

薬剂耐性菌感染症治療薬の探索研究

Study on therapeutic agents for  
infection of drug resistant bacteria

研究分野	薬品製造学
紹介教授	横松 力 教授
学位申請者	平岩 由起子

# 目次

緒論	1
第1章 新規アミノグリコシド系抗菌薬の探索	9
第1節 ABK類縁体 <b>1</b> の合成と抗菌活性	13
第1項 ABK類縁体 <b>1</b> の合成	13
第2項 ABK類縁体 <b>1</b> の抗菌活性	14
2-1 グラム陽性菌に対する抗菌活性	15
2-2 グラム陰性菌に対する抗菌活性	16
第2節 ABK類縁体 <b>2</b> の合成と抗菌活性	17
第1項 ABK類縁体 <b>2</b> の合成	17
第2項 ABK類縁体 <b>2</b> の抗菌活性	18
2-1 グラム陽性菌に対する抗菌活性	19
2-2 グラム陰性菌に対する抗菌活性と異物排出ポンプの影響	19
第3節 ABK類縁体 <b>3</b> の合成と抗菌活性	21
第1項 ABK類縁体 <b>3a</b> の合成	21
第2項 ABK類縁体 <b>3b</b> および <b>3c</b> の合成	22
第3項 ABK類縁体 <b>3</b> の抗菌活性	23
第4節 ABK類縁体 <b>3a</b> の高次評価	25
第1項 修飾酵素に対する安定性	25
第2項 臨床分離株に対する感受性分布試験	27
第3項 殺菌作用	28
小括	30
第2章 メタロβ-ラクタマーゼ阻害剤の探索	32
第1節 リード化合物の探索	32
第2節 リード化合物の構造展開	35
第3節 3位置換フタル酸誘導体の構造活性相関	36
第1項 3C-フタル酸誘導体の活性評価	36
第2項 3O-フタル酸誘導体の活性評価	40

第3項	3N-フタル酸誘導体の活性評価	43
3-1	非環状アミン構造を有する3N-フタル酸誘導体の評価	44
3-2	環状アミン構造を有する3N-フタル酸誘導体の評価	45
第4節	フタル酸誘導体の合成	49
第1項	4位置換フタル酸誘導体の合成	49
第2項	3C-フタル酸誘導体の合成	49
第3項	3O-フタル酸誘導体の合成	51
第4項	3N-フタル酸誘導体の合成	51
第5節	3N-フタル酸誘導体 <b>45e</b> の構造最適化と高次評価	54
第1項	IMP-1 と <b>45e</b> の複合体 X線結晶構造解析	54
第2項	3,6-ジ置換フタル酸誘導体の合成	55
第3項	3,6-ジ置換フタル酸誘導体の活性評価	57
第4項	IMP-1 産生緑膿菌（臨床分離株）に対する効果	58
小括		61
結論		62
実験の部		63
引用文献		105
謝辞		

## 略語表

AAC	aminoglycoside <i>N</i> -acetyltransferase
AAD	aminoglycoside <i>O</i> -adenyltransferase
ABK	Arbekacin
Ac	acetyl
AHB	( <i>s</i> )-amino hydroxyl butyryl
AMK	Amikacin
APH	aminoglycoside <i>O</i> -phosphotransferase
BC-Plate	breakpoint checkerboard Plate
BIPM	Biapenem
Bn	benzyl
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
BOP	Benzotriazol-1-yloxy)-tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate B
Bz	benzoyl
CA-MRSA	community-acquired MRSA
CAZ	Ceftazidime
DKB	Dibekacin
DMAP	<i>N,N</i> -dimethyl-4-aminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
GM	Gentamicin
HA-MRSA	hospital-acquired MRSA
HTS	high throughput screening
IPA	isopropylalcohol
KM	Kanamycin
KM-B	Kanamycin B
MBL	metallo $\beta$ -lactamase
MDRP	multi-drug resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
MEPM	Meropenem
MRCNS	methicillin resistant coagulase negative staphylococci
MRSA	methicillin resistant staphylococcus aureus
MsCl	methanesulfonyl chloride
PBP	penicillin binding protein
PMZ	<i>p</i> -methoxybenzyloxycarbonyl
Tf	trifluoromethanesulfonyl
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
TOB	Tobramycin
Tr	triphenylmethyl

## 緒論

肺炎、結核、胃腸感染など、病原菌が体内に侵入することで起こる感染症は、古来より多くのヒトが命を落とす原因となり、感染症による死亡率は高かった。しかし、1940年代に、ペニシリンが発見されて以来、多くの抗菌薬が開発され、感染症の治療に使用されるようになると、感染症による死亡率は低下した<sup>1</sup>。それに伴い、平均寿命も延長し、現在、日本は世界でも有数の長寿国となった<sup>2</sup>。一方、高齢化社会に伴い、高齢者の肺炎が増加し、2011年には肺炎は死亡原因の第3位となっている<sup>3</sup>。高齢化社会が進行するに伴い、今後益々、感染症治療は医療現場で重要性が増すと考えられる。しかし、既存の抗菌薬に対して耐性を獲得している薬剤耐性菌が報告されており、今後、薬剤耐性菌に対して有効な薬剤が必要と考えられる<sup>4</sup>。著者は、薬剤耐性菌の中でも、医療現場で最も検出頻度が高い、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（Methicillin resistant staphylococcus aureus; MRSA）<sup>5,6</sup>、および治療が困難なことが多い多剤耐性緑膿菌（multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*; MDRP）を含む薬剤耐性緑膿菌<sup>7</sup>に着目して、これらの薬剤耐性菌による感染症の治療に有効な薬剤の探索研究に取り組んだ。以下にMRSAおよびMDRPを含む耐性緑膿菌感染症の現状を述べる。

### 黄色ブドウ球菌感染症の現状と治療薬

黄色ブドウ球菌は、グラム陽性球菌であり、ヒトの皮膚などに存在する細菌である。通常は、無害であるが、免疫力の低下した患者では、肺炎、敗血症、髄膜炎などの感染症の原因菌となり、重症化する場合も多い<sup>8</sup>。1940年代に見出されたペニシリン G は、黄色ブドウ球菌に良好な抗菌活性を示すことから、感染症の治療に使用されてきた。その後、ペニシリナーゼを産生する耐性菌が検出され、ペニシリナーゼに安定なメチシリンやオキサシリンが開発された<sup>1</sup>。しかし、1980年代より医療機関でメチシリンに耐性を示す MRSA が検出され、問題となった<sup>5</sup>。MRSA は *mecA* 遺伝子を有しており、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の親和性が低いペニシリン結合タンパク質 PBP2'（PBP2a）を獲得している。このことから MRSA は  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬に耐性を示す<sup>9</sup>。MRSA は、施設により検出率が異なり、黄色ブドウ球菌の 50~70%が MRSA であった施設もあり、院内感染対策を含めて注意が必要な耐性菌である<sup>6</sup>。MRSA は、院内感染等で問題となった院内感染型(HA-MRSA)に加え、市中感染型（CA-MRSA）が出現しており、近年、市中感染型は増加傾向にあると言われている<sup>5</sup>。抗 MRSA 薬は、日本国内では現在 5 薬剤が使用されているが、グラム陽性菌にのみに有効な薬剤が多い<sup>10</sup>。しかし、MRSA とともにグラム陰性菌が検出される例も多く<sup>11</sup>、グラム陽性菌と陰性菌に有効な薬剤は感染症治療において有用と考えられ、そのような特性を有する抗菌薬の開発が望まれる。

### 緑膿菌感染症の現状と MDRP

緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）は、1880年代に、包帯に付着した緑色の膿から

分離されたブドウ糖非発酵性グラム陰性桿菌であり、その和名は、緑色の色素ピオシアニンを産生することに由来する。本菌は、低栄養の環境下でも生存可能であり、土壌中、水中、風呂場、水道などの環境中ばかりか動物体内や植物組織中に広く生息している。本菌は、日和見感染の起因菌の一つであり、健常人に感染することは稀であるが、免疫力の低下した患者では、慢性気道感染症、尿路感染症、敗血症など重篤な感染症を引き起こす。また、血管留置カテーテルや尿路カテーテルなどを介した院内感染症の原因菌となることが明らかとなっており、臨床上注意が必要な細菌である<sup>12</sup>。

緑膿菌の外膜は、抗菌薬を透過しにくい構造をしており、緑膿菌は種々の抗菌薬に対して自然耐性を有している。一方、1980年代に抗緑膿菌作用の強いカルバペネム系抗菌薬、アミノグリコシド系抗菌薬、およびニューキノロン系抗菌薬などが開発され、臨床上使用されている。しかし、これらの薬剤に耐性を獲得したMDRPが出現し、臨床上の重要な問題となっている<sup>13</sup>。

MDRPによる感染症は、感染症法において、「薬剤耐性緑膿菌感染症」として第5類感染症に分類され、定点把握疾患に定められており、その動向に注意が必要な感染症の一つである。定点把握は、カルバペネム系抗菌薬のイミペネム、アミノグリコシド系抗菌薬のアミカシン、ニューキノロン系抗菌薬のシプロフロキサシンすべてに耐性を示す場合に行なわれる。この法律に基づき、約50件程度のMDRPによる感染症報告が定点施設より毎月報告されており、国内で分離される緑膿菌の約3%がMDRPであると考えられている<sup>14</sup>。

## 緑膿菌の耐性メカニズムと臨床分離緑膿菌株の薬剤感受性

薬剤耐性緑膿菌に対する治療薬を開発するうえで、緑膿菌の耐性化メカニズムと臨床分離緑膿菌株の既存薬剤に対する薬剤感受性を把握することは、極めて重要となる。カルバペネム系抗菌薬、アミノグリコシド系抗菌薬およびニューキノロン系抗菌薬に対する緑膿菌の耐性化メカニズムは多岐にわたっている<sup>15</sup>。それぞれの抗菌薬に対する耐性化メカニズムを**Table 1**に示す。緑膿菌の耐性化メカニズムは、概ね ①分解酵素あるいは修飾酵素の産生による薬剤の不活化、②抗菌薬の流入阻害・排出亢進に伴う薬剤蓄積量の減少、③細菌の変異に伴う抗菌薬の作用部位変化に分類される。

薬剤耐性緑膿菌は、菌株ごとに獲得した耐性化メカニズムが異なっており、各薬剤に対する感受性も異なることが知られている。厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)の検査部門の集計(2013年)によると、緑膿菌約10万株に対する主要抗菌薬の薬剤感受性は以下のとおりである。すなわち、カルバペネム系抗菌薬の感受性菌の割合は、イミペネム(IPM)では78.3%、メロペネム(MEPM)では84.0%である。また、ニューキノロン系抗菌薬の感受性菌の割合は、レボフロキサシン(LVFX)で78.0%である。一方、アミノグリコシド系抗菌薬の感受性菌の割合は、ゲンタマイシン(GM)で84.0%、アミカシン(AMK)で94.8%である。これらのデータは、同じ系統の薬剤間でも耐性化状況が異なることを示しているが、アミノグリコシド系抗菌

薬は、他の系統の抗菌薬よりも感受性菌の割合が比較的高く、耐性化が進んでいないことをうかがわせる。

**Table 1.** Resistance mechanisms of *P. aeruginosa* against antimicrobial agents

薬剤系統	薬剤耐性メカニズム	
カルバペネム系薬	薬剤の不活化	メタロβ-ラクタマーゼ産生
		AmpCβ-ラクタマーゼ過剰産生
		OXA型β-ラクタマーゼ産生
	薬剤蓄積量減少	OprD減少
		排出システム亢進
アミノグリコシド系薬	薬剤の不活化	修飾酵素産生
	薬剤蓄積量減少	排出システム亢進
	作用部位の変異	16S rRNAメチルトランスフェラーゼ
キノロン系薬	作用部位の変異	DNAジャイレースの変異 トポイソメラーゼIV変異
	薬剤蓄積量減少	排出システム亢進

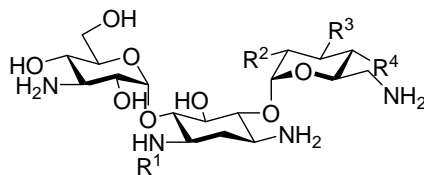
## MDRPを含む薬剤耐性緑膿菌感染症に対する治療の現状

薬剤耐性緑膿菌の各抗菌薬に対する耐性化率は、各々の菌株が獲得している耐性メカニズムにより異なる。そのため、現状ではMDRP感染症の治療には、単剤による治療は必ずしも効果的でなく、複数の抗菌薬の併用に頼らなければならない状況である。すなわち、Breakpoint Checkerboard Plate(BC-Plate)<sup>16</sup>などを用いて、有効な抗菌薬の組み合わせが選択されている。しかしながら、予想通り治療効果が上がらないこともあり、臨床上的の問題となっている。このような状況下、緑膿菌およびMDRPに対し有効な薬剤の開発は臨床現場での治療の選択の幅を広げ、医療に貢献することが期待できる。著者はこのような臨床現場での問題点を踏まえ、緑膿菌およびMDRPに有効な薬剤の探索を2つのアプローチにより取り組んだ。1つは、化学修飾に基づくアミノグリコシド系抗菌薬の抗菌力向上を目指した探索研究、もう1つは、溶解性、菌体内への透過性等に優れた物理化学的特性を有するメタロβ-ラクタマーゼ阻害薬の探索研究である。本論文はこの2つのアプローチを二章に分けて詳述する。以下に第1章、第2章の研究の背景と概要を述べる。

## 化学修飾に基づくアミノグリコシド系抗菌薬の抗菌力向上を目指した研究

アミノグリコシド系抗菌薬は、真正細菌のリボソームを構成している30Sサブユニット(16S rRNAのA-サイト)に結合し、そのタンパク質合成を阻害することで殺菌的な抗菌作用を示すことが知られている<sup>17,18</sup>。アミノグリコシド系抗菌薬はグラム陽性菌、グラム陰性菌、結核菌に対し有効に作用することから、臨床で広く使用されている。現在日本国内で使用できるアミノグリコシド系抗菌薬は11種類あるが、その中

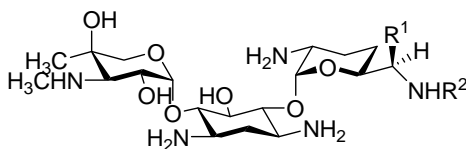
で緑膿菌による感染症を適応症としている薬剤は、カナマイシン (KM) 誘導体、ゲンタマイシン (GM) 類、イセパマイシン (ISP) の 6 種類である。これらのアミノグリコシド系抗菌薬の化学構造式を **Fig. 1** に示す。



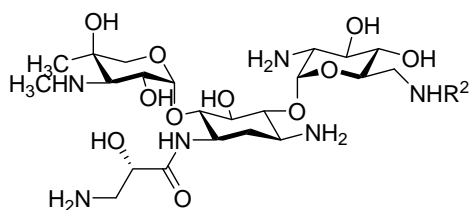
カナマイシン(KM)誘導体

抗菌薬	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
カナマイシン (KM)	H	OH	OH	OH
アミカマイシン (AMK)	AHB*	OH	OH	OH
ドブラマイシン (TOB)	H	NH <sub>2</sub>	H	OH
ジベカシン (DKB)	AHB*	NH <sub>2</sub>	H	H

\*4-amino-2-hydroxybutyryl



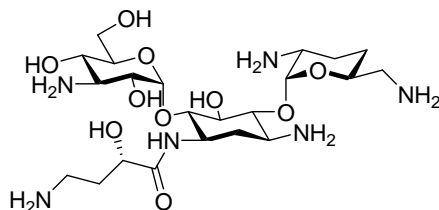
ゲンタマイシン(GM) 混合物 (R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub> or H, R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub> or H)



イセパマイシン (ISP)

**Fig. 1.** Structures of aminoglycoside antibiotic used for *P. aeruginosa*

上記の抗菌薬以外に、緑膿菌感染症に適応症は有さないが、抗緑膿菌活性を有するアミノグリコシド系抗菌薬としてアルベカシン(ABK)がある (**Fig. 2**)。



**Fig. 2.** Structure of Arbekacin (ABK)



ABK は、アミノグリコシド系抗菌薬の中で唯一、MRSA による感染症を適応症としており、抗 MRSA 薬として临床上使用されている薬剤である<sup>19</sup>。MRSA はアミノグリコシド系抗菌薬に対し一般に耐性を示すが、これは MRSA の産生するアミノグリコシド修飾酵素により、アミノグリコシドのヒドロキシ基やアミノ基がアセチル化、リン酸化などを受けるためである<sup>20</sup>。アミノグリコシド修飾酵素としてはアミノグリコシドアセチル基転移酵素 (AAC)、アミノグリコシドアデニル基転移酵素 (AAD)、アミノグリコシドリソ酸基転移酵素 (APH) などが知られている<sup>1</sup>。また MRSA は2つの酵素機能を併せ持つ二機能性酵素 (bifunctional enzyme) AAC(6')-APH(2'')を産生することも知られている<sup>21</sup>。KM に対するアミノグリコシド修飾酵素による修飾部位を Fig. 3 に示す。

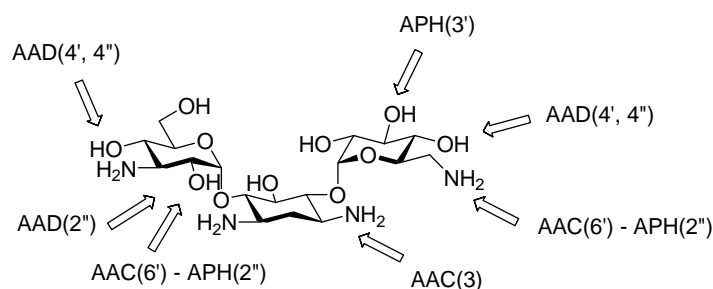


Fig. 3. Modification of KM by aminoglycoside modifying enzyme

ABK はこれらの修飾酵素による構造変化をうけにくく、そのため抗 MRSA 薬として临床上使用されている<sup>22</sup>。また、臨床の現場では MRSA と緑膿菌が同時に分離される場合も多く<sup>11</sup>、これらの細菌に共通して効果のある薬剤の開発が求められている。しかし、临床上使用されている抗 MRSA 薬 5 剤の中で緑膿菌 (グラム陰性菌) にも有効な薬剤は ABK だけである (Table 2)。

Table 2. List of anti MRSA antibiotics used in Japan

一般名	略号	作用機序	抗 G (-) 菌
アルベカシン硫酸塩	ABK	タンパク質合成阻害	○
バンコマイシン塩酸塩	VCM	細胞壁合成阻害	×
テイコプラニン	TEIC	細胞壁合成阻害	×
リネゾリド	LZD	タンパク質合成阻害	×
ダプトマイシン	DAP	細胞膜脱分極作用、DNA,RNA、タンパク質合成阻害	×

ABK が MRSA および緑膿菌に対して治療効果を発揮できるのは、1) ABK の修飾酵素に対する安定性に加えて、2) ABK が高い細胞壁透過性と異物排出ポンプの影響を受けにくい構造を有しているためであると推定した。そこで、著者は ABK の化学

<sup>1</sup>アミノグリコシド修飾酵素 (略号) のカッコ内に付記した数字は、修飾される官能基の位置を示す。

修飾を基盤とし、MRSA と薬剤耐性緑膿菌に対する抗菌活性の更なる向上を目指して、新規アミノグリコシド系抗菌薬の探索研究を実施した。第 1 章では、ABK の化学修飾体のデザインおよびその合成と抗菌活性について 4 節に亘って詳述する。

## メタロ $\beta$ -ラクタマーゼ阻害薬の探索研究

緑膿菌の治療においては、前述したようにアミノグリコシド系抗菌薬のほかに、カルバペネム系抗菌薬も使用される。緑膿菌の薬剤耐性メカニズムにおいて、カルバペネム系抗菌薬は主に  $\beta$ -ラクタマーゼによる  $\beta$ -ラクタム環の加水分解により不活化される。 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤とカルバペネム系抗菌薬との併用療法は、カルバペネム系抗菌薬の分解を阻害し、カルバペネム系抗菌薬の抗菌活性の保持に貢献できると考えられる。第 2 章では、薬剤の不活化に関与する  $\beta$ -ラクタマーゼ、その中でもメタロ  $\beta$ -ラクタマーゼ (MBL) に着目した新規阻害剤の開発経緯を詳述する。以下に、MBL の概要と阻害剤開発の現状を述べる。

## メタロ $\beta$ -ラクタマーゼ (MBL)

$\beta$ -ラクタマーゼは分子量 20~30kDa の加水分解酵素である。 $\beta$ -ラクタマーゼは、構成するアミノ酸の一次配列の相同性により、クラス A~D に分類される<sup>23</sup>。クラス A および C は、それぞれ、ペニシリン系抗生物質およびセファロsporin系抗生物質の加水分解反応を主に触媒する。クラス D はオキサシリンペニシリナーゼに相当し、オキサシリンの分解反応を触媒する。これらの酵素は、いずれも活性中心にセリン残基を有するセリン  $\beta$ -ラクタマーゼである。

一方、クラス B に分類される  $\beta$ -ラクタマーゼは、活性中心に亜鉛 (Zn) を有するためメタロ  $\beta$ -ラクタマーゼ (MBL) と呼ばれている。MBL は、活性中心の Zn に結合した不安定な水分子により、 $\beta$ -ラクタム環を加水分解する (Fig. 4)。MBL はほぼ全ての  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬を分解する強力な  $\beta$ -ラクタマーゼである。カルバペネム系抗菌薬に対する MBL による耐性化は、高度化を示す傾向があり、臨床上問題となる耐性メカニズムの一つである。

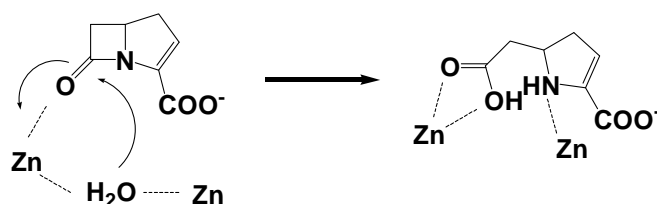


Fig. 4. Hydrolysis of  $\beta$ -lactam ring catalyzed by MBL

MBL は遺伝子的にいくつかの型が知られており、国や地域により分離状況が異なる傾向がみられる。日本国内では、MBL の中でも IMP-1 型が多いが、欧米では VIM-2 型が多い<sup>24</sup>。また MBL の遺伝子は、伝達性のプラスミド上にコードされているため、

プラスミドを介して菌種を超えて伝達される。この事は、院内感染等の耐性菌拡散の観点で憂慮すべき特性の1つである<sup>25</sup>。

現在、臨床上β-ラクタム系抗菌薬との併用で使用されているβ-ラクタマーゼ阻害剤として、クラバン酸、スルバクタムなどの薬剤がある<sup>26,27</sup>。これらのβ-ラクタマーゼ阻害剤は、セリンβ-ラクタマーゼに対して有効であるが、MBL に対しては無効である。MBL 阻害剤は、カルバペネム系抗菌薬との併用により、MBL 産生緑膿菌などに対して、その感受性を維持することが可能となり、緑膿菌および MDRP 感染症の治療に大きく貢献できると考えられる。

### メタロβ-ラクタマーゼ阻害剤研究の現状

これまでに、いくつかの化合物が MBL 阻害剤として報告されている<sup>28-32</sup> (Fig. 5)。これらの MBL 阻害剤は、酵素阻害活性 (IC<sub>50</sub>) が約 0.003~2 μM と強いものであったが、現在臨床で使用されていない。また、MBL 阻害剤共存下での MBL 産生緑膿菌に対するβ-ラクタム系抗菌薬の抗菌活性についての報告はほとんどない。

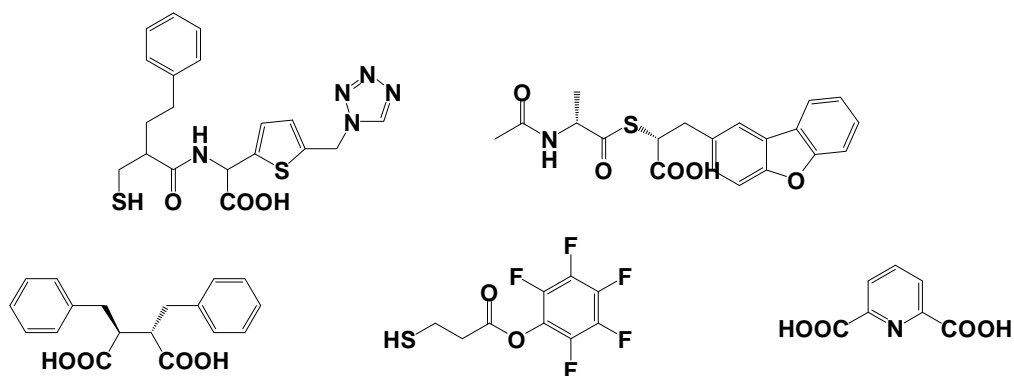
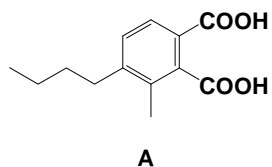


Fig. 5. Structures of MBL inhibitors

この理由として著者は、1) グラム陽性菌と比べると、緑膿菌は薬剤の菌体内への透過性が低いこと、2) 抗菌薬を排出する異物排出システムが存在することから、菌体内への薬剤の蓄積量が低いことが一因ではないかと推定した。すなわち、MBL 産生の緑膿菌株に対し、β-ラクタム系抗菌薬と共に使用することでβ-ラクタム系抗菌薬の抗菌活性を保持することができる MBL 阻害剤を見出すためには、MBL 阻害活性の高い誘導体を探索するだけでなく、同時に菌体内への透過性が高く、排出されにくい誘導体を見出すことが必要であると考えられる。

そこで著者は、社内化合物ライブラリー (91496 サンプル) について、IMP-1 阻害活性を指標としたハイスループットスクリーニング (HTS) を行い、ヒット化合物 230 化合物を見出した。更に、2 次、3 次スクリーニングにおいて、IMP-1 産生大腸菌および緑膿菌の異物排出ポンプ欠損株

に対して、抽出化合物の共存下で、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬メロペネム (MEPM) およびセフトジジム (CAZ) の抗菌活性をを評価したところ、抗菌活性の保持に有効な 4 化合物の抽出に成功した。その中から構造展開の可能性、異物排出ポンプへの抵抗性の可能性を加味して、化合物 A をリード化合物として選択した (Fig. 6)。第 2 章では、HTS の詳細、リード化合物の構造展開および、合成誘導体の活性評価について 5 節に亘り詳述する。



**Fig. 6.** The lead compound for MBL inhibitors

## 第1章 新規アミノグリコシド系抗菌薬の探索

アミノグリコシド系抗菌薬の開発は、放線菌 *Streptomyces kanamyceticus* の培養液中からカナマイシン (KM) とカナマイシン B (KM-B) が発見されたことに端を発している<sup>33</sup>。KM は、2-デオキシストレプトアミン (A 環) を中心に、4 位の位置に 6-アミノグルコース (B 環) と 6 位の位置に 3-アミノグルコース (C 環) を配した構造を有している (Fig. 7)。KM および KM-B の発見以来、耐性機構の解明および耐性菌に有効な誘導体の開発を目的に、B 環および C 環のヒドロキシ基やアミノ基の化学修飾体が多数合成され、構造活性相関研究が展開されてきた<sup>34</sup>。

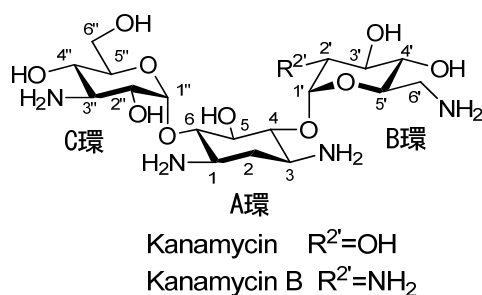


Fig. 7. Structures of Kanamycin and Kanamycin B

これらの構造活性相関研究において、KM の B 環 3'位ヒドロキシ基を除去した 3'-デオキシカナマイシンは、アミノグリコシド修飾酵素 APH(3')による不活化を受けにくく、耐性菌の発育を阻止することが見出された。また、KM-B の B 環上の二つのヒドロキシ基を除去した 3',4'-ジデオキシカナマイシン B (ジベカシン、DKB) は、AAD(4') および APH(3')に対する安定性が向上することが判明している<sup>35</sup> (Fig. 8)。

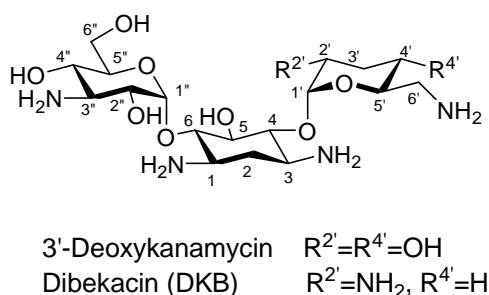


Fig. 8. Structures of 3'-Deoxykanamycin and Dibekacin (DKB)

一方、KM および DKB をリードとする化学修飾において、A 環 1 位のアミノ基が(S)-アミノ-2-ヒドロキシ酪酸 (AHB 側鎖) でアシル化されたアミカシン (AMK) およびアルベカシン (ABK) がそれぞれ合成された<sup>35</sup>。AMK および ABK は AAD(2'')などのアミノグリコシド修飾酵素に対する安定性が増強することが明らかとされた。この結果は、A 環 1 位のアミノ基に AHB 側鎖を導入すると、AAD(2'')に対する C 環 2'位のヒドロキシ基の安定性が向上することを意味している (Fig. 9)。

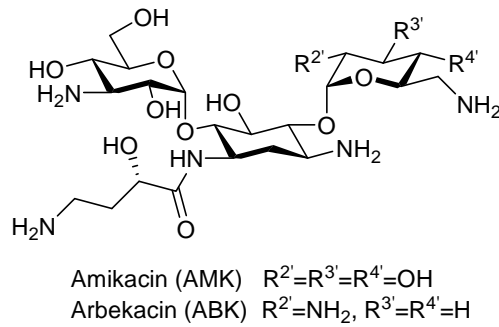


Fig. 9. Structure of Amikacin and Arbekacin

### アミノグリコシド系抗菌薬の作用機序

アミノグリコシド系抗菌薬と rRNA との結合様式については、トブラマイシン (TOB)<sup>36</sup>、ゲンタマイシン (GM)<sup>37</sup>、アミカシン (AMK)<sup>38</sup>との共結晶の X 線結晶構造解析結果がそれぞれ報告されている。これらの報告によるとアミノグリコシド系抗菌薬の A 環、B 環および C 環上のヒドロキシ基およびアミノ基の一部は rRNA の A サイトに位置する核酸塩基由来の窒素原子、酸素原子と直接相互作用をしていることが判明している。さらに、AMK では、AHB 側鎖の末端アミノ基が A サイトとの結合に関与することが明らかとされている<sup>38</sup>。Fig. 10 に、rRNA のアミノグリコシド系抗菌薬の結合部位と、AMK の rRNA と直接相互作用している官能基を示す。ABK と rRNA との共結晶の X 線結晶構造解析の報告はないが、ABK と rRNA との相互作用は AMK のそれとほぼ同じであると推定される。

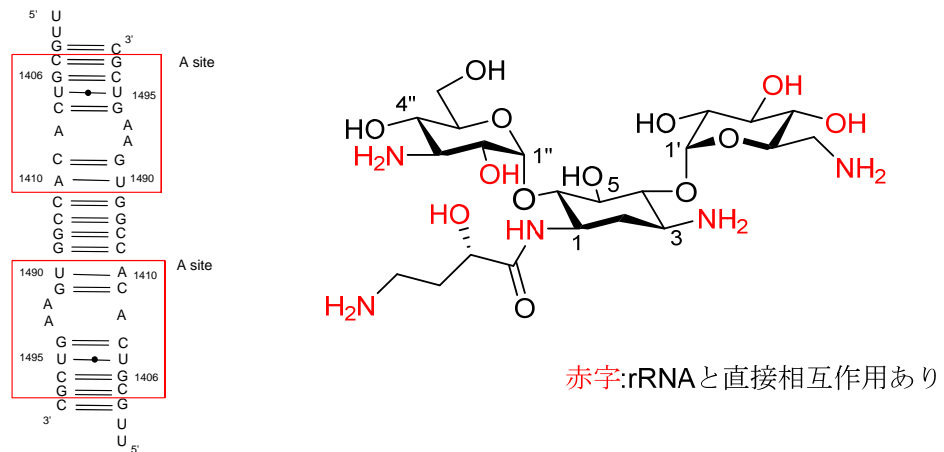


Fig. 10. Secondary structure of the A site of rRNA and the interactive substituents of Amikacin to rRNA

### 研究の方針

著者は、上記の先行研究を踏まえ、MDRP を含む薬剤耐性緑膿菌および MRSA に有効な抗菌薬の開発を目的として、ABK をリード化合物とした構造活性相関研究を展開した。構造活性相関研究は①rRNA と直接相互作用をしている置換基については構造

を維持し、rRNA との結合を保持する。②rRNA との結合に関与しない A 環から C 環上の置換基に注目し、化学修飾を試み高い抗菌活性と、修飾酵素に対する高い安定性を有する ABK 類縁体の創製を目的とした。

### 新規 ABK 誘導体のデザイン

AMK および ABK の耐性菌に対する抗菌活性および修飾酵素に対する安定性の研究から、これらの抗菌薬は MRSA の産生する AAC(6')-APH(2'')により不活化されることが明らかとなっている<sup>39</sup>。前述したとおり、C 環 2''位のヒドロキシ基の修飾酵素に対する安定性は A 環 1 位のアミノ基に AHB 側鎖を導入することにより、向上できる。しかし、AAC(6')-APH(2'')を大量に産生する高度耐性株では、この修飾酵素による不活化が報告されている<sup>22</sup>。

そこで、著者は AAC(6')-APH(2'')に対する安定性をさらに高めるために、AMK と rRNA との共結晶の X 線結晶構造解析情報を踏まえ、A 環上の 5 位のヒドロキシ基に着目した。前述したように、AMK の 5 位ヒドロキシ基は、rRNA との結合には直接関与しておらず、ABK の 5 位ヒドロキシ基も rRNA との結合には直接関与していないことが推測される (Fig. 11)。

著者は、以上の構造情報を踏まえて、はじめに 5 位ヒドロキシ基の近傍の化学修飾を検討した。すなわち、ABK をリード化合物としてエクアトリアル配置の 5 位ヒドロキシ基を保持して、その付け根炭素から種々の置換基 ( $R_{ax}$ ) をアクシャル配置に導入した類縁体をデザインした (Fig. 11)。

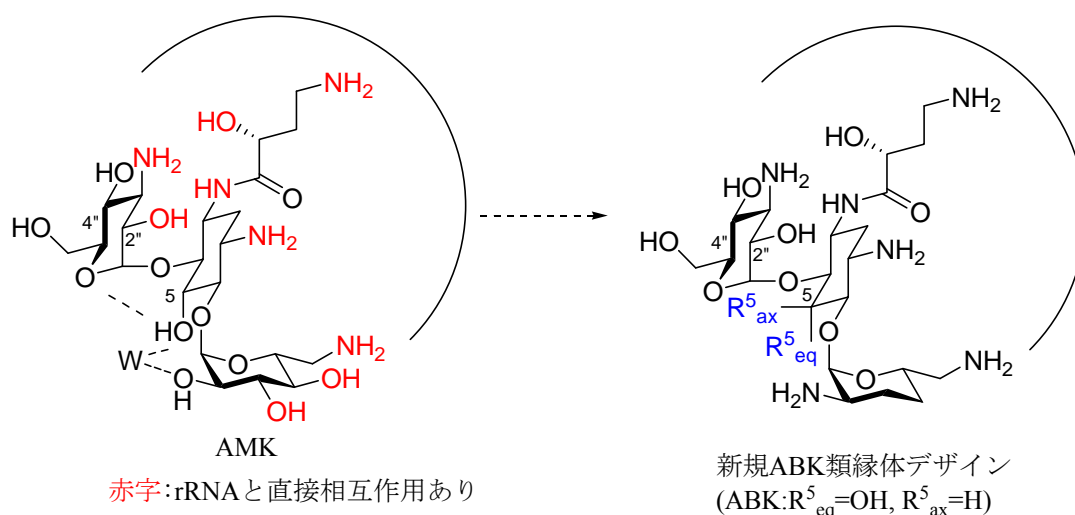


Fig. 11. Design of new ABK derivatives

5 位アクシャル配置に導入された置換基は空間的に 2''位ヒドロキシ基の近傍に位置することが可能となり、MRSA が産生する AAC(6')-APH(2'')との親和性を弱め、修飾酵素に対する安定性を高める効果が期待された。第 1 節では、ABK の 5 位ヒドロキシ基の付け根炭素からアクシャル配置に種々の置換基を導入した ABK 類縁体 **1** の合成

