、窒素雰囲気下でジケトエステル3 (Lot.5187301, 602 mg, 2.81 mmol) 及びN-アミノフタルイミド4 (455 mg, 2.81 mmol, 1.00 eq.) を加え、さらに酢酸 (3.6 mL) を加えて室温で攪拌した (N-アミノフタルイミド4不溶)。オイルバス温度を130 °C前後に設定し、反応液を還流させた (バス温度80 °C程度でN-アミノフタルイミド4完溶)。1時間後、TLCで分析 (UV、リンモリブデン酸) したところ、ジケトエステル3の残存と新たなスポットが確認された (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル=4/1、Rf値: 0.3)。さらに3時間還流を行った後、同様にTLC分析を行ったが、ジケトエステル3は残存したままだった。N-アミノフタルイミド4 (91.1 mg, 0.56 mmol, 0.2 eq.) を追加し、30分還流した後に、TLC分析を行った結果、ジケトエステル3のスポットが薄くなったことから、さらに還流を18時間行った。反応液をTLCで分析 (UV、リンモリブデン酸) したところ、ごく薄くジケトエステル3の残存が確認されたが、加熱を止めて反応を停止した。酢酸を減圧下留去し、酢酸エチル (40 mL) と蒸留水 (30 mL) を加え、5分間攪拌した。2層を分離した後、水層を酢酸エチル (30 mL) で抽出し、合わせた有機層を飽和炭酸水素ナトリ

ウム水溶液 (40 mL) で洗浄し、pH試験紙にてpH = 9程度に調整した。飽和塩化ナトリウム水溶液 (30 mL) で洗浄した後に、硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。乾燥剤をろ別後、ろ液を減圧下濃縮したところ黄色固体1.01 gが得られ、得られた粗生成物を山善製中圧分取液体クロマトグラフ (シリカゲル) にて精製した。溶出液として酢酸エチル/ヘキサン0% (3分、グラジエント10分) ⇒10% (3分、グラジエント10分) ⇒20% (16分) を使用した。目的物のフラクションを濃縮し、40 °Cで1時間真空乾燥することで、フタルイミドピロール5を596 mg、白色結晶で得た (収率62%) 。

[0201] クロロ硫酸を用いてクロロスルホン化を行い、スルホン酸クロリド6を合成した。即ち、攪拌子を備え、十分に窒素置換した10 mLねじ口試験管に、クロロ硫酸 (1.1 mL, 16.55 mmol, 10.09 eq.) を加えて氷浴で攪拌した (発煙注意)。そこへフタルイミドピロール5 (Lot.5188011, 596 mg, 1.75 mmol) を少しずつ加えた後、密閉して室温まで昇温した (橙色透明溶液)。17時間後、TLCで分析 (UV、リンモリブデン酸) したところ、フタルイミドピロール5の消失と新たなスポットが確認された (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル=4/1、Rf値: 0.2)。また、反応液を少量取り、重クロロホルムで1H NMRを測定してピロール環のプロトンの消失を確認した (褐色溶液)。氷冷した蒸留水 (40 mL) に反応液をゆっくり滴下することで反応を停止した。水層を塩化メチレン (40 mL) で2回抽出した後、合わせた有機層に硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。乾燥剤をろ別後、ろ液を減圧下濃縮したところ淡褐色油状物質が得られ、40 °Cで1時間真空乾燥することで、スルホン酸クロリド6を410 mg、淡褐色アモルファス結晶で得た (収率72%) 。

[0202] 得られたスルホン酸クロリド6をアンモニア/ジオキサン溶液と反応させ、スルホン酸アミド7を合成した。即ち、攪拌子を備えた30 mLナスフラスコに、スルホン酸クロリド6 (Lot.5187201, 369.3 mg, 0.84 mmol) を仕込み、氷浴下で0.5 Mアンモニア/ジオキサン溶液 (7.3 mL, 3.64 mmol, 4.32 eq.) を加えた後、室温で攪拌した。4時間後にTLCで分析 (UV、リンモリブデン酸) したところ、新たに2種のスポットが確認された (展開溶媒: ヘキサン/酢酸

エチル=1/1、Rf値：0.4及び0.02)。アンモニア/ジオキサン溶液を減圧留去し、得られた粗生成物を山善製中圧分取液体クロマトグラフ（シリカゲル）にて精製した。溶出液として溶出液として酢酸エチル/ヘキサン55%（3分、グラジエント10分）⇒76%（3分、グラジエント13分）⇒100%（11分）を使用した。目的物と思われたフラクションは得られず、代わりに主として得られたフラクションを濃縮し、40℃で1時間真空乾燥することで、スルホン酸アミド7が68.0 mg（収率19%）、スルホン酸アミド7'が170 mg（収率46%）双方、白色アモルファス結晶で得られた。

[0203] スルホン酸アミド7及び7'をヒドラジンと反応させ、N-アミノピロール8を合成した。即ち、攪拌子及び冷客管を備えた30 mLナスフラスコに、スルホン酸アミド7及び7'（Lot. 5188232, 合計295 mg, 0.68 mmol（すべて7'として計算））を仕込み、エタノール（2.4 mL）を加え攪拌した。室温下でヒドラジン-水和物（ $d = 1.03$ ）（328 μL , 6.75 mmol, 10.0 eq.）を加えた後、100℃に加熱して攪拌した。1時間後にTLCで分析（UV、リンモリブデン酸）したところ、スルホン酸アミド7及び7'と反応中間体の消失が確認され、2種のスポットが確認された（展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル = 1/1、Rf値：0.5及び0.03）。反応液を減圧留去し、得られた粗生成物を山善製中圧分取液体クロマトグラフ（シリカゲル）で精製した。チャージ時はDMSOを用いて粗生成物を溶解した。溶出液として酢酸エチル/ヘキサン0%（16分、グラジエント13分）⇒55%（7分）を使用した。得られたフラクションを濃縮、40℃で1時間真空乾燥し、N-アミノピロール8のDMSO溶液を得た。さらにインジェクタラムを取り付けた山善製中圧分取液体クロマトグラフ（溶出液として酢酸エチル/ヘキサン50%（3分、グラジエント13分）⇒100%（17分））にDMSO溶液を通し、DMSOを除去することでN-アミノピロール8を128 mg、白色結晶で得た（収率65%）。

[0204] N-アミノピロール8を2 M LiOH/H₂Oと反応させ、化合物9（X 3a）を合成した。即ち、攪拌子を備えた10 mLねじ口試験管に、N-アミノピロール8（Lot. 5189181, 96 mg, 0.33 mmol）を仕込んだ。2 M LiOH/H₂O（717 μL , 1.433 m

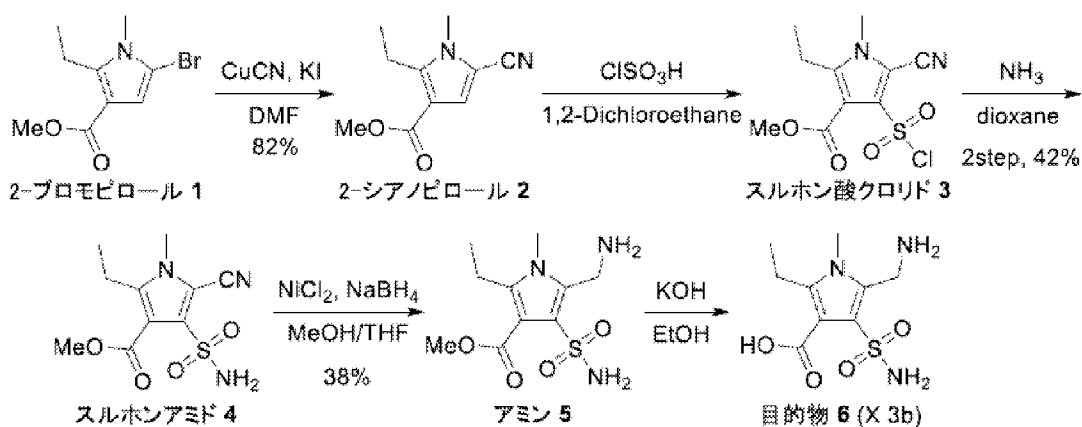
mol, 4.32 eq.) 及びエタノール (143 μ L) を加え、100 $^{\circ}$ Cで攪拌した。1時間後、HPLC分析によりN-アミノピロール8の消失を確認した。反応液を室温まで冷却した後、1 M塩酸によりpH = 4~4.5程度に調製し、白色沈殿を析出させた。反応液を50 mLナスフラスコに移し、減圧下濃縮した (淡黄色固体)。系内にメタノール (1 mL) を加え、超音波処理により、固体を完溶させた。クロロホルム (19 mL) を加えた後に溶液を冷凍庫 (約-10 $^{\circ}$ C) で一晩静置した。析出した固体を吸引ろ過により回収した (10.1 mg)。母液に関しては減圧下濃縮した。合一した粗生成物を、山善製中圧分取液体クロマトグラフ (溶出液としてメタノール/クロロホルム10% (5分、グラジエント5分) \Rightarrow 25% (15分)) に付し、精製を行った。化合物9が溶出したフラクションを合わせ、減圧濃縮及び50 $^{\circ}$ Cで2時間減圧乾燥することにより、化合物9を、淡黄色固体で得た (収率51%)。

1 H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.09 (t, J = 6.0 Hz, 3H), 1.09 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 2.91-2.98 (m, 4H), 5.64 (bs, 2H, -N-NH $_2$), 7.24 (bs, 2H, -SONH $_2$). 13 C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 1.09。

[0205] 合成例9. 化合物X3bの合成

化合物X3bを以下のようにして合成することができる。

[0206] [化33]



[0207] 攪拌子を備えた500 mL 三口ナスフラスコに、2-ブロモピロール1 (3.9 g, 15.85 mmol) 及びDMF (95 mL) を加え、室温下にて攪拌した。そこへ、シアン化銅(I) (7.1 g, 79.24 mmol, 5.0 eq.) 及びヨウ化カリウム (184 mg, 1.

11 mmol, 0.07 eq.) を加え、120 °Cで攪拌した。17時間攪拌した。反応終了後、酢酸エチル (95 mL) で希釈後、蒸留水 (95 mL) を加え、固体をセライトろ過でろ別した。ろ液を分液後に水層を酢酸エチル (100 mL) で抽出した。有機層を合わせ、5%塩化ナトリウム水溶液 (300 mL) で3回洗浄した。有機層に硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。乾燥剤をろ別後、ろ液を減圧下濃縮したところ、褐色油状の粗生成物3.12 g を得た。得られた粗生成物を山善製中圧分取液体クロマトグラフ (シリカゲル) にて精製した。溶出液として溶出液として酢酸エチル/ヘキサン10% (3分、グラジエント10分⇒31%、14分) を使用した。フラクションを濃縮し、2-シアノピロール2 (2.49 g, 82%) で淡黄色固体として得た。

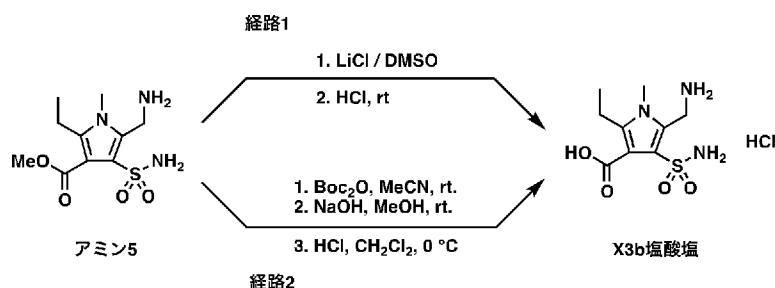
[0208] 攪拌子を備えた300 mL ナスフラスコに、氷浴下、1,2-ジクロロエタン (42 mL)、クロロ硫酸 (7.23 mL, 12.73 mmol, 10.0 eq.) を加え、氷浴下で攪拌した。そこへ、2-シアノピロール2 (2.1 g, 10.93 mmol) の1,2-ジクロロエタン (13 mL) 溶液を滴下し、室温で40分、攪拌した。反応終了後、反応液に氷冷下、五塩化リン (11.38 g, 54.63 mmol, 5.0 eq.) を加え、60 °Cで1時間加熱攪拌した。反応液を室温まで冷却後、氷冷した蒸留水 (200 mL) 中に滴下し、反応を停止した。分液後、水層をジクロロメタン200 mL で抽出し、有機層を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤をろ別後、ろ液を減圧下濃縮したところ、スルホン酸クロリド3の粗生成物 (3.41 g、粗収率107%) を橙色油状物質として得た。

[0209] 攪拌子を備えた300 mL ナスフラスコに、スルホン酸クロリド3の粗生成物 (3.41 g, 11.73 mmol) へ、氷冷下、0.5 M アンモニア/ジオキサン溶液 (101 mL, 50.67 mmol, 4.32 eq.) を加え、室温にて15時間攪拌した。反応終了後、ろ過にて不要物を除去し、スルホンアミド4 (1.32 g, 42%)、灰白色固体で得た。

[0210] 攪拌子を備えた1000 mL ナスフラスコに、スルホンアミド4 (933 mg, 3.442 mmol)、塩化ニッケル(II) (446.0 mg, 0.369 mmol, 1.0 eq.)、メタノール (177 mL) 及びTHF (177 mL) を加え、室温にて攪拌した。そこへ、水素化

ホウ素ナトリウム (390.6 mg, 10.32 mmol, 3.0 eq.) を加え、室温で3攪拌した。30分後、さらに水素化21 ホウ素ナトリウム (390.6 mg, 10.32 mmol, 3.0 eq.) を追加し、室温で攪拌した。1時間後、さらに塩化ニッケル(II) (446.0 mg, 0.369 mmol, 1.0 eq.)、水素化ホウ素ナトリウム (390.6 mg, 10.32 mmol, 3.0 eq.) を加え、室温で5時間攪拌した。蒸留水 (100 mL) を加え、反応を停止した。不溶物を吸引ろ過でろ別した。ろ液を減圧下濃縮し、白色固体の粗生成物を得た。得られた粗生成物を中圧分取液体クロマトグラフ (溶出液: メタノール/ クロロホルム4% (3分、グラジエント10分) ⇒11% (13分) ⇒30% (18分)) で精製しアミン5 (355.6 mg、収率38%) を淡黄色固体として得た。

[0211] [化34]



[0212] アミン5からX3bへの変換は、通常塩基性条件下を用いると遊離のアミノ基とスルホンアミドとの環化反応が優先してしまうことが分かっている。そこで、DMSO中で塩化リチウムとともに加熱し中性条件下でメチルエステルをカルボン酸へと導くKrapcho反応が有用である(経路1)。また、遊離のアミン5にBoc基(t-ブトキシカルボニル基)を導入した後、メチルエステルを加水分解、Boc基を酸性条件下で脱保護することによって得られる(経路2)。いずれも最終的に塩酸塩とすることで、X3bを良好に合成可能である。

[0213] 4. 化合物の解析2

試験例9. 酵素活性測定試験

メタローβ-ラクタマーゼ (IMP-1) (最終濃度 10 nM) を使用し且つ基質としてイミペネム (最終濃度 100 μM) を使用し、阻害剤となる被験物質 (化合物No. 9-7、No. 9-8、No. 9-9) の濃度をそれぞれ変化させ (0 μM、10 μM、10

0 μM)、各ポイントにおける吸光度298 nm、30℃条件下のイミペネム分解活性(Δabs/min)を測定した。被検物質0の場合の活性を100%として、被検物質を添加した場合の活性相対値を算出した。

[0214] 結果を表3に示す。表3中、最左列は、阻害剤である被験物質を示す。

[0215] [表3]

	IMP-1酵素活性(%)		
	阻害剤なし	阻害剤10μM	阻害剤100μM
No9-7	100	100	35
No9-8	100	89	45
No9-9	100	104	37

[0216] 表3に示されるように、化合物No.9-7、No.9-8、及びNo.9-9の添加により、β-ラクタマーゼ活性が阻害されることが分かった。

[0217] 試験例10. 薬剤感受性試験5

阻害剤となる被検物質としてX2a、X2b、X2c、X2d、X3a、及びX4を用いる以外は、試験例1と同様にして行った。阻害剤濃度は10 μg/mLとした。

[0218] 結果を表4に示す。表4中、最左列は、阻害剤である被験物質を示す。

[0219] [表4]