と抗菌活性について検討した結果を詳述する。

一方、社内の先行研究において、ABKの5位ヒドロキシ基を除去した5-デオキシ誘導体は、AAC(6')-APH(2'')を産生するMRSA株に対する抗菌力において、ABKと同等であった。また、5位ヒドロキシ基を除去し、さらにアクシャル配置にフッ素を導入した誘導体は、AAC(6')-APH(2'')に対する安定性がABKと比較して向上し、抗菌活性も高まる傾向が観察されていた<sup>40</sup>。また、第1節の研究において、5位アクシャル配置へ置換基を導入することにより、AAC(6')-APH(2'')に対する安定性が向上することが確認された。そこで第2節では5位アクシャル配置に様々な置換基を導入したABK類縁体2の合成、および構造活性相関について検討した結果を述べる。

また、MRSAではC環4"位のヒドロキシ基をアデニル化するAAD(4',4'')を産生する株が知られている。この酵素をAAC(6')-APH(2'')とともに産生する菌ではABKのMIC値が高値を示すことが報告されている<sup>22</sup>。この酵素に対する安定性を高めることは、耐性菌に対する有効な抗菌薬の創製につながると考えられる。そこで、第3節では、第1節および第2節で合成したABK類縁体の中でも、抗菌活性の強い化合物について4"位のヒドロキシル基を反転させたABK類縁体3の合成と抗菌活性を検討した(Fig. 12)。第4節では最も抗菌活性の高かった化合物について高次評価を実施した結果を述べる。

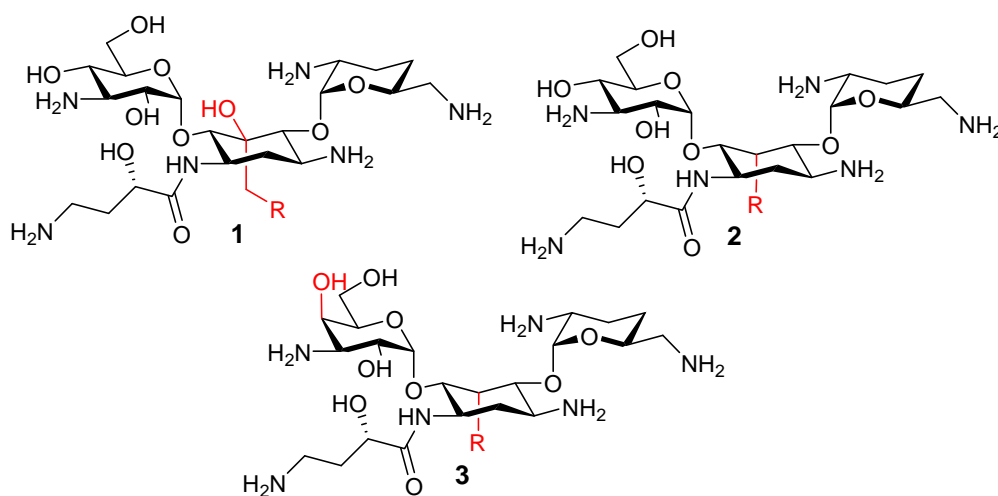


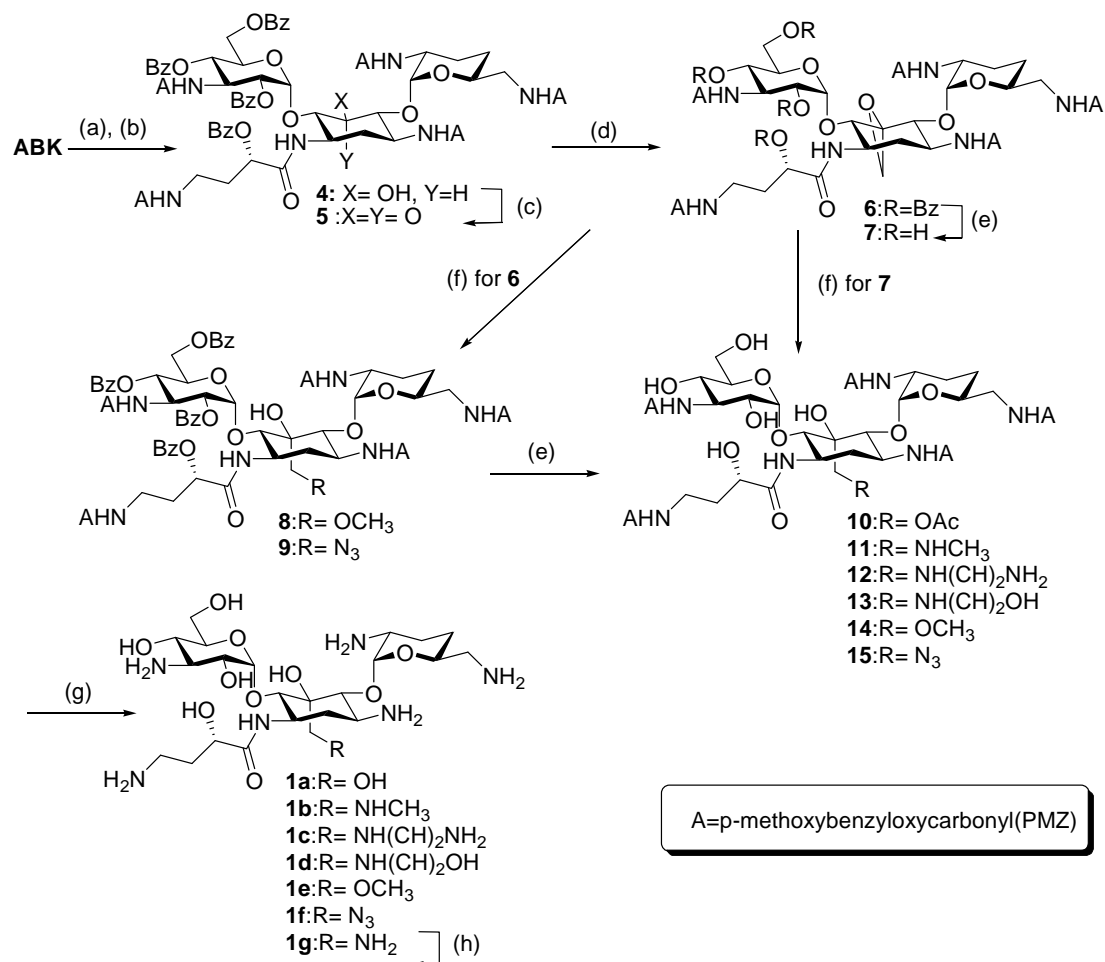
Fig. 12. Structures of new ABK derivatives



## 第1節 ABK 類縁体 1 の合成と抗菌活性

### 第1項 ABK 類縁体 1 の合成<sup>41</sup>

5 位アクシアル配置に置換基を有する ABK 類縁体 **1** は、大量に入手可能な ABK から **Scheme 1** に示すルートにより合成した。



#### Scheme 1. Preparation of ABK derivatives **1**

Reagents and conditions: (a) PMZ-S, Et<sub>3</sub>N, IPA, THF-H<sub>2</sub>O, 60 °C; (b) BzCl, pyridine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t.; (c) DMSO, Ac<sub>2</sub>O, r.t.; (d) CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>, MeOH-Et<sub>2</sub>O, 0 °C; (e) 1M NaOH<sub>aq</sub>, MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t.; (f) NaOMe-MeOH, r.t. (for **8**), NaN<sub>3</sub>, DMF, 80 °C (for **9**), CsOAc, DMF, 80 °C (for **10**), MeNH<sub>2</sub>, EtOH, 80 °C (for **11**), NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, EtOH, 80 °C (for **12**), NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH, EtOH, 80 °C (for **13**); (g) 90%TFA, r.t.; (h) H<sub>2</sub>, 10%Pd-C.

すなわち、最初に ABK の 5 つのアミノ基を *p*-メトキシベンジルオキシカルボニル基 (PMZ 基) で保護した。得られた生成物をベンゾイルクロライド (BzCl) で処理すると、5 位を除く 4 つのヒドロキシ基が Bz 基で選択的に保護された化合物 **4** が得られた。化合物 **4** は Albright-Goldman 酸化<sup>42</sup> により 5 位ヒドロキシ基を酸化して化合物 **5** へと変換後、ジアゾメタンで処理すると、立体障害の少ない  $\alpha$  面 (convex 面) よりジアゾメタンのカルボニル基への付加反応が進行して、オキシラン誘導体 **6** が立体選択

的に得られた。6 は脱ベンズイル (Bz) 体 7 に誘導後、種々の求核試薬との反応により、化合物 10–13 に誘導した。一方、オキシラン誘導体 6 のオキシラン開環反応により化合物 8 および 9 を得た。8 および 9 の脱 Bz 化により化合物 14 および 15 を得た。以上で得られた 10–15 をトリフルオロ酢酸 (TFA) で処理して ABK 類縁体 1a–1f に誘導した。1f はさらに接触還元して、ABK 類縁体 1g に変換した。

得られた ABK 類縁体 1a–1g の構造は、高分解能核磁気共鳴スペクトル (NMR スペクトル) および質量分析スペクトル (MS スペクトル) を解析して、確認した。また、化合物 1e については、2次元 NMR (ROESY) スペクトルの ROE の解析により、さらに、その構造を確認した。化合物 1e の ROE の結果を Fig. 13 に示す。

すなわち、1e の高分解能 NMR スペクトル (400MHz, D<sub>2</sub>O+DCl) において、B 環および C 環のアノメリック位の水素 (1'-H および 1''-H) は、それぞれ、 $\delta=5.76$  (d,  $J=3.2$  Hz) および  $\delta=5.19$  (d,  $J=3.6$  Hz) にダブルットで観察された。これらのカップリング定数は、アノメリック位の水素がエクアトリアルに配置されていることを示しており、ABK からの合成過程でアノメリック位の立体配置が保持されていることを支持する。

一方、A 環 1 位のアクシャル配置の水素 (1-H) と 2 位のエクアトリアル配置の水素 (2-H) および 3 位のアクシャル配置の水素 (3-H) との間に ROE 相関が観察された。また 1 位のアクシャル配置の水素 (1-H) と 5 位のアクシャル配置のメチレン水素 (5-CH<sub>2</sub>) との間に ROE の相関が確認された。さらに、2 位のアクシャル配置の水素 (2-H) と 4 位のアクシャル配置の水素 (4-H) および 6 位のアクシャル配置の水素 (6-H) との間に ROE の相関が確認された。これらの結果は、5 位ヒドロキシ基がエクアトリアル配置であることをよく支持した (Fig. 13)。

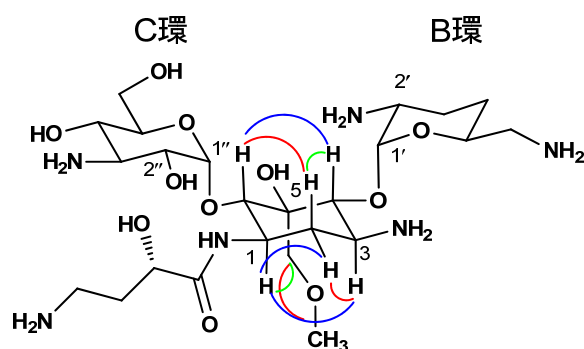


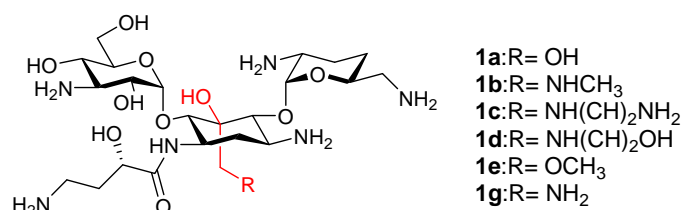
Fig. 13. Selective ROE of ABK derivative 1e

## 第 2 項 ABK 類縁体 1 の抗菌活性<sup>41</sup>

抗菌活性評価は、グラム陽性菌とグラム陰性菌に対して行った。グラム陽性菌とグラム陰性菌では、細胞壁の構造が大きく異なっており、一般的に、グラム陰性菌では薬物の細胞内への透過性が低いことが知られている。そこで、5 位アクシャル配置に置換基を有する ABK 類縁体 1a–1e および 1g の抗菌活性について、グラム陽性菌 2 株

(*S. aureus* 209P JC-1 株、*S. aureus* MF490(MRSA)株) とグラム陰性菌 2 株 (*E. coli* NIH JC-2 株、*P. aeruginosa* PAO1 株) に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)の Agar dilution method に準じ測定して、抗菌活性評価を行った。評価結果を **Table 3** に示す。

**Table 3.** Minimum inhibitory concentrations (MICs) of ABK derivatives **1a-e** and **1g**.



Test organism	MIC (μg/mL)						ABK
	<b>1a</b>	<b>1b</b>	<b>1c</b>	<b>1d</b>	<b>1e<sup>b</sup></b>	<b>1g<sup>b</sup></b>	
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P JC-1	0.25	0.13	0.25	0.13	0.20	0.20	0.06
<i>S. aureus</i> MF490 (MRSA) <sup>a</sup>	32	4	8	8	6.25	12.5	64
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	4	2	8	4	1.56	3.13	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	8	8	8	8	12.5	6.25	2

<sup>a</sup>Producing AAC(6')-APH(2'') and AAD(4',4'').

<sup>b</sup>日本化学療法学会標準法に準じた寒天平板希釈法にて測定

## 2-1 グラム陽性菌に対する抗菌活性

はじめに、*S. aureus* 209P JC-1 株および *S. aureus* MF490(MRSA)株に対する抗菌活性を評価した。*S. aureus* 209P JC-1 株は、ABK 感受性株であり、この菌株に対する MIC 値は、ABK 類縁体の基本的な抗菌力 (rRNA との結合力) を評価できると考えられる。*S. aureus* MF490(MRSA)株は、AAC(6')-APH(2'')および AAD(4',4'')を産生している株であり、この菌株に対する MIC 値は、AAC(6')-APH(2'')および AAD(4',4'')による影響を評価できると考えられる。

ABK 類縁体 **1a-1e** および **1g** の *S. aureus* 209P JC-1 株に対する MIC 値 (0.13~0.25 μg/mL) は、ABK の MIC 値 (0.06 μg/mL) とほぼ同等の値を示した。この結果は、5 位アクシャル配置への置換基の導入により基本的な抗菌力 (rRNA との結合力) はほぼ保持されていることを示唆している。また、ABK 類縁体 **1a-1e** および **1g** の *S. aureus* MF490(MRSA)株に対する MIC 値 (4~32 μg/mL) は、いずれも、ABK の MIC 値 (64 μg/mL) よりも低く、ABK 類縁体 **1a-1e** および **1g** は ABK よりも強い抗菌活性を示す傾向が明らかとなった。この結果は、5 位アクシャル配置への置換基の導入により、著者が予想したように、AAC(6')-APH(2'')および AAD(4',4'')に対する安定性の向上に寄与していることを支持していた。

## 2-2 グラム陰性菌に対する抗菌活性

次に、グラム陰性菌に対する抗菌活性を評価した。*E. coli* NIH JC-2 株に対する抗菌活性は、ABK 類縁体 **1a-e** および **1g** のグラム陰性菌に対する基本的抗菌活性 (rRNA との結合力) が評価できると考えられた。

一方、*P. aeruginosa* PAO1 株は、グラム陰性菌に属する緑膿菌の代表株である。緑膿菌は、グラム陰性菌のなかでも、細菌内への薬剤の透過性が低いことが知られており<sup>14</sup>、この株に対する抗菌活性は、ABK 類縁体 **1a-1e** および **1g** の細胞壁透過性の評価につながると考えられる。

ABK 類縁体 **1a-1e** および **1g** の *E. coli* NIH JC-2 株に対する MIC 値 (1.56~8 µg/mL) は ABK の MIC 値 (1 µg/mL) よりわずかに高いが、抗菌活性は維持していると判断した。すなわち、5 位アクシャル配置への置換基を導入しても、グラム陽性菌と同様、グラム陰性菌に対する基本的な抗菌力はほぼ維持していると考えられる。しかしながら、ABK 類縁体 **1a-1e** および **1g** の *P. aeruginosa* PAO1 株に対する MIC 値 (6.25~12.5 µg/mL) は、ABK の MIC 値 (2 µg/mL) よりも、すべての化合物で抗菌活性が低下する傾向がみられた。この結果より、ABK 類縁体 **1a-1e** および **1g** は ABK と比較して緑膿菌菌体内への透過性が低下していることが示唆された。ABK と比較して、ABK 類縁体 **1a-1e** および **1g** の緑膿菌菌体内への透過性が低下した要因の一つとして、5 位近傍に極性基が多数存在することにより、分子全体の極性が大きく変化したことが考えられた。そこで、次に、5 位エクアトリアル配置のヒドロキシ基を除去して、アクシャル配置にのみ置換基を導入した ABK 類縁体を合成・評価した。

## 第2節 ABK 類縁体 2 の合成と抗菌活性<sup>43</sup>

5位アクシャル配置にのみに置換基を導入した ABK 類縁体については、前述したように、ABK の5位ヒドロキシ基を除去し、さらにアクシャル配置にフッ素を導入した5-デオキシ-5-エピフルオロ ABK (5-epiF-ABK) の抗菌活性が先行研究において評価されていた<sup>41</sup> (Fig. 14)。

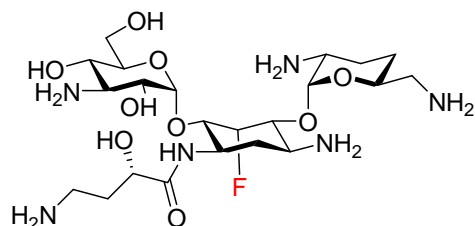
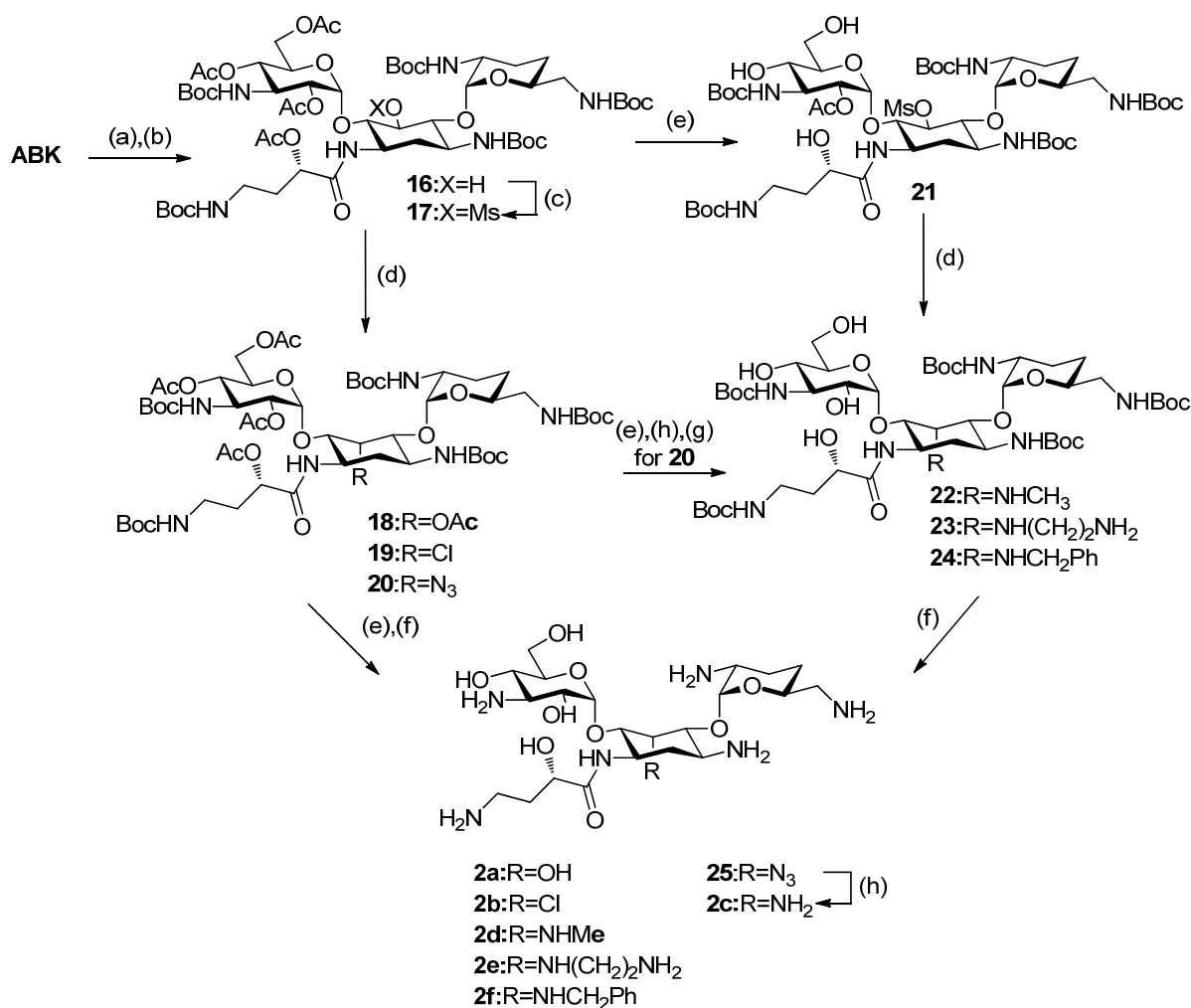


Fig. 14. Structure of 5-epiF-ABK

この先行研究において得られた 5-epiF-ABK の *S. aureus* MF490 株に対する抗菌活性 (MIC=25  $\mu\text{g/mL}$ ) は、ABK の抗菌活性 (MIC=64  $\mu\text{g/mL}$ ) よりも向上する傾向が観察されていた。しかしながら、フルオロ基以外の置換基を導入した ABK 類縁体の抗菌活性については、未検討であった。本節では ABK 類縁体 2 の合成と抗菌活性について検討した結果を述べる。

### 第1項 ABK 類縁体 2 の合成<sup>43</sup>

ABK 類縁体 2 は、ABK から Scheme 2 に示すルートにより合成した。すなわち、最初に ABK の5つのアミノ基を *tert*-ブチルカルボニル基 (Boc 基) で保護した。得られた生成物を精製することなく無水酢酸・ピリジンで処理すると、5位を除く4つのヒドロキシ基がアセチル基で選択的に保護された化合物 16 が得られた。化合物 16 は、メタンスルホナート 17 に変換後、CsOAc、LiCl、および  $\text{NaN}_3$  でそれぞれ処理して化合物 18-20 に誘導した。18-20 は、脱アセチル化および脱 Boc 化反応を経て化合物 2a、2b および 25 に誘導した。さらに、25 は、接触還元により、アミノ体 2c に変換した。一方、メタンスルホナート 17 を脱アセチル化後、得られた化合物 21 を、封管中、対応するアミンと反応させて、22 および 23 へ変換した。また、アジド体 20 は、接触還元後、ベンジル化を行い 24 に誘導した。アミン 22、23 および 24 は、脱 Boc 化により 2d、2e および 2f に誘導した。以上に得られた ABK 類縁体 2a-2f の高分解能 NMR および MS スペクトルは、その構造を良く支持していた。



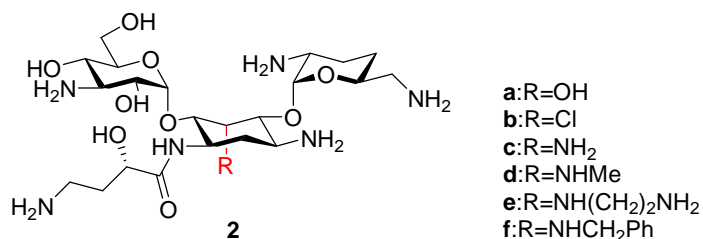
### Scheme 2. Preparation of ABK derivatives 2

Reagents and conditions: (a) Boc<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, DMF-H<sub>2</sub>O, r.t.; (b) Ac<sub>2</sub>O, pyridine, r.t.; (c) MsCl, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t.; (d) CsOAc, DMF, 80 °C (for **18**), LiCl, DMF, 80 °C, (for **19**); NaN<sub>3</sub>, DMF, 80 °C, (for **20**), MeNH<sub>2</sub>, MeOH, 80 °C, (for **22**), NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 60 °C, (for **23**); (e) NaOMe, MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t.; (f) 90% TFA; (g) BnBr, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, r.t.; (h) H<sub>2</sub>, 10% Pd-C, H<sub>2</sub>O, r.t.

## 第 2 項 ABK 類縁体 2 の抗菌活性<sup>43</sup>

ABK 類縁体 **2a–2f** の抗菌活性は、ABK 類縁体 **1a–1f** の評価に準じて、グラム陽性菌 2 種類およびグラム陰性菌 2 種類に対する MIC で評価した (Table 4)。さらに *P. aeruginosa* PAO1 の異物排出ポンプ mexXY 欠損株 (*P. aeruginosa* N101<sup>44</sup>) に対する抗菌活性についても測定した。*P. aeruginosa* PAO1 に対する MIC 値と *P. aeruginosa* N101 に対する MIC 値を比較することにより、異物排出ポンプ mexXY による影響を確認することができると考えられた。

**Table 4.** Minimum inhibitory concentrations (MICs) of ABK derivatives **2a-f**



Test organism	MIC(μg/mL)						5-epiF ABK <sup>bd</sup>	ABK
	2a	2b <sup>b</sup>	2c	2d	2e	2f		
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P JC-1	0.06	0.1	0.13	0.25	0.13	0.13	0.1	0.06
<i>S.aureus</i> MF490(MRSA) <sup>a</sup>	2	3.13	2	4	2	8	25	64
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	1	1.56	2	2	4	4	1.56	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	2	2	2	4	2	32	3.13	2
<i>P.aeruginosa</i> N101(ΔmexXY of PAO1)	0.25	0.5	0.5	NT <sup>c</sup>	NT <sup>c</sup>	1	NT <sup>c</sup>	0.25

<sup>a</sup>Producing AAC(6')-APH(2'') and AAD(4',4'').

<sup>b</sup>日本化学療法学会標準法に準じた寒天板希釈法にて測定 <sup>c</sup>Not tested

<sup>d</sup>自社先行研究時の評価結果

## 2-1 グラム陽性菌に対する抗菌活性

*S. aureus* 209P JC-2 株に対する ABK 類縁体 **2a-2f** の MIC 値は、0.06~0.25 μg/mL であり、ABK の MIC 値 0.06 μg/mL とほぼ同等であった。この結果より ABK 類縁体 **2a-2f** は基本的抗菌力 (rRNA との結合能力) を維持していることが明らかとなった。ABK 類縁体 **2a-2f** の *S. aureus* MF490 (MRSA) 株に対する抗菌活性 (MIC=2~8 μg/mL) は、ABK の抗菌活性 (MIC=64 μg/mL) および 5-epiF-ABK の抗菌活性 (MIC=25 μg/mL) よりも強い傾向が見られた。また、ABK 類縁体 **1** と比較して ABK 類縁体 **2a-2f** の抗菌活性の抗菌活性は、強い傾向が認められた。この MRSA 株は AAC(6')-APH(2'') および AAD(4',4'') を産生していることから、ABK 類縁体 **2a-2f** は、ABK および ABK 類縁体 **1** と比較し、これらの修飾酵素に対する安定性が高いと考えられる。

## 2-2 グラム陰性菌に対する抗菌活性と異物排出ポンプの影響

グラム陰性菌の代表株 *E. coli* NIH JC-2 に対する抗菌活性は、ABK が MIC=1 μg/mL を示すのに対して、ABK 類縁体 **2a-2f** は MIC=1~4 μg/mL を示した。この MIC 値は、ABK 類縁体 **1** の MIC 値よりも低濃度であり、ABK 類縁体 **2a-f** は ABK 類縁体 **1** よりも、グラム陰性菌に対する抗菌活性が強い傾向を示した。*P. aeruginosa* PAO1 に対する抗菌活性は、ABK 類縁体 **2f** を除くすべての類縁体で、ABK とほぼ同等であった。

一方、ABK 類縁体 **2f** の *E. coli* NIH JC-2 に対する MIC 値は、ABK 類縁体 **2a-2e** とほぼ同等であるにも関わらず、*P. aeruginosa* PAO1 に対する MIC 値は 32 μg/mL と大きな値を示した。この結果より、ABK 類縁体 **2f** が他の類縁体よりも、緑膿菌菌体内への透過性が低下していることが示唆された。

緑膿菌菌体内への薬剤への透過は、薬剤の流入と、異物排出ポンプによる薬剤の排出のバランスにより制御されている。そこで、異物排出ポンプの影響を調べるために、*P. aeruginosa* PAO1 の異物剤排出ポンプの中でも、アミノグリコシド系抗菌薬の排出に関与することが知られている *mexXY* を欠損した *P. aeruginosa* N101<sup>44</sup>( $\Delta mexXY$ )に対する抗菌活性を測定した。この株に対する ABK および ABK 類縁体 **2a–2c** の抗菌活性 (MIC=0.25~0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) は、化合物 **2f** の抗菌活性 (MIC=1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) とほぼ同等であった。すなわち、*P. aeruginosa* N101 株に対する抗菌活性と *P. aeruginosa* PAO1 株に対する抗菌活性の比を MIC 値で比較すると、ABK および化合物 **2a–2c** は、*P. aeruginosa* N101 株に対して活性が 4~8 倍の上昇に留まった。しかし、化合物 **2f** の場合には 32 倍上昇することが明らかとなった。この結果より、化合物 **2f** は、異物排出ポンプによる影響が大きいことが推定された。化合物 **2f** は、構造中に脂溶性の高いフェニル基を有し、分子量が大きいため、異物排出ポンプの影響を受けやすいと考えられる。



### 第3節 ABK 類縁体 3 の合成と抗菌活性<sup>45</sup>

第1節および第2節で述べた構造活性相関研究において、ABKの5位ヒドロキシ基を除去して、5位のアクシャル配置に比較的小さな極性基を導入すると、グラム陽性菌およびグラム陰性菌に対する抗菌活性が向上することが明らかとなった。特に、ABK類縁体 **2a-2c** は、AAC(6')-APH(2'') および AAD(4',4'') を産生する MRSA 株に高い抗菌活性を示した。臨床で分離された MRSA のなかには、ABKのC環4''位のヒドロキシ基をアデニル化する AAD(4',4'') の酵素活性が亢進している株も知られており<sup>23</sup>、AAD(4',4'') に対する抵抗性をさらに高めることは、広範なスペクトルを示す抗菌薬の開発に繋がると考えられる。

一般に、アミノグリコシド修飾酵素に対するアミノグリコシド系抗菌薬の安定性は、修飾される官能基の除去あるいは立体配置の反転などにより高められることが自社の先行研究で知られていた。そこで、著者は、前節の検討で抗菌活性および菌体内の薬物蓄積量などで好結果が得られた ABK 類縁体 **2a-2c** に着目して、AAD(4',4'') に対する抵抗性をさらに高めるために、4''位ヒドロキシ基を反転させた ABK 類縁体 **3a-3c** を設計した (Fig. 15)。ABK 類縁体 **3a-c** の合成とその抗菌活性について以下に述べる。

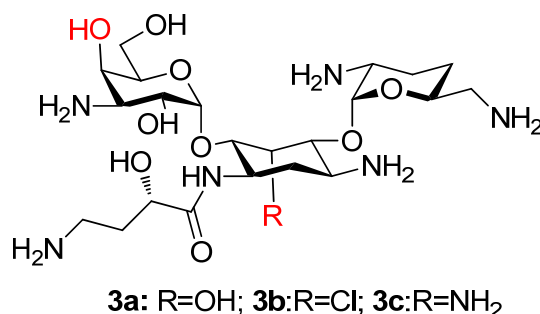
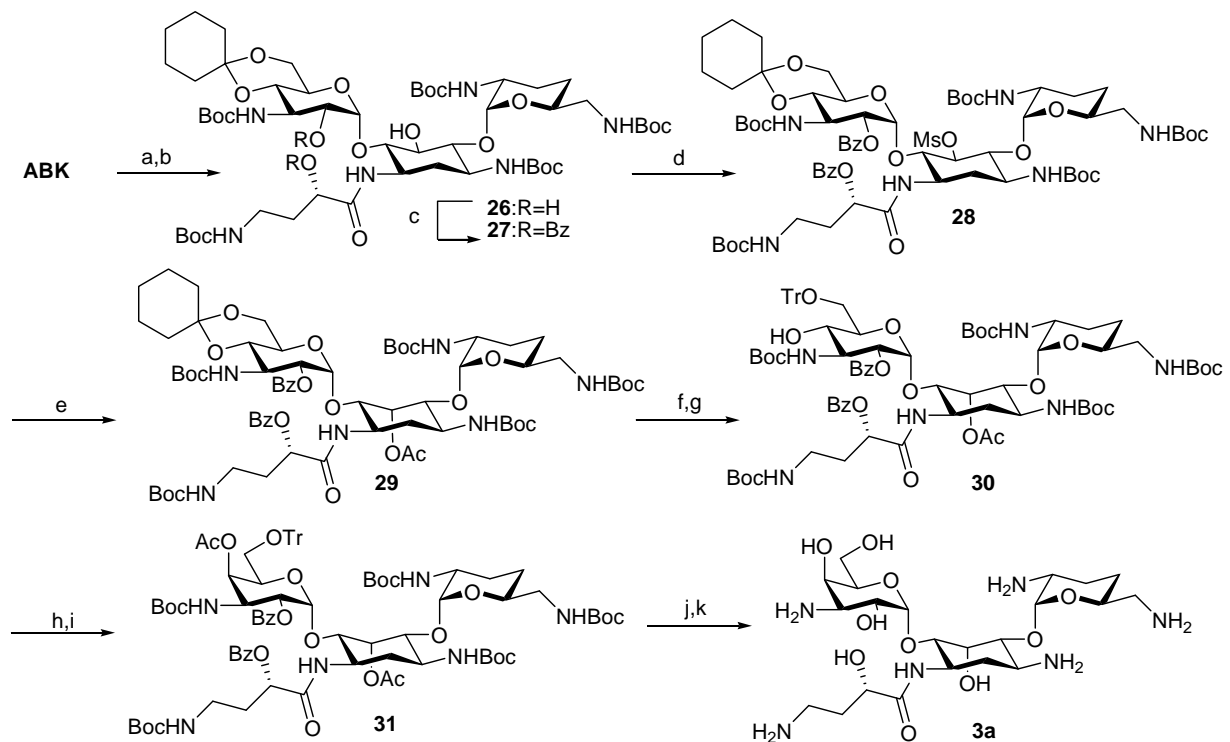


Fig.15. Structures of ABK derivatives **3a-3c**

#### 第1項 ABK 類縁体 3a の合成<sup>45</sup>

ABKの5位および4''位のヒドロキシ基の立体配置を反転させた ABK 類縁体 **3a** は、ABK から Scheme 3 に示すルートにより合成した。ABKの5つのアミノ基を Boc 基で保護後、4''位および6''位のヒドロキシ基をシクロヘキシリデン基で選択的に保護して化合物 **26** を得た。続いて、2''位および1位 AHB 側鎖上のヒドロキシ基をベンゾイル (Bz) 基で選択的に保護して化合物 **27** に誘導した。**27** の5位ヒドロキシ基をメタンホルホナート **28** に変換した後、酢酸セシウム (CsOAc) を反応させると、立体配置の反転したアセテート **29** が得られた。**29** のシクロヘキシリデン基を除去後、6''位ヒドロキシ基を選択的にトリチル (Tr) 基で保護した。得られた **30** の4''位ヒドロキシ基をトリフレートとした後、精製することなく CsOAc と加熱下に反応させると、立体配置の反転したアセテート **31** が得られた。**31** は、アセテートおよびベンゾエートの加

水分解、さらに、Boc 基の除去を連続的に行い、目的とする ABK 類縁体 **3a** に変換した。以上に得られた ABK 類縁体 **3a** の高分解能 NMR スペクトルおよび MS スペクトルは、その構造を良く支持していた。



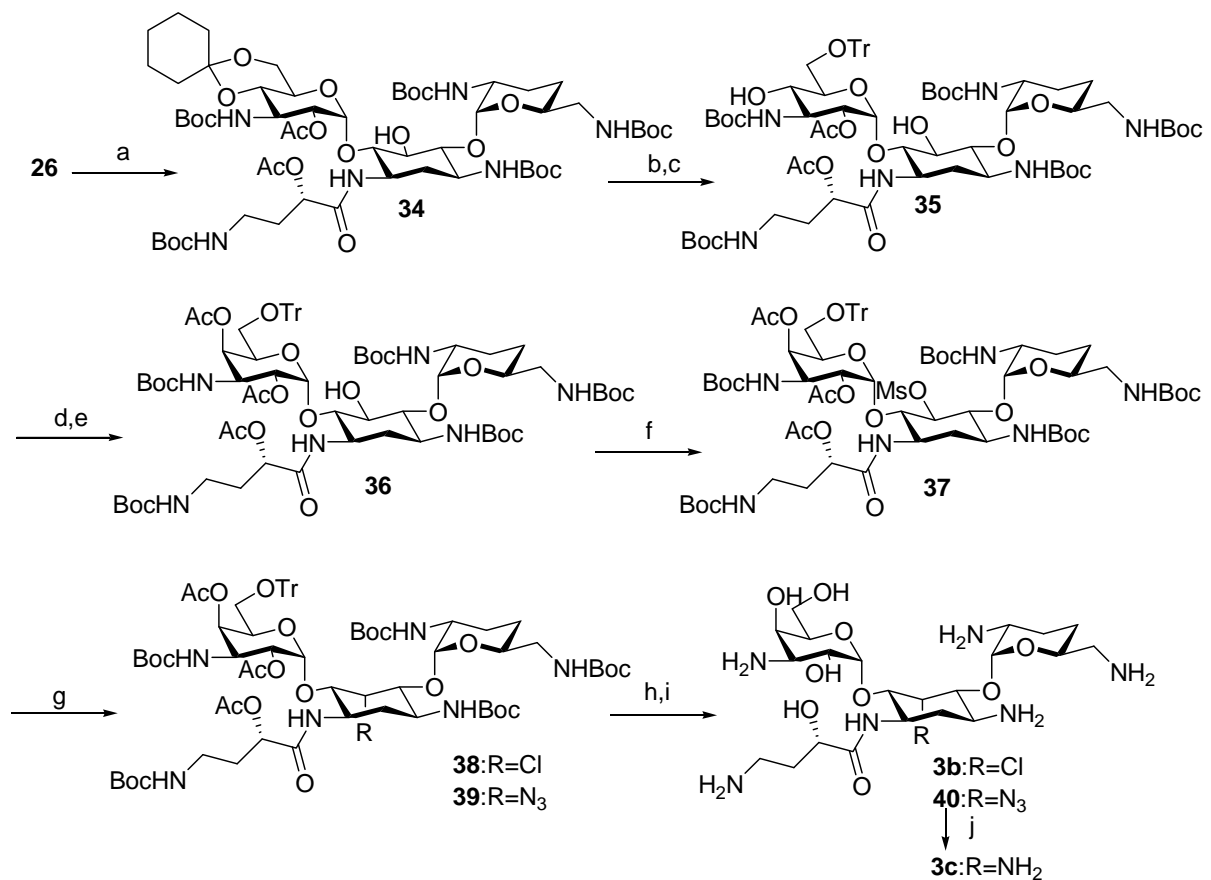
### Scheme 3. Preparation of ABK derivative **3a**

Reagents and conditions: (a)  $\text{Boc}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{DMF-H}_2\text{O}$ , r.t.; (b) 1,1-dimethoxycyclohexane, *p*-TsOH,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{DMF}$ ,  $50^\circ\text{C}$ , 46-48mbar; (c)  $\text{BzCl}$ , pyridine, r.t.; (d)  $\text{MsCl}$ , DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ ; (e)  $\text{CsOAc}$ ,  $\text{DMF}$ ,  $100^\circ\text{C}$ ; (f) 90%TFA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{MeOH}$ , r.t.; (g)  $\text{TrCl}$ , pyridine,  $60^\circ\text{C}$ ; (h)  $\text{Tf}_2\text{O}$ , pyridine,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-5^\circ\text{C}$ ; (i)  $\text{CsOAc}$ ,  $\text{DMF}$ ,  $100^\circ\text{C}$ ; (j)  $\text{NaOMe}$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , r.t.; (k) 90%TFA,  $\text{H}_2\text{O}$ .