	メロペネム MIC(ug/mL)	メロペネム MIC(ug/mL)	セフトジジム MIC(ug/mL)
	IMP1産生株	NDM-1産生株	VIM-2産生株
阻害剤なし	2	4	16
X2a	0.031	0.0625	1
X2b	0.031	0.0625	1
X2c	0.031	0.5	1
X2d	0.031	0.0625	1
X3a	0.031	0.5	4
X4	0.031	0.5	1

[0220] 表4に示されるように、化合物X2a、X2b、X2c、X2d、X3a、及びX4の添加により、β-ラクタマーゼ産生菌に対する抗菌薬のMICが低下することが分かった。

た。

[0221] 試験例11. 阻害定数(Ki)測定試験2

阻害剤となる被検物質としてX2a、X2b、X2c、X2d、X3a、及びX4を用いる以外は、試験例6と同様にして行った。

[0222] 結果を表5に示す。表5中、最左列は、阻害剤である被検物質を示す。

[0223] [表5]

	酵素学的阻害効果Ki (uM)		
	IMP-1	NDM-1	VIM-2
X2a	1.77	1.83	0.023
X2b	0.98	1.73	0.1
X2c	1.24	1.5	0.019
X2d	0.11	0.08	0.033
X3a	21.4	22.1	1.97
X4	0.9	4.3	0.017

[0224] 表5に示されるように、化合物X2a、X2b、X2c、X2d、X3a、及びX4の添加により、 β -ラクタマーゼ活性が阻害されることが分かった。

[0225] 試験例12. 動物試験（マウス腹腔感染モデル）1

実験用菌株（クラスB β -ラクタマーゼ（IMP-1）をコードするプラスミドが導入された大腸菌株）をマウスに感染させた後、被検物質（化合物A）を投与し、生死を観察した。具体的には以下のようにして行った。

[0226] ミューラーヒントン寒天培地上で1晩発育させた実験用菌株を滅菌綿棒でかきとり、生理食塩水に懸濁し、 $2-5 \times 10^8$ CFU/mLに調整後、10%ムチン溶液と等量混和して（ $1-2.5 \times 10^8$ CFU/mL）、菌液を作製した。入荷後に4日間馴化させたマウス（CrI:CD1(ICR)、雄、4週齢（日本チャールズリバー））の体重を測定後、作製した菌液をマウス1匹あたり250 μ L腹腔投与して感染させた。一方で、抗菌薬（メロペネム3水和物（WAKO 137-15674））及び被検物質を生理食塩水で溶解した。感染1時間後に、1回目の抗菌薬（0.2mg/kg）及び／又は被検物質（100mg/kg）の腹腔投与を行った。感染3時間後にも、1回目と同様に、2回目の投与を行った（ここまでday0）。翌日（day1）より、生死の観察

を毎日、定時に行い、生存率を記録した。

[0227] 結果を図10に示す。化合物Aの投与により、生存率が顕著に向上することが分かった。

[0228] 試験例13. 動物試験（マウス腹腔感染モデル）2

実験用菌株として、クラスB β -ラクタマーゼ（IMP-1）をコードするプラスミドが導入された大腸菌株に加え、NDM及びVIMをコードするプラスミドが導入された細菌（*K. pneumoniae*）を使用し、被検物質として化合物Iを投与した。抗菌薬投与量は0.8mg/kg又は4mg/kg、被検物質投与量は10mg/kgとした。これら以外は、試験例12と同様にして行った。

[0229] 結果を図11及び12に示す。化合物Iの投与により、生存率が顕著に向上することが分かった。

[0230] 試験例14. 動物試験（マウス腹腔感染モデル）3

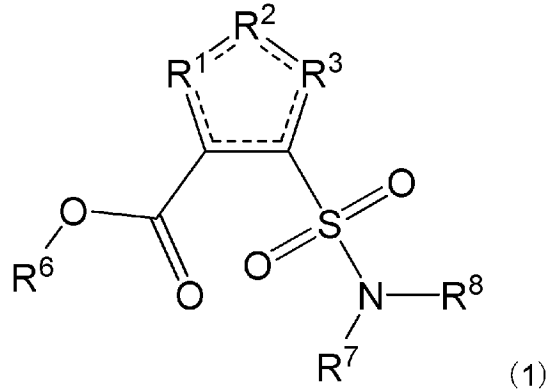
実験用菌株として、NDM及びVIMをコードするプラスミドが導入された細菌（*K. pneumoniae*）を使用し、被検物質として化合物X2dを投与した。抗菌薬投与量は2mg/kg又は8mg/kg、被検物質投与量は10mg/kgとした。これら以外は、試験例12と同様にして行った。

[0231] 結果を図13に示す。化合物X2dの投与により、生存率が顕著に向上することが分かった。

請求の範囲

[請求項1] 一般式 (1) :

[化1]



[式中：R¹は-C(-R^A)-を示す。R²は-N(-R^B)_n-、-O-、又は-C(-R^A)-を示す。R³は、R²が-N(-R^B)_n-又は-O-の場合は-C(-R^A)-を示し、R²が-C(-R^A)-の場合は-S-を示す。R^Aは同一又は異なって、水素原子、ハロゲン原子、又はアミノ基で置換されていてもよい炭化水素基を示す。R^Bは水素原子、ハロゲン原子、置換されていてもよいアミノ基、又はアミノ基で置換されていてもよい炭化水素基を示す。nは、0又は1を示す。R⁶は水素原子又は炭化水素基を示す。R⁷及びR⁸は同一又は異なって、水素原子又は炭化水素基を示し、或いはR⁷及びR⁸は互いに結合して隣接する窒素原子と共に環を形成する。実線と点線の二重線で表される結合は、単結合又は二重結合を示す。]

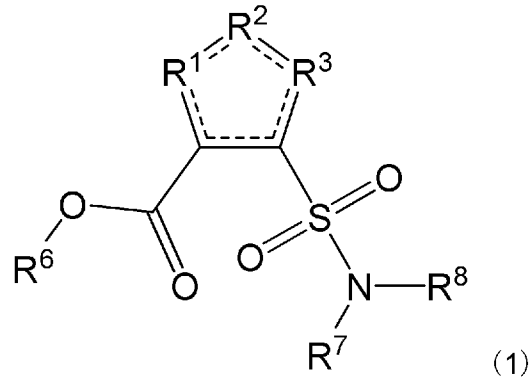
で表される化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物を含有する、β-ラクタマーゼ阻害剤。

[請求項2] 前記β-ラクタマーゼがクラスB β-ラクタマーゼである、請求項1に記載の阻害剤。

[請求項3] 前記β-ラクタマーゼがクラスB1 β-ラクタマーゼである、請求項1又は2に記載の阻害剤。

[請求項4] 一般式 (1) :

[化2]

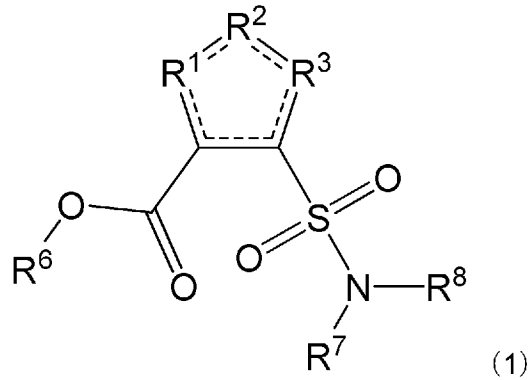


[式中：R¹は-C(-R^A)-を示す。R²は-N(-R^B)_n-、-O-、又は-C(-R^A)-を示す。R³は、R²が-N(-R^B)_n-又は-O-の場合は-C(-R^A)-を示し、R²が-C(-R^A)-の場合は-S-を示す。R^Aは同一又は異なって、水素原子、ハロゲン原子、又はアミノ基で置換されていてもよい炭化水素基を示す。R^Bは水素原子、ハロゲン原子、置換されてもよいアミノ基、又はアミノ基で置換されていてもよい炭化水素基を示す。nは、0又は1を示す。R⁶は水素原子又は炭化水素基を示す。R⁷及びR⁸は同一又は異なって、水素原子又は炭化水素基を示し、或いはR⁷及びR⁸は互いに結合して隣接する窒素原子と共に環を形成する。実線と点線の二重線で表される結合は、単結合又は二重結合を示す。]

で表される化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物を含有する、β-ラクタム系抗菌化合物の抗菌効果の増強剤。

[請求項5] 一般式(1)：

[化3]



[式中：R¹は-C(-R^A)-を示す。R²は-N(-R^B)_n-、-O-、又は-C(-R^A)-を示す。R³は、R²が-N(-R^B)_n-又は-O-の場合は-C(-R^A)-を示し、R²が-C(-R^A)-の場合は-S-を示す。R^Aは同一又は異なって、水素原子、ハロゲン原子、又はアミノ基で置換されていてもよい炭化水素基を示す。R^Bは水素原子、ハロゲン原子、置換されてもよいアミノ基、又はアミノ基で置換されていてもよい炭化水素基を示す。nは、0又は1を示す。R⁶は水素原子又は炭化水素基を示す。R⁷及びR⁸は同一又は異なって、水素原子又は炭化水素基を示し、或いはR⁷及びR⁸は互いに結合して隣接する窒素原子と共に環を形成する。実線と点線の二重線で表される結合は、単結合又は二重結合を示す。]

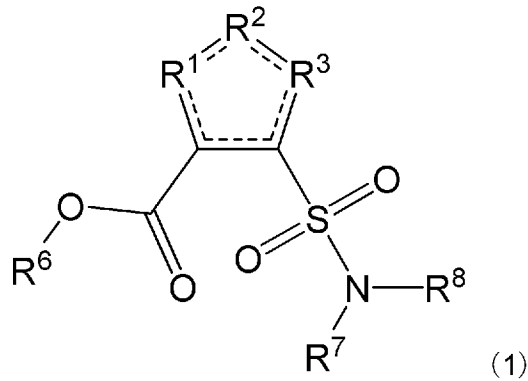
で表される化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物、並びにβ-ラクタム系抗菌化合物を含有する、抗菌剤。

[請求項6]

β-ラクタム系抗菌化合物を含有する、

一般式(1)：

[化4]



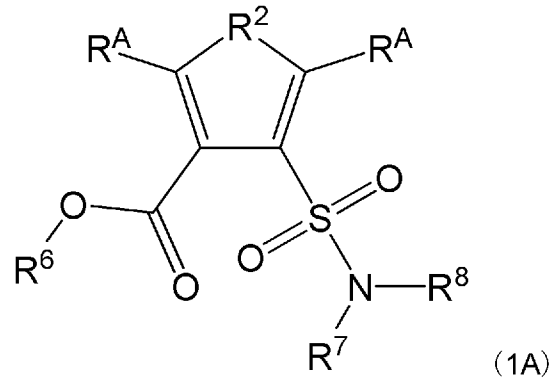
[式中：R¹は-C(-R^A)-を示す。R²は-N(-R^B)_n-、-O-、又は-C(-R^A)-を示す。R³は、R²が-N(-R^B)_n-又は-O-の場合は-C(-R^A)-を示し、R²が-C(-R^A)-の場合は-S-を示す。R^Aは同一又は異なって、水素原子、ハロゲン原子、又はアミノ基で置換されていてもよい炭化水素基を示す。R^Bは水素原子、ハロゲン原子、置換されてもよいアミノ基、又はアミノ基で置換されていてもよい炭化水素基を示す。nは、0又は1を示す。R⁶は水素原子又は炭化水素基を示す。R⁷及びR⁸は同一又は異なって、水素原子又は炭化水素基を示し、或いはR⁷及びR⁸は互いに結合して隣接する窒素原子と共に環を形成する。実線と点線の二重線で表される結合は、単結合又は二重結合を示す。]

で表される化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物と併用投与されるように用いられる抗菌剤。

[請求項7]

一般式 (1A) :

[化5]



[式中：R²は、-N(-R^b)-又は-O-を示す。R^Aは同一又は異なつて、水素原子、アミノ基で置換されていてもよい直鎖状若しくは分岐鎖状アルキル基（但し、R²が-N(-R^b)-の場合は炭素数1~5であり、R²が-O-の場合は炭素数2~5である）、アミノ基で置換されていてもよい炭素数3~7の環状アルキル基、又はアミノ基で置換されていてもよいフェニル基を示す。R^bは水素原子、直鎖状若しくは分岐鎖状アルキル基で置換されてもよいアミノ基、又はアミノ基で置換されていてもよいアルキル基を示す。R⁶は水素原子を示す。R⁷及びR⁸は同一又は異なつて、水素原子又はアルキル基を示し（但し、R⁷及びR⁸の両方がアルキル基である場合を除く）、或いはR⁷及びR⁸は互いに結合して隣接する窒素原子と共に環を形成する。]

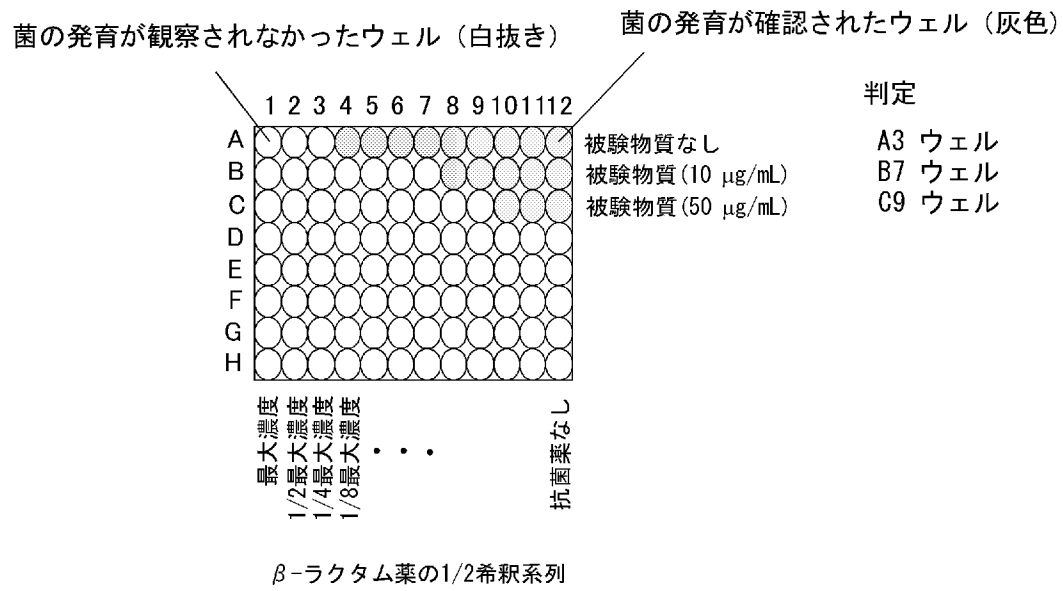
で表される化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

[請求項8] R^bで示されるアルキル基が炭素数1~4の直鎖状アルキル基である、請求項7に記載の化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

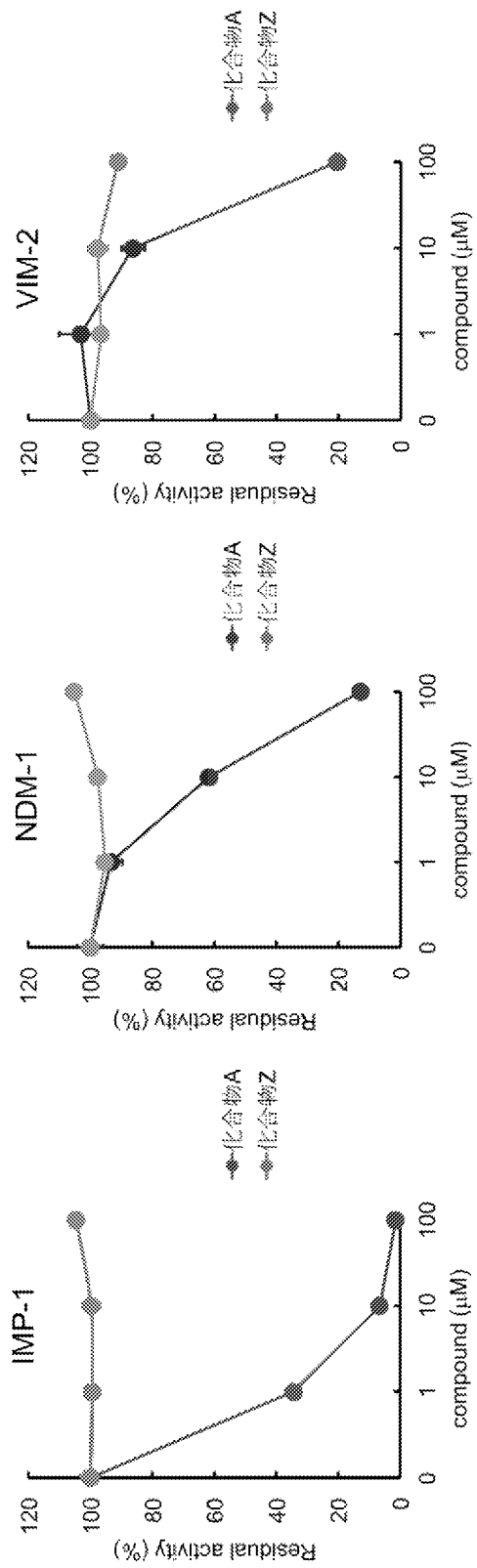
[請求項9] 請求項7又は8に記載の化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物を含有する、医薬。