## 第2項 ABK 類縁体 **3b** および **3c** の合成

ABK 類縁体 **3b** および **3c** の合成は、Scheme 4 に従って行った。本合成法では、C 環 4''位ヒドロキシ基を反転後、その後 A 環 5 位のヒドロキシ基の化学修飾を行った。すなわち、前項で得られた化合物 **26** の 2''位および 1 位 AHB 側鎖上のヒドロキシ基をアセチル基で保護し、アセテート **34** に変換した。**34** は、シクロヘキシリデン基の除去、続く選択的なトリチル化により **35** に誘導した。**35** の 4''位ヒドロキシ基をトリフレートとした後、精製することなく  $\text{CsOAc}$  と加熱下に反応させると、立体配置の反転したアセテート **36** が得られた。**36** は、5 位ヒドロキシ基をメタンシルホナート **37** に変換した後、 $\text{LiCl}$  または  $\text{NaN}_3$  との反応させることにより、5 位アクシャル配置に  $\text{Cl}$  および  $\text{N}_3$  基が導入された化合物 **38** および **39** に誘導した。**38** および **39** の Ac 基、

Boc 基および Tri 基を順次脱保護すると、**3b** および **40** が得られた。**40** は、さらに、5 位アジド基を接触還元すると **3c** に変換された。以上に得られた ABK 類縁体 **3b** および **3c** の構造は、高分解能 NMR スペクトルおよび MS スペクトルを解析して、確認した。**3c** において、3''位アクシャル水素 (3''-H) が、 $\delta=3.20$  (dd,  $J=3.2, 11$  Hz) で観察された。これらのカップリング定数は、それぞれ、アクシャル-エクアトリアル水素間 (3.2 Hz) およびアクシャル-アクシャル水素間 (11 Hz) に基づくものである。従って、この結果は 4''位ヒドロキシ基の配置がアクシャル配置であることを良く支持している。



**Scheme 4.** Preparation of ABK derivatives **3b** and **3c**

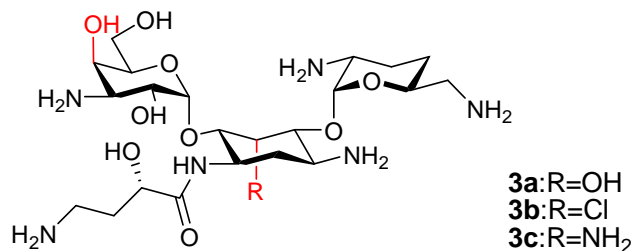
Reagents and conditions: (a) Ac<sub>2</sub>O, pyridine, r.t.; (b) 90%TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH, r.t.; (c) TrCl, pyridine, 60°C; (d) Tf<sub>2</sub>O, pyridine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (e) CsOAc, DMF, 100°C; (f) MsCl, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C; (g) LiCl, 100°C (for **38**), NaN<sub>3</sub>, 80°C (for **39**); (h) NaOMe, MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t.; (i) 90%TFA, H<sub>2</sub>O; (j) H<sub>2</sub>, 10%Pd-C.

**第3項 ABK 類縁体 3 の抗菌活性**<sup>45</sup>

ABK 類縁体 **3a-c** の抗菌活性は、ABK 類縁体 **2a-2f** の評価に準じて、グラム陽性菌 2 種類および *P. aeruginosa* PAO1 から異物排出ポンプ (*mexXY*) を欠損した株 (*P. aeruginosa* N101)<sup>43</sup> を含むグラム陰性菌 3 種類の菌株に対する最小発育阻止濃度 (MIC)

で評価した。結果を **Table 5** に示す。

**Table 5.** Minimum inhibitory concentrations (MICs) of ABK derivatives **3a-c**



Test organism	MIC( $\mu\text{g/mL}$ )			
	<b>3a</b>	<b>3b</b>	<b>3c</b>	<b>ABK</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P JC-1	0.06	0.13	0.25	0.06
<i>S.aureus</i> MF490(MRSA) <sup>a</sup>	1	2	4	64
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.5	1	2	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	1	4	4	2
<i>P.aeruginosa</i> N101( $\Delta\text{mexXY}$ of PAO1)	0.25	0.5	1	0.25

<sup>a</sup>Producing AAC(6')-APH(2'') and AAD(4',4'').

ABK 類縁体 **3a-c** の *S. aureus* 209P JC-2 株に対する MIC 値は、4''位を反転させていない **2a-2c** の MIC 値と同等であり、4''位ヒドロキシ基は基本的な抗菌力 (rRNA との結合) には関与していないことが示唆された。一方、*S. aureus* MF490 (MRSA) 株に対する抗菌力において、ABK 類縁体 **3a** および **3b** は 4''位ヒドロキシ基を反転していない **2a** および **2b** と比較してわずかではあるが、低い MIC 値を示した。特に **3a** の MIC 値は 1  $\mu\text{g/mL}$  と、その抗菌力は ABK と比較すると、64 倍強い活性を示した。

グラム陰性菌に対する **3a-3c** の MIC 値は、ほぼ同等であったが、ABK 類縁体 **3a** は、**2a** と比較すると、MIC 値が 1/2 低い濃度を示した。また、*P. aeruginosa* PAO1 から異物排出ポンプ (*mexXY*) を欠損した株 (*P. aeruginosa* N101 株) に対して、**3a** の MIC 値は 0.25  $\mu\text{g/mL}$  あった。これらのデータは、**3a** が、**2a** および ABK と比較して、異物排出ポンプによる影響を受けにくい傾向を示した。

## 第4節 ABK 類縁体 3a の高次評価

前節までの検討において、ABK の A 環 5 位近傍および C 環 4"位のヒドロキシ基の立体反転などの化学修飾を基盤として、グラム陽性菌およびグラム陰性菌に有効な数種の ABK 類縁体の創製に成功した。中でも、ABK 類縁体 **3a** は ABK よりも、優れた薬物プロファイルを有していることが示唆された。そこで、本節では、ABK 類縁体 **3a** について、1) 修飾酵素に対する安定性評価、2) 臨床分離株に対する感受性、3) 殺菌力などの高次評価を詳細に行い、これらの高次評価結果を既存のアミノグリコシド系抗菌薬 (ABK、GM、および KM-B) のそれと比較した。

### 第1項 修飾酵素に対する安定性

第3節での検討により、ABK 類縁体 **3a** は、MIC 値で比較すると、ABK よりも AAC(6')-APH(2")産生株 (*S. aureus* MF490) に対する抗菌活性が 64 倍向上した。これより、ABK 類縁体 **3a** は AAC(6')-APH(2")に対して ABK より安定であると考えられる。そこで、ABK 類縁体 **3a**、ABK、GM および KM-B の 4 つのアミノグリコシド系抗菌薬の安定性について以下の検討を行った。

すなわち、AAC(6')-APH(2")存在下で、これらの抗菌薬を *in vitro* で反応させて、生成するアミノグリコシドの質量分布を LCMS で観察した。AAC(6')-APH(2")は、アミノグリコシド系抗菌薬の 6'位のアミノ基および 2"位のヒドロキシ基をそれぞれアセチル化およびリン酸化するばかりか、その両方の官能基を同時にアセチル化及びリン酸化する二機能性酵素であることから、以上の酵素反応では、Fig. 16-1 および Fig. 16-2 に示す官能基修飾アミノグリコシドが生成することが予想された。

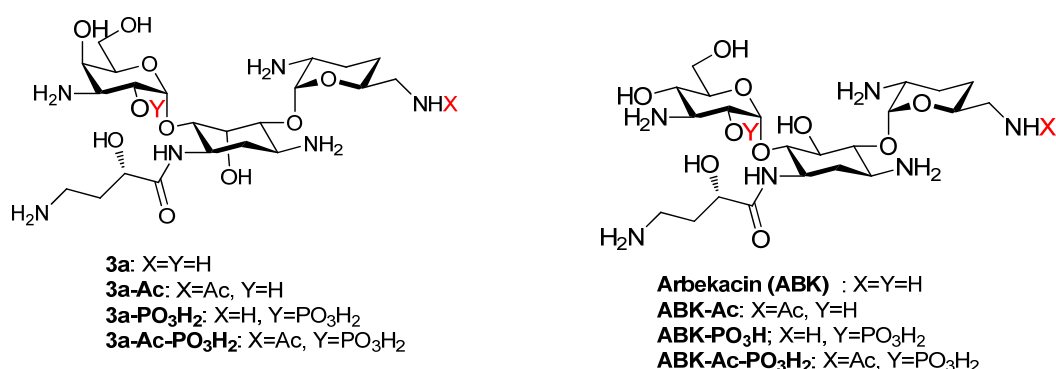
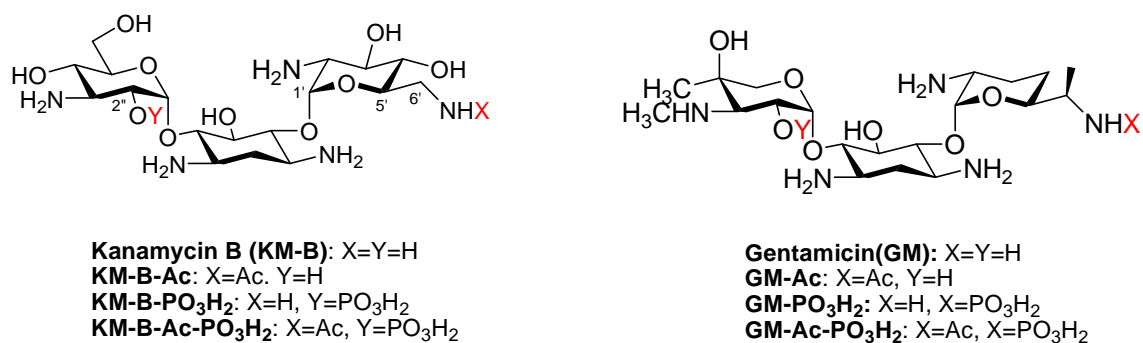
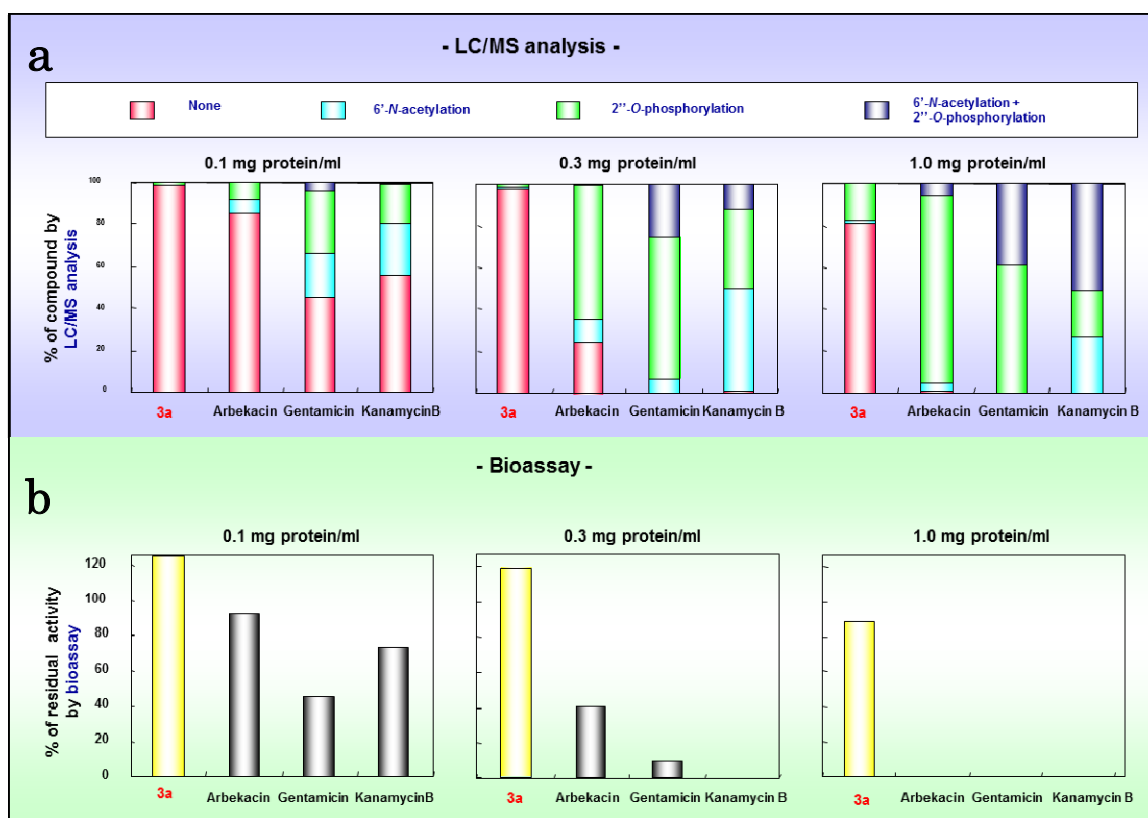


Fig. 16-1. Estimated aminoglycosides from AAC(6')-APH(2")-catalyzed acetylation and phosphorylation of aminoglycoside antibiotics ( to be continued )



**Fig. 16-2.** Estimated aminoglycosides from AAC(6')-APH(2'')-catalyzed acetylation and phosphorylation of aminoglycoside antibiotics (continued)

そこで、*S. aureus* RN4220/pMF490 由来の AAC(6')-APH(2'') の濃度を 3 段階 (0.1、0.3、1.0 mg protein/mL) に変化させて、ABK 類縁体 **3a**、ABK、GM および KM-B との酵素反応を行い、酵素反応により生成したアミノグリコシドの生成量を LCMS で分析した。また、上記の酵素反応の前後で、それぞれの抗菌薬が示す抗菌活性を百分率で比較するバイオアッセイ試験を実施した。これらの結果を **Fig. 17** に示す。



**Fig. 17.** (a) Distribution of modified aminoglycosides by AAC(6')-APH(2'')-catalyzed reactions. (b) Residual activities of **3a** and antibiotics (ABK, GM, and KM-B).

Fig. 17(a) に示すように、酵素濃度が 0.1 mg protein/mL の酵素反応において、**3a** から官能基修飾アミノグリコシド (**3a-Ac**, **3a-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>**, **3a-Ac-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>**) の生成は認められなかった。しかしながら、ABK、GM、および KM-B の酵素反応では、対応する 6'-アセチル化体 (**ABK-Ac**, **GM-Ac**, **KM-B-Ac**) および 2''-リン酸化体 (**ABK-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>**, **GM-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>**, **KM-B-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>**) の生成が認められた。さらに、GM の酵素反応では、6'位と 2''位が共に修飾を受けた **GM-Ac-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>** が僅かに観測された。

酵素濃度を 0.3 mg protein/mL に高めても、**3a** は修飾酵素 AAC(6')-APH(2'') の作用を受けなかった。しかしながら、GM および KM-B はすべて、6'-アセチル化体 (**GM-Ac**, **KM-B-Ac**) および 2''-リン酸化体 (**GM-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>**, **KM-B-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>**) に変換された。さらに、これらの酵素反応では、6'位と 2''位がそれぞれアセチル化およびリン酸化を受けた **GM-Ac-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>** および **KM-B-Ac-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>** も生成した。

酵素濃度をさらに高濃度 (1.0 mg protein/mL) にすると、この傾向は強まり、ABK は、6'-アセチル化体 (**ABK-Ac**) および 2''-リン酸化体 (**ABK-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>**) に変換された。また、GM および KM-B との反応では、6'位と 2''位がそれぞれアセチル化およびリン酸化を受けた **GM-Ac-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>** および **KM-B-Ac-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>** の生成量が 40%~60% に増加することが明らかとなった。しかしながら、**3a** との反応では、2''-リン酸化体 (**3a-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>**) が約 20% 生成するにとどまった。

一方、LCMS 分析 (Fig. 17(a)) とバイオアッセイ試験 (Fig. 17(b)) を比較すると、**3a**、ABK、GM および KM-B の残存抗菌活性は、いずれも、AAC(6')-APH(2'') により修飾を受けた抗菌薬の質量分布が増加すると平行に減弱することが明らかとなった。しかしながら、**3a** の残存抗菌活性の低下率は、明らかに他の抗菌薬のそれよりも、小さかった。

以上の結果から、ABK の 5 位および 4''位のヒドロキシ基をアクシャル配置に変換すると、AAC(6')-APH(2'') に対する 6 位および 2''位のヒドロキシ基の安定性が上昇し、抗菌活性も保持していることが明らかとなった。

## 第 2 項 臨床分離株に対する感受性分布試験

次に、**3a** について、臨床分離株 (241 株) に対する抗菌活性を測定した。この分離株の内訳は、グラム陽性菌として、MRSA (54 株)、MRCNS (53 株)、*E. faesium* (29 株)、グラム陰性菌として *E. coli* (26 株)、*K. pneumoniae* (25 株)、*P. aeruginosa* (54 株) である。また、各菌種に対して臨床上一般的に使用される各種抗菌薬についても抗菌活性を測定した。Table 6 に MIC 値の Range、50% 最小発育阻止濃度 (MIC<sub>50</sub>) および 90% 最小発育阻止濃度 (MIC<sub>90</sub>) の値を示す。

MRSA に対して、化合物 **3a** は MIC<sub>50</sub> = 0.25 μg/mL および MIC<sub>90</sub> = 0.25 μg/mL を示した。現在臨床で使用されている抗 MRSA 薬の MIC<sub>50</sub> および MIC<sub>90</sub> の値と比較すると、化合物 **3a** がこれらの抗 MRSA 薬よりも強い抗菌活性を示していることが判明した。また、メチシリン耐性コアグラマーゼ陰性ブドウ球菌 (MRCNS) に対しても、化合物

**3a** は、MIC<sub>50</sub> および MIC<sub>90</sub> がそれぞれ 0.12 µg/mL と強い抗菌活性を維持していた。一方、*E. faecium* に対して、MIC<sub>50</sub> および MIC<sub>90</sub> は、他のアミノグリコシド系抗菌薬と同等の値を示した。*E. coli* に対する化合物 **3a** の MIC<sub>50</sub> および MIC<sub>90</sub> は、共に 1 µg/mL であり、ABK のそれと同等であった。また、化合物 **3a** は AMK、GM および TOB と同等かそれ以上に優れた抗菌活性を示した。*K. pneumoniae* に対する化合物 **3a** の MIC<sub>50</sub> および MIC<sub>90</sub> は、共に 0.5 µg/mL であり、既存アミノグリコシド系抗菌薬のそれと殆ど差はなかった。*P. aeruginosa* に対する化合物 **3a** の MIC<sub>50</sub> および MIC<sub>90</sub> は、それぞれ 1 および 4 µg/mL であり、測定した薬剤の中で最も優れた抗菌活性を示した。以上より、化合物 **3a** は臨床分離株である MRSA および緑膿菌に対し、強い抗菌活性を示し、その抗菌活性は、現在臨床で使用されている抗菌薬と同等以上の効果が期待できる薬剤であることを確認した。

**Table 6.** Antimicrobial activity of ABK derivative **3a** against clinical isolates of bacteria

Strain		MIC (µg/ml)				Strain		MIC (µg/mL)			
(No. of tested)	Antibiotic	Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	(No. of tested)	Antibiotic	Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>		
MRSA (n = 54)	<b>3a</b>	0.12 - 0.5	0.25	0.25	<i>E. coli</i> (n = 26)	<b>3a</b>	0.5 - 2	1	1		
	Arbekacin	0.25 - 8	0.5	2		Arbekacin	0.5 - 2	1	1		
	Gentamicin	0.25 - >128	0.5	128		Gentamicin	0.5 - >128	0.5	2		
	Amikacin	2 - 64	8	16		Amikacin	1 - 4	2	2		
	Vancomycin	0.5 - 2	1	1		Tobramycin	0.5 - 64	1	2		
	Teicoplanin	0.5 - 2	1	1		Imipenem	0.12 - 0.25	0.12	0.12		
	Linezolid	1 - 2	1	2		Cefepime	0.008 - 0.12	0.03	0.12		
MRCNS (n = 53)	<b>3a</b>	0.03 - 1	0.12	0.12	Ciprofloxacin	0.008 - 16	0.03	0.25			
	Arbekacin	0.03 - 2	0.5	2	<i>K. pneumoniae</i> (n = 25)	<b>3a</b>	0.25 - 1	0.5	0.5		
	Gentamicin	0.06 - >128	32	>128		Arbekacin	0.25 - 1	0.5	1		
	Amikacin	0.12 - 64	4	32		Gentamicin	0.25 - 1	0.5	0.5		
	Vancomycin	0.25 - 2	2	2		Amikacin	1 - 2	1	1		
	Linezolid	0.25 - 4	2	4		Tobramycin	0.25 - 1	0.5	0.5		
	Imipenem	0.03 - 128	16	64		Imipenem	0.06 - 0.25	0.12	0.12		
Ciprofloxacin	0.12 - >128	16	64	Cefepime		0.02 - 0.06	0.03	0.06			
<i>E. faecium</i> (n = 29)	<b>3a</b>	4 - >128	8	128	Ciprofloxacin	0.008 - 0.5	0.03	0.06			
	Arbekacin	4 - 64	8	64	<i>P. aeruginosa</i> (n = 54)	<b>3a</b>	0.25 - 32	1	4		
	Gentamicin	4 - >128	8	>128		Arbekacin	0.5 - 128	2	16		
	Amikacin	32 - >128	32	>128		Gentamicin	0.5 - >128	4	>128		
	Vancomycin	0.5 - 2	0.5	1		Amikacin	0.5 - 128	4	32		
	Linezolid	2 - 2	2	2		Tobramycin	0.25 - >128	1	128		
	Imipenem	4 - >128	>128	>128		Imipenem	1 - >128	4	32		
Ciprofloxacin	2 - >128	64	>128	Cefepime		1 - >128	8	128			
					Ciprofloxacin	0.06 - >128	0.5	64			

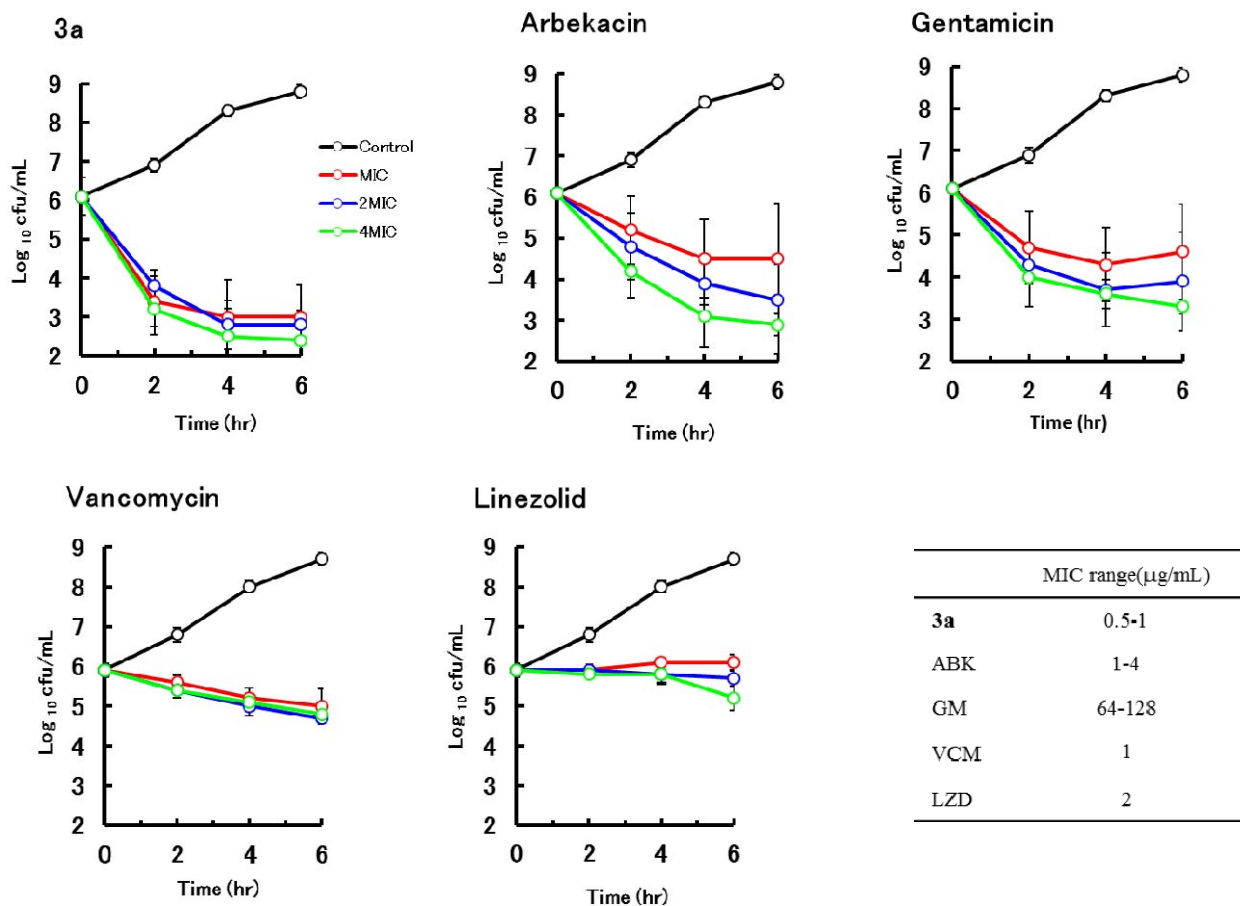
### 第3項 殺菌作用

次に化合物 **3a**、アミノグリコシド系抗菌薬 (ABK、GM)、および非アミノグリコシド系の抗 MRSA 薬 (VCM (バンコマイシン) および LZD (リネゾリド)) について、MIC の 1 ~ 4 倍の薬剤を作用させ経時的に残存生菌数を測定した。残存生菌数は、経時的に培養液を回収、寒天平板上に塗り広げて発育するコロニー数 (cfu/mL) により算出した。試験には GM 耐性臨床分離 MRSA 株 5 株を使用した。Fig. 18 に、生菌数 (単



位：log<sub>10</sub> cfu/mL) の経時的変化を示す。アミノグリコシド系抗菌薬 **3a**、ABK、および GM の 3 剤を添加した場合は、生菌数が濃度依存的に低下した。特に、化合物 **3a** は、すべての濃度において、薬剤作用後 2 時間で、生菌数を 2 log 以上減少させる殺菌効果が認められた。一方、非アミノグリコシド系抗 MRSA 薬である VCM および LZD を添加した場合は、薬剤作用後 6 時間経過しても、生菌数の低下は 1 log 程度にとどまった。

以上の結果から、アミノグリコシド系抗菌薬 (**3a**、ABK、および GM) は、現在臨床で使用されている非アミノグリコシド系の抗 MRSA 薬 (VCM および LZD) よりも殺菌力が高いことが確認された。また、化合物 **3a** はアミノグリコシド系抗菌薬 (ABK および GM) と同等もしくはそれ以上の殺菌力を有していることが明らかとなった。



**Fig. 18.** Bactericidal activity of **3a** and other drugs against GM resistant MRSA 5 strains

## 小括

医療現場で最も検出頻度が高いメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)、および、治療が困難なことが多い多剤耐性緑膿菌(MDRP)を含む薬剤耐性緑膿菌に対する治療薬の開発は、臨床現場での治療の選択の幅を広げ、医療に貢献することが期待できる。抗MRSA薬は、日本国内では現在5薬剤が使用されているが、グラム陽性菌にのみに有効な薬剤が多い。しかし、MRSAとともにグラム陰性菌が検出される例も多く、グラム陽性菌と陰性菌に有効な薬剤は感染症治療において有用と考えられる。

本章では、アミノグリコシド系抗菌薬アルベカシン(ABK)が、MRSA(グラム陽性菌)および緑膿菌(グラム陰性菌)に抗菌活性を示すことに注目し、さらに抗菌活性の向上を目指して、ABKの化学修飾に基づく新規アミノグリコシド系抗菌薬を探索した経緯を述べた。化学修飾のデザインは、A環5位アクシャル配置に置換基を導入すると、C環2"位のヒドロキシ基の近傍が立体的に遮蔽されて、AAC(6')-APH(2")およびAAD(4,4")に対する安定性が増強するとの仮説に基づいて行った。

第1節では、ABKのA環5位エクアトリアル配置のヒドロキシ基を保持して、5位アクシャル配置に種々の置換基を導入したABK類縁体**1**の合成と評価を述べた。ABK類縁体**1**は、予想どおりABKよりもAAC(6')-APH(2")およびAAD(4,4")産生株(*S. aureus* MF490(MRSA)株)に対する抗菌活性が向上することが明らかとなった。しかしながら、ABK類縁体**1**は、緑膿菌(グラム陰性菌)に対する抗菌活性が低下する傾向が認められた。これは、**1**のA環5位に極性基が多数存在することにより、細胞壁透過性が低下したためと予想される。

そこで、第2節では、ABKのエクアトリアル配置の5位ヒドロキシ基を除去し、5位アクシャル配置にのみ置換基を導入したABK類縁体**2**の合成・評価を検討した。ABK類縁体**2**は、ABK類縁体**1**と比較して、さらに、*S. aureus* MF490(MRSA)株に対する抗菌活性が向上する傾向が認められた。また、グラム陰性菌(*E. coli* NIH JC-2、*P. aeruginosa* PAO1)に対する抗菌活性も向上する傾向が認められた。

臨床で分離されたMRSAのなかには、ABKのC環4"位のヒドロキシ基をアデニル化する修飾酵素(AAD(4',4"))の酵素活性が亢進している株も知られており、修飾酵素AAD(4',4")に対する抵抗性をさらに高めることは、広範なスペクトルを示す抗菌薬の開発に繋がると考えた。第3節では、第2節で強い抗菌活性が確認できたABK類縁体**2a-2c**について、AAD(4',4")に対する安定性向上を目的として、4"位のヒドロキシ基を反転させたABK類縁体**3a-3c**の合成と評価を検討した。これらの類縁体の中でも、特に化合物**3a**は、4"位ヒドロキシ基が反転していない化合物**2a**と比較して、予想どおり*S. aureus* MF490(MRSA)株およびグラム陰性菌(*E. coli* NIH JC-2、*P. aeruginosa* PAO1)に対する抗菌活性が向上する傾向がみられた。

第4節では、*S. aureus* RN4220/pMF490由来のAAC(6')-APH(2")の濃度を変化させて、ABK類縁体**3a**、ABK、GMおよびKM-Bとの酵素反応を行い、酵素反応により生成し

た修飾を受けたアミノグリコシドの生成量を LCMS で定量分析した。また、バイオアッセイによる抗菌活性の確認も行った。これらの分析から、既存の抗菌薬 (ABK、GM、KM-B) と比較して、化合物 **3a** は AAC(6')-APH(2'')による修飾アミノグリコシドの生成量は低く、抗菌活性の向上は AAC(6')-APH(2'')に対する安定性が顕著に向上したことによることが明らかとなった。化合物 **3a** は、臨床分離株 (241 株) に対する感受性分布試験でも優れた抗菌活性を示した。また、GM 耐性 MRSA 株に対する強い短時間殺菌効果を確認した。これらの結果より、化合物 **3a** は MRSA および MDRP に有効な薬剤であると判断し、開発候補化合物として選択された。

## 第2章 メタロβ-ラクタマーゼ阻害剤の探索

メタロβ-ラクタマーゼ (MBL) はペニシリン系、セフェム系およびカルバペネム系などほぼすべてのβ-ラクタム系抗菌薬を分解する強力なβ-ラクタマーゼである。MBLの産生は緑膿菌がβ-ラクタム系抗菌薬に対して耐性を示す大きな要因の1つとなっている<sup>46</sup>。

β-ラクタム系抗菌薬とMBL阻害剤の併用療法は、薬剤耐性緑膿菌による感染症の治療に有効であると考えられる。特に多剤耐性緑膿菌 (MDRP) ではMBL産生菌が多いことが知られており<sup>47</sup>、この併用療法はMDRP感染症の治療に有効であると推定される。著者は、MDRPを含む薬剤耐性緑膿菌感染症の有効な治療法を提供する目的で、β-ラクタム系抗菌薬と併用可能なMBL阻害剤の創製研究を行った。本章ではリード化合物の探索、その構造展開と最適化及び高次評価について5節に亘り詳述する。