[請求項10] 請求項7又は8に記載の化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物を含有する、試薬。

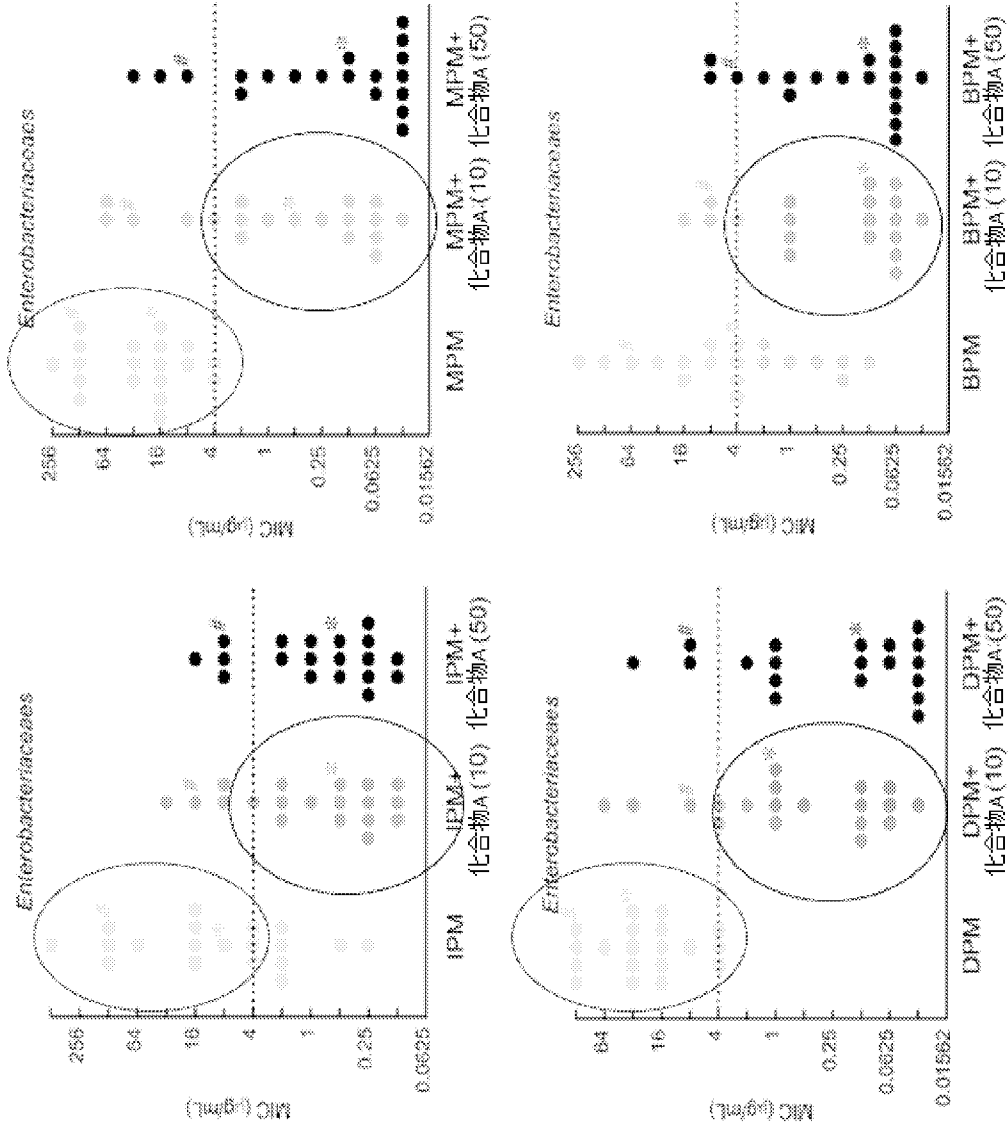
[図1]



[図2]

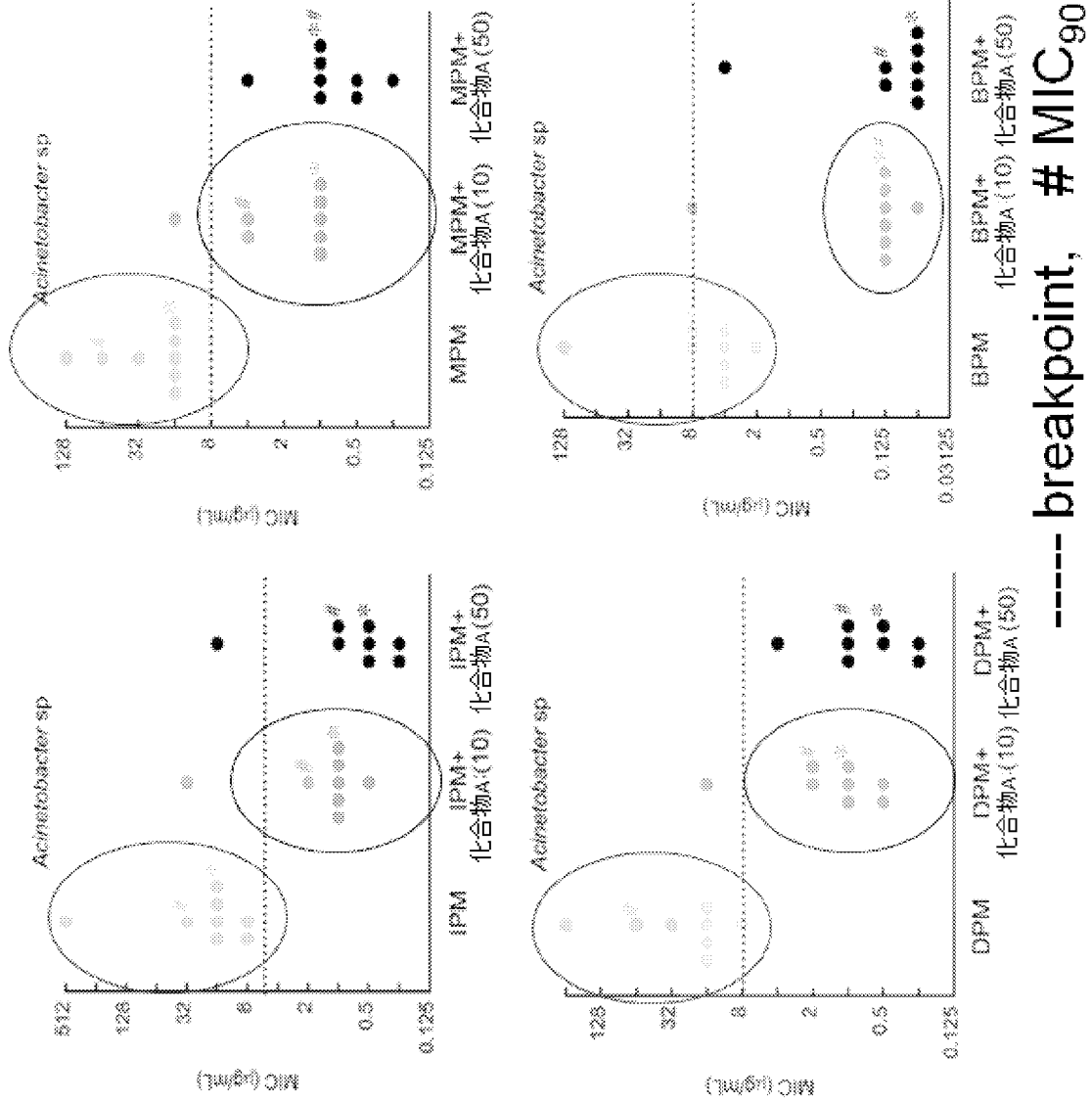


[図3]