### 第1節 リード化合物の探索

緒論で概説したように、MBL阻害剤については、強い酵素阻害活性を有する数種の化合物が報告されている<sup>28-32</sup>。しかし、薬剤耐性緑膿菌、特にMDRPを対象とする治療薬として、これらのMBL阻害剤がβ-ラクタム系抗菌薬と共に使用されている治療例は報告されていない。その理由として、①緑膿菌は、外膜および細胞壁の構造上、薬剤の菌体内への透過性が他の菌に比べ低いこと、②緑膿菌には多くの異物排出ポンプが存在するため、わずかに透過した薬剤も排出されやすいことが挙げられる (Fig.19)。すなわち、これらの緑膿菌の機能に対して、既存のMBL阻害剤はその物性が十分に対応できていないことが推定される。β-ラクタム系抗菌薬を用いる緑膿菌感染症に対する併用療法において、有効なMBL阻害剤を見出すためには、高い阻害活性を有し、さらに菌体内への透過性の高い化学構造 (リード化合物) を探索することが必要と考えた。

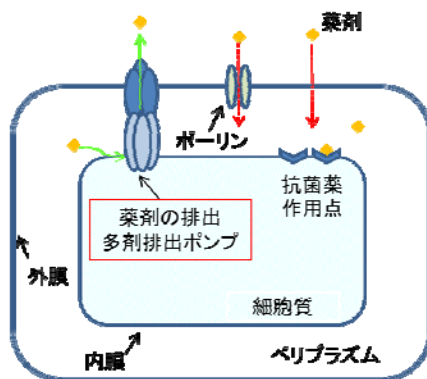


Fig.19. The function of cell wall in *P. aeruginosa*

リード化合物の探索において、目的とする生物活性を示す化学構造を見出す方法は、標的分子のタンパク質構造やリガンドの構造情報に基づき、理論的にリード化合物をデザイン・合成する方法 (rational approach) と多数の化合物をランダムにスクリーニングする方法 (random approach) に大別される<sup>48</sup>。rational approach は標的分子等に親和性の高い分子の構造の最適化には有効であるが、薬物透過性と排出能のバランスに起因する菌体内の薬物量など、物理化学的な性質を踏まえたリード化合物の探索には必ずしも有効ではない。一方 random approach は、スクリーニング系を適切に選択することにより、菌体内の薬物量などの物理化学的な性質において、好ましいリード化合物の探索が可能であると考えられる。特に、ロボット工学の発展により利用可能となったハイスループットスクリーニング (HTS) は random approach の 1 つとしてリード化合物の探索に利用されている<sup>48</sup>。そこで、著者は社内化合物ライブラリー (91496 化合物) について以下のスクリーニング系を組み合わせ、HTS を行い、MBL 阻害剤のリード化合物を探索した (Fig. 20)。

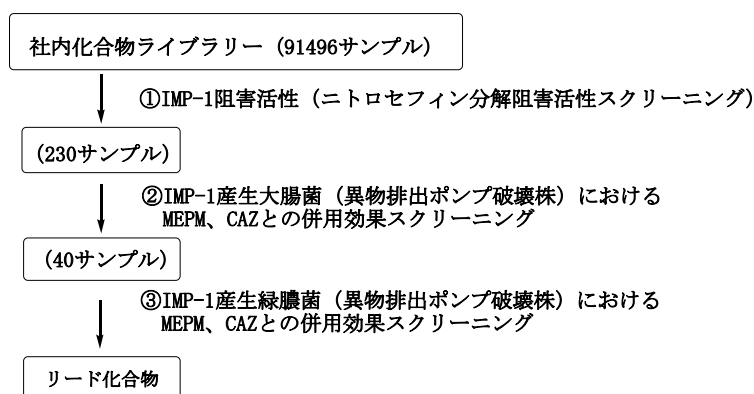


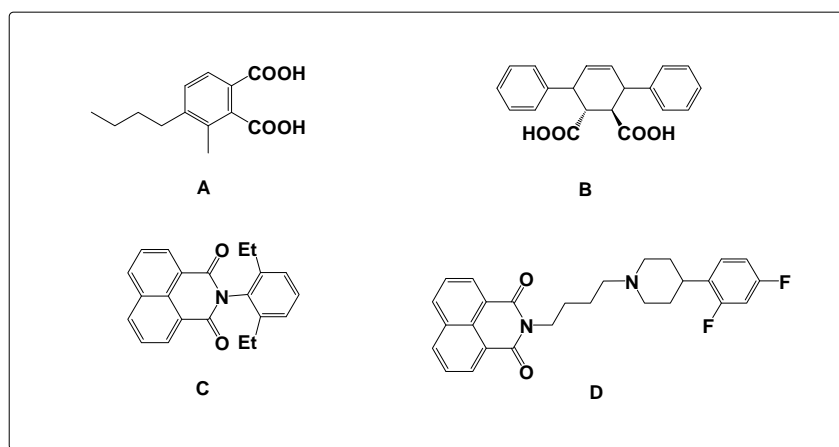
Fig. 20. Scheme for discovery of the lead compound through HTS

HTS の戦略として、はじめに MBL 阻害活性を有する化合物を見出した後 (1 次スクリーニング)、菌体内の薬物量を踏まえた以下の 2 次および 3 次スクリーニングを実施する計画を立てた。菌体内の薬物量は薬物の細胞壁透過性と菌体に備わった薬物排出能のバランスにより決定される。グラム陽性菌とグラム陰性菌では細胞壁構造の違いにより、一般に、薬物の透過性はグラム陽性菌よりもグラム陰性菌の方が低いことが知られている。また、グラム陰性菌の中でも特に、緑膿菌は薬物の細胞壁透過性が低いことが知られている<sup>49,50</sup>。

そこで、HTS では、典型的なグラム陰性菌として、大腸菌 (排出ポンプ欠損株) を選択し、1 次スクリーニングで抽出された化合物が共存する時の  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の抗菌活性を評価する 2 次スクリーニングを実施

することとした。 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬としてはメロペネム (MEPM)<sup>51</sup> 及びセフトジジム (CAZ)<sup>52</sup> を用いることとした。さらに、抽出された化合物について緑膿菌 (排出ポンプ欠損株) を用いて同じ評価 (3次スクリーニング) により、リード化合物を見出すこととした。

すなわち、社内化合物ライブラリー (91496 化合物) に対し、初めにニトロセフィン を基質とする MBL 阻害活性を指標とし<sup>53</sup>、1次スクリーニングを実施した。MBLは遺伝子的にいくつかの型が知られているので<sup>54</sup>、日本国内で報告の多い IMP-1 (IMP型)<sup>55</sup> に対する阻害活性を指標とした。このスクリーニングでは、ライブラリー化合物の濃度を 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に固定し、酵素阻害率が 50%以上の化合物を抽出した。その結果 IMP-1 阻害活性を有する 230 化合物を抽出することに成功した。次に、この 230 化合物について、これらの化合物が共存する時の MEPM 及び CAZ の IMP-1 産生大腸菌 (異物排出ポンプ欠損株) に対する抗菌活性を評価した (2次スクリーニング)。その結果、MEPM 及び CAZ の抗菌活性を保持する作用を有する 40 化合物を見出すことができた。さらに、得られた 40 化合物について、これらの化合物が共存する時の MEPM 及び CAZ の IMP-1 産生緑膿菌 (異物排出ポンプ欠損株) に対する抗菌活性測定した。その結果、**Fig 21** に示す 4 化合物 (A~D) を抽出することができた。これらの化合物の中で、1) 構造展開の多様性、2) 緑膿菌の異物排出ポンプに対する抵抗性を考慮して、リード化合物を以下のように選択した。一般に脂溶性が高い化合物は、異物排出ポンプにより排出されやすいことが知られている<sup>56</sup>。また第1章で述べたアミノグリコシド系抗菌薬の探索研究において、フェニル基を有するアミノグリコシド系抗菌薬は異物排出ポンプを有する菌株に対する抗菌活性の低下が観測されている。以上を踏まえて、分子量が大きく、脂溶性の高い化合物は異物排出ポンプにより排出されやすいと推定し、A~D の 4 化合物中、フェニル基の数が最も少なく、分子量も小さなフタル酸誘導体 A をリード化合物として選択した。



**Fig. 21.** Structures for candidates of the lead compound

## 第 2 節 リード化合物の構造展開<sup>57</sup>

リード化合物 **A** の 2 つのカルボキシ基は、IMP-1 の活性中心に存在する Zn と結合し阻害活性を示すと推定した (Fig. 22)。そこで著者は構造展開にあたり、2 つのカルボキシ基については保存し、ベンゼン環上の 3 位および 4 位の置換基の影響を確認した。すなわち、3 位の置換基を水素原子に置き換えて、4 位の置換基を種々変換したフタル酸誘導体 **41a–41e** の IMP-1 阻害活性を評価した (Table 7)。なお、化合物 **41a–41e** の合成法については、第 4 節「フタル酸誘導体の合成」で述べる。

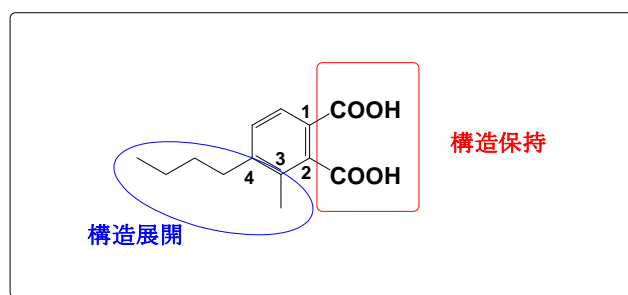


Fig. 22. Structural moieties in modification of the lead compound A

はじめに、ニトロセフィンを基質としてリード化合物 **A** の IMP-1 阻害活性を評価<sup>53</sup>したところ、 $IC_{50}$  値は 16  $\mu$ M を示した。3 位のメチル基を除去して、4 位の *n*-ブチル基を保持した化合物 **41a** は、弱いながら IMP-1 阻害活性 ( $IC_{50}=243 \mu$ M) を示した。しかしながら、*n*-ブチル基を減炭したメチル基、嵩高い *tert*-ブチル基、あるいは平面性の高いフェニル基に置き換えたフタル酸誘導体 (**41b**、**41c** および **41d**) はいずれも、IMP-1 阻害活性を示さなかった。さらに、3 位および 4 位に置換基のないフタル酸 (**41e**) も IMP-1 阻害活性は示さなかった。以上の結果より、IMP-1 阻害活性の発現には、フタル酸ベンゼン環上の 3 位の置換基が必須であることが示唆された。

Table 7 Inhibitory activity of 4-substituted phthalic acids against IMP-1

Compd.	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>
<b>A</b>	Me	<i>n</i> -Bu	16.0
<b>41a</b>	H	<i>n</i> -Bu	243
<b>41b</b>	H	Me	>300
<b>41c</b>	H	<i>tert</i> -Bu	>300
<b>41d</b>	H	Ph	>300
<b>41e</b>	H	H	>100

<sup>a</sup> Determined by measuring inhibition rate for IMP-1 mediated hydrolysis of Nitrocefin.

### 第3節 3位置換フタル酸誘導体の構造活性相関<sup>57</sup>

本節では、第2節の知見を踏まえ、フタル酸4位を水素原子で固定し、3位置換基を種々変換したフタル酸誘導体（3位置換フタル酸誘導体）のIMP-1阻害活性およびフタル酸誘導体共存下でのβ-ラクタム系抗菌薬の抗菌活性を測定した。本検討では3位置換フタル酸誘導体を1)炭素-炭素結合で3位に置換基を導入したフタル酸誘導体（3C-フタル酸誘導体）、2)炭素-酸素結合で3位に置換基を導入したフタル酸誘導体（3O-フタル酸誘導体）、3)炭素-窒素結合で3位に置換基を導入したフタル酸誘導体（3N-フタル酸誘導体）に分類して、各系統についてIMP-1阻害活性と併用効果を検討した（Fig. 23）。なお、これらのフタル酸誘導体の合成法については、第4節「フタル酸誘導体の合成」に記載する。

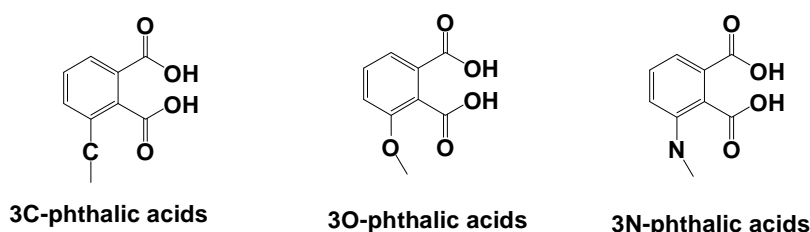


Fig. 23. 3-Substituted phthalic acids

#### 第1項 3C-フタル酸誘導体の活性評価<sup>57</sup>

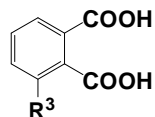
リード化合物Aの3位置換基はメチル基であることから、はじめに、3位にメチル基を有する3C-フタル酸誘導体42aおよび関連類縁体のIMP-1阻害活性を測定した。結果をTable 8に示す。42aは、活性が弱いもののIMP-1阻害活性（ $IC_{50}=160\ \mu\text{M}$ ）を示すことを確認した。メチル基の代わりに、平面性の高いフェニル基で置換した3C-フタル酸誘導体42bは $IC_{50}=1.00\ \mu\text{M}$ を示し、42aよりもIMP-1阻害活性が160倍向上することが判明した。しかし、42bは水溶解性が低く、物性面で難点を有していた。当社は、MBL阻害剤を注射剤として開発する予定であったため、阻害活性と水溶解性を兼ね備えた誘導体を見出す必要があった。

そこで、3位フェニル基に極性基を導入した誘導体42c-42fを合成して、阻害活性と水溶解性を検討した。これらのフタル酸誘導体の $IC_{50}$ 値とclogP値をTable 8に示す。ヒドロキシ基あるいはカルボキシ基を3位フェニル基のメタ位あるいはパラ位に導入した化合物42c-42fについて、IMP-1阻害活性を確認したところ、メタ位にカルボキシ基を有する42eを除き、すべての化合物が強い阻害活性（ $IC_{50}=1.50\sim 2.20\ \mu\text{M}$ ）を示した。しかし、これらの化合物の水溶解性は42bのそれとほとんど変わらなかった。脂溶性の高いフェニル基を有する3C-フタル酸誘導体は、水溶解性の改善は望めないと判断し、末端にヒドロキシ基を有するアルキル鎖の導入を試みた。その結果、3位に3-ヒドロキシプロピル基を有する誘導体42gは、阻害活性（ $IC_{50}=\$



13.2  $\mu\text{M}$ ) が低下するものの、3位フェニル置換誘導体 **42b–42f** よりも高い水溶解性を示した。clogP の値は、**42g** が高い水溶解性を有することを支持した。

**Table 8.** Inhibitory activity of 3C-phthalic acids against IMP-1 and their clogP values

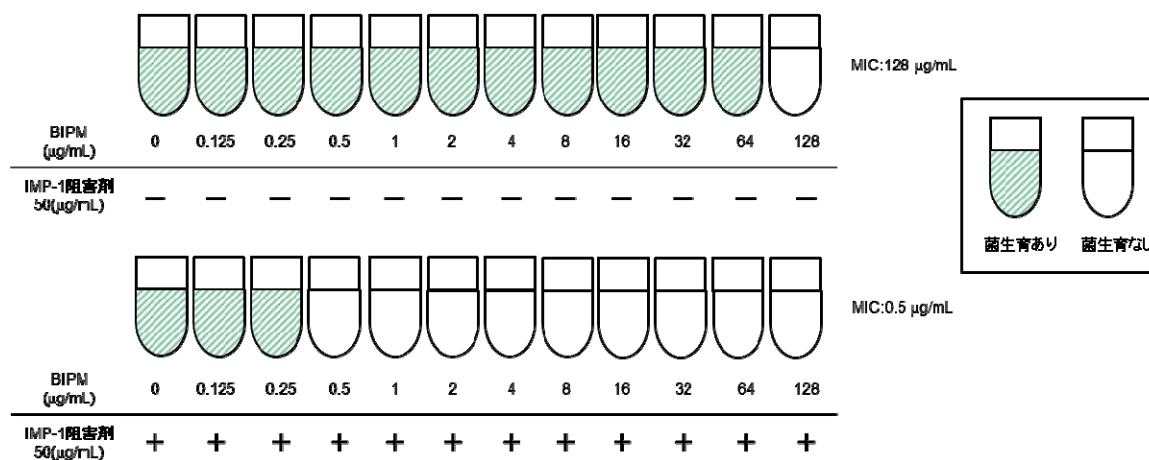


Compd.	R <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	clog P <sup>b</sup>
<b>42a</b>	-CH <sub>3</sub>	160	0.931
<b>42b</b>		1.00	1.82
<b>42c</b>		1.70	1.18
<b>42d</b>		1.50	1.18
<b>42e</b>		17.9	1.58
<b>42f</b>		2.20	1.58
<b>42g</b>		13.2	-0.598

<sup>a</sup>Determined by measuring inhibition rate for IMP-1 mediated hydrolysis of Nitrocefin,

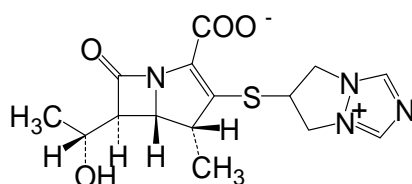
<sup>b</sup>Calculated by Chem Bio Draw Ultra 12.0.

次に 3C-フタル酸誘導体存在下での IMP-1 産生緑膿菌に対する BIPM の抗菌活性を測定した。



**Fig. 24.** Schematic illustration for combination effect test.

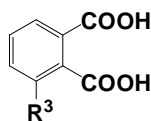
この検討では、IMP-1 産生緑膿菌として、*P. aeruginosa* PAO1/pMS363<sup>58</sup> と *P. aeruginosa* KG5002<sup>59</sup>/pMS363<sup>58</sup> ( $\Delta$ mexAB) を用いた。mexAB はカルバペネム系抗菌薬の排出に関わる緑膿菌の異物排出ポンプの 1 つである。mexAB 発現株と欠損株に対する MIC は、菌体内の薬物量の評価に利用できる、両者の MIC 比が小さいほど、異物排出ポンプの影響を受けにくい阻害剤と評価することができる。評価に使用した  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬ピアペネム (BIPM)<sup>60</sup> の構造を **Fig. 25** に示す。



**Fig. 25.** Structure of BIPM

この評価での目標値として、*P. aeruginosa* PAO1/pMS363 株に対して IMP-1 阻害剤が存在する場合の BIPM の MIC 値が 2  $\mu$ g/mL 以下である場合に、その IMP-1 阻害剤を開発候補品とする目安を立てた。これは、1) 親株であり、IMP-1 を産生していない *P. aeruginosa* PAO1 株に対する BIPM の MIC 値が 3.13  $\mu$ g/mL<sup>60</sup> であること、2) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の基準により、カルバペネム系抗菌薬 (MEPM やイミペネム (IPM)) の感受性 (S) 判定が MIC 値 2  $\mu$ g/mL 以下であることに基づいて設定した<sup>61</sup>。なお、BIPM の IMP-1 産生緑膿菌に対する抗菌活性は MIC = 64 ~ 128  $\mu$ g/mL を示すことから、IMP-1 産生緑膿菌は BIPM に対し耐性を示すことを確認した。また、3C-フタル酸誘導体は、単独では抗菌活性を示さないことを確認した。3C-フタル酸誘導体の併用効果の評価結果を **Table 9** に示す。

**Table 9.** MICs of BIPM against *P. aeruginosa* producing IMP-1 in the presence of 3C-substituted phthalic acids



Compd.	R <sup>3</sup>	MIC(μg/mL) of BIPM with the inhibitor(50 μg/mL)		MIC ratio ②/①
		<i>P. aeruginosa</i> KG5002 <sup>59</sup> /pMS363 <sup>58</sup> ΔmexAB①	<i>P. aeruginosa</i> PAO1/pMS363 <sup>58</sup> mexAB(wild type)②	
42a	-CH <sub>3</sub>	4	16	4
42b		≤ 0.5	2	≥ 4
42c		0.5	4	8
42d		≤ 0.25	1	≥ 4
42e		32	64	2
42f		0.5	2	4
42g		1	4	4

The MIC of BIPM against *P. aeruginosa* producing IMP-1 was determined to be 64-128 μg/mL

BIPM と IMP-1 阻害剤 **42a–42g** (50 μg/mL) の存在下、ΔmexAB 株に対する BIPM の抗菌活性は、**42e** を添加した系を除き、すべての系で MIC ≤ 0.25~4 μg/mL を示した。すなわち、BIPM 単独使用の場合と比較し、最大で 512 倍 MIC 値を低下させることを確認した。

一方、*P. aeruginosa* PAO1 / pMS363 株に対する抗菌活性は、誘導体 **42e** を添加した系を除き、MIC=1~16 μg/mL を示した。特に 4-ヒドロキシフェニル基を有する **42d** 存在下では MIC=1 μg/mL と強い抗菌活性を示した。この MIC 値は、BIPM 単独使用時と比較して、128 倍低い値であった。しかしながら、**42a–42g** の MIC 比は 2~8 であり、IMP-1 阻害剤 **42a–42g** は異物排出ポンプの影響を受けていると推定された。3-ヒドロキシプロピル基を有する **42g** の IMP-1 阻害活性 (IC<sub>50</sub>=13.2 μM) は、他の 3C-フタル酸誘導体よりも弱い。しかしながら、**42g** 存在下の *P. aeruginosa* PAO1 / pMS363 株と ΔmexAB 株に対する MIC 値は他の 3C-フタル酸誘導体の MIC 値と同等であった。

以上の結果より、3C-フタル酸誘導体の中では、4-ヒドロキシフェニル

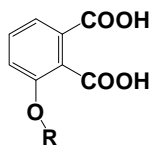
基を有する **42d** は IMP-1 阻害活性および 3C-フタル酸誘導体存在下の BIPM の抗菌活性について目標値 (MIC=2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) に近づくことができたが、物性面での改善が必要であることが判明した。一方、3-ヒドロキシプロピル基を有する **42g** は IMP-1 阻害活性が弱いものの、3C-フタル酸誘導体の中では、菌体内薬物量と水溶解性の両面で好ましい IMP-1 阻害剤であると推定された。

## 第 2 項 3O-フタル酸誘導体の活性評価<sup>62</sup>

3C-フタル酸誘導体は、予想通り強い IMP-1 阻害活性と IMP-1 産生緑膿菌に対する BIPM の抗菌活性向上への寄与が見られたが、炭素-炭素結合形成反応を利用して合成しているため、3 位置換基に多様性を持たせることは困難であった。そこで、3 位置換基に多様性を持たせるために、合成の簡便さを踏まえて、炭素-酸素結合で 3 位に置換基を導入した 3O-フタル酸誘導体の IMP-1 阻害活性と水溶解性について検討した。結果を **Table 10** に示す。

3 位酸素上の置換基が水素である **43a** は IMP-1 阻害活性を示さなかったが、メチル基を導入した **43b** は、弱いながらも IMP-1 阻害活性 ( $\text{IC}_{50}=142 \mu\text{M}$ ) を示した。置換基の嵩高さ、アルキル基の長さ、疎水性などの影響を確認するために **43c-43h** を合成し、IMP-1 阻害活性を測定した。いずれの化合物も強い阻害活性 ( $\text{IC}_{50}=2.00\sim 7.40 \mu\text{M}$ ) を示したが、プロピル基の末端にフェニル基を有する 3O-フタル酸誘導体 **43g** が最も強い阻害活性を示すことが明らかになった。アルキル鎖の長さが IMP-1 阻害活性へ与える影響は、比較的少ないことが示唆された。水溶解性の向上を考慮し、末端にヒドロキシ基あるいはカルボキシ基を有するアルキル置換体 **43i-43k** の IMP-1 阻害活性を測定した。これらの化合物の IMP-1 阻害活性は減弱したが活性は保持していた ( $\text{IC}_{50}=18.8\sim 47.8 \mu\text{M}$ )。 **43i-43k** は、 $\text{clogP}$  値が **43c-43h** と比較して著しく低下しており、水溶解性において好ましいプロファイルを有するものと推定される。

**Table 10.** Inhibitory activity against IMP-1 and clogP values for 3O-substituted phthalic acids



Compd	R	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	clog P <sup>b</sup>
43a	—H	>300	0.996
43b	—Me	142	0.307
43c		2.60	2.34
43d		7.40	2.71
43e		5.10	1.89
43f		2.00	4.02
43g		1.70	2.78
43h		5.80	3.31
43i		18.8	0.447
43j		47.8	-0.566
43k		21.4	-0.172

<sup>a</sup>Determined by measuring inhibition rate for IMP-1 mediated hydrolysis of Nitrocefin,

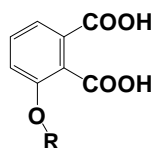
<sup>b</sup>Calculated by Chem Bio Draw Ultra 12.0.

次に、3O-フタル酸誘導体の代表的化合物について、その化合物が共存する時の BIPM の抗菌活性を前項の評価法に準じて測定した。評価結果を **Table 11** に示す。

はじめに、疎水性の高い IMP-1 阻害剤 **43c**, **43f**, **43g**, および **43h** (50  $\mu$ g/ml) と BIPM が共存する系で  $\Delta$ mexAB 株に対する抗菌活性を測定したところ、MIC 値は MIC  $\leq$  0.5~4  $\mu$ g/mL を示し、強い抗菌活性を示した。

しかし、*P. aeruginosa* PAO1 / pMS363 株に対しては **43c** 存在下の BIPM の MIC 値が 16  $\mu$ g/mL を示したが、他の化合物は MIC = 64  $\mu$ g/mL を示した。さらに、MIC 比 (②/①) は 16~128 であった。以上の結果から、3O-フタル酸誘導体 **43c**, **43f**, **43g**, および **43h** は細胞壁を透過しているが、異物排出ポンプの影響を大きく受けやすいことが示唆された。

**Table 11.** MICs of BIPM against *P. aeruginosa* producing IMP-1 in the presence of 3O-phthalic acids



Compd	R	MIC( $\mu\text{g/mL}$ ) of BIPM with the inhibitor (50 $\mu\text{g/mL}$ )		MIC ratio ②/①
		<i>P. aeruginosa</i> KG5002 <sup>59</sup> /pMS363 <sup>58</sup> $\Delta\text{mexAB}$ ①	<i>P. aeruginosa</i> PAO1/pMS363 <sup>58</sup> mexAB(wild type)②	
43a	—H	64	64	1
43c		$\leq 0.5$	16	$\leq 32$
43f		4	64	16
43g		0.5	64	128
43h		2	64	32
43i		2	8	4
43j		16	16	1
43k		16	16	1

The MIC of BIPM against *P. aeruginosa* producing IMP-1 was determined to be 64-128  $\mu\text{g/mL}$

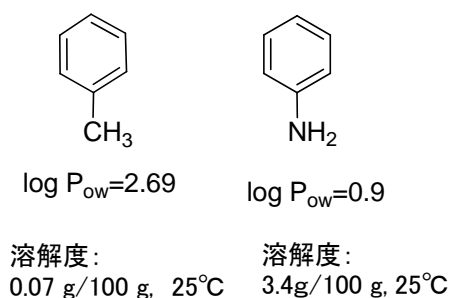
次に、3O-フタル酸誘導体のうち、カルボキシ基やヒドロキシ基を有し、親水性の高い誘導体 **43i**、**43j** および **43k** の生物活性を検討した。カルボキシ基を有する誘導体 **43i** は阻害活性 ( $\text{IC}_{50}=18.8 \mu\text{M}$ ) が疎水性化合物 **43f**、**43h** よりも低い、**43i** 存在下の BIPM の  $\Delta\text{mexAB}$  株に対する抗菌活性は  $\text{MIC}=2 \mu\text{g/mL}$  を示し、疎水性化合物 **43f** および **43h** と同等の生物を示した。また、*P. aeruginosa* PAO1 / pMS363 株に対しては、**43i** 共存下の BIPM の抗菌活性は  $\text{MIC}=8 \mu\text{g/mL}$  を示し、3O-フタル酸誘導体中最も小さい MIC 値を示した。また、ヒドロキシ基を有する 3O-フタル酸誘導体 **43j**、**43k** の IMP-1 阻害活性 ( $\text{IC}_{50}=20\sim 40 \mu\text{M}$ ) は弱かったが、これらの化合物が存在下の BIPM の抗菌活性は、異物排出ポンプの有無にかかわらず  $16 \mu\text{g/mL}$  であった。

以上の結果より親水性置換基を有する 3O-フタル酸誘導体 **43i**、**43j** および **43k** は、細胞壁の透過性が高く、特に **43j** と **43k** は、異物排出ポンプによる排出も受けにくい IMP-1 阻害剤であることが明らかになった。

### 第 3 項 3N-フタル酸誘導体の活性評価<sup>62</sup>

3O-フタル酸誘導体の3位酸素上の置換基を適切に選択することにより、細胞壁透過性と異物排出ポンプの抵抗性を兼ね備え、さらにIMP-1産生緑膿菌に対するBIPMの抗菌活性を保持する作用を有するIMP-1阻害剤**43j**および**43k**を創出することに成功した。**43j**および**43k**は3C-フタル酸誘導体と比較して水溶解性は向上した。しかし、3O-フタル酸誘導体**43j**および**43k**のIMP-1阻害活性は他の誘導体と比較して弱く、そのため**43k**が共存する時のBIPMのMIC値は16 μg/mLまでにとどまった。

そこで、水溶解性とIMP-1阻害活性を兼ね備えた誘導体を目指して、新たな構造展開を検討することとした。一般に、アルキル置換ベンゼンの置換基をアミノ基で置き換えると、もとのアルキル置換ベンゼンよりも水に対する溶解度が増加する傾向が知られている。例えばトルエンのメチル基をアミノ基に置き換えてアニリンに変換すると、水に対する溶解度は大幅に向上することが知られている<sup>63,64</sup> (**Fig. 26**)。また分配係数(logP<sub>ow</sub>)においても、アニリンとトルエンは大きな差異があり、アニリンが高い親水性を有している。



**Fig. 26.** Comparison between toluene and aniline in solubility

著者は、前項までに述べた検討結果および以上に述べた置換ベンゼン誘導体の水溶解性など踏まえて、新たに炭素-窒素結合で3位に置換基を導入した3N-フタル酸誘導体**I**をIMP-1阻害剤としてデザインした(**Fig. 27**)。3N-フタル酸誘導体**I**は、アニリン誘導体の高い水溶解性を有するばかりか、アミノ酸構造を有するため、生体内の液性によっては、分子形**I**あるいは双性イオン形(**II**あるいは**III**)などで存在することが可能で、細胞壁の透過性と異物排出ポンプ抵抗性を有することが期待される。また、3N-フタル酸誘導体は、窒素上に2つの置換基を導入可能であり、3O-フタル酸誘導体よりも、3位置換基に多様性を持たせることが可能であり、広範な構造活性相関が検討できると考えた。

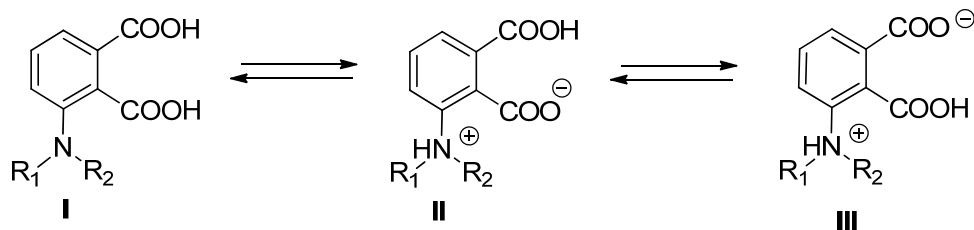


Fig. 27. Equilibrium of 3N-substituted phthalic acids in various pH

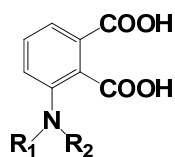
### 3-1 非環状アミン構造を有する 3N-フタル酸誘導体の評価

はじめに、窒素上に置換基を持たない 3-アミノフタル酸 (**44a**) および典型的な置換基を 1 つ導入した化合物 **44b-44d** を合成し、IMP-1 阻害活性およびそれらが共存する時の BIPM の抗菌活性を観察した (Table 12)。**44a-44d** の合成法については、第 4 節「フタル酸誘導体の合成」で記載する。3-アミノフタル酸 (**44a**) は全く IMP-1 阻害活性を示さなかった。しかしながら、*n*-ブチル基、3-ピリジニルメチル基、*n*-ブチロイル基を有する **44b**、**44c** および **44d** は中程度の IMP-1 阻害活性 ( $IC_{50}=13.1\sim 56.4\ \mu\text{M}$ ) を示した。また、3N-フタル酸誘導体 **44b-44d** 存在下の BIPM の抗菌活性を前項に準じて評価したところ、 $\Delta\text{mexAB}$  株では、 $MIC=1\sim 4\ \mu\text{g/mL}$  と強い効果を示したが、*P. aeruginosa* PAO1 / pMS363 株に対しては、 $MIC=32\sim 64\ \mu\text{g/mL}$  を示し、MIC 比は 16~64 であった。以上の結果より、3N-フタル酸誘導体 **44b-44d** は、IMP-1 阻害活性を示すものの、異物排出ポンプによる影響を受けやすい化合物であることが明らかとなった。

一方、フタル酸 3 位窒素上に 2 つのメチル基を導入した **44e** が共存する時の BIPM の抗菌活性は、異物排出ポンプ (*mexAB*) の発現の有無に関わらず、 $MIC=4\ \mu\text{g/mL}$  を示した。この結果より、2 級アミノ基を 3 級アミノ基に変換すると、異物排出ポンプの影響を受けにくいことが示唆された。また、化合物 **44e** は、3O-フタル酸誘導体 **43j** および **43k** と比較し IMP-1 阻害活性はかなり弱いだが、BIPM の抗菌活性を保持することから、高い細胞壁透過性を示すことが示唆された。なお、以上の 3N-フタル酸誘導体の水溶解性は著者が予想したように高く、3 位にアミノ基を導入すると物性面で大幅な改善が出来ることが明らかとなった。



**Table 12.** Inhibitory activity against IMP-1 and clogP values for 3*N*-substituted phthalic acids and MICs of BIPM against *P. aeruginosa* producing IMP-1 in the presence of 3*N*-substituted phthalic acids.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	clog P <sup>b</sup>	MIC(μg/mL) of BIPM with the inhibitor(50 μg/mL)		MIC ratio ②/①
					<i>P. aeruginosa</i>		
					KG5002 <sup>5,9</sup> /pMS363 <sup>58</sup> Δ <i>mexAB</i> ①	<i>P. aeruginosa</i> PAO1/pMS363 <sup>58</sup> <i>mexAB</i> (wild type)②	
<b>44a</b>	H	—H	≅ 300	0.0102	NT <sup>c</sup>	NT <sup>c</sup>	NT <sup>c</sup>
<b>44b</b>	H		13.1	2.76	1	64	64
<b>44c</b>	H		56.4	1.12	2	64	32
<b>44d</b>	H		49.4	1.68	2	32	16
<b>44e</b>	Me	Me	94.5	1.00	4	4	1

The MIC of BIPM against *P. aeruginosa* producing IMP-1 was determined to be 64-128 μg/mL

<sup>a</sup>Determined by measuring inhibition rate for IMP-1 mediated hydrolysis of Nitrocefin,

<sup>b</sup>Calculated by Chem Bio Draw Ultra 12.0.

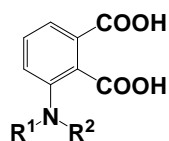
<sup>c</sup>Not tested.

### 3-2 環状アミン構造を有する 3*N*-フタル酸誘導の評価

3位窒素に2つのメチル基を有する3級アミン誘導体 **44e** は、IMP-1 阻害活性が低いものの、高い細胞壁透過性と排出ポンプによる影響を受けにくい物性を有していた。また、水溶解性などにおいても好ましい物性を有していた。そこで、次に、IMP-1 阻害活性の向上を目指して、**44e** の構造展開を検討した。

前述した 3*C*-フタル酸誘導体の構造活性相関において、IMP-1 阻害活性は、直鎖状のアルキル鎖よりもフェニル基など空間的に嵩高い置換基を3位に導入すると高まる傾向が観察されていた。また、3位置換基の末端にヒドロキシ基やカルボキシ基など親水基を導入すると、その置換位置により、併用効果が大きく変化することが観察されていた。そこで、**44e** の非環状アミン構造を環状アミン構造に変換し、さらに環状構造の末端に親水基を導入した類縁体 **45a–45m** を合成して IMP-1 阻害活性を検討した (Table 13)。

**Table 13.** Inhibitory activity against IMP-1 and clogP values for 3*N*-substituted phthalic acids having cyclic amines



Compd.	NR <sup>1</sup> R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	clogP <sup>b</sup>	Compd.	NR <sup>1</sup> R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	clogP <sup>b</sup>
<b>44e</b>		94.5	1.00	<b>45g</b>		2.60	0.209
<b>45a</b>		2.80	1.12	<b>45h</b>		25.6	0.738
<b>45b</b>		10.8	1.68	<b>45i</b>		3.70	0.306
<b>45c</b>		4.40	-0.215	<b>45j</b>		28.7	-0.258
<b>45d</b>		2.70	0.344	<b>45k</b>		5.20	0.160
<b>45e</b>		2.70	-0.410	<b>45l</b>		2.30	1.45
<b>45f</b>		2.10	0.209	<b>45m</b>		12.8	3.61

<sup>a</sup>Determined by measuring inhibition rate for IMP-1 mediated hydrolysis of Nitrocefin,

<sup>b</sup>Calculated by Chem Bio Draw Ultra 12.0.