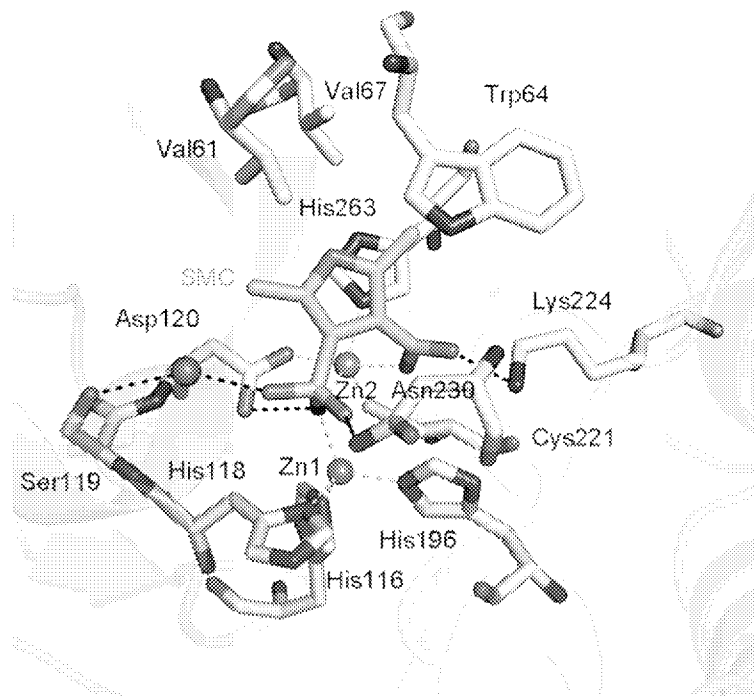


----- breakpoint, # MIC₉₀, * MIC₅₀

[図4]

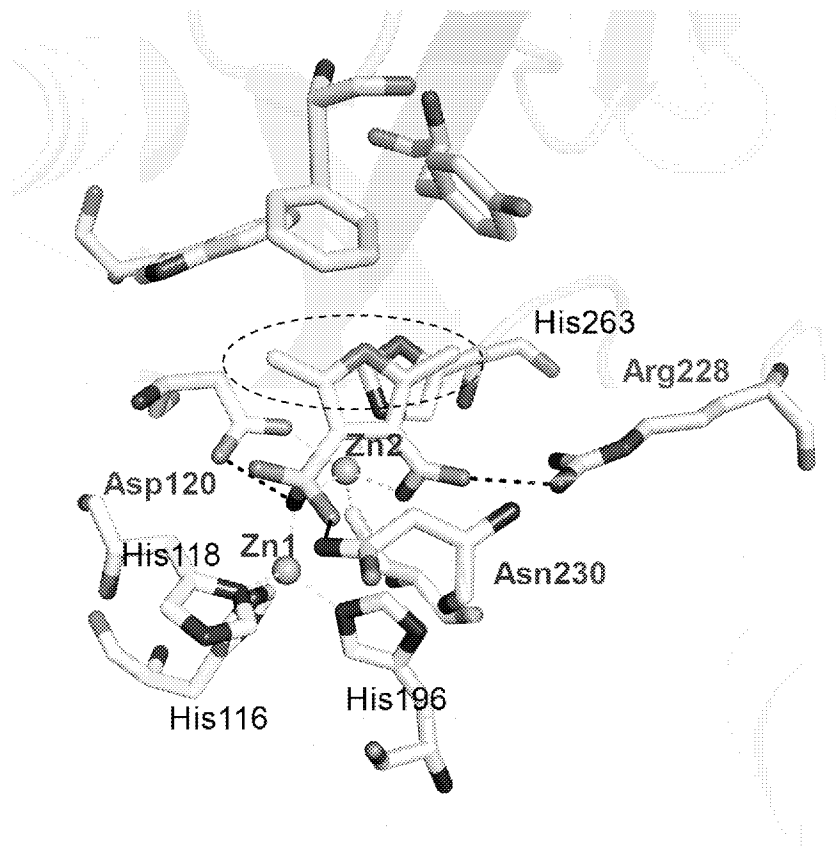


[図5]



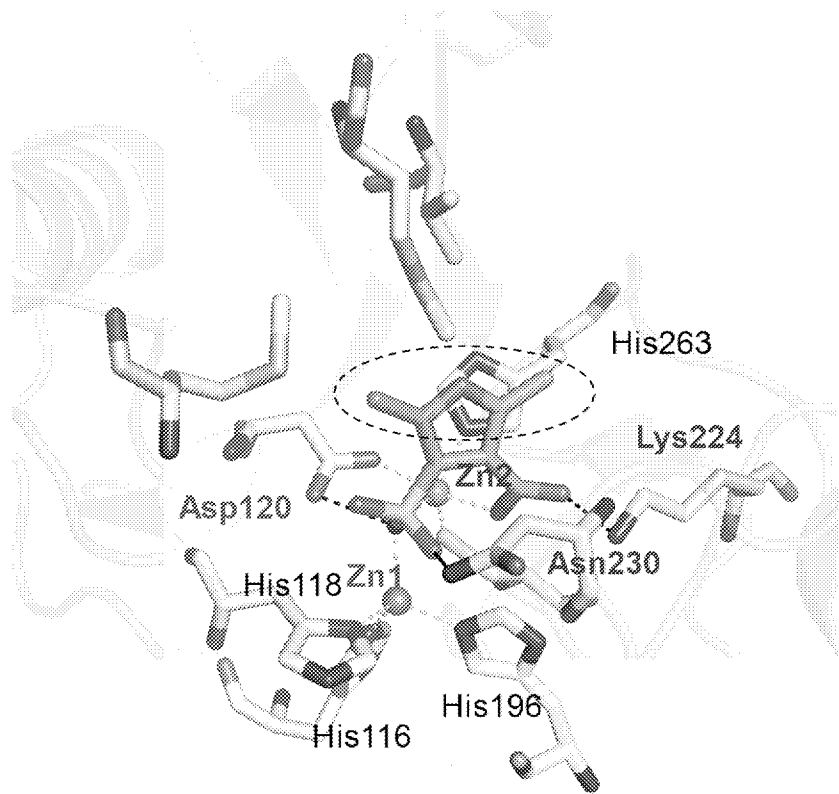
IMP-1-compound A
complexd structure
[1.7 Å resolution]

[図6]



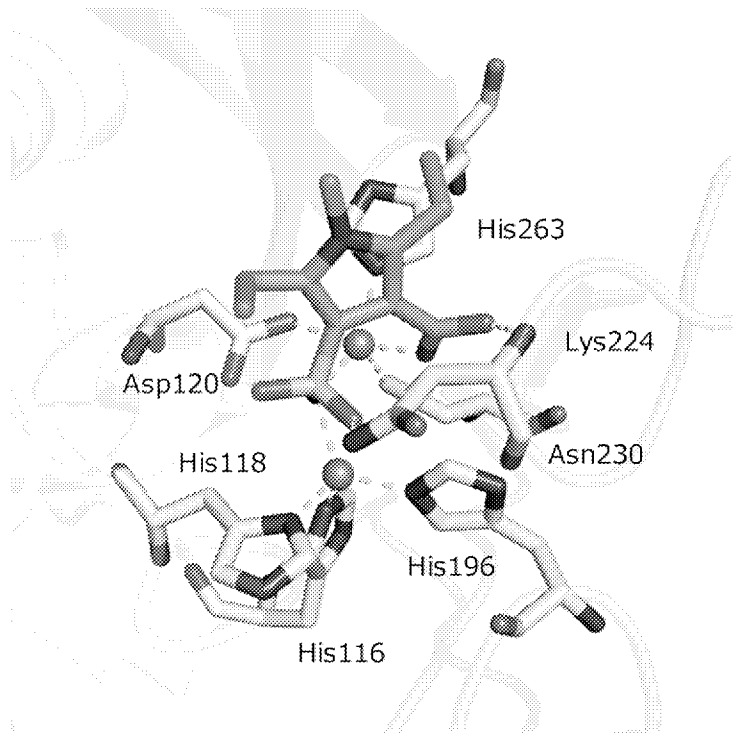
*VIM-2-compound A
complexed structure
[1.5 Å resolution]*

[図7]



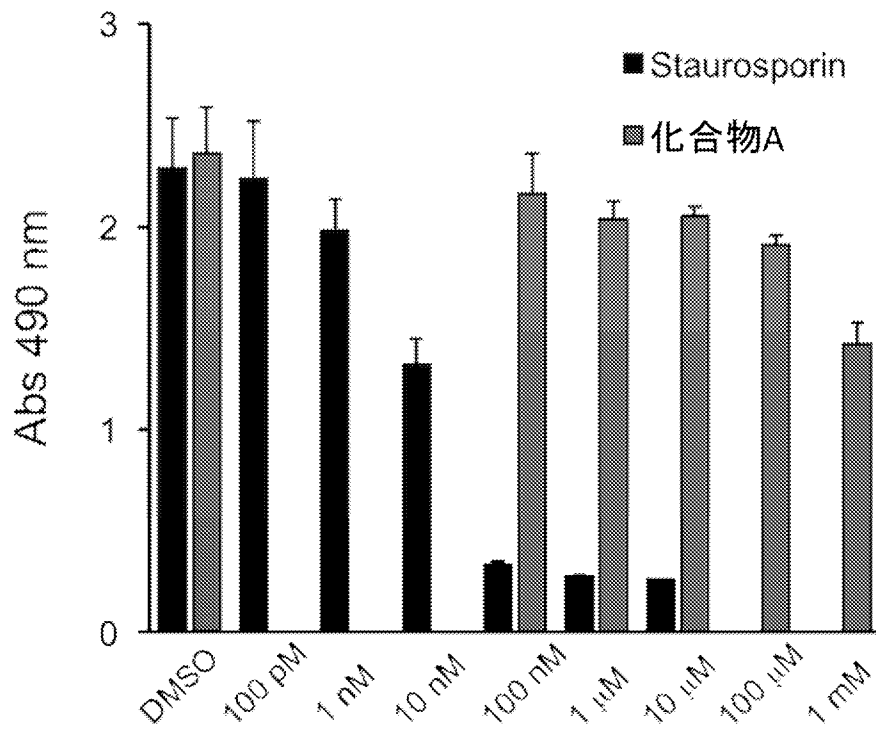
*NDM-1-compound A
complexed structure
[1.4 Å resolution]*

[図8]

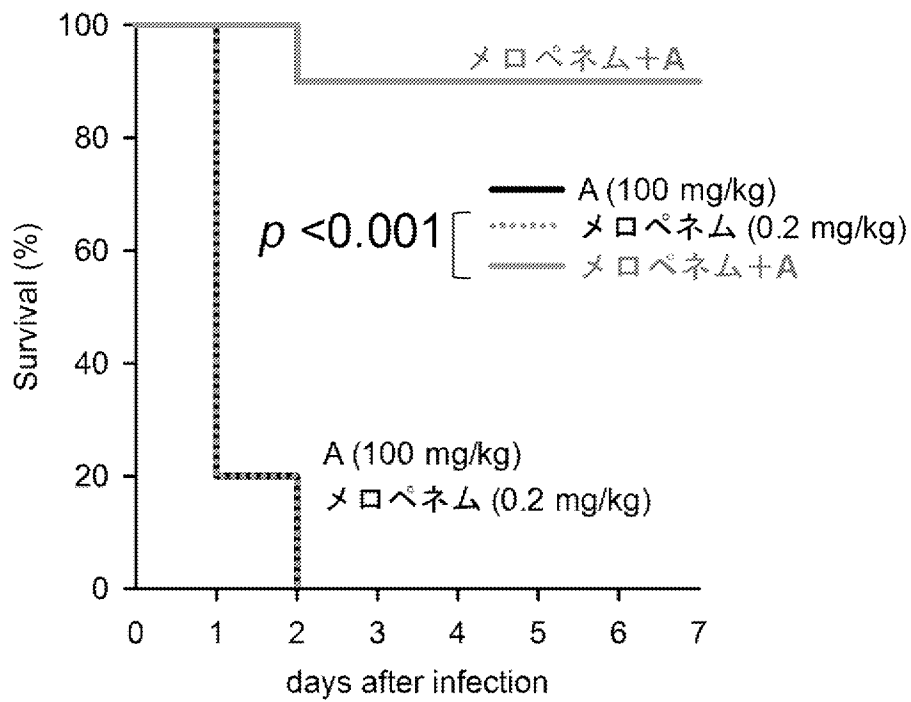


*NDM-1-compound I
complexed structure
[1.8 Å resolution]*

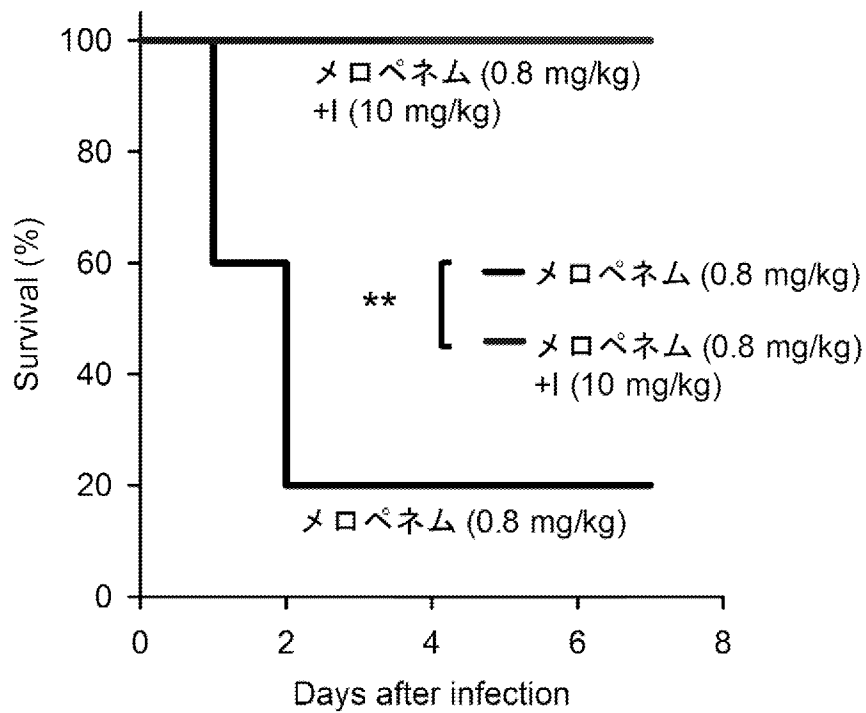
[図9]



[図10]



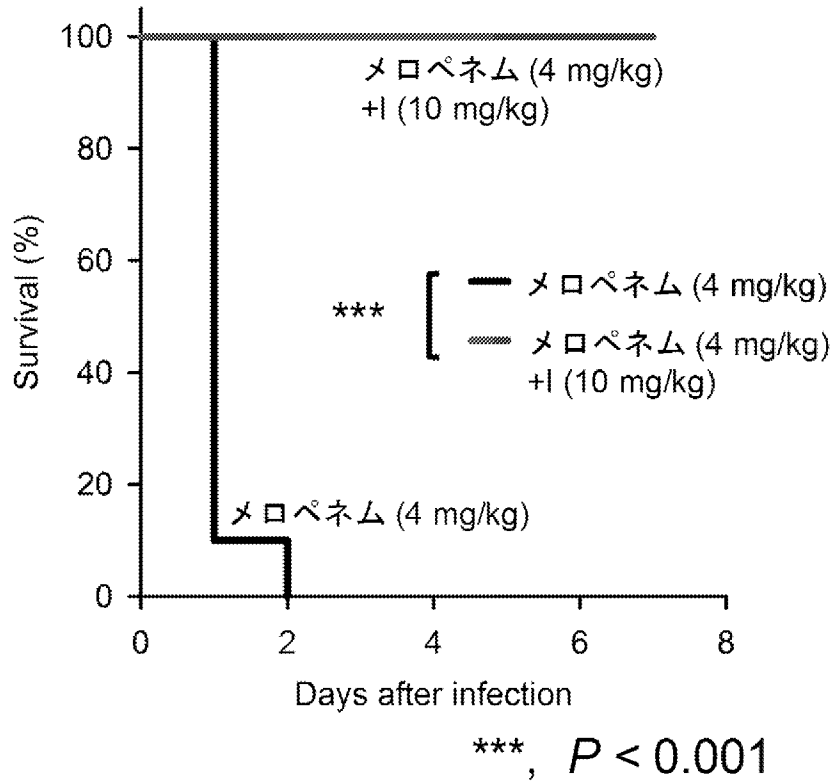
[図11]