**Table 14** に示すように、3 位にピロリジンあるいはピペリジンなどの環状アミノ基を導入した化合物 **45a** および **45b** は、予想通り強い IMP-1 阻害活性 (IC<sub>50</sub>=2.80 μM および 10.8 μM) を示し、その阻害活性は **44e** よりも 9~34 倍高まることが明らかとなった。ピロリジンおよびピペリジン環上にヒドロキシ基あるいはヒドロキシメチル基を導入した誘導体 **45c-g** は、IC<sub>50</sub>=10 μM 以下の強い IMP-1 阻害活性を保持していた。しかし、ピペリジン環 4 位にヒドロキシエチル基、ベンジル基あるいはアミノ基を導入した **45h**、**45j** および **45m** の IMP-1 阻害活性は低下した。IMP-1 阻害活性はピペリジン環の 4 位の置換基により大きく変化することが観察された。

次に、以上に合成した IMP-1 阻害剤 **45a-45m** の存在下、BIPM の抗菌活

性を前項に準じて評価した (Table 14)。ΔmexAB 株に対して、**45a-m** 存在下の BIPM の抗菌活性は MIC ≤ 0.25 ~ 8 μg/mL を示した。中でもピペリジン環 4 位にヒドロキシ基を導入した **45e**、メトキシ基を導入した **45i** 存在下での BIPM の抗菌活性は MIC ≤ 0.25 μg/mL を示し、最も強い抗菌活性を示すことが明らかとなった。

一方、*P. aeruginosa* PAO1 / pMS363 株に対しては MIC = 1 ~ 64 μg/mL を示し、阻害剤の構造により BIPM の MIC 値は大きく異なることが明らかとなった。特に、ピペリジン環上にベンジル基等の脂溶性を有する置換基を導入した **45l** および **45m** 存在下での BIPM の抗菌活性 (MIC = 16 ~ 64 μg/mL) は、他の誘導体共存下の BIPM の抗菌活性と比較して弱かった。この結果より、ベンゼン環の数が多く分子量が大きい化合物は異物排出ポンプにより排出されやすいことが示唆された。なお、以上の環状アミン構造を有する 3N-フタル酸誘導体の水溶解性は、予想したように高かった。

以上に述べた IMP-1 阻害活性及び IMP-1 産生緑膿菌に対する IMP-1 阻害剤存在下での BIPM の抗菌活性評価、ならびに分子に不斉中心を持たないことなどを総合的に判断して、フタル酸 3 位に 4-ヒドロキシピペリジニル基を導入した **45e** の高次評価を次に行うこととした。高次評価の結果は、第 5 節で述べる。

**Table 14** MICs of BIPM against *P. aeruginosa* producing IMP-1 in the presence of 3N-substituted phthalic acids of cyclic amines

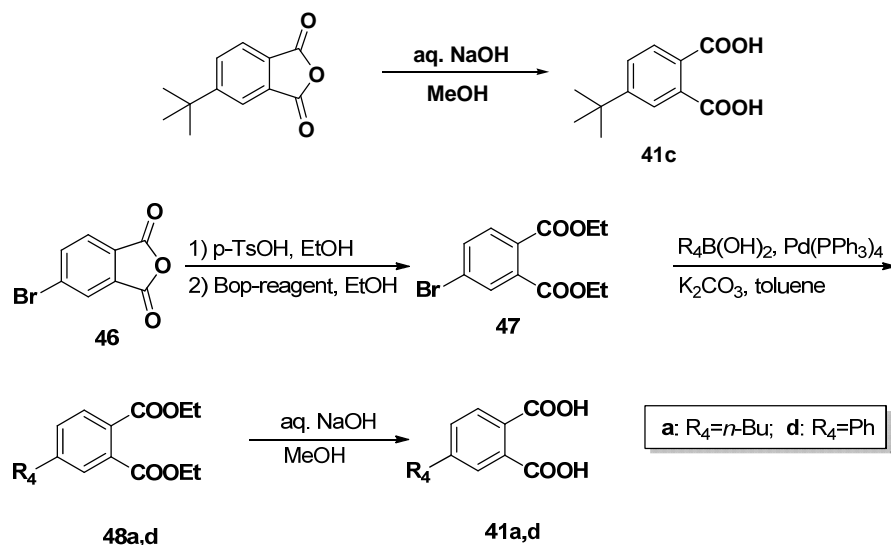
Compd.	NR <sup>1</sup> R <sup>2</sup>	MIC(μg/mL) of BIPM with the inhibitor (50 μg/mL)		MIC ratio ②/①
		<i>P. aeruginosa</i>		
		KG5002 <sup>59</sup> /pMS363 <sup>58</sup> ΔmexAB ①	<i>P. aeruginosa</i> PAO1/pMS363 <sup>58</sup> mexAB(wild type)②	
44e		4	4	1
45a		0.5	4	8
45b		≅ 0.5	4	≅ 8
45c		1	2	2
45d		≅ 0.5	1	≅ 2
45e		≅ 0.25	1	≅ 4
45f		0.5	2	4
45g		1	2	2
45h		8	32	4
45i		≅ 0.25	2	≅ 8
45j		1	1	1
45k		0.5	2	4
45l		≅ 0.5	16	≅ 32
45m		8	64	8

The MIC of BIPM against *P. aeruginosa* producing IMP-1 was determined to be 64-128 μg/mL

## 第4節 フタル酸誘導体の合成

### 第1項 4位置換フタル酸誘導体の合成

4位置換フタル酸誘導体は以下のようにして合成した。すなわち、4位に *tert*-ブチル基を有する誘導体 **41c** については、対応する酸無水物が市販品として入手可能であったため、その加水分解反応により合成した (Scheme 5)。しかしながら、4位に *n*-ブチル基あるいはフェニル基を有するフタル酸誘導体 **41a** および **41d** については、対応する酸無水物が市販されていないため、4-ブロモフタル酸無水物 **46** から合成した (Scheme 5)。すなわち、**46** を酸触媒下、エタノールで加溶媒分解後、得られたハーフエステルのカルボキシ基をエステル化して、ジエステル **47** を得た。**47** と *n*-ブチルボロン酸あるいはフェニルボロン酸の Pd 触媒下の Suzuki-Miyaura cross coupling 反応<sup>65</sup> により、4位に置換基を導入して **48a** および **48d** を得た。**48a** および **48d** は、常法によりエステル加水分解により4位置換フタル酸誘導体 **41a** および **41d** に変換した。また、4位にメチル基を有する **41b** およびベンゼン環上に置換基を持たない *o*-フタル酸 (**41e**) については市販の製品を用いて、活性を測定した。

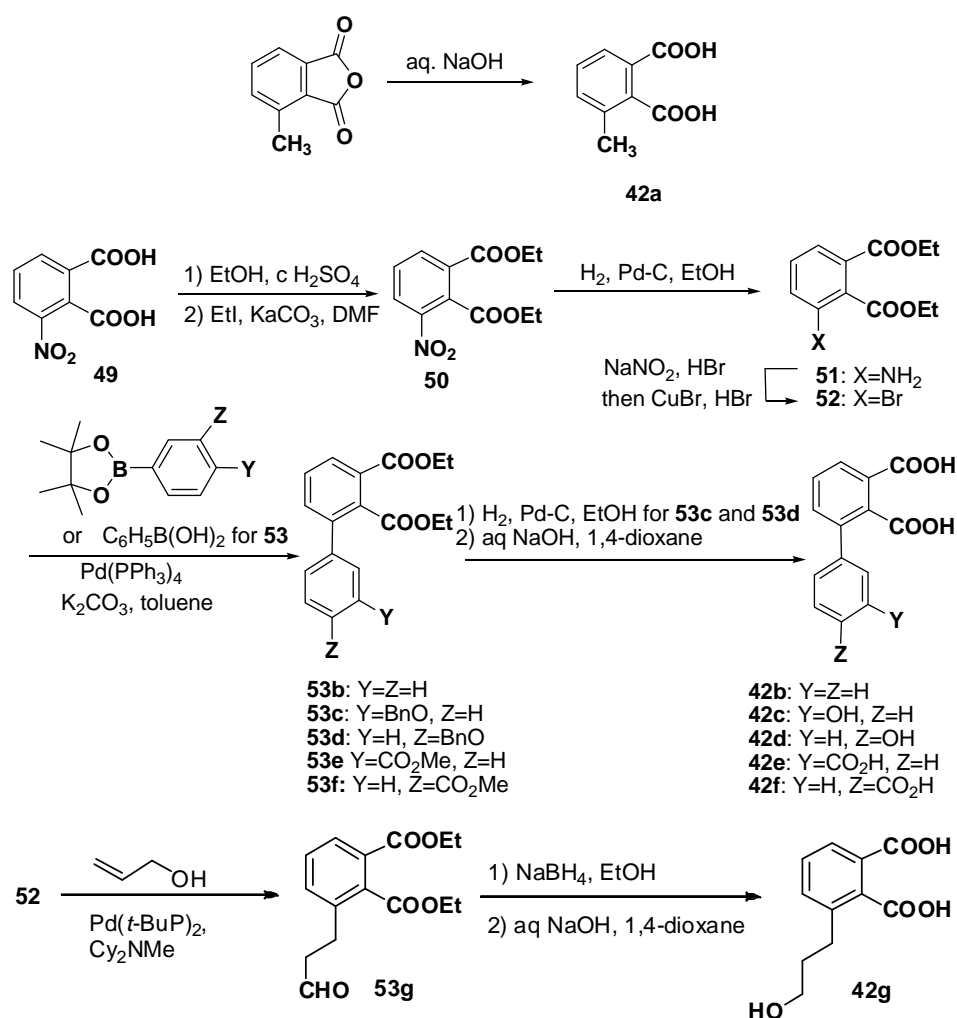


Scheme 5. Preparation of 4-substituted phthalic acids

### 第2項 3C-フタル酸誘導体の合成

4位にメチル基を有する誘導体 **42a** は、市販の酸無水物の加水分解反応により合成した。**42a** 以外の誘導体については、3-ニトロフタル酸 **49** を原料に以下のようにして合成した。すなわち、**49** とエタノールを酸触媒下で反応させて、カルボキシ基の一つをエチルエステルに誘導した。さらに、もう一つのカルボキシ基を  $\text{K}_2\text{CO}_3$  存在下、 $\text{EtI}$  でアルキル化してジエステル **50** を得た。**50** は接触還元により3位ニトロ基をアミノ基へと変換した後、Sandmeyer 反応<sup>66</sup> を用いて3位に Br 基を導入して、**52** に変換し

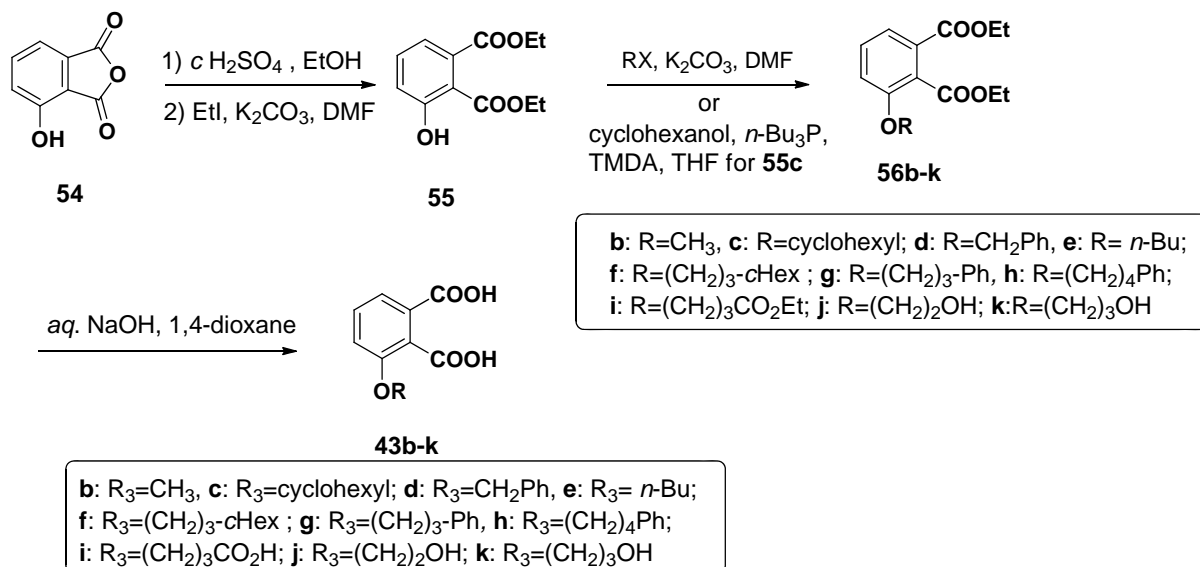
た。**52**と各種ボロン酸誘導体の Suzuki-Miyaura cross coupling 反応により、3位に置換基を有するフタル酸誘導体 **53b–53f**を得た。**53b**, **53e**および **53f**は、エステルのアルカリ加水分解により、目的とする 3C-フタル酸誘導体 **42b**, **42e**および **42f**に誘導した。フタル酸誘導体 **53c**および **53d**は、接触還元で脱ベンジル化後、エステルを加水分解することにより、フタル酸誘導体 **42c**および **42d**に変換した。なお、4位置換フタル酸誘導体のエステルのアルカリ加水分解は室温で行うことができたが、3位置換フタル酸誘導体の場合は、室温での反応では、モノエステル体しか得られなかった。そこで、溶媒を 1,4-ジオキサンに変更し、加熱条件下で脱エステル化を行った。一方、プロモフタル酸誘導体 **52**を  $\text{Pd}(\text{tert-BuP})_2$ 存在下、アリルアルコールと反応させると、Heck 型の反応<sup>67</sup>が進行してアルデヒド **53g**が得られた。**53g**を水素化ホウ素ナトリウムでアルコールに変換後、加水分解すると 3位にヒドロキシプロピル基を有するフタル酸誘導体 **42g**が得られた (Scheme 6)。



Scheme 6. Preparation of 3C-substituted phthalic acids

### 第 3 項 3O-フタル酸誘導体の合成

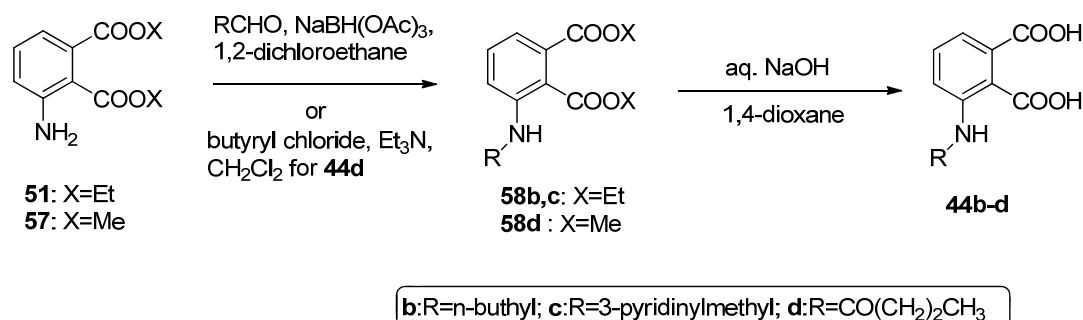
市販の 3-ヒドロキシフタル酸無水物 **54** を、**50** の合成法に準じて 2 段階の反応でジエチルエステル体 **55** へと変換した。**55** は、Williamson エーテル合成<sup>68</sup>により DMF 溶媒中、炭酸カリウム存在下、対応するハロゲン化アルキルと反応させて、**56b-56k** に誘導した。一方、**55** とシクロヘキサノールの Mitsunobu 反応<sup>69</sup>により **56c** を得た。ここに得られた **56b-56k** は、1,4-ジオキサン中 NaOH 水溶液と加熱処理すると、3O-フタル酸誘導体 **43b-43k** が得られた。



Scheme 7. Preparation of 3O-substituted phthalic acids

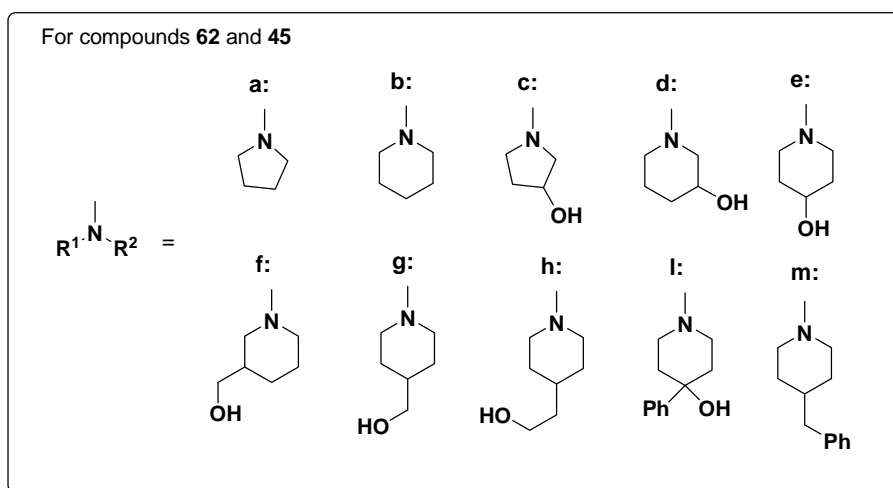
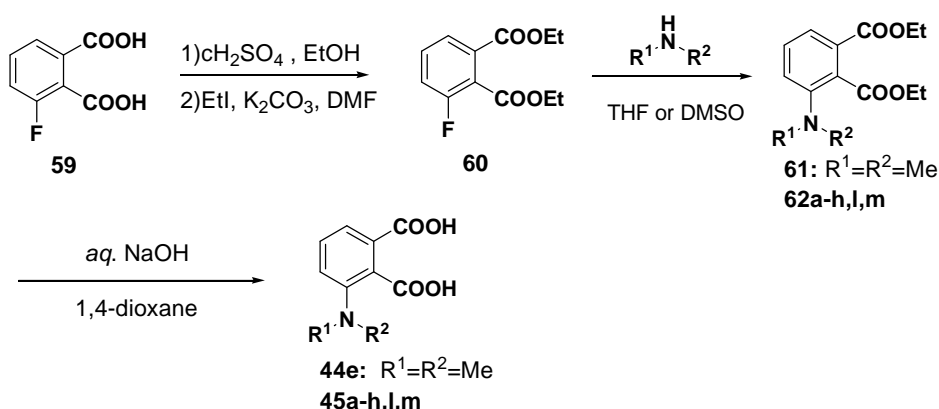
### 第 4 項 3N-フタル酸誘導体の合成

3N-フタル酸誘導体のうち、2 級アミノ基を有する 3N-フタル酸誘導体 **44b-d** は、市販の 3-アミノフタル酸エステル **51** あるいは **57** から以下のようにして合成した。すなわち **51** は、還元的アルキル化反応を利用して窒素上にアルキル基を導入して 2 級アミン **58b** および **58c** に変換した。また、**57** は、アシル化反応を利用して **58d** に変換した。得られた化合物 **58b-58d** を加熱条件下アルカリ加水分解すると、**44b-44d** が得られた (Scheme 8)。



Scheme 8. Preparation of 3N-phthalic acids possessing non-cyclic amines

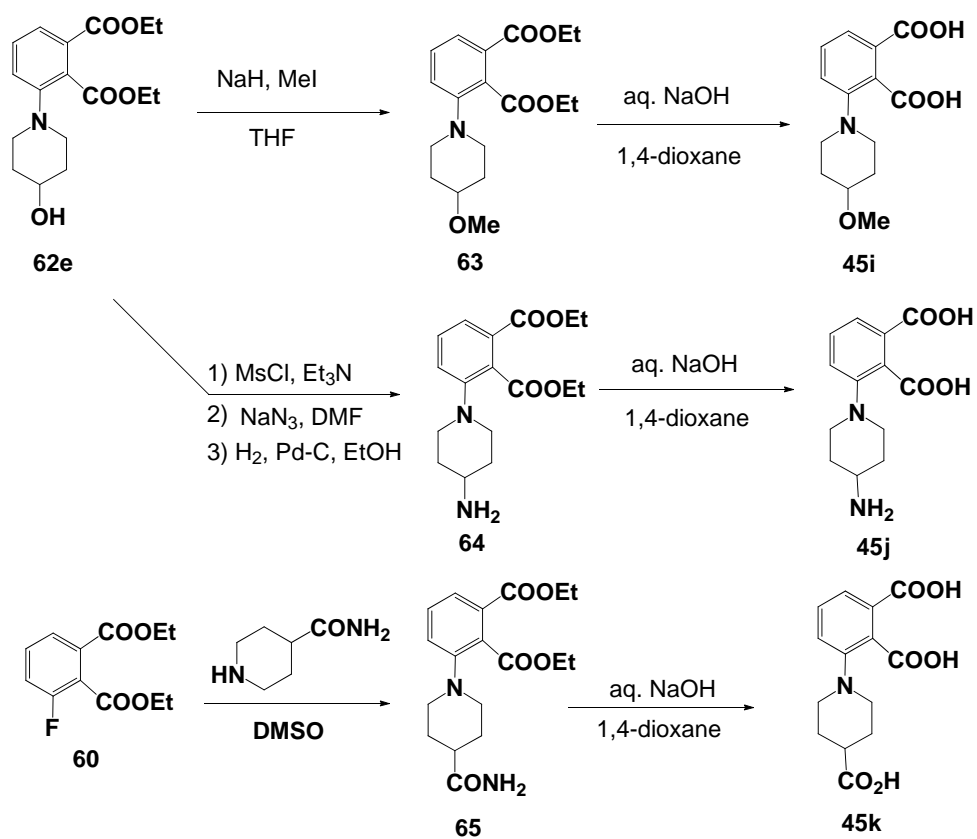
一方、3級アミノ基を有する 3N-フタル酸誘導体は、3-フルオロフタル酸から **Scheme 9** に示すルートで合成した。すなわち、市販の 3-フルオロフタル酸 (**59**) を 2 段階でジエステル **60** に誘導した。**60** をジメチルアミンの THF 溶液と封管中 90°C で加熱すると、芳香族求核置換反応 ( $S_NAr$  反応) が進行して 3 位にジメチルアミノ基を有する化合物 **61** が得られた。また、**60** と各種環状アミン誘導体を DMSO 中 80°C で加熱して、環状アミン誘導体 **62a–62h**, **62l** および **62m** を得た。以上に得られた **61** および **62a–62h**, **62l** および **62m** はエステルのアルカリ加水分解を行い化合物 **44e**, **45a–45h**, **45l** および **45m** に誘導した。



**Scheme 9.** Preparation of 3N-substituted phthalic acids having secondary amines

一方、環状アミン誘導体 **62e** は、ピペリジン環上のヒドロキシル基をメトキシ基またはアミノ基に変換して、フタル酸誘導体 **63** および **64** に誘導した (**Scheme 10**)。 **63** および **64** は、アルカリ加水分解反応を行い、3N-フタル酸誘導体 **45i** および **45j** に誘導した。また、**60** から環状アミン誘導体 **65** を合成した。環状アミン誘導体 **65** をアルカリ処理すると、エステルとアミドの加水分解反応が同時に進行して、フタル酸誘導体 **45k** が得られた。





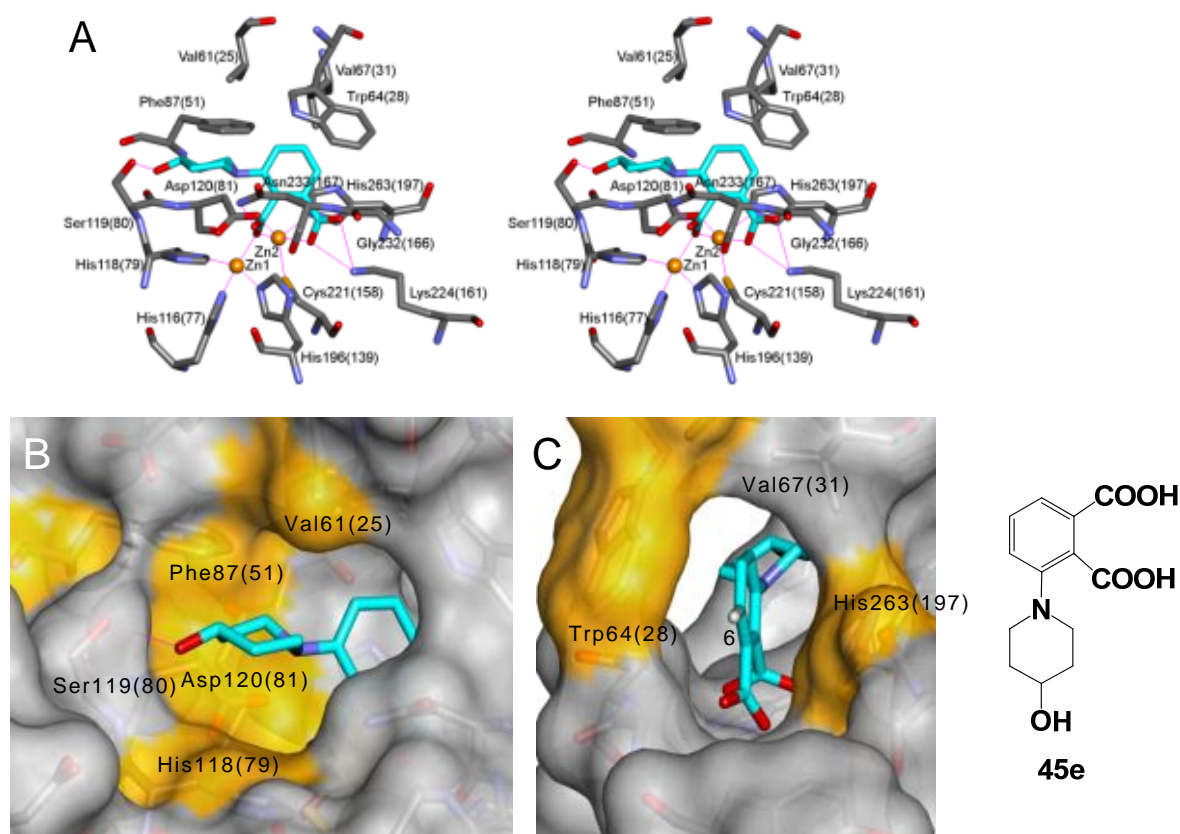
**Scheme 10.** Preparation of 3N-substituted phthalic acids **45i**, **45j** and **45k**

## 第5節 3N-フタル酸誘導体 45e の構造最適化と高次評価<sup>70</sup>

3N-フタル酸誘導体 **45e** は、IMP-1 阻害活性、BIPM との併用効果および水溶解性において、開発候補品として好ましいプロファイルを有していた。そこで、著者は **45e** の更なる構造展開の可能性を見出すために、**45e** と IMP-1 の共結晶の X 線結晶構造解析に取り組んだ。本節では、1) X 線結晶構造解析の結果、2) X 線構造情報に基づく薬物設計と評価、ならびに 3) IMP-1 産生緑膿菌（臨床分離株）に対する、各種  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬と **45e** の併用効果の検討結果を 3 項に亘って述べる。

### 第1項 IMP-1 と 45e の複合体 X 線結晶構造解析

IMP-1 と **45e** の共結晶は、シッピングドロップ蒸気拡散法<sup>71</sup>を用いて調製した。調製した共結晶に関して、理化学研究所 SPring-8 のタンパク質構造解析ビームラインを用いて回析データを収集し、分子置換法により結晶構造を決定した。この X 線結晶構造解析により得られた IMP-1 と **45e** の結合様式を Fig.28 に示す。



**Fig. 28.** Crystal structure of IMP-1 complexed with derivative **45e**. (A) Stereoview of the active site. IMP-1 and derivative **45e** are shown as stick models. IMP-1 and derivative **45e** are shown as stick models colored gray and light blue, respectively. Non-carbon atoms are colored according to atom type. Zn<sup>2+</sup> ions are shown as orange spheres. (B) Hydrophobic pocket around the piperidine moiety of derivative **45e**. IMP-1 is shown as a surface model colored gray except for Val61(25), Phe87(51), His118(79), and Asp120(81), which are colored gold. The hydrogen bond between the hydroxyl group of derivative **1** and Ser119(80) is shown as a magenta line. (C) Possibility of substitution at the 6-position of derivative **45e**. IMP-1 is shown as a surface model colored gray except for Trp64(28) and His263(197), which are colored gold. Derivative **45e** is shown as a stick model. The hydrogen atom at the 6-position is calculated by Discovery Studio (Accelrys Software Inc.), and the position numbers are also shown.

予想していたように、誘導体 **45e** の 2 つのカルボキシ基は、IMP-1 の活性中心の 2 つの Zn と配位結合し、さらに、Asn233(167) と水素結合をしている。3 位のピペリジン部分は、Val61(25)、Phe87(51)、His118(79)、Asp120(81) で構成される疎水性ポケットと相互作用をしている。また、4-ヒドロキシピペリジンのヒドロキシ基は Ser119(80) と水素結合を形成している。フタル酸骨格部分は、Trp64(28) 側鎖のインドール部分と  $\pi/\pi$  スタッキング、さらに、Val61(25) および Val67(31) の両側鎖と疎水性相互作用をしている。この解析結果から、フタル酸 6 位の近傍には、Phe87(51)、Val61(25)、Val67(31)、Trp64(28) から構成される疎水性ポケットの存在が示唆された。この疎水性ポケットと相互作用可能な置換基をフタル酸の 6 位に導入すると、3N-フタル酸誘導体と IMP-1 の親和性はさらに上昇し、IMP-1 阻害活性の向上に寄与することが期待された。そこで、3,6-ジ置換フタル酸誘導体の分子設計と合成、さらにそれらの IMP-1 阻害活性と併用効果について検討を行った。

## 第 2 項 3,6-ジ置換フタル酸誘導体の合成

第 1 項での解析結果を踏まえて、疎水性ポケットと相互作用可能な疎水基を有する化合物として、下記の 3 種類の 3,6-ジ置換フタル酸誘導体を設計した。

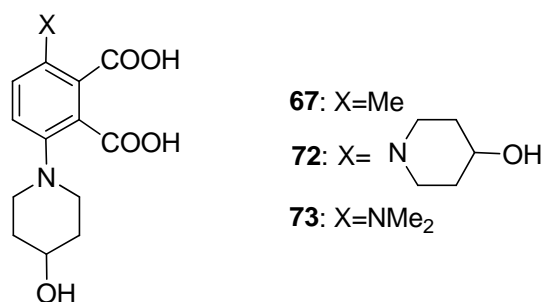
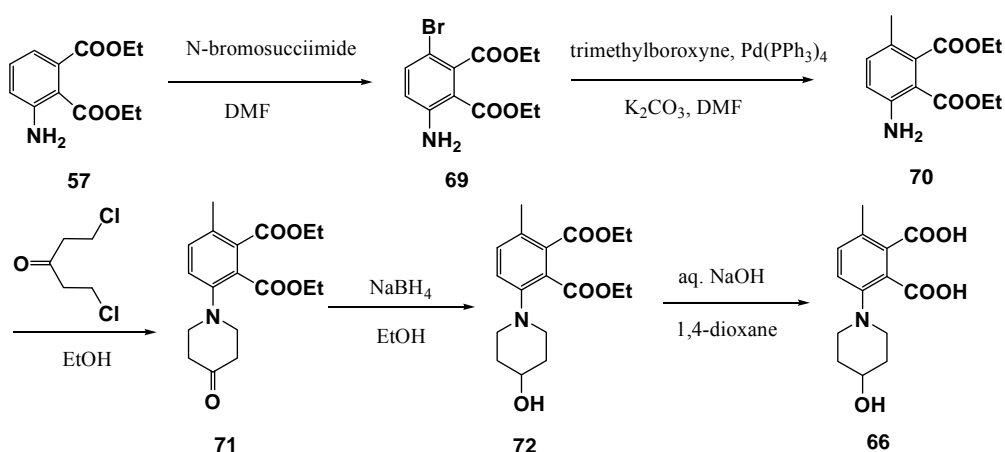


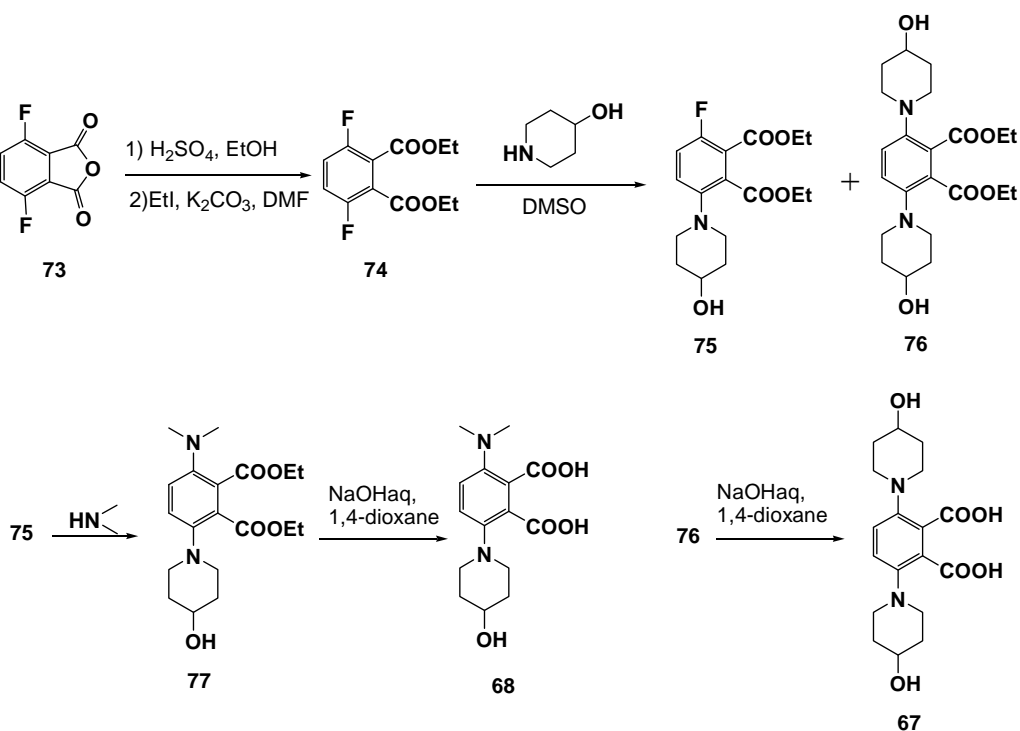
Fig. 29. 3,6-disubstituted phthalic acids

3,6-ジ置換フタル酸誘導体 **66** は、Scheme 11 に示すように合成した。第 4 節第 4 項で述べたフタル酸誘導体 **57** と NBS との反応によりフタル酸 6 位にブロモ基を導入した。得られたブロム体 **69** の Pd 触媒を用いたクロスカップリング反応により、6 位にメチル基を導入して **70** を得た。**70** は、4-オキソピペリジン環を構築、NaBH<sub>4</sub> によりピペリジン環上のカルボニル基を還元して、フタル酸誘導体 **72** を得た。**72** のエステル加水分解により **66** を合成した。



**Scheme 11.** Preparation of 3,6-disubstituted phthalic acid **66**

3,6-ジ置換フタル酸誘導体 **67** および **68** は、3,6-ジフルオロフタル酸無水物 **73** から合成した (**Scheme 12**)。すなわち、3,6-ジフルオロフタル酸無水物 **73** を 2 工程でジエチルエステル体 **74** へと変換した。**74** と 4-ヒドロキシピペリジンの  $S_NAr$  を行うと、4-ヒドロキシピペリジン基が 1 つまたは 2 つ導入された **75** および **76** が 3:1 の生成比で得られた。**75** は、封管中ジメチルアミンと反応させることにより、**77** に誘導した。**76** および **77** は、それぞれエステルのアルカリ加水分解により、目的とする 2,6-ジ置換フタル酸誘導体 **67** および **68** に変換した。



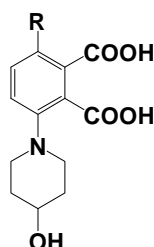
**Scheme 12.** Preparation of 3,6-disubstituted phthalic acid derivatives **67** and **68**

### 第 3 項 3,6-ジ置換フタル酸誘導体の活性評価

前項で合成した 3,6-ジ置換フタル酸誘導体の IMP-1 阻害活性と共存下での IMP-1 産生緑膿菌に対する BIPM の抗菌活性評価について、第 3 節で述べた方法に準じて評価した (Table 15 および Table 16)。

Table 15 に示すように、6 位にジメチルアミンを導入した 3,6-ジ置換フタル酸誘導体 68 は、期待したような IMP-1 阻害活性の向上が認められなかった。しかしながら、6 位にメチル基あるいは 4-ヒドロキシピペリジニル基を導入した 3,6-ジ置換フタル酸誘導体 66 および 67 は、親化合物 45e よりも強い IMP-1 阻害活性を示した。45e と比較すると、特に、3,6-ビス(4-ヒドロキシピペリジン) 誘導体 67 は約 10 倍強い IMP-1 阻害活性を示した。この結果は、第 1 項の X 線結晶構造解析の結果と良く一致した。

Table 15. Inhibitory activity against IMP-1 and clogP values of 3,6-disubstituted phthalic acids



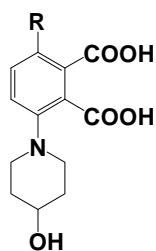
Compd.	R	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	clogP <sup>b</sup>
45e	—H	2.70	−0.410
66	—Me	0.700	−0.211
67	—N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>2</sub> OH	0.270	−1.63
68	—N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4.10	−0.213

<sup>a</sup>Determined by measuring inhibition rate for IMP-1 mediated hydrolysis of Nitrocefin,

<sup>b</sup>Calculated by Chem Bio Draw Ultra 12.0

Table 16 に示すように、3,6-ジ置換フタル酸誘導体 66、67、および 68 存在下で、ΔmexAB 株に対する BIPM の MIC は、親化合物 45e の場合と同様に MIC ≤ 0.25 μg/mL を示した。また、これらの誘導体は、*P. aeruginosa* PAO1/pMS363 株に対しても、強い効果が観察された (MIC=0.5–1.0 μg/mL)。特に、3,6-ビス(4-ヒドロキシピペリジニル)フタル酸誘導体 67 存在下では、MIC=0.5 μg/mL と親化合物 45e 存在下の場合より、強い傾向を示した。また、化合物 67 存在下での MIC 比 (②/①) が親化合物 45e より小さい傾向があり、異物排出ポンプの影響を受けにくい IMP-1 阻害剤であることが示唆された。

**Table 16.** MIC of BIPM against *P. aeruginosa* producing IMP-1 in the presence of 3,6-disubstituted phthalic acids



Compd.	R	MIC( $\mu\text{g/mL}$ ) of BIPM with the inhibitor(50 $\mu\text{g/mL}$ )		MIC ratio ②/①
		<i>P. aeruginosa</i>		
		KG5002 <sup>59</sup> /pMS363 <sup>58</sup> $\Delta\text{mexAB}$ ①	PAO1/pMS363 <sup>58</sup> mexAB(wild type)②	
<b>45e</b>	—H	$\leq 0.25$	1	$\geq 4$
<b>66</b>	—Me	$\leq 0.25$	1	$\geq 4$
<b>67</b>		$\leq 0.25$	0.5	$\geq 2$
<b>68</b>		$\leq 0.25$	1	$\geq 4$

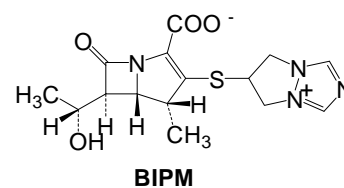
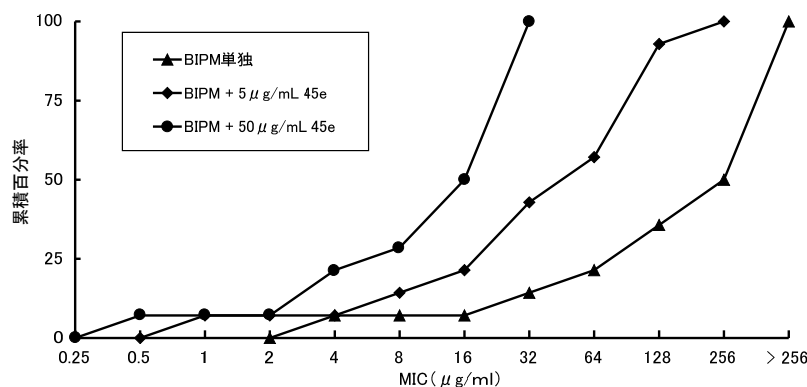
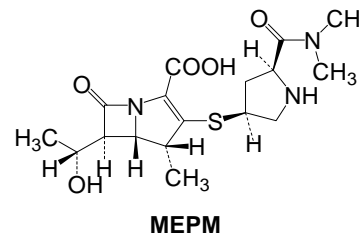
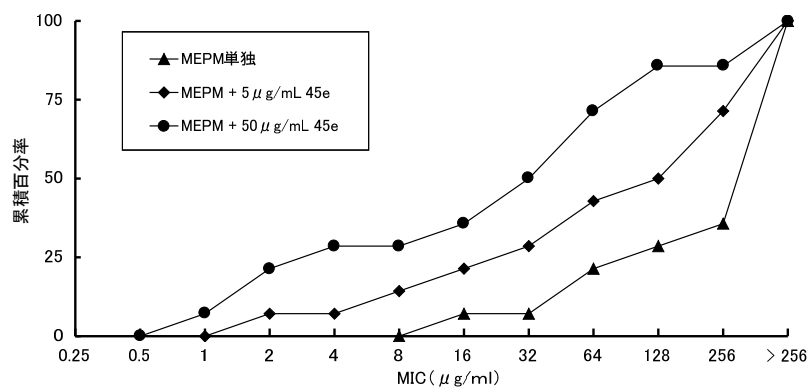
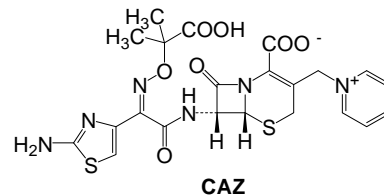
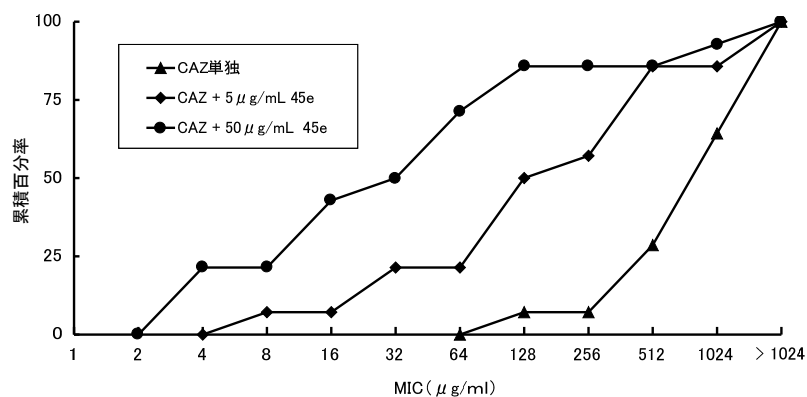
MICs of BIPM against *P. aeruginosa* producing IMP-1 was determined to be 64-128  $\mu\text{g/mL}$

#### 第 4 項 IMP-1 産生緑膿菌（臨床分離株）に対する効果

前項までの検討で、IMP-1 阻害活性および BIPM との併用効果で優れたプロファイルを有する IMP-1 阻害剤 **67** の創製に成功した。しかしながら、**67** は、**45e** よりも、化学合成にかかる工程数および費用などにおいて、難点を有していた。したがって、開発候補品としては、**45e** が選択された。

そこで、**45e** についてさらに詳細な高次評価（感受性試験）を実施した。感受性試験は、**45e** と併用可能な  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬のうち、最も治療効果の高い組み合わせを見出すために行われた。すなわち、**45e** の水溶液（5 および 50  $\mu\text{g/mL}$ ）が共存する系で、IMP-1 産生緑膿菌の臨床分離株 14 株に対して、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の抗菌力を MIC で評価した。 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬として、CAZ、BIPM、および MEPM を使用した。

**Fig. 30** に、**45e** 共存下での、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の感受性分布図を示す。感受性分布図は、以上に得られた MIC 値に対して、臨床分離株 14 株のうち何株が殺菌されたかを累積百分率（%）として表した。



**Fig. 30.** Combination effects of **45e** on  $\beta$ -lactam antibiotics activities against clinical isolated *P. aeruginosa* producing IMP-1.

**Fig. 30** に示すように、試験したすべて  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬 (CAZ、BIPM、および MEPM) の抗菌力は、化合物 **45e** の濃度が高まると、高まる傾向が認められた。すなわち、**45e** 共存下で、これらの  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の

IMP-1 産生緑膿菌に対する抗菌活性向上の効果が確認できた。しかしながら、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬として、CAZ と MEPM を用いた場合には、化合物 **45e** を添加しても、MIC 値が下がらない株が存在しており、累積百分率の上昇率は小さかった。以上の結果は、IMP-1 産生緑膿菌（臨床分離株）の一部は、CAZ および MEPM に対して、IMP-1 産生以外の耐性機序を獲得していることを示している。すなわち、**45e** の共存により IMP-1 酵素活性を阻害しても、他の耐性機序により、CAZ および MEPM を不活化する臨床分離株が存在することが判明した。

以上の結果より、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬 CAZ、BIPM、および MEPM のうち、IMP-1 阻害剤 **45e** の効果が最も高まるのは、BIPM との組み合わせであることが明らかとなった。



## 小括

カルバペネムなどの $\beta$ -ラクタム系抗菌薬と MBL 阻害剤の併用療法は、多剤耐性緑膿菌による感染症等の治療法の一つとして、医療に貢献できると考えられる。しかし、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬と MBL 阻害剤の併用療法は、臨床の現場で使用されていない。これは、水溶解性や菌体への薬物透過性などの物理化学的性質において、優れた特性を有する MBL 阻害剤が開発されていないことが主な要因であると考えられる。本章では、日本国内で報告の多い IMP-1 型 MBL に注目して、物理化学的特性に優れた MBL (IMP-1) 阻害剤の探索を行った経緯を述べた。

第 1 節では、IMP-1 阻害活性と菌体内への薬物蓄積などの物理化学的性質で好ましい化合物見出すため、自社化合物ライブラリー (91496 化合物) の HTS を行った。1 次スクリーニングにより、MBL 阻害活性を有する 230 化合物、2 次および 3 次スクリーニングにより、IMP-1 産生大腸菌および緑膿菌の異物排出ポンプ欠損株に対し MEPM 及び CAZ との併用効果を有する 4 化合物を抽出した。その中から、構造展開の多様性、異物排出ポンプへの抵抗性を考慮し、リード化合物としてフタル酸誘導体 A を選択した。

第 2 節では、リード化合物 A の構造活性相関から、フタル酸の 3 位置換基が IMP-1 阻害活性に重要であることを確認した。第 3 節および第 4 節では、3 位に種々の置換基を有するフタル酸誘導体を系統的にデザイン・合成し、各化合物の IMP-1 阻害活性および IMP-1 産生緑膿菌に対する BIPM との併用効果を検討した。その結果、4-ヒドロキシピペリジニル基を有するフタル酸誘導体 **45e** が高い IMP 阻害活性と IMP-1 産生緑膿菌に対する BIPM との高い併用効果、さらに高い水溶解性を示すことが明らかとなった。

第 5 節では、化合物 **45e** と IMP-1 の複合体 X 線結晶構造解析から得られた構造情報と **45e** の高次評価について述べた。この構造情報から、化合物 **45e** の 2 つのカルボキシ基は予想どおり、IMP-1 活性中心の 2 つの Zn に配位結合しており、さらに、6 位近傍に疎水ポケットの存在が確認された。このポケットと相互作用する置換基を 6 位に導入することにより、阻害剤と IMP-1 との結合が強固になり、高活性な IMP-1 阻害剤の創製が期待された。そこで、3 種の 3,6-ジ置換フタル酸誘導体を合成・評価したところ、6 位に 4-ヒドロキシピペリジニル基を導入した化合物 **67** は、**45e** と比較し IMP-1 阻害活性が 10 倍向上した。また IMP-1 産生緑膿菌に対し、強い BIPM との併用効果を示すことが明らかとなった。しかし **67** は、化学合成にかかる工程数および費用などにおいて、難点を有することより、開発候補品として、**45e** が選択された。**45e** と  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬 (CAZ、MEPM、および BIPM) との併用効果について、IMP-1 産生緑膿菌 (臨床分離株) 14 株に対し、感受性分布を測定したところ、**45e** は、濃度依存的にこれらの  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬と併用効果を示すことが確認された。また、この感受性分布から、併用した  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の中では、**45e** と BIPM との併用が最も好ましい組み合わせであることが明らかとなった。

## 結論

高齢化社会の進行に伴い、高齢者の肺炎等の感染症による死亡率が高まっている。原因菌として耐性菌が検出される場合も多く、耐性菌に対し、有効な薬剤の開発は、今後も重要性が増すと考えられる。中でも、緑膿菌は、MRSA と共に検出される頻度が高く、これらの感染症は、臨床現場で治療を困難となる場合が多い。このような背景から、本研究では、これらの耐性菌に有効な新規薬剤の探索研究を行った。

第1章では、抗緑膿菌活性と共に MRSA にも有効な ABK に着目し、修飾酵素に対する安定性の向上を目指した構造展開を試みた。その結果、ABK の 5 位および 4' 位のヒドロキシ基を立体反転させた **3a** が、MRSA および緑膿菌に強い抗菌活性を有することを見出した。**3a** は、MRSA 臨床分離株 (54 株) に対する抗菌活性が、臨床で使用されている抗 MRSA 薬 VCM および TEIC と比較して強いばかりか、緑膿菌臨床分離株 (54 株) に対する抗菌活性も、現在、臨床で緑膿菌感染症治療に使用されているカルバペネム系抗菌薬 IPM と比べて強い活性を示した。**3a** は、強い短時間殺菌力も有し、MRSA および耐性緑膿菌感染症の治療に貢献できる薬剤であると考えた。

第2章では、耐性緑膿菌による  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の不活化メカニズムの一つであるメタロ  $\beta$ -ラクタマーゼ (MBL) による  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の不活化に注目した。現在、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬と共に臨床で使用されている MBL 阻害剤は存在しない。これは薬物移行性や水溶解性で好ましい MBL 阻害剤が開発されていないことによると考えた。著者は、MBL 阻害活性および、IMP-1 産生大腸菌および緑膿菌の異物排出ポンプ欠損株に対する  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬との共存での抗菌活性を指標として HTS を実施し、3,4-ジ置換フタル酸誘導体 **A** をリード化合物として見出した。リード化合物 **A** の構造展開により、強い IMP-1 阻害活性を有するフタル酸誘導体 **45e** を見出した。**45e** 共存下で、BIPM は、IMP-1 産生緑膿菌に対して強い抗菌活性を保持した。また、**45e** は水溶解性でも優れたプロファイルを示した。さらに、IMP-1 産生緑膿菌 (臨床分離株) 14 株に対し、**45e** 共存下で  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬 (CAZ、MEPM、および BIPM) の感受性分布試験を行い、**45e** と BIPM の組み合わせが最も併用効果が高いことを明らかとした。**45e** は、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の活性保持に有効な MBL 阻害剤として、初めて効果が確認された薬物である。

本研究で得られた知見は、薬剤耐性菌に対する治療薬の新しい選択肢の一つを提供するものであり、学術的な意義を有するものと考えている。

## 実験の部

本研究では、化合物の分析に以下の機器を用いた。

### 核磁気共鳴スペクトル ( $^1\text{H-NMR}$ )

JEOL JNM-LA400 spectrometer(400MHz)

JEOL JNM-GX400 spectrometer(400MHz)

化学シフトは値を ppm 単位で記載し、内部標準として重クロロホルム中のテトラメチルシラン(0.00ppm)及び重メタノール中のテトラメチルシラン(0.00ppm)を用いた。重水中の HDO の H の化学シフト値を 4.70ppm として自動測定した。

### 質量分析スペクトル(MS)

JEOL Fab mate (EI, FAB)

JEOL JMS-700 spectrometer (FAB-HR)

Waters ZQ (API, ESI)

Hewlett-Packard 5989A spectrometer (TSP)

### 高分解能質量分析スペクトル(HRMS)

JEOL JMS-700 spectrometer

### 分離精製

シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分離精製には関東化学 シリカゲル 60N (球状, 中性), particlesize 63-210 $\mu\text{m}$  (カラムクロマトグラフィー用)を用いた。プレパラティブ薄層クロマトグラフィーには Merck silica gel 60 F<sub>254</sub> (0.5mm)を用いた。

イオン交換樹脂による分離精製には、BIO-RAD BIO-REX70 および SIGMA CM-Sephadex C-25 を用いた。

合成吸着剤による分離精製には、三菱化学セパビーズ SP207 およびダイヤイオン HP20 を用いた。

### 第 1 章の合成に関する実験

試薬は購入したものを精製することなく使用したが、CsOAc は 120 $^{\circ}\text{C}$  で 2 時間、乾燥したものを使用した。

### 化合物 4 の合成

Arbekacin<sup>19</sup> (3.36 g, 6.10 mmol)を水(30 mL)、THF (60 mL)およびEt<sub>3</sub>N (2.4 mL)に溶解した。この溶液に、S-*p*-methoxybenzyloxycarbonyl-1-4,6-dimethyl-2-merkaptopyrrolidine (10.2 g, 33.5 mmol)をTHF (30 mL) および*i*-PrOH(18 mL)に溶解した溶液を室温で滴下した。混合液を60 $^{\circ}\text{C}$ で4時間攪拌、室温で1晩攪拌した。析出した固体を濾取し、Et<sub>2</sub>O および水で洗浄後、減圧乾燥した。得られた固体(6.97 g, 83.4%)の構造をMS (FABMS:m/z1395(M+Na)<sup>+</sup>) 確認後、精製することなく次の反応を行った。以上に得ら

れた固体 (5.50 g, 4.40 mmol)の pyridine (30 mL)およびCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL)の混合溶液に、氷冷下、BzCl (2.7 mL, 19.2 mmol)のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9.0 mL)溶液を加え、氷冷下0.5時間攪拌した後、室温まで昇温し1晩攪拌した。水(0.1 mL)を加えた後、減圧濃縮した。残渣をAcOEtに溶解し、その溶液を水、10%KHSO<sub>4</sub>水溶液、飽和NaHCO<sub>3</sub>水溶液、飽和NaCl水溶液で順次洗浄した。有機層を無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥後、濃縮乾固した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt=1:2)で精製して、化合物 **4** (5.80 g, 81.0%)をアモルファスとして得た。MS(FABMS:m/z 1811(M+Na)<sup>+</sup>)で構造を確認後、次の反応を行った。

### 化合物 **5** の合成

化合物 **4** (2.00 g, 1.12 mmol)の DMSO 溶液(10 mL)に、Ac<sub>2</sub>O(3.0 mL)を加え、室温で3日間攪拌した。飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液(5 mL)を加え、1時間攪拌した後、AcOEt を加えた。混合液を、水、飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液、飽和 NaCl 水溶液で順次洗浄した。AcOEt 層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥、濃縮乾固した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt=1:2)で精製して、化合物 **5** (1.36 g, 68.0%)をアモルファスとして得た。MS (FABMS:m/z 1810(M+Na)<sup>+</sup>, 1826(M+K)<sup>+</sup>) で構造を確認後、次の反応を行った。

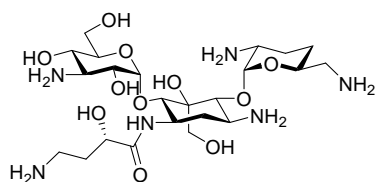
### 化合物 **6** の合成

化合物 **5** (190 mg, 0.107 mmol)の MeOH 溶液(12 mL)に、氷冷下ジアゾメタンの Et<sub>2</sub>O 溶液(0.6 mmol/mL) (3.2 mL)を加え、氷冷下2時間攪拌した。この反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=20:1)で精製し、アモルファス **6** (160 mg, 82.6%)を得た。

### 化合物 **7** の合成

化合物 **6** (150 mg, 0.0830 mmol)の MeOH (2.5 mL)および CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.5 mL)の混合溶液に 1.0M NaOH(0.50 mL)を加え、室温で4時間攪拌した。この溶液を 1.0M HCl によって中和後、減圧濃縮した。この残渣を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> で抽出し、有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮して、アモルファス **7** (110 mg, 95.8%)を得た。MS(FABMS:m/z1423(M+K))で構造を確認後、次の反応を行った。

### 3-Amino-3-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[2,6-diamino-2,3,4,6-tetra-deoxy- $\alpha$ -D-erythro-hexopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-1-N-[(2S)-4-amino-2-hydroxybutanoyl]-2-deoxy-5-hydroxymethyl-D-streptomine (**1a**) の合成



化合物 **7** (13.8 mg, 0.00997 mmol)の DMF(1.0 mL)溶液に、CsOAc (5.70 mg, 0.0299 mmol)を加え 80°C で5時間攪拌した。水(5 mL)、1M NaOH(1 ml)を加え室温で3時間攪拌した。反応液を 1M HCl で中和後、減圧留去した。残渣に 90%

TFA (5.0 mL)を加え室温で3時間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、アンモニア水を加え再度減圧留去した。残渣をイオン交換樹脂 CM-Sephadex(H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH=20:1~15:1)で精製して、**1a** (4.40 mg, 76%)をアモルファスとして得た。<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O + ND<sub>3</sub>): δ 1.32 – 1.50 (m, 2H), 1.65 – 1.80 (m, 4H), 1.85 – 1.95 (m, 1H), 1.97 – 2.05 (m, 1H), 2.60 – 2.70 (m, 2H), 2.70 – 2.80 (m, 2H), 2.85 – 2.92 (m, 1H), 2.98 (t, *J* = 10.0 Hz, 1H), 3.15 – 3.25 (m, 1H), 3.32 (t, *J* = 10.0 Hz, 1H), 3.39 (dd, *J* = 10.5, 3.9 Hz, 1H), 3.45 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 3.76 – 3.78 (m, 2H), 3.81 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 3.85 – 3.94 (m, 1H), 3.90 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 3.99 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 3.99 – 4.05 (m, 1H), 4.18 (dd, *J* = 9.2, 3.6 Hz, 1H), 4.32 – 4.40 (m, 1H), 5.05 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 5.11 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H). FABMS: *m/z* 583(M+H)<sup>+</sup>.

### 3-Amino-3-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[2,6-diamino-2,3,4,6-tetra-deoxy- $\alpha$ -D-erythro-hexopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-1-N-[(2S)-4-amino-2-hydroxybutanoyl]-2-deoxy-5-methylaminomethyl-D-streptamine (**1b**) の合成

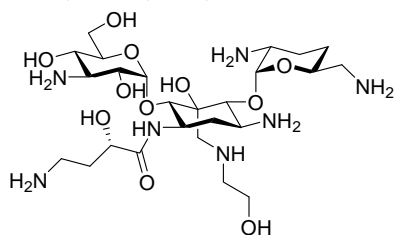
化合物 **7** (10.0 mg, 0.0072 mmol)のEtOH (1.0 mL)溶液に、40%methyamine 水溶液 (1.10 mg)を加えて、80°Cで3時間攪拌した。反応液を減圧濃縮して、得られた残渣を90%TFA (5.0 mL)を加え室温で1晩攪拌した。反応液に水およびEt<sub>2</sub>Oを加えて攪拌した。水層をアンモニア水でpH=7に中和し、得られた混合物をイオン交換樹脂 Bio-Rex70 (H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH = 20:1)で精製して、アモルファス **1b** (3.70 mg, 86.2%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O+ND<sub>3</sub>):δ 1.38 (1H, ddd, *J* = 12.7, 12.7, 12.7 Hz), 1.41 – 1.44 (1H, m), 1.62 – 1.79 (4H, m), 1.91 – 1.93 (1H, m), 2.22 (1H, ddd, *J* = 4.7, 4.7, 13.2 Hz), 2.46 (3H, s), 2.65 – 2.70 (2H, m), 2.76 – 2.81 (2H, m), 2.90 (1H, dd, *J* = 10.3, 10.3 Hz), 2.93 – 3.01 (2H, m), 3.05 (1H, d, *J* = 13.2 Hz), 3.10 (1H, d, *J* = 13.4 Hz), 3.31 (1H, dd, *J* = 9.8, 9.8 Hz), 3.39 (1H, dd, *J* = 3.8, 10.4 Hz), 3.41 (1H, d, *J* = 10.3 Hz), 3.74 – 3.81 (3H, m), 3.82 – 3.92 (1H, m), 4.04 (1H, ddd, *J* = 2.6, 3.9, 10.3 Hz), 4.11 (1H, ddd, *J* = 4.4, 12.2, 12.2 Hz), 4.18 (1H, dd, *J* = 3.7, 9.3 Hz), 5.03 (1H, d, *J* = 3.7 Hz), 5.07 (1H, d, *J* = 3.4 Hz). TSPMS:*m/z* 596 (M+H)<sup>+</sup>.

### 3-Amino-3-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[2,6-diamino-2,3,4,6-tetra-deoxy- $\alpha$ -D-erythro-hexopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-1-N-[(2S)-4-amino-2-hydroxybutanoyl]-2-deoxy-5-(2-aminoethyl)aminomethyl-D-streptamine (**1c**) の合成

化合物 **7** (320 mg, 0.30 mmol)のEtOH (10 mL)溶液に、1,3-diaminoethane (4.0 mL, 60 mmol)を加え、80°Cで1晩攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、90%TFA (10 mL)を加え、室温で1晩攪拌した。反応溶液にアンモニア水を加え減圧濃縮した後、残渣をイオン交換樹脂CM-Sephadex (NH<sub>4</sub>OH:H<sub>2</sub>O=20:1)で精製し、無色アモルファス **1c** (107 mg, 57.2%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O+ND<sub>3</sub>) δ: 1.35 (1H, ddd, *J* = 12.9, 12.9, 12.9 Hz), 1.42 (1H, dddd, *J* = 4.9, 12.4, 12.4, 12.4 Hz), 1.64 (1H, dddd, *J* = 3.7, 12.4, 12.4, 12.4 Hz), 1.71–1.79

(3H, m), 1.91–1.93 (1H, m), 2.03 (1H, ddd,  $J = 4.7, 4.7, 13.2$  Hz), 2.62–2.82 (6H, m), 2.88–2.99 (3H, m), 2.99 (1H, d,  $J = 13.2$  Hz), 3.05 (1H, d,  $J = 12.9$  Hz), 3.31 (1H, dd,  $J = 9.7, 9.7$  Hz), 3.38 (1H, dd,  $J = 3.7, 10.5$  Hz), 3.40 (1H, d,  $J = 10.2$  Hz), 3.73–3.79 (3H, m), 3.84–3.92 (1H, m), 4.02 (1H, dt,  $J = 2.9, 9.5$  Hz), 4.13 (1H, ddd,  $J = 3.8, 11.4, 11.4$  Hz), 4.18 (1H, dd,  $J = 3.6, 9.2$  Hz), 5.04 (1H, d,  $J = 3.9$  Hz), 5.07 (1H, d,  $J = 3.2$  Hz). TSPMS:  $m/z$  625(M+H)<sup>+</sup>.

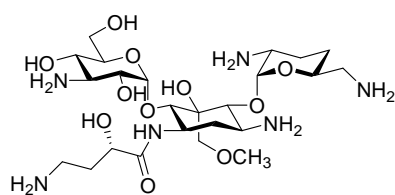
**3-Amino-3-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[2,6-diamino-2,3,4,6-tetra-deoxy- $\alpha$ -D-erythro-hexopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-1-N-[(2S)-4-amino-2-hydroxybutanoyl]-2-deoxy-5-(2-hydroxyethyl)aminomethyl-D-streptamine (1d) の合成**



化合物 7 (12.3 mg, 0.0068 mmol)のEtOH (4.0 mL)溶液に、hydroxyethylamine (0.10 mL, 1.70 mmol)を加え、80°Cで1晩攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、90%TFA (3.0 mL)を加え1晩攪拌した。反応溶液にアンモニア水を加え減圧濃縮後、残渣をイオン交換樹脂 CM-Sephadex

(NH<sub>4</sub>OH:H<sub>2</sub>O=20:1)で精製して、アモルファス **1d** (4.00 mg, 92.0%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O+ND<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.35 (1H, ddd,  $J = 12.7, 12.7, 12.7$  Hz), 1.37 – 1.50 (1H, m), 1.60 – 1.85 (4H, m), 1.88 – 1.98 (1H, m), 2.04 (1H, ddd,  $J = 4.6, 4.6, 13.2$  Hz), 2.62 – 2.70 (2H, m), 2.72 – 2.83 (4H, m), 2.85 – 3.00 (3H, m), 3.00 (1H, d,  $J = 13.0$  Hz), 3.05 (1H, d,  $J = 13.0$  Hz), 3.31 (1H, dd,  $J = 9.8, 9.8$  Hz), 3.38 (1H, dd,  $J = 3.7, 10.5$  Hz), 3.39 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz), 3.65 – 3.73 (2H, m), 3.75 – 3.83 (3H, m), 3.85 – 3.95 (1H, m), 4.02 – 4.08 (1H, m), 4.13 (1H, ddd,  $J = 3.9, 11.4, 11.4$  Hz), 4.18 (1H, dd,  $J = 3.6, 9.3$  Hz), 5.03 (1H, d,  $J = 4.4$  Hz), 5.04 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz). TSPMS:  $m/z$  626(M+H)<sup>+</sup>.

**Amino-3-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[2,6-diamino-2,3,4,6-tetra-deoxy- $\alpha$ -D-erythro-hexopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-1-N-[(2S)-4-amino-2-hydroxybutanoyl]-2-deoxy-5-methoxymethyl-D-streptamine (1e) の合成**

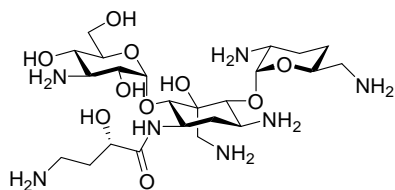


化合物 6 (44.0 mg, 0.0240 mmol)のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6.0 mL)溶液に、NaOMe (0.5M MeOH溶液) (2.0 mL)を加え室温で3時間攪拌した。反応液にドライアイスを加えて30分攪拌後、減圧濃縮した。得られた残渣に90%のTFA (5.0 mL)を加えて

室温で1晩攪拌した。反応液に水およびEt<sub>2</sub>Oを加えて攪拌した。水層をアンモニア水でpH=7に中和後、イオン交換樹脂Bio-Rex70 (H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH=20:1)で精製し、無色アモルファス **1e** (5.80 mg, 40.4%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O+DCl)  $\delta$ : 1.69 – 1.75 (1H, m), 1.90 (1H, ddd,  $J = 12.7, 12.7, 12.7$  Hz), 1.99 – 2.06 (2H, m), 2.08 – 2.16 (2H, m), 2.24 (1H, ddt,  $J = 3.9, 7.3, 14.4$  Hz), 2.39 (1H, ddd,  $J = 4.6, 4.6, 12.9$  Hz), 3.20 – 3.24 (1H, m), 3.24 (2H, dd,  $J = 7.4, 7.4$  Hz), 3.35 (1H, dd,  $J = 3.4, 13.6$  Hz), 3.44 (1H, dd,  $J = 10.5, 10.5$  Hz), 3.50 (3H, s), 3.63 – 3.68 (1H, m), 3.77 (1H, dd,  $J = 10.0, 10.0$  Hz), 3.82 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 3.86 (1H, dd,

$J = 3.7, 10.0$  Hz), 3.87 (2H, d,  $J = 2.9$  Hz), 3.87 – 3.92 (1H, m), 3.94 (1H, d,  $J = 10.8$  Hz), 4.02 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.06 (1H, dt,  $J = 2.9, 10.0$  Hz), 4.12 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 4.26 (1H, dddd,  $J = 3.4, 6.9, 6.9, 6.9$  Hz), 4.33 (1H, dd,  $J = 3.6, 6.9$  Hz), 4.35 – 4.40 (1H, m), 5.19 (1H, d,  $J = 3.6$  Hz), 5.76 (1H, d,  $J = 3.2$  Hz). FABMS:  $m/z$  597(M+H)<sup>+</sup>.

### 3-Amino-3-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[2,6-diamino-2,3,4,6-tetra-deoxy- $\alpha$ -D-erythro-hexopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-1-N-[(2S)-4-amino-2-hydroxybutanoyl]-2-deoxy-5-amino methyl-D-streptamine (1g) の合成



化合物 **6** (50.0 mg, 0.027 mmol)のDMF (0.50 mL)溶液に、NaN<sub>3</sub> (5.40 mg, 0.083 mmol)を加え、80°Cで2時間攪拌した。この反応液に飽和NH<sub>4</sub>Cl水溶液を加えた後、AcOEtで抽出した。AcOEt層を飽和NaClで洗浄後、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣を分取TLC (CHCl<sub>3</sub>:MeOH=9:1)で精製し、化合物**9** (24.3 mg)を得た。化合物**9**をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6.0 mL)に溶解し、NaOMe (0.5M MeOH溶液) (2.0 mL)を加え室温で3時間攪拌した。反応液にドライアイスを加えて30分攪拌後、減圧濃縮して、化合物 **15** (5.30 mg)を得た。化合物**15**は精製することなく、90%のTFA (5.0 mL)に溶解して、室温で1晩攪拌した。この混合物を減圧濃縮して化合物 **1f** を得た。得られた化合物を水(1.0 mL)に溶解し、10%Pd-C (4.6 mg)を加え、室温常圧で3時間接触水素還元を行った。触媒を濾過して、ろ液を減圧濃縮した。得られた残渣をイオン交換樹脂CM-Sephadex(H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH=10:1)で精製し無色アモルファス **1g** (4.00 mg, 25.5%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O+ND<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.70 – 1.81 (1H, m), 1.95 – 2.10 (3H, m), 2.10 – 2.20 (2H, m), 2.25 (1H, ddt,  $J = 3.7, 7.1, 14.4$  Hz), 2.42 (1H, ddd,  $J = 4.8, 4.8, 12.9$  Hz), 3.25 (2H, dd,  $J = 7.3, 7.3$  Hz), 3.35 – 3.40 (3H, m), 3.55 (1H, d,  $J = 13.9$  Hz), 3.56 – 3.65 (1H, m), 3.61 (1H, d,  $J = 13.9$  Hz), 3.74 – 3.77 (1H, m), 3.78 (1H, dd,  $J = 10.0, 10.0$  Hz), 3.88 (1H, dd,  $J = 4.1, 11.8$  Hz), 3.92 (1H, dd,  $J = 3.9, 11.2$  Hz), 3.97 (1H, dd,  $J = 2.2, 12.2$  Hz), 4.05 (1H, ddd,  $J = 2.2, 4.1, 10.0$  Hz), 4.27 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 4.30 – 4.45 (4H, m), 5.29 (1H, d,  $J = 4.0$  Hz), 5.81 (1H, d,  $J = 3.2$  Hz). TSPMS:  $m/z$  582 (M+H)<sup>+</sup>.