IMP産生*E. coli*

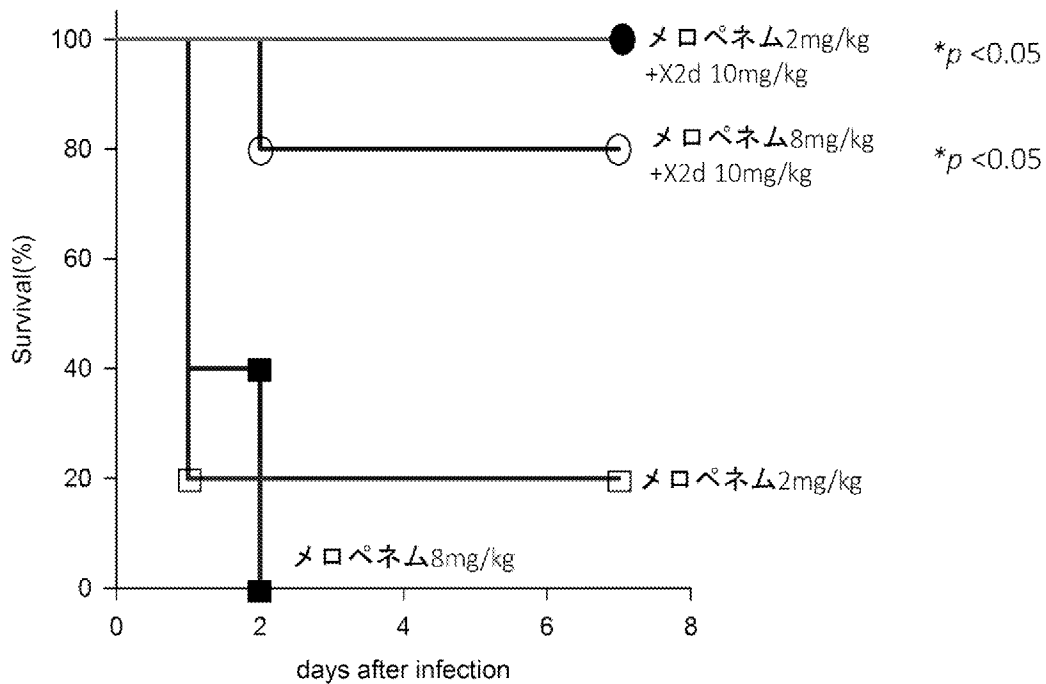
** , $P < 0.01$

[図12]

NDM(+)-VIM(+)
K. pneumoniae



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/019133

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl. A61K31/341(2006.01)i, A61K31/381(2006.01)i, A61K31/40(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07D207/36(2006.01)n, C07D307/68(2006.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. A61K31/341, A61K31/381, A61K31/40, A61K45/00, A61P31/04, A61P43/00, C07D207/36, C07D307/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Published examined utility model applications of Japan	1922-1996	
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019	
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019	
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RACHEL, A. et al., "Structure-Based Discovery of a Novel", Noncovalent Inhibitor of AmpC β -Lactamase, Structure, 2002, vol. 10, pp. 1013-1023, entire text	1-10
A	WO 03/070682 A1 (NORTHWESTERN UNIVERSITY) 28 August 2003, entire text & US 2009/0318711 A1 (entire text)	1-10
A	JP 2016-520658 A (ANTABIO SAS) 14 July 2016, entire text & US 2016/0272601 A1 (entire text) & WO 2014/198849 A1	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 04 June 2019 (04.06.2019)	Date of mailing of the international search report 16 July 2019 (16.07.2019)	
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/019133

<Concerning the subject of the search>

For the β -lactamase inhibitor of the invention in claim 1, a compound represented by general formula (1) encompasses various options, but only a compound according to the aspect in which the 5-membered ring structure containing R1-R3 among the structures of compounds represented by general formula (1) forms an aromatic ring is disclosed within the meaning of PCT Article 5, and thus only a compound according to the aspect in which the 5-membered ring structure containing R1-R3 among the structures of compounds represented by general formula (1) forms an aromatic ring is supported by the description within the meaning of PCT Article 6.

Accordingly, the search in this internal search was carried out for the aspect in which the 5-membered ring structure containing R1-R3 among the structures of compounds represented by general formula (1) forms an aromatic ring.

This also applies to claims 2-6.

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. A61K31/341(2006.01)i, A61K31/381(2006.01)i, A61K31/40(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07D207/36(2006.01)n, C07D307/68(2006.01)n</p>														
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. A61K31/341, A61K31/381, A61K31/40, A61K45/00, A61P31/04, A61P43/00, C07D207/36, C07D307/68</p>														
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2019年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2019年	日本国実用新案登録公報	1996-2019年	日本国登録実用新案公報	1994-2019年				
日本国実用新案公報	1922-1996年													
日本国公開実用新案公報	1971-2019年													
日本国実用新案登録公報	1996-2019年													
日本国登録実用新案公報	1994-2019年													
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY (STN)</p>														
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>RACHEL A. et al., Structure-Based Discovery of a Novel, Noncovalent Inhibitor of AmpC β-Lactamase, Structure, 2002, Vol.10, p.1013-1023, 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 03/070682 A1 (NORTHWESTERN UNIVERSITY) 2003.08.28, 全文 & US 2009/0318711 A1 (全文)</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2016-520658 A (アンタビオ エスアーエス) 2016.07.14, 全文 & US 2016/0272601 A1 (全文) & WO 2014/198849 A1</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	A	RACHEL A. et al., Structure-Based Discovery of a Novel, Noncovalent Inhibitor of AmpC β -Lactamase, Structure, 2002, Vol.10, p.1013-1023, 全文	1-10	A	WO 03/070682 A1 (NORTHWESTERN UNIVERSITY) 2003.08.28, 全文 & US 2009/0318711 A1 (全文)	1-10	A	JP 2016-520658 A (アンタビオ エスアーエス) 2016.07.14, 全文 & US 2016/0272601 A1 (全文) & WO 2014/198849 A1	1-10
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号												
A	RACHEL A. et al., Structure-Based Discovery of a Novel, Noncovalent Inhibitor of AmpC β -Lactamase, Structure, 2002, Vol.10, p.1013-1023, 全文	1-10												
A	WO 03/070682 A1 (NORTHWESTERN UNIVERSITY) 2003.08.28, 全文 & US 2009/0318711 A1 (全文)	1-10												
A	JP 2016-520658 A (アンタビオ エスアーエス) 2016.07.14, 全文 & US 2016/0272601 A1 (全文) & WO 2014/198849 A1	1-10												
<p>☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>														
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table border="0"> <tr> <td>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</td> <td>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの													
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの													
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの													
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献													
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願														
<p>国際調査を完了した日</p> <p>04.06.2019</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>16.07.2019</p>													
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P)</p> <p>郵便番号 100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>磯部 洋一郎</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3452</p>	<table border="1"> <tr> <td>4C</td> <td>4432</td> </tr> </table>	4C	4432										
4C	4432													

〈調査対象について〉

請求項1に係る発明の β -ラクタマーゼ阻害剤について、一般式(1)で示される化合物は種々の選択枝を包含するものであるが、PCT第5条の意味において開示されているのは、一般式(1)で示される化合物の構造中、R1~R3を含む5員環構造が芳香族環を形成する態様に関するものにすぎず、PCT6条の意味において明細書に裏付けられているのは、一般式(1)で示される化合物の構造中、R1~R3を含む5員環構造が芳香族環を形成する態様についてのみである。

よって、本国際調査においては、一般式(1)で示される化合物の構造中、R1~R3を含む5員環構造が芳香族環を形成する態様について調査を行った。

請求項2-6についても同様である。