### 化合物 **16** の合成

Arbekacin<sup>20</sup> (100 g, 1.81 mol)の水溶液 (300 mL)と DMF (600 mL)の混合溶液に Et<sub>3</sub>N (165 mL, 1.17 mol)を加えた。この溶液に、氷浴下で Boc<sub>2</sub>O (237 g, 1.08 mol)を加えて、室温で1晩攪拌した。反応液に AcOEt を加えた後、AcOEt 層を飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液、飽和 NaCl 水溶液で順次洗浄し、無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥した。この溶液を減圧濃縮して、無色固体 (158 g, 83.0%)を得た(FABMS:  $m/z$  1053(M+H)<sup>+</sup>)。この固体 (14.0g, 13.3 mmol)の pyridine 溶液 (30 mL)に、無水酢酸(13 mL)を加え室温で1晩攪拌した。反応液を AcOEt で抽出し、AcOEt 層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt=1:2)で精製し、油状化合物 **16**

(11.6 g, 71.4%)を得た。MS(FABMS:m/z 1259 (M+K)<sup>+</sup>)で構造を確認後、次の反応を行った。

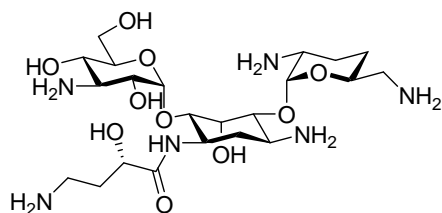
### 化合物 17 の合成

化合物 16 (11.6 g, 9.5 mmol)のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液 (200 mL)に、室温でDMAP (17.2g, 141 mmol)を加えた。この溶液に、氷浴下、MsCl (8.9mL, 112 mmol)を加えて、1時間攪拌した後、室温まで昇温して2時間攪拌した。この反応液に、氷浴下で水(100 mL)を加え、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> で抽出した。この有機層を10%KHSO<sub>4</sub>水溶液、飽和NaHCO<sub>3</sub>水溶液、飽和NaCl水溶液で順次洗浄後、無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt=1:1)で精製し、油状化合物 17 (7.40 g, 60.0%)を得た。MS (FABMS: m/z 1321 (M+Na)<sup>+</sup>, 1337 (M+K)<sup>+</sup>)で構造を確認後、次の反応を行った。

### 化合物 18 の合成

化合物 17 (7.40 g, 5.7 mmol)をDMF (150 mL)に溶解した。この溶液にCsOAc (21.8 g, 114 mmol)を加え、80°Cで2時間攪拌した。反応液を室温まで冷却した後、減圧濃縮した。残渣をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>に溶解し水で洗浄した。有機層を無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt=1:2)で精製し、油状化合物 18 (3.60g, 50.0%)を得た。MS(FABMS: m/z 1263(M+H)<sup>+</sup>)で構造を確認後、次の反応を行った。

### 3-Amino-3-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[2,6-diamino-2,3,4,6-tetra-deoxy- $\alpha$ -D-erythro-hexopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-1-N-[(2S)-4-amino-2-hydroxybutanoyl]-2-deoxy-5-epi-D-streptomine (2a) の合成

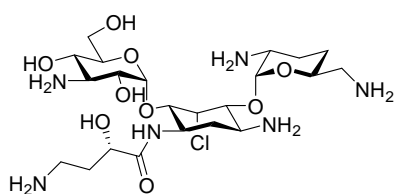


化合物 18 (3.60 g, 2.85 mmol)のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL)の溶液にNaOMe (0.5M MeOH溶液) (5.0 mL)を加えて室温で3時間攪拌した。反応液にドライアイスを加えて30分攪拌後、減圧濃縮した。得られた残渣に90%TFA (15 mL)を加え、室温で1晩攪拌した。反応液に水を加え、水層をEt<sub>2</sub>Oで3回洗浄した。水層をアンモニア水でpH=7に中和後、イオン交換樹脂Bio-Rex70(H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH=20:1)で精製し、アモルファス 2a (1.30 g, 82.6%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O+ND<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.27 – 1.48 (2H, m), 1.64 – 1.80 (4H, m), 1.85 – 1.95 (1H, m), 1.98 – 2.07 (1H, m), 2.60 – 2.86 (5H, m), 3.02 (1H, dd, *J* = 10.3 Hz), 3.17 – 3.26 (2H, m), 3.39 (1H, ddd, *J* = 1.2, 3.9, 10.3 Hz), 3.46 (1H, dd, *J* = 1.2, 10.3 Hz), 3.67 (1H, dd, *J* = 6.9, 12.1 Hz), 3.77 – 3.93 (4H, m), 4.17 (1H, dd, *J* = 3.7, 9.3 Hz), 4.25 (1H, dd, *J* = 4.4, 11.7 Hz), 4.50 (1H, s), 4.94 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 5.40 (1H d, *J* = 3.9 Hz). FABMS: m/z 553 (M+H)<sup>+</sup>.

### 3-Amino-3-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[2,6-diamino-2,3,4,6-tetra-deoxy- $\alpha$ -D-erythro-hexopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-1-N-[(2S)-4-amino-2-hydroxybutanoyl]-2,5-dideoxy-5-epichlor

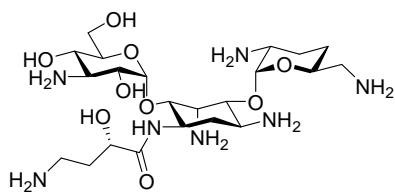


### o-D-streptamine (2b) の合成



化合物 **17** (120 mg, 0.092 mmol)のDMF (5.0 mL)溶液にLiCl (117 mg, 2.76 mmol)を加え、80°Cで2時間攪拌した。反応液を室温まで冷却した後、減圧濃縮した。残渣をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>に溶解し水で洗浄した。有機層を無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt=1:2)で精製し、化合物 **19** (110 mg, 70.0%)を得た。この化合物 **19** (110 mg, 0.089 mmol)のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL)溶液に、NaOMe (0.5M MeOH溶液) (5.0 mL)を加えて室温で3時間攪拌した。反応液にドライアイスを加えて30分攪拌後、減圧濃縮した。得られた残渣に90%TFA (15 mL)を加え、室温で1晩攪拌した。反応液に水を加え、水層をEt<sub>2</sub>Oで3回洗浄した。水層をアンモニア水でpH=7に中和後、イオン交換樹脂Bio-Rex70 (H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH=20:1)で精製し、無色アモルファス **2b** (45.0 mg, 88.7%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O+ND<sub>3</sub>) δ: 1.62 (1H, dddd, *J* = 3.90, 13.67, 13.67, 13.67 Hz), 1.85 (1H, ddd, *J* = 12.7, 12.7, 12.7 Hz), 1.90 – 2.10 (4H, m), 2.17 (1H, ddt, *J* = 3.42, 7.81, 14.16 Hz), 2.34 (1H, ddd, *J* = 4.39, 4.39, 12.7 Hz), 3.09 (1H, dd, *J* = 7.33, 13.19 Hz), 3.17 (2H, dd, *J* = 6.84, 6.84 Hz), 3.27 (1H, dd, *J* = 2.93, 13.18 Hz), 3.38 (1H, dd, *J* = 10.26, 10.26 Hz), 3.58 (1H, dd, *J* = 9.77, 9.77 Hz), 3.58 – 3.63 (1H, m), 3.69 (1H, dd, *J* = 7.33, 12.21 Hz), 3.81 (1H, dd, *J* = 3.90, 11.23 Hz), 3.87 – 3.97 (3H, m), 4.05 – 4.13 (1H, m), 4.28 (1H, dd, *J* = 3.41, 9.27 Hz), 4.30 (1H, dd, *J* = 2.93, 9.77 Hz), 4.38 – 4.45 (1H, m), 4.42 (1H, dd, *J* = 2.93, 10.74 Hz), 5.15 (1H, dd, *J* = 2.93, 2.93 Hz), 5.17 (1H, d, *J* = 3.91 Hz), 5.35 (1H, d, *J* = 3.42 Hz). FABMS: *m/z* 571 (M+H)<sup>+</sup>.

### 3-Amino-3-deoxy-α-D-glucopyranosyl-(1→6)-[2,6-diamino-2,3,4,6-tetrahydro-2H-pyrimidin-4(1H)-one-2,5-dideoxy-5-erythro-hexopyranosyl-(1→4)]-1-N-[(2S)-4-amino-2-hydroxybutanoyl]-2,5-dideoxy-5-epiamino-D-streptamine (2c) の合成



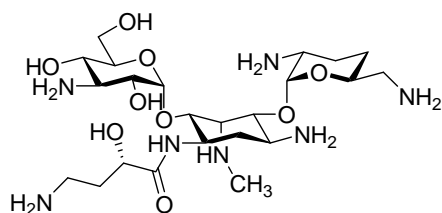
化合物 **17** (100 mg, 0.077 mmol)のDMF (5.0 mL)溶液にNaN<sub>3</sub> (75.0 mg, 1.16 mmol)を加え、80°Cで2時間攪拌した。反応液を室温まで冷却した後、減圧濃縮した。残渣に水を加えてCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で抽出した。有機層を無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt=2:1)で精製し、化合物 **20** (57.0 mg, 59.7%)を得た。この化合物 **20** (57.0 mg, 0.046 mmol)のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(5.0 mL)の溶液に、NaOMe (0.5M MeOH溶液) (5.0 mL)を加えて室温で3時間攪拌した。反応液にドライアイスを加えて30分攪拌後、減圧濃縮した。得られた残渣に90%TFA (15 mL)を加え、室温で1晩攪拌した。反応液に水を加え、水層をEt<sub>2</sub>Oで3回洗浄した。水層をアンモニア水でpH=7に中和後、イオン交換樹脂Bio-Rex70(H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH=20:1)で精製し、化合物 **25** (8.4 mg)を得た。MS(FABMS: *m/z* 578(M+H)<sup>+</sup>)で構造を確認後、この化合物(8.3 mg, 0.0143 mmol)を水(5.0 mL)に溶解し、アルゴン気流下10%Pd-C(8.0 mg)を加えた後、水素置換した。混合液を

室温で 5 時間攪拌した。反応液をセライト濾過した後、ろ液を CM-Sephadex(H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH=20:1)を用いて精製し、無色アモルファス **2c** (5.7 mg, 13.4%:2 工程)得た。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O+ND<sub>3</sub>) δ: 1.27 – 1.48 (1H, m), 1.33 (1H, q, *J* = 12.8 Hz), 1.67 – 1.80 (4H, m), 1.87 – 1.97 (1H, m), 2.01 (1H, dt, *J* = 4.7, 12.8 Hz), 2.62 – 2.87(5H, m), 3.02 (1H, t, *J* = 10.1 Hz), 3.15 – 3.30 (1H, m), 3.38 (1H, dd, *J* = 3.9 Hz, *J* = 10.1 Hz), 3.52 (1H, dd, *J* = 3.1 Hz, *J* = 10.3 Hz), 3.73 – 3.87 (6H, m), 4.19 (1H, dd, *J* = 3.6, 9.5 Hz), 4.26 - 4.35 (1H, m), 4.93 (1H, d, *J* = 3.4 Hz), 5.17 (1H, d, *J* = 3.9 Hz). FABMS: *m/z* 552 (M+H)<sup>+</sup>.

### 化合物 **21** の合成

化合物 **17** (500 mg, 0.385 mmol)のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL)溶液に、NaOMe (0.5M MeOH溶液) (5.0 mL)を加えて室温で3時間攪拌した。反応液にドライアイスを加えて30分攪拌後、減圧濃縮しアモルファス**21** (406 mg, 93.3%)を得た。MS(FABMS:*m/z*1131(M+H)<sup>+</sup>)で構造を確認後、次の反応を行った。

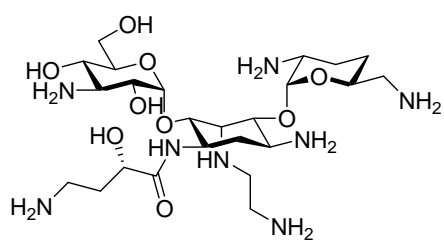
### 3-Amino-3-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[2,6-diamino-2,3,4,6-tetra-deoxy- $\alpha$ -D-erythro-hexopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-1-N-[(2S)-4-amino-2-hydroxybutanoyl]-2,5-dideoxy-5-epimethylamino-D-streptamine (**2d**) の合成



化合物 **21** (100 mg, 0.088 mmol)と methylamine (40%MeOH 溶液、5.0 mL)を封管中 60°Cで 4 日間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=9:1)で精製し、化合物 **22** (27.0 mg, 28.6%)を得た。MS (FABMS: *m/z* 1088(M+Na)<sup>+</sup>)で構造を確認後、化合物 **22** (23.0 mg,

0.021 mmol)に 90%TFA (5 mL)を加えて室温で 1 晩攪拌した。反応液に水を加え、得られた水層を Et<sub>2</sub>O で洗浄した。水層をアンモニア水で pH=7 に中和後、イオン交換樹脂 Bio-Rex70 (H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH=20:1)で精製し、アモルファス **2d** を(12.0 mg, 100%)得た。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O+ND<sub>3</sub>) δ: 1.48 (1H, m), 1.60 (1H, m), 1.90 (4H, m), 2.09 (1H, m), 2.19 (1H, m), 2.74 (3H, s), 2.84 (2H, m), 2.94 (2H, m), 3.01 (1H, m), 3.15 (1H, dd, *J* = 9.7, 10.5 Hz), 3.32 (1H, m), 3.40 (1H, dd, *J* = 9.8, 10.0 Hz), 3.56 (2H, m), 3.72 (1H, dd, *J* = 3.0, 10.0 Hz), 3.88 (2H, m), 3.99 (2H, m), 4.08 (1H, m), 4.35 (1H, dd, *J* = 3.4, 9.3 Hz), 4.52 (1H, ddd, *J* = 4.8, 12.0 Hz), 5.12 (1H, d, *J* = 3.4 Hz), 5.20 (1H, d, *J* = 4.0 Hz). FABMS: *m/z* 566 (M+H)<sup>+</sup>.

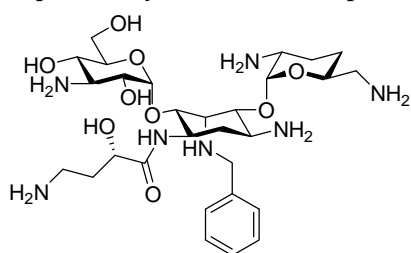
### 3-Amino-3-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[2,6-diamino-2,3,4,6-tetra-deoxy- $\alpha$ -D-erythro-hexopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-1-N-[(2S)-4-amino-2-hydroxybutanoyl]-2,5-dideoxy-5-epi (2-aminoethyl)amino-D-streptamine (**2e**) の合成



化合物 **21** (100 mg, 0.082 mmol) と ethylenediamine (5 mL, 8.57 mmol) を封管中 60°C で 4 日間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>:MeOH=9:1) で精製し、化合物 **23** (21.0 mg, 23.2%) を得た。MS (FABMS: m/z 1095 (M+H)<sup>+</sup>) で構造を確認後、化合物 **23** (21.0 mg, 0.019

mmol) に 90%TFA(5.0 mL) を加え室温で 1 晩攪拌した。反応液に水を加え、得られた水層を Et<sub>2</sub>O で洗浄した。水層をアンモニア水で pH=7 に中和後、イオン交換樹脂 Bio-Rex70(H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH=20:1) で精製して、アモルファス **2e** (11.0 mg, 100%) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O+ND<sub>3</sub>) δ: 1.35 – 1.48 (1H, m), 1.59 (1H, m), 1.90 (4H, m), 2.08 (1H, m), 2.18 (1H, m), 2.83 (2H, m), 2.92 (4H, m), 3.00 (2H, m), 3.13 (1H, dd, J = 10.2 Hz), 3.20 (1H, m), 3.35 (1H, m), 3.40 (1H, dd, J = 10.2 Hz), 3.55 (1H, dd, J = 3.9, 10.2 Hz), 3.65 (1H, brs), 3.71 (1H, dd, J = 3.0, 10.1 Hz), 3.87 (1H, m), 3.97 (2H, m), 4.06 (2H, m), 4.34 (1H, dd, J = 3.5, 9.8 Hz), 4.59 (1H, m), 5.10 (1H, d, J = 3.4 Hz), 5.19 (1H, d, J = 3.9 Hz). FABMS: m/z 595 (M+H)<sup>+</sup>.

### 3-Amino-3-deoxy-α-D-glucopyranosyl-(1→6)-[2,6-diamino-2,3,4,6-tetra-deoxy-α-D-erythro-hexopyranosyl-(1→4)]-1-N-[(2S)-4-amino-2-hydroxybutanoyl]-2,5-dideoxy-5-epibenzylamino-D-streptamine(**2f**) の合成



化合物 **20** (220 mg, 0.204 mmol) を 50%EtOH (4.0 mL) に溶解し、アルゴン気流下、10%Pd-C(200 mg) を加えた。水素置換した後、室温で 1 晩攪拌した。反応液をセライト濾過し、濾液を留去した。残渣を分取 TLC (アセトン) で精製し、油状物(120 mg, 56.0%)を得た。この化合物(100 mg, 0.095 mmol)の DMF (3.0 mL)溶液に、

K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (15.0 mg, 0.114 mmol) および benzylbromide (0.066 mL, 0.55 mmol) を加え、室温で 1 晩攪拌した。反応液を減圧濃縮後、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> で希釈した。この溶液を飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液、飽和食塩水で洗浄、無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後、濃縮乾固して化合物 **24**(64.0 mg) を得た。化合物 **24**(64.0 mg) に 90%TFA(5.0 mL) を加えて室温で 1 晩攪拌した。反応液に水を加え、得られた水層を Et<sub>2</sub>O で洗浄した。水層をアンモニア水で pH=7 に中和後、イオン交換樹脂 Bio-Rex70(H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH=20:1) で精製して、アモルファス **2f** (30 mg, 49.0%) 得た。FABMS: m/z 642 (M+H)<sup>+</sup>.

### 化合物 **26** の合成

化合物 **16** の合成第 1 段階で得られた無色固体 (40 g, 38.0 mmol) の DMF(360 mL) 溶液に、1,1-dimethoxycyclohexane (11.6 mL, 77.3 mmol) および *p*-TsOH H<sub>2</sub>O(1.3g, 7.55 mmol) を加え 50°C、46~48mbar で 5 時間反応させた。この溶液を AcOEt で希釈後、水で洗浄した。有機層を濃縮乾固して化合物 **26** (43.0g, 99.0%) を得た。MS(FABMS: m/z

1155 (M+Na)<sup>+</sup>, 1171 (M+Na)<sup>+</sup>で構造を確認後、次の反応を行った。

### 化合物 27 の合成

化合物 26 (25.0 g, 22.0 mmol)の pyridine (500 mL)溶液に、内温 4~6°Cで benzoyl chloride (8.53mL, 50.6 mmol)を 20 分かけて滴下した。4~6°Cに保ちながら 2 時間攪拌した後、室温まで昇温し、1 時間攪拌した。反応液に水 (0.75 mL)を加えた後、減圧濃縮した。残渣に AcOEt を加え、水、10%KHSO<sub>4</sub> 水溶液、飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液、飽和 LiCl 水溶液で順次洗浄した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後、濃縮してアモルファス 27 (30.0 g, 100%)を得た。MS(FABMS: m/z 1363 (M+Na)<sup>+</sup>, 1379 (M+K)<sup>+</sup>)で構造を確認後、次の反応を行った。

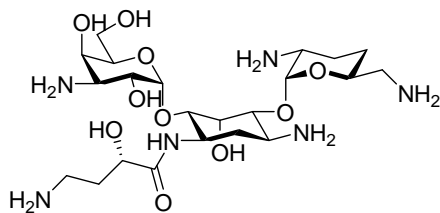
### 化合物 29 の合成

化合物 27 (11.6 g, 8.65 mmol)の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 mL)溶液に、室温で DMAP 18.0g(14.7 mmol)を加えた。この溶液に、氷浴下 MsCl (2.5 mL, 32.3 mmol)を加えた。1 時間攪拌した後、室温まで昇温して 4 時間攪拌した。混合物を氷浴下で水(100 mL)と CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (240 mL)に分配した。有機層を 10%KHSO<sub>4</sub> 水溶液、飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液、および飽和 NaCl 水溶液で順次洗浄し、無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt=1:2)で精製し、油状化合物 28 (7.40 g, 60.3%)を得た。この化合物 28 (6.0 g, 4.23 mmol)を DMF (60 mL)に溶解し、CsOAc (6.4 g, 33.3 mmol)を加え、100°Cで 2 時間反応させた。この溶液を室温まで冷却し、減圧濃縮した。残渣を塩化メチレン 300mL で希釈後、水で洗浄した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt=1:2)で精製しアモルファス 29 (4.6 g, 78.7%)を得た。MS(FABMS: m/z 1405 (M+Na)<sup>+</sup>, 1421 (M+K)<sup>+</sup>)で構造を確認後、次の反応を行った。

### 化合物 30 の合成

化合物 29 (1.70 g, 1.23 mmol)を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL)および MeOH(2.0mL)に溶解した。この溶液に 90%TFA(1.25 mL)を加えて 1 時間攪拌した。反応液に水を加え、AcOEt で抽出した。、有機層を飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水で洗浄し、無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後、減圧濃縮してアモルファス(1.45g, 100%)を得た。MS(FABMS: m/z 1201 (M+Na)<sup>+</sup>)で構造を確認後、この化合物(1.40 g, 0.960 mmol)を pyridine (25mL)に溶解し、TrCl (1.00 g, 3.60 mmol)を加えて 60°Cで 1 晩攪拌した。反応後 MeOH (0.75 mL)を加えて 1 時間攪拌した。この反応液を AcOEt で希釈し、無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮し、アモルファス 30(1.00 g, 68.2%)を得た。MS(FABMS: m/z 1567 (M+Na)<sup>+</sup>)で構造を確認後次の反応を行った。

### 3-Amino-3-deoxy-4-epi- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[2,6-diamino-2,3,4,6-tetra-deoxy- $\alpha$ -D-erythro-hexopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-1-N-[(2S)-4-amino-2-hydroxybutanoyl]-2-deoxy-5-epi-D-streptamine (3a) の合成



化合物 **30** (0.84 g, 0.54 mmol)の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8.0 mL)溶液に、pyridine (0.54 mL)を加えた。この溶液に−18℃に冷却下、Tf<sub>2</sub>O (0.24 mL)を加え、−5℃で 2 時間攪拌した。MeOH を 6 滴加えた後、反応溶液を AcOEt で希釈した。この溶液を氷水、飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水、および

10%KHSO<sub>4</sub> 水で洗浄し、有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮した。残渣にトルエンを加えてさらに減圧濃縮した。得られた残渣を DMF (9.0 mL)に溶解し、検体乾燥機にて 120℃で 2 時間反応させた CsOAc (0.59 g, 3.10mmol)を加え室温で 2 時間攪拌した。反応液に水を加え AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後、減圧濃縮して化合物 **31** を 0.93 g 得た。この化合物 **31**(0.92 g)を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 15 mL に溶解し、NaOMe (0.5M MeOH 溶液) (5.0 mL)を加えて室温で 3 時間攪拌した。反応液にドライアイスを加えて 30 分攪拌後、減圧濃縮し得られた残渣(0.72 g)に 90%TFA(15 mL)を加えて室温で 1 晩攪拌した。反応液に水 10 mL を加え、混合物を Et<sub>2</sub>O (5.0 mL)で 3 回洗浄した。水層をアンモニア水で pH=7 に中和し、さらに Bio-Rex(H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH=30:1)で精製してアモルファス **3a** (0.16 g, 53.5%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O+ND<sub>3</sub>) δ: 1.54 (1H, m), 1.60 (1H, m), 1.93 (4H, m), 2.11 (1H, m), 2.22 (1H, ddd, *J* = 4.4, 4.6, 12.9 Hz), 2.85 (2H, m), 2.94 (2H, m), 3.02 (1H, m), 3.17 (1H, dd, *J* = 2.9, 10.7 Hz), 3.41 (1H, m), 3.67 (1H, dd, 2.4, 10.0 Hz), 3.76 (1H, dd, *J* = 3.9, 10.7 Hz), 3.92 (2H, m), 4.00 (1H, dd, *J* = 2.6, 10.5 Hz), 4.02 (1H, m), 4.07 (1H, brd), 4.27 (1H, m), 4.38 (1H, dd, *J* = 3.6, 9.2 Hz), 4.46 (1H, m), 4.75 (1H, dd, *J* = 2.3 Hz), 5.14 (1H, d, *J* = 3.4 Hz), 5.27 (1H, d, *J* = 3.9 Hz). TSPMS: *m/z* 553 (M+H)<sup>+</sup>.

### 化合物 **34** の合成

化合物 **26** (2.50 g, 2.21 mmol)の pyridine (7.0 mL)溶液に、無水酢酸(3.0 mL)を加え、室温で 1 晩攪拌した。反応液を AcOEt で抽出し、無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt=1:2)で精製し、アモルファス **34** (1.90 g, 70.7%)を得た。MS(ESIMS: *m/z* 1217 (M+H)<sup>+</sup>)で構造を確認後、次の反応を行った。

### 化合物 **35** の合成

化合物 **34** (2.74 g, 2.25 mmol)を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80 mL)および MeOH (10 mL)に溶解した。この溶液に 90%TFA(4.0 mL)を加えて 1 時間攪拌した。反応液に水(40 mL)を加え有機層を分取した。有機層を飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水で洗浄し、無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮し、4",6"位が脱保護された油状化合物(2.50 g, 97.6%)を得た。MS(FABMS: *m/z* 1159 (M+Na)<sup>+</sup>)で構造を確認後、この化合物(2.4g, 2.11 mmol)の pyridine (12mL)溶液に、TrCl (1.76 g, 6.33 mmol)を加えて 60℃で 1 晩攪拌した。反応後、MeOH (3.0 mL)を加えて 1 時間攪拌した。この反応液を AcOEt で抽出し、有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮し、油状化合物 **35** (2.20 g, 75.7%)を得た。MS(FABMS: *m/z* 1379 (M+H)<sup>+</sup>)で構造を確認後、次の反応

を行った。

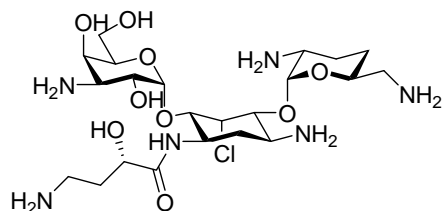
### 化合物 36 の合成

化合物 **35** (0.80 g, 0.58 mmol)の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (16.0 mL)溶液に、pyridine (0.80 mL)を加えた。-18°Cに冷却下、Tf<sub>2</sub>O (0.29 mL, 1.74 mmol)を加え-5°Cで 2 時間攪拌した。反応液に MeOH を 5 滴加え攪拌した後、AcOEt で希釈した。有機層を、氷水、飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液、10%KHSO<sub>4</sub> 水溶液で洗浄し、無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮した。残渣にトルエンを加えてさらに減圧濃縮した。得られた残渣を DMF (5.0 mL)に溶解し、CsOAc (1.11g, 5.80 mmol)を加え室温で 2 時間攪拌した。反応液を AcOEt で希釈後、無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥し、化合物 **36** (0.53g, 64.3%)を得た。MS(FABMS: m/z 1443 (M+Na)<sup>+</sup>)で構造を確認後、次の反応を行った。

### 化合物 38 の合成

化合物 **36** (0.270 g, 0.193 mmol)の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8.5 mL)溶液に、MsCl (0.17mL, 2.30 mmol) および DMAP (3.50 g, 2.87 mmol)を加え室温で 1 晩攪拌した。反応液を AcOEt および水に分配した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt=1:2)で精製し、アモルファス **37**(0.250 g, 87.0%)を得た。この化合物 **37** (0.21 g, 0.14 mmol)の DMF(5.0 mL)溶液に、LiCl(0.180 g, 4.20 mmol)を加え、100°Cで 2 時間攪拌した。反応液を室温まで冷却し、減圧濃縮後、残渣に AcOEt を加えた。有機層を水でおよび飽和 NaCl 水溶液で洗浄し、無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥、減圧濃縮した。得られた残渣を分取 TLC (hexane:AcOEt=1:2) で精製し、アモルファス **38**(0.13 g, 64.6%)得た。MS(FABMS: m/z 1461 (M+Na)<sup>+</sup>, 1477 (M+K)<sup>+</sup>)で構造を確認後、次の反応を行った。

### 3-Amino-3-deoxy-4-epi- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[2,6-diamino-2,3,4,6-tetra-deoxy- $\alpha$ -D-erythro-hexopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-1-N-[(2S)-4-amino-2-hydroxybutanoyl]-2,5-dideoxy-5-epichloro-D-streptamine (**3b**) の合成



化合物 **38** (42.0 mg, 0.029 mmol)の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6.0 mL) 溶液に、NaOMe (0.5M MeOH 溶液) (3.0 mL)を加えて室温で 2 時間攪拌した。反応液にドライアイスを加え、30 分攪拌後減圧濃縮した。得られた残渣に 90%TFA (5.0 mL)を加え、室温で 1 晩攪拌した。反応液を減圧濃縮し、アンモニア水を加え再度減圧濃縮した。得られた残渣をイオン交換樹脂 CM-Sephadex(H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH=30:1)で精製し、化合物 **3b** (12.0 mg, 72.4%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O+ND<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.60 (2H, m), 1.92 (4H, m), 2.11 (1H, m), 2.26 (1H, m), 2.85 (2H, m), 2.98 (3H, m), 3.16 (1H, dd,  $J = 2.9, 10.7$  Hz), 3.52 (1H, m), 3.77 (1H, dd,  $J = 3.9, 10.7$  Hz), 3.92 (3H, m), 4.02 (1H, m), 4.07 (1H, brd,  $J = 2.9$  Hz), 4.24 (1H, dd,  $J = 3.1, 10.5$  Hz), 4.33 (1H, m), 4.38 (1H, dd,  $J = 3.6, 9.2$  Hz), 4.53 (1H, m),

5.10 (1H, d,  $J = 3.4$  Hz), 5.23 (1H, brs,  $J = 3.7$  Hz), 5.27 (1H, d,  $J = 3.9$  Hz). FABMS:  $m/z$  571 (M+H)<sup>+</sup>.

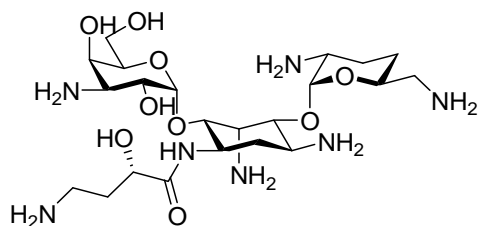
### 化合物 39 の合成

化合物 38 の合成第 1 段階で得られた。化合物 37 (100 mg, 0.067 mmol)の DMF (5.0 mL)溶液に、アジ化ナトリウム(65.0 mg, 1.0 mmol)を加え、80°Cで 1 時間攪拌した。反応液を室温まで冷却し、AcOEt を加えた。有機層を水、飽和 NaCl 水溶液で洗浄し、無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:AcOEt=1:2) で精製し、化合物 39 (57.0mg, 58.8%)を得た。MS(FABMS:  $m/z$  1446 (M+H)<sup>+</sup>)で構造を確認後、次の反応を行った。

### 化合物 40 の合成

化合物 39 (52.0 mg, 0.021 mmol)をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5.0 mL)に溶解し、NaOMe (0.5M MeOH溶液) (2.5 mL) を加えて室温で2時間攪拌した。反応液にドライアイスを加え、30分攪拌後減圧濃縮した。得られた残渣に90%TFAを加え室温で1晩攪拌した。反応液を減圧濃縮し、アンモニア水を加えて再度減圧濃縮した。得られた残渣をイオン交換樹脂CM-Sephadex(H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH=20:1)で精製し、アモルファス 40 (6.3 mg, 52.0%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O+ND<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.54 (1H, m), 1.60 (1H, m), 1.92 (4H, m), 2.12 (1H, m), 2.19 (1H, ddd,  $J = 4.5, 12.9$  Hz), 2.86 (2H, m), 2.95 (2H, m), 3.04 (1H, m), 3.14 (1H, dd,  $J = 3.0, 10.7$  Hz), 3.34 (1H, m), 3.78 (2H, m), 3.95 (2H, m), 4.00 (1H, m), 4.09 (2H, brd), 4.24 (2H, m), 4.37 (1H, dd,  $J = 3.6, 9.3$  Hz), 4.46 (1H, ddd,  $J = 3.6, 11.5$  Hz), 4.61 (1H, brs), 5.16 (1H, d,  $J = 3.4$  Hz), 5.30 (1H, d,  $J = 3.9$  Hz). FABMS:  $m/z$  578 (M+H)<sup>+</sup>.

### 3-Amino-3-deoxy-4-epi- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[2,6-diamino-2,3,4,6-tetra-deoxy- $\alpha$ -D-erythro-hexopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-1-N-[(2S)-4-amino-2-hydroxybutanoyl]-2,5-dideoxy-5-epiamino-D-streptamine (3c) の合成



化合物 40 (6.25 mg, 0.010 mmol)の水溶液(5.0 mL)に、アルゴン気流下10%Pd-C(8.0 mg)を加えた。水素置換を行い、室温で5時間攪拌した。反応液をセライト濾過した後、濾液をイオン交換樹脂CM-Sphadex(H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH=20:1)を用いて精製し、アモルファス 3c (4.07 mg, 68.7%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O+ND<sub>3</sub>):  $\delta$  1.57 (1H, m), 1.62 (1H, m), 1.97 (4H, m), 2.15 (1H, m), 2.23 (1H, m), 2.89 (2H, m), 2.98 (2H, m), 3.05 (1H, m), 3.20 (1H, dd,  $J = 3.2, 11.0$  Hz), 3.47 (1H, ddd,  $J = 4.4, 11.7$  Hz), 3.74 (1H, dd,  $J = 3.4, 10.3$  Hz), 3.79 (1H, dd,  $J = 3.9, 11.0$  Hz), 3.94 (2H, m), 4.04 (2H, m), 4.12 (2H, m), 4.22 (1H, dd,  $J = 6.1$  Hz), 4.41 (1H, dd,  $J = 3.4, 9.3$  Hz), 4.52 (1H, ddd,  $J = 3.6, 7.3$  Hz), 5.16 (1H, d,  $J = 3.2$  Hz), 5.30 (1H, d,

$J = 3.9 \text{ Hz}$ ). FABMS:  $m/z$  552 (M+H)<sup>+</sup>.

## 第1章生物評価に関する実験

### 抗菌活性の測定

対象菌株に対するMICをNCCLSの方法に準じた寒天平板法<sup>72</sup>で測定した。ただし、探索初期においては、旧化学療学会標準法の100mg/mLを基準とした濃度設定を使用した。Mueller-Hinton agar (MHA、Difco)を用いて、**3a**および既存薬含有平板を作製した。接種用菌液は、Mueller-Hinton broth (MHB、Difco)で一夜培養した菌液を用時調整したMHBでグラム陽性菌では100倍、グラム陰性菌では1000倍に希釈したものを使用した。抗菌活性の判定では、接種用菌液5 $\mu$ Lをマイクロプランター（佐久間製作所）でMHA平板上に接種し、35 $^{\circ}$ Cで20時間培養後に菌の発育がみられない最小薬剤濃度をMIC値とした。

抗菌活性測定には以下の菌株を使用した。

*S. aureus* 209P JC-1: 感受性株 MSSA（一般的に実験に用いられる感受性株）

*S. aureus* MF490: 臨床分離株 MRSA, 保有遺伝子 *aad(4')-I, aac(6')-aph(2'')*

*E. coli* NIHJ JC-2: 感受性株（一般的に実験に用いられる感受性株）

*P. aeruginosa* PAO1: 感受性株（一般的に実験に用いられる感受性株）

*P. aeruginosa* N101: *P. aeruginosa* PAO1の $\Delta$ mexXY株<sup>44</sup>

感受性分布試験には、1996～2002年に分離された臨床分離株を使用した。

### 修飾酵素に対する安定性試験

1) *S. aureus* RN4220/pMF490株 (*S. aureus* RN4220\*にプラスミドを導入し、二機能性酵素 AAC(6')-APH(2'')のみを産生) の一夜培養菌液20 mLをLBブロス200 mLに接種し、振盪培養 (37 $^{\circ}$ C, 5時間) 後、7,000 rpm/15分遠心分離により集菌した。その後、50 mM Tris-HCl (pH7.6) で菌体を洗浄し再度遠心分離により集菌後、Lysostaphin (和光純薬) を最終濃度 50  $\mu$ g / mL となるように添加した。さらに、50 mM Tris-HCl (pH7.6) 5 mL に菌体を懸濁し、インキュベート (37 $^{\circ}$ C, 30分) した。この懸濁液を超音波破碎し、遠心分離 (4 $^{\circ}$ C, 15,000 rpm, 35分) して得られた上清を粗酵素液とした。なお、粗酵素液のタンパク濃度は、Bio-Rad protein assay (Bio-Rad) を用いて測定しタンパク量 (mg protein/mL) として表した。

\**S. aureus* RN4220: 遺伝子の受容菌として実験に用いられる感受性の実験株

2) 1) で調製した二機能性酵素を用いて、**45e** の修飾酵素に対する安定性を以下のように評価した。100 mM PB (pH=8.0) : 4 mM Acetyl CoA : 20 mM ATP : 20 mM MgAc を 3 : 1 : 1 : 1 の比率で混合した溶液 80  $\mu$ L に種々の濃度の粗酵素液 40  $\mu$ L 及び薬剤 10.4  $\mu$ L を添加 (最終濃度 250  $\mu$ g / mL) し、インキュベート (37 $^{\circ}$ C, 3時間) した。また、反応液の組成を変えることにより、AAC(6')あるいはAPH(2'')のそれぞれの活性



を単独で発現させ、化合物の修飾の程度を調べた。すなわち、AAC(6')反応では ATP の代わりに DW を、APH(2'')反応では Acetyl CoA の代わりに DW、MgAc の代わりに 20mM MgCl<sub>2</sub> を加え反応させた。対照液は、4 mM acetyl CoA 及び 20 mM ATP の代わりに DW を添加したものを使用した。なお、反応停止は、5 分間加熱することによって酵素を失活させることにより行った。以上のサンプルを使用して、二機能性酵素が **45e** に及ぼす修飾効果を以下の 3 種類の方法で評価した。

**TLC による定性反応方法**：粗酵素反応液及び薬剤 (250 µg / mL) をシリカゲルプレートにそれぞれ 5 µL ずつスポットし、展開用バッファー (塩化メチレン:メタノール:アンモニア水=1:4:3) にて 1~1.5 時間展開した。その後、シリカゲルプレートを乾燥、ニンヒドリン反応にて各反応生成物を検出した。

**抗菌活性残存率の測定**：残存力価の測定はバイオアッセイにて実施した。すなわち、粗酵素反応液あるいは対照液 20 µL をペーパーディスク (ADVANTEC, 8 mm, 薄型) に浸透させた。これを、*B. subtilis* ATCC6633 で混釈した感受性ディスク用アガー-N (SDA, 日水) に乗せ、予備拡散 (4°C、1 時間) した。さらに、32°C で 18~20 時間培養した後、発育阻止円径を測定した。この条件による標準曲線を作成し、粗酵素反応液サンプルで得られた阻止円径と比較することで残存薬剤量を算出した。抗菌活性残存率は対照を 100% として計算した。

**LC/MS によるアミノ糖の測定方法**：分離カラムは ODS 逆相カラム (資生堂: Capcell Pak C18 AQ 3×150mm) を使用した。溶離液は 0.2% ペンタフルオロプロピオン酸 (PFPA) 及びアセトニトリルを用いた。分離分析は WatersZQ システムにて実施した。分離条件は、流速を 0.4mL/分として、アセトニトリル濃度を 15 分間かけて 10% から 30% に暫増するリニアグラジェント法で実施した。なお、予測代謝物である各アミノグリコシドのアセチル化体、リン酸化体、アセチル化+リン酸化体は、以下の各イオンをモニターしてエレクトロスプレー (ESI) 法にて検出した。

原体：原体の分子量+H

アセチル化体：原体の分子量+42+H

リン酸化体：原体の分子量+80+H

アセチル化+リン酸化体：原体の分子量+42+80+H

### 短時間殺菌力の測定

短時間殺菌力の試験は、感受性分布試験に使用した株のうち、AAC(6')-APH(2'')および AAD(4')を産生し、ゲンタマイシンに耐性を示す 4 株に、1992 年に臨床分離された MRSA *S. aureus* MF535 (分離源カテ先) を加えた計 5 株を使用した。これらの株の MIC および短時間殺菌力を以下の方法で評価した。

微量液体希釈法による MIC 測定：NCCLS の勧告を参考に微量液体希釈法で MIC を測定した。測定用液体培地として BBL<sup>TM</sup> Mueller-Hinton II broth cation adjusted (MHB-II、Becton, Dickinson) を用いた。試験菌は、Mueller-Hinton agar (MHA、Difco) 平板上の発育集落をプラスチックエーゼでかきとったものを使用し、MHB-II で懸濁した。濁度は  $O.D_{625nm} \doteq 0.1$  に調整した。この菌液はさらに同新鮮培地で 100 倍希釈し、接種菌量が  $10^4$  cfu/well になるように薬剤含有培地に添加した。判定は、35°C で 20 時間培養後に行なった。判定には菌の発育が認められない最小薬剤濃度を MIC として用いた。

短時間殺菌力の測定：被験菌は、MIC の測定に用いた接種菌液調製と同様の直接コロニー懸濁法で調製した。試験菌液は、濁度を  $O.D_{625nm} \doteq 0.1$  にそろえ、MHB-II で 800 倍（約  $10^5$  cfu/mL）に希釈したものを使用した。殺菌力の測定では、35°C で 2 時間の振盪培養を施した後に、対数増殖期にある菌に対して、MIC を基準に 1~4MIC 濃度の薬剤を作用させ、35°C で振盪培養を継続した。その後、薬剤作用時から 2、4 および 6 時間後に培養液を採取して、buffered saline gelatin (BSG) による 10 倍希釈系列を作り、希釈済みの培養液 100  $\mu$ L を MHA 平板上に塗布した。菌数計測平板への薬剤の持ち込みによる影響を考慮し、培養原液は使用しなかった。MHA 平板に添付した培養液は、35°C で 24 時間培養した。培養液中の生菌数は、平板上の発育コロニー数を計測し、 $[\text{Log}_{10}(\text{cfu/mL})]$  を求めた。データは、5 菌株の平均値とその SD を用いて表記した。

## 第 2 章の合成に関する実験

### Diethyl 4-bromophthalate (47) の合成

4-bromo phthalicanhydride (4.50 g, 20.0 mmol) の EtOH (30 mL) 懸濁液に、*p*TsOH $\cdot$ H<sub>2</sub>O (0.038 g, 0.20 mmol) を加え、7 時間加熱還流した (油浴 100°C)。反応液を減圧濃縮した後、残渣に水を加えて AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) に溶解した。この溶液に BOP 試薬 (8.8 g, 20.0 mmol)、diisopropylethylamine (7.0 mL, 40.0 mmol) を加え室温で 1 時間攪拌後、EtOH (30 mL) を加え室温で 2 日間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣に水を加え AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:AcOEt=4:1) で精製し、化合物 47 (4.70 g, 79.0%) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.37 (6H, m), 4.37 (4H, m), 7.60 (1H, d,  $J=8.3\text{Hz}$ ), 7.64 (1H, dd,  $J=1.9, 8.3\text{Hz}$ ), 7.81 (1H, d,  $J=1.9\text{Hz}$ ). EIMS:  $m/z$  300 ( $M^+$ ).

### Diethyl 4-buthylphthalic acid (41a) の合成

化合物 47 (0.30 g, 1.00 mmol) の脱水トルエン (5.0 mL) 溶液にアルゴン

置換後 *n*-butyl boronic acid (0.20 g, 2.00 mmol)、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(0.280g 2.00 mmol)、Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.120 g, 0.10 mmol)を加え 80°Cで 4 時間攪拌した。反応液を分 TLC(hexane:AcOEt=2:1) を用いて精製し、4-*n*-buthylphthalicacid diethylester と 4-*n*-buthylphthalicacid ethylester の混合物(0.180 g)を得た。得られた混合物(0.100 g)を THF (6.0 mL)および MeOH(3.0 mL)に溶解し、1M NaOH(5.0 mL)を加え室温で 4 時間攪拌した。反応液に 1M HCl(5.0 mL)を加えた後減圧濃縮した。得られた残渣を逆相カラムクロマトグラフィー (ODS、H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN=9:1~3:2)で精製し無色固体 **41a**(5.0 mg, 4.21%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>): δ 0.95 (3H, t, *J*=7.3 Hz), 1.37 (2H, m), 1.63 (2H, m), 2.70 (2H, t, *J*=7.8Hz), 7.39 (1H, dd, *J*=1.1, 7.8Hz), 7.60(1H, d, *J*=1.1Hz), 7.80(1H, d, *J*=7.8Hz). ESIMS:m/z 223 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 4-*tert*-Buthylphthalic acid (**41c**) の合成

4-*tert*-buthylphthalic anhydride (0.50 g, 2.51 mmol)を THF(5.0 mL)および水(5.0 mL)に溶解した。この混合溶液に、1M NaOH(2.0 mL)を加え室温で 1 晩攪拌した。反応液に 1M HCl(5.0 mL)を加え酸性にした後、減圧濃縮した。得られた残渣を逆相カラムクロマトグラフィー (ODS、H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN=9:1~7:3)で精製し無色固体 **41c**(0.30 g, 55.2%)を得た。Mp:165°C. <sup>1</sup>H-NMR(CD<sub>3</sub>OD): δ 1.37 (9H, s), 7.62 (1H, dd, *J*=1.9, 8.2Hz), 7.81(1H, d, *J*=1.9Hz), 7.84(1H, d, *J*=8.2Hz). FABMS:m/z 223 (M+H)<sup>+</sup>.

#### Diethyl(1,1'-Biphenyl)-3,4-dicarboxylate (**48d**) の合成

化合物 **47** (0.30 g, 1.00 mmol) の脱水トルエン(5.0 mL)溶液にアルゴン気流下、phenyl boronic acid (0.24 g, 2.0 mmol)、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>0.28 g (2.03 mmol)、Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.12 g, 0.10 mmol)を加え 80°Cで 4 時間攪拌した。反応液に水を加え、AcOEt で抽出した。抽出層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt=2:1)で精製し油状化合物 **48d** (0.27 g, 93.0%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>)δ:1.38 (6H, t, *J*=7.0Hz), 4.38 (4H, m), 7.45 (3H, m), 7.60 (2H, m), 7.72 (1H, dd, *J*=1.8, 8.0Hz), 7.82(1H, d, *J*=8.0Hz), 7.88(1H, d, *J*=1.8Hz). EIMS: m/z 298 (M<sup>+</sup>).

#### (1,1'-Biphenyl)-3,4-dicarboxylic acid (**41d**) の合成

化合物 **48d** (0.140 g, 0.47 mmol)の THF(10 mL)、MeOH(5.0 mL)の混合液に溶液に、1M NaOH(5.0 mL)を加え室温で 1 晩攪拌攪拌した。反応液に 1MHCl (7.0 mL)を加え酸性にした後、AcOEt で抽出し、有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮し、無色固体 **41d**(0.10 g, 88.0%)を得た。Mp:195-196°C. <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>): δ 7.39 (1H, m), 7.46 (2H, m), 7.62 (2H, m), 7.74

(1H, dd,  $J=2.0, 8.0\text{Hz}$ ), 7.90(1H, d,  $J=8.0\text{Hz}$ ), 7.99(1H, d,  $J=2.0\text{Hz}$ ).EIMS:  $m/z$  242( $M^+$ ).

### 3-Methylphthalic acid (42a) の合成

3-methylphthalic anhydride (500 mg, 3.09 mmol)の THF (5.0 mL)、水 (5.0 mL)の混合溶液に、1.0M NaOH(3.0 mL)を加え室温で 1 晩攪拌した。反応液に 1.0M HClを加え pH2 にした後減圧濃縮した。得られた残渣を逆相カラムクロマトグラフィー (ODS、 $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}=9:1\sim 7:3$ )で精製し、無色固体 **42a** (550 mg, 100%)を得た。Mp:157-158°C。 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  3.12 (3H, s), 7.34 (1H, dd,  $J=7.6\text{ Hz}$ ), 7.40 (1H, d,  $J=7.6\text{ Hz}$ ), 7.84 (1H, d,  $J=7.6\text{ Hz}$ ).ESIMS : $m/z$  179( $M-H$ ) $^-$ .

### Diethyl 3-nitrophthalate (50) の合成

3-nitrophthalic acid **49** (5.00 g, 23.6 mmol) の EtOH(100 mL)溶液に、 $\text{cH}_2\text{SO}_4$ (10 mL)を加え 6 時間加熱還流した。反応液に水を加え、AcOEt で抽出し、有機層を無水  $\text{MgSO}_4$  で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣を DMF(200 mL)に溶解し、 $\text{K}_2\text{CO}_3$ (9.78 g, 70.9mmol)、ethyl iodide(2.9 mL, 36.3 mmol)を加え室温で 1 晩攪拌した。反応液に水を加え AcOEt で抽出し、有機層を無水  $\text{MgSO}_4$  で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:AcOEt=1:1)を用いて精製し、油状化合物 **50** (5.68 g, 90.1%) を得た。 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  1.40 (6H, m), 4.40 (2H, q,  $J=7.0\text{ Hz}$ ), 4.49 (2H, q,  $J=7.2\text{ Hz}$ ), 7.67 (1H, dd,  $J= 8.0\text{ Hz}$ ), 8.34 (2H, m). ESIMS: $m/z$  268 ( $M+H$ ) $^+$ .

### Diethyl 3-aminophthalate (51) の合成

化合物 **50** (2.67 g, 10.0 mmol)の EtOH(40 mL)溶液に、アルゴン気流下 10% Pd-C (0.53 g)を加え、水素置換した。反応液を室温で 5 時間攪拌した。反応液をセライト濾過した後、濾液を減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:AcOEt=7:3)で精製し、アモルファス **51** (2.38 g, 100%)を得た。 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$  1.33 (3H, t,  $J=7.3\text{ Hz}$ ), 1.35 (3H, t,  $J=7.3\text{ Hz}$ ), 4.29 (2H, q,  $J=7.3\text{ Hz}$ ), 4.30 (2H, q,  $J=7.3\text{ Hz}$ ), 6.76 (1H, dd,  $J=1.2, 7.5\text{Hz}$ ), 6.87 (1H, dd,  $J=1.2, 7.5\text{ Hz}$ ), 7.21 (1H, dd,  $J=7.5, 7.5\text{ Hz}$ ).ESIMS: $m/z$  238( $M+H$ ) $^+$ .

### Diethyl 3-bromophthalate (52) の合成

化合物 **51** (2.30 g, 9.66 mmol)の水 (40 mL)および 48% HBr (20 mL)に溶解した。この溶液に、 $\text{NaNO}_2$  (680 mg, 9.85 mmol)を加え室温で 1 時間攪拌

した。この反応液に、CuBr(I)(1.40 g, 9.75 mmol)を 48% HBr(8.0 mL)に溶解した溶液を加え 70°C で 1 晩攪拌した。反応液を 5.0M NaOH で中和後、AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane/AcOEt=7:3)で精製し、アモルファス **52** (2.23 g, 76.4%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.37 (3H, t, *J*=7.3 Hz), 1.42 (3H, t, *J*=7.3 Hz), 4.36 (2H, q, *J*=7.3 Hz), 4.46 (2H, q, *J*=7.3 Hz), 7.34 (1H, dd, *J*= 0.8, 8.0 Hz), 7.76 (1H, dd, *J*= 0.8, 8.0 Hz), 7.99 (1H, dd, *J*=8.0, 8.0 Hz). EIMS: *m/z* 300, 302(M<sup>+</sup>).

### Diethyl biphenyl-2,3-dicarboxylate (**53b**) の合成

アルゴン雰囲気下、化合物 **52** (300 mg, 1.00 mmol)のトルエン(5.0 mL)溶液に、phenylboronic acid (244 mg, 2.01 mmol)、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(276 mg, 2.00 mmol)、および Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(120 mg, 0.1 mmol)を加え 80°C で 1 晩攪拌した。反応液に水を加え、AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt=7:3)を用いて精製し、アモルファス **53b** (160 mg, 54.0%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.02 (3H, t, *J*=7.2 Hz), 1.37 (3H, t, *J*=7.2 Hz), 4.11 (2H, q, *J*=7.2 Hz), 4.36 (2H, q, *J*=7.2 Hz), 6.83 (1H, d, *J*=7.8 Hz), 7.51 (6H, m), 7.99 (1H, dd, *J*=2.4, 7.8 Hz). ESIMS: *m/z* 299 (M+H)<sup>+</sup>.

### Biphenyl-2,3-dicarboxylic acid (**42b**) の合成

化合物 **53b** (160 mg, 0.54 mmol)の 1,4-dioxane(1.0 mL)溶液に 5.0 M NaOH(5.0 mL)を加え、80°C で 1 晩攪拌した。反応液に 1.0M HClを加え pH=2 にした後、AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮し、淡黄色固体 **42b** (115 mg, 88.0%)を得た。Mp:171-172°C. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.40 (5H, m), 7.54-7.61 (2H, m), 8.05 (1H, dd, *J*=1.5, 7.6 Hz); FABMS: *m/z* 243 (M+H)<sup>+</sup>

### Diethyl 3'-(benzyloxy)biphenyl-2,3-dicarboxylate (**53c**) の合成

アルゴン雰囲気下、化合物 **52** (100 mg, 0.36 mmol) のトルエン(3.0 mL)溶液に、2-(3-benzyloxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxabororane(230 mg, 0.73 mmol)、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(100 mg, 0.73 mmol)、および Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (84.0 mg, 0.073 mmol)を加え 80°C で 1 晩攪拌した。反応液に水を加え、AcOEt で抽出し、有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt=3:1)を用いて精製し、油状化合物 **53c** (37.0 mg, 25.4%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.05 (3H, t, *J*=7.2 Hz), 1.37 (3H, t, *J*=7.2 Hz), 4.13 (2H, q, *J*=7.2 Hz), 4.36 (2H, q, *J*=7.2 Hz),

5.08 (2H, s), 6.98 (3H, m), 7.39 (7H, m), 7.99 (1H, dd,  $J=2.2, 6.8\text{Hz}$ ). ESIMS:  $m/z$  405(M+H)<sup>+</sup>.

### 3'-Hydroxybiphenyl-2,3-dicarboxylic acid (42c) の合成

化合物 **53c** (37.0 mg, 0.091 mmol)を EtOH (10 mL)および水(1.0 mL)に溶解した。この溶液に、アルゴン雰囲気下、10% Pd-C (17.0 mg)を加えた。水素置換後、1晩室温で攪拌した。反応液をセライト濾過した後、濾液を減圧濃縮した。得られた残渣に 1,4-dioxane(1.0 mL)および 5.0M NaOH 5.0 mL を加え 80°C で 1晩攪拌した。反応液に 1.0M HCl を加え pH=2 にした後、AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮し、淡黄色固体 **42c** (14.0 mg, 59.6 %)を得た。Mp:190–191°C. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  6.76 (3H, m), 7.19 (1H, t,  $J=7.7\text{ Hz}$ ), 7.50 (2H, m), 7.86 (1H, d,  $J=7.0\text{ Hz}$ ). FABMS:  $m/z$  259(M+H)<sup>+</sup>.

### Diethyl 4'-(benzyloxy)biphenyl-2,3-dicarboxylate (53d) の合成

アルゴン雰囲気下、化合物 **52** (110 mg, 0.36 mmol) のトルエン(5.0 mL)溶液に、2-(4-benzyloxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxabororane(230 mg, 0.73 mmol)、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(110 mg, 0.73 mmol)、および Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (84.0 mg, 0.073 mmol)を加え 80°C で 1晩攪拌した。反応液をセライト濾過し濾液を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:AcOEt=7:3)で精製し、アモルファス **53d**(75.0 mg, 51.6%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): $\delta$  1.37 (3H, t,  $J=7.1\text{ Hz}$ ), 1.42 (3H, t,  $J=7.1\text{ Hz}$ ), 4.36 (2H, q,  $J=7.1\text{ Hz}$ ), 4.46 (2H, q,  $J=7.1\text{ Hz}$ ), 5.00 (1H, brs), 5.10 (1H, brs), 6.75 (1H, d,  $J=8.8\text{ Hz}$ ), 6.85 (1H, d,  $J=8.8\text{ Hz}$ ), 6.99 (1H, dd,  $J=8.4, 8.4\text{ Hz}$ ), 7.41 (7H, m), 7.76 (1H, dd,  $J=1.0, 8.4\text{ Hz}$ ), 7.99 (1H, dd,  $J=1.0, 8.4\text{ Hz}$ ). ESIMS: $m/z$  405(M+H)<sup>+</sup>.

### 4'-Hydroxybiphenyl-2,3-dicarboxylic acid (42d) の合成

化合物 **53d** (75.0 mg, 18.6 mmol)の EtOH(5.0 mL)溶液に、アルゴン雰囲気下、10% Pd-C 15.0 mg を加えた。水素置換後、混合溶液を 1晩室温で攪拌した。反応液をセライト濾過した後、濾液を減圧濃縮した。得られた残渣に 1,4-dioxane(1.0 mL)および 5.0M NaOH(5.0 mL)を加え 80°C で 1晩攪拌した。反応液に 1.0M HCl を加え pH2 にした後、AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮し、無色固体 **42d** (8.0 mg, 30.9%)得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  6.81 (2H, d,  $J=8.3\text{ Hz}$ ), 7.17 (2H, d,  $J=8.3\text{ Hz}$ ), 7.47 (2H, m), 7.87 (1H, dd,  $J=2.7, 6.3\text{ Hz}$ ). FABMS: $m/z$  259 (M+H)<sup>+</sup>.

### Diethyl 3'-(methoxycarbonyloxy)biphenyl-2,3-dicarboxylate (53e) の合成

アルゴン雰囲気下、化合物 **52** (180 mg, 0.60 mmol) のトルエン (5.0 mL) 溶液に、3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxabororane-2-yl)methyl benzoate (310 mg, 1.2 mmol)、 $K_2CO_3$  (165 mg, 1.2 mmol)、および  $Pd(PPh_3)_4$  (140 mg, 0.12 mmol) を加え 80°C で 1 晩攪拌した。反応液をセライト濾過した後路液を減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane/AcOEt=4:1) で精製し、アモルファス **53e** (47.0 mg, 22.0%) を得た。 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  1.07 (3H, t,  $J=7.1$  Hz), 1.37 (3H, t,  $J=7.1$  Hz), 3.92 (3H, s), 4.13 (2H, q,  $J=7.1$  Hz), 4.37 (2H, q,  $J=7.1$  Hz), 7.47 (1H, dd,  $J=7.5$  Hz), 7.50 (2H, d,  $J=4.6$  Hz), 7.58 (1H, d,  $J=7.5$  Hz), 8.03 (1H, dd,  $J=4.6, 4.6$  Hz), 8.01 (2H, brd). EIMS:  $m/z$  356 ( $M^+$ ).

### Biphenyl-2,3,3'-tricarboxylic acid (42e) の合成

化合物 **53e** (47.0 mg, 0.13 mmol) の 1,4-dioxane (1.0 mL) 溶液に、5.0 M NaOH (5.0 mL) を加え 80°C で 1 晩攪拌した。反応液に 1.0 M HCl を加え pH=2 にした後、AcOEt で抽出した。有機層を無水  $MgSO_4$  で乾燥後減圧濃縮し、無色固体 **42e** (12.0 mg, 32.3%) を得た。Mp: 315 °C (dec.).  $^1H$ -NMR ( $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  7.55 (4H, m), 7.94 (3H, m). ESIMS:  $m/z$  287 ( $M+H$ ) $^+$ .

### Diethyl 4'-(methoxycarbonyloxy)biphenyl-2,3-dicarboxylate (53f) の合成

アルゴン雰囲気下、化合物 **52** (180 mg, 0.59 mmol) のトルエン (5.0 mL) 溶液に、4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxabororane-2-yl)methyl benzoate (310 mg, 1.20 mmol)、 $K_2CO_3$  (165 mg, 1.2 mmol)、および  $Pd(PPh_3)_4$  (140 mg, 0.12 mmol) を加え 80°C で 1 晩攪拌した。反応液をセライト濾過した後、濾液を減圧濃縮し、得られた残渣を分取 TLC (hexane:AcOEt=2:1) で精製し、アモルファス **53f** (160 mg, 76.2%) を得た。 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  1.05 (3H, t,  $J=7.1$  Hz), 1.38 (3H, t,  $J=7.1$  Hz), 3.94 (3H, s), 4.11 (2H, q,  $J=7.1$  Hz), 4.37 (2H, q,  $J=7.1$  Hz), 7.45 (2H, d,  $J=8.6$  Hz), 7.53 (1H, d,  $J=6.6$  Hz), 7.54 (1H, dd,  $J=6.6, 6.6$  Hz), 8.03 (1H, d,  $J=6.6$  Hz), 8.07 (1H, d,  $J=8.6$  Hz). EIMS:  $m/z$  356 ( $M^+$ ).

### Biphenyl-2,3,4'-tricarboxylic acid (42f) の合成

化合物 **53f** (160 mg, 0.45 mmol) の 1,4-dioxane (1.0 mL) 溶液に 5.0 M NaOH (5.0 mL) を加え 80°C で 1 晩攪拌した。反応液に 1.0 M HCl を加え pH=2 にした後、AcOEt で抽出した。有機層を無水  $MgSO_4$  で乾燥後減圧濃縮し、無色固体 **42f** (35.0 mg, 27.2%) を得た。Mp: 310 °C (dec.)  $^1H$ -NMR ( $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  7.50 (2H, d,  $J=8.2$  Hz), 7.59 (2H, m), 7.92 (1H, dd,  $J=2.5,$

6.6Hz), 7.98 (2H, d,  $J=8.2$  Hz). ESIMS: $m/z$  287 (M+H)<sup>+</sup>.

### Diethyl 3-(3-hydroxypropyl)phthalate (53g) の合成

化合物 **52** (360 mg, 1.20 mmol) の 1,4-dioxane (2.0 mL) 溶液に、allylalcohol(0.16 mL, 2.35 mmol)、bis(tri-*t*-butylphosphine)Pd (14.0 mg, 0.019 mmol)、および *N,N*-dicyclohexylmethylamine (0.50 mL, 0.089 mmol) を加え室温で 2 日間攪拌した。反応液に水を加え、AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt=1:1)を用いて精製し、油状化合物 diethyl 3-(3-oxopropyl)phthalate (146 mg, 43.6%) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): $\delta$  1.37 (3H, t,  $J=7.1$  Hz), 1.38 (3H, t,  $J=7.1$  Hz), 2.82 (2H, t,  $J=7.3$ Hz), 2.96 (2H, t,  $J=7.3$  Hz), 4.34 (2H, q,  $J=7.1$  Hz), 4.41 (2H, q,  $J=7.1$  Hz), 7.40 (1H, dd,  $J=7.4, 7.4$  Hz), 7.44 (1H, d,  $J=7.4$  Hz), 7.87 (1H, d,  $J=7.4$  Hz), 9.79 (1H, s). EIMS:  $m/z$  279 (M<sup>+</sup>). この化合物 (140 mg, 0.501 mmol) の EtOH(5.0 mL)溶液に、NaBH<sub>4</sub>(23.0 mg, 0.607 mmol)を加え室温で 1 晩攪拌した。反応液に水を加え、AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮し油状化合物 **53g** (110 mg, 79.2%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): $\delta$  1.37 (3H, t,  $J=7.1$  Hz), 1.38 (3H, t,  $J=7.1$  Hz), 1.87 (2H, m), 2.74 (2H, t,  $J=7.2$  Hz), 3.59 (2H, t,  $J=6.0$  Hz), 4.34 (2H, q,  $J=7.1$  Hz), 4.42 (2H, q,  $J=7.1$  Hz), 7.40 (1H, dd,  $J=7.3, 7.5$  Hz), 7.44 (1H, d,  $J=7.5$  Hz), 7.86 (1H, d,  $J=7.3$  Hz). FABMS: $m/z$  281 (M+H)<sup>+</sup>.

### 3-(3-Hydroxypropyl)phthalic acid (42g) の合成

化合物 **53g** (100 mg, 0.357 mmol) の 1,4-dioxane (1.0 mL)溶液に、5.0 M NaOH (5.0 mL)を加え、80℃で 1 晩攪拌した。反応液に 1.0 M HClを加え pH=2 にした後、AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮し、無色固体 **42g** (46.0 mg, 57.5%)を得た。Mp:137-138℃.<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): $\delta$  1.69 (2H, m), 2.64 (2H, t,  $J=8.0$  Hz), 3.39 (2H, t,  $J=6.4$  Hz), 7.42 (1H, dd,  $J=7.6, 7.6$  Hz), 7.49 (1H, d,  $J=7.6$  Hz), 7.72 (1H, d,  $J=7.6$  Hz).FABMS:  $m/z$  225 (M+H)<sup>+</sup>.

### 3-Hydroxyphthalic acid (43a) の合成

3-hydroxyphthalic anhydride **54** (60.0 mg,0.366mmol)の水溶液(2.0 mL)に、1.0M NaOH(5.0mL)を加え室温で 1 晩攪拌した。反応液に 1.0 M HClを加え pH=2 にした後、AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮し、無色固体 **43a** (14.0 mg, 21.0%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>): $\delta$  7.07 (2H, m), 7.44 (1H, dd,  $J=7.6, 8.2$ Hz). ESIMS: $m/z$ 181(M-H)<sup>-</sup>.



### Diethyl 3-hydroxyphthalate (55) の合成

3-hydroxy phthalic anhydride **54** (650 mg, 3.57 mmol)の EtOH(15 mL)溶液に、 $cH_2SO_4$ (3.0 mL)を加え1晩加熱還流した。反応液を減圧濃縮後、残渣に水を加え AcOEt で抽出した。有機層を無水  $MgSO_4$  で乾燥後減圧濃縮し、油状化合物 **55** (850 mg, 100%)を得た。 $^1H$ -NMR( $CDCl_3$ ) : $\delta$  1.37 (6H, t,  $J=7.0$ Hz), 4.34 (2H, q,  $J=7.0$ Hz), 4.38 (2H, q,  $J=7.0$ Hz), 6.94 (1H, dd,  $J=1.2$ , 8.0Hz), 7.06 (1H, dd,  $J=1.2$ , 8.0Hz), 7.44 (1H, dd,  $J=8.0$ Hz), 10.75 (1H, brs). ESIMS:  $m/z$  237( $M-H$ ) $^-$ .

### Diethyl 3-methoxyphthate (56b) の合成

化合物 **55** (100 mg, 0.42 mmol)の DMF(5.0 mL)溶液に、 $K_2CO_3$ (120 mg, 0.87 mmol)および iodomethane (0.031 mL, 0.50 mmol)を加え室温で1晩攪拌した。反応液に水を加え、AcOEt で抽出した。有機層を無水  $MgSO_4$  で乾燥後減圧濃縮した。残渣を分取 TLC (hexane:AcOEt=2:1)で精製して、油状化合物 **56b** (35.0 mg, 33.0%)を得た。MS(ESIMS:  $m/z$  253 ( $M+H$ ) $^+$ )で構造を確認後、次の反応を行った。

### 3-Methoxy phthalic acid (43b) の合成

化合物 **56b** (34 mg, 0.135 mmol)を 1,4-dioxane (1.0 mL)溶液に、5M NaOH(5.0 mL)を加え80°Cで1晩攪拌した。反応液を AcOEt および水に分配した。水層を5M HCl で酸性(pH=3)にした後、AcOEt で抽出した。有機層を無水  $MgSO_4$  で乾燥後減圧濃縮し、無色固体 **43b** (14.0 mg, 53.0%)を得た。Mp:167-168°C.  $^1H$ -NMR ( $CD_3OD$ )  $\delta$ : 3.78 (3H, s), 7.21 (1H, dd,  $J=0.97$ , 8.3 Hz), 7.51 (1H, dd,  $J=8.0$ , 8.3 Hz), 7.49 (1H, dd,  $J=0.97$ , 8.0 Hz). ESIMS:  $m/z$  195 ( $M-H$ ) $^-$ .

### Diethyl 3-(cyclohexyloxy)phthalate (56c) の合成

化合物 **55** (140 mg, 0.59 mmol)の THF (3.0 mL)に溶液に、cyclohexanol (70 mg, 0.70 mmol)、tributylphosphine (590 mg, 2.91 mmol)および 1,1'-azobis(N,N-dimethylformamide) (500 mg, 2.90 mmol)を加え室温で1晩攪拌した。反応液に水を加え AcOEt で抽出した。有機層を無水  $MgSO_4$  で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣を分取 TLC (hexane:AcOEt=2:1)で精製し、油状化合物 **56c** (84.0 mg, 44.5%)を得た。 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ): $\delta$  1.36 (3H, t,  $J=7.2$  Hz), 1.39 (3H, t,  $J=7.2$  Hz), 1.70 (10H, m), 4.33 (2H, q,  $J=7.2$  Hz), 4.42 (2H, q,  $J=7.2$  Hz), 4.44 (1H, m), 7.12 (1H, d,  $J=8.0$  Hz), 7.36 (1H, dd,  $J=8.0$ , 8.0 Hz), 7.57 (1H, d,  $J=8.0$  Hz). ESIMS:  $m/z$  321( $M+H$ ) $^+$ .

### 3-(Cyclohexyloxy)phthalic acid (43c) の合成

化合物 **56c** (80 mg, 0.25 mmol) の 1,4-dioxane (1.0 mL) に溶液に、5M NaOH (5.0 mL) を加え 80°C で 1 晩攪拌した。反応液を AcOEt および水に分配した。水層を 5M HCl で酸性 (pH=3) にした後、AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー (セパピーズ SP207, H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN=10:1~2:1) で精製し、無色固体 **43c** (46.0 mg, 70.0%) を得た。Mp: 170-171°C. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD): δ 1.33-1.89 (10H, m), 4.35 (1H, m), 7.15 (1H, d, *J*=8.3 Hz), 7.37 (1H, dd, *J*=7.8, 8.3 Hz), 7.59 (1H, d, *J*=7.8 Hz). FABMS: *m/z* 265 (M+H)<sup>+</sup>.

### Diethyl 3-(benzyloxy)phthalate (56d) の合成

化合物 **55** (100 mg, 0.42 mmol) の DMF (5.0 mL) に溶液に、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.12 g, 0.87 mmol)、および benzyl bromide (0.060 mL, 0.50 mmol) を加え室温で 1 晩攪拌した。反応液に水を加え、AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣を分取 TLC (hexane:AcOEt=2:1) で精製し、油状化合物 **56d** (90.0 mg, 65.0%) を得た。MS (ESIMS: *m/z* 329(M+H)<sup>+</sup>) で構造を確認後、次の反応を行った。

### 3-(Benzyloxy)phthalic acid (43d) の合成

化合物 **56d** (90.0 mg, 0.27 mmol) の 1,4-dioxane (1.0 mL) に溶液に、5M NaOH (5.0 mL) を加え 80°C で 1 晩攪拌した。反応液に AcOEt を加え分液操作後、水層を 5M HCl で酸性 (pH3) にした後、AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮し、無色固体 **43d** (64.0 mg, 87.0%) を得た。Mp: 127-128°C. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 5.09 (2H, s), 7.27 (7H, m), 7.51 (1H, dd, *J*=0.98, 7.6 Hz). ESIMS: *m/z* 271 (M-H)<sup>-</sup>.

### Diethyl 3-(buthyloxy)phthalate (56e) の合成

化合物 **55** (60.0 mg, 0.25 mmol) の DMF (5.0 mL) に溶液に、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (87.0 mg, 0.63 mmol) と 1-iodobutane (0.034 mL, 0.30 mmol) を加え室温で 1 晩攪拌した。反応液に水を加え AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣を分取 TLC (hexane:AcOEt=2:1) で精製し、油状化合物 **56e** (52.0 mg, 70.7%) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.95 (3H, t, *J*=7.4 Hz), 1.36 (3H, t, *J*=7.1 Hz), 1.39 (3H, t, *J*=7.1 Hz), 1.47 (2H, m), 1.75 (2H, m), 4.01 (2H, t, *J*=6.3 Hz), 4.33 (2H, q, *J*=7.1 Hz), 4.41 (2H, q, *J*=7.1 Hz), 7.10 (1H, d, *J*=8.1 Hz), 7.38 (1H, dd, *J*=8.1 Hz), 7.59 (1H, d, *J*=8.1 Hz). ESIMS: *m/z* 295 (M+H)<sup>+</sup>

### 3-Butyloxy phthalic acid (43e) の合成

化合物 **56e** (50.0 mg, 0.17 mmol)の 1,4-dioxane (1.0 mL)溶液に 5.0 M NaOH (5.0 mL)を加え、80℃で3時間攪拌した。反応液を 1.0M HClで pH=2にした後、AcOEtで抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub>で乾燥後減圧濃縮し、無色固体 **43e** (42.9 mg, 100%)を得た。Mp:153℃. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):δ 0.95 (3H, t, *J*=7.3 Hz), 1.48 (2H, m), 1.77 (2H, m), 4.04 (2H, t, *J*=6.5 Hz), 7.13 (1H, d, *J*=8.0 Hz), 7.38 (1H, dd, *J*=8.0 Hz), 7.60 (1H, d, *J*=8.0 Hz). EIMS: *m/z* 238 (M<sup>+</sup>).

### Diethyl 3-(3-cyclohexylpropyloxy)phthalate (56f) の合成

化合物 **55** (290mg, 1.22 mmol)の DMF (5.0 mL)溶液に、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (500 mg, 3.62 mmol)、および(3-bromopropyl)cyclohexane (500 mg, 2.43 mmol)を加え室温で2日間攪拌した。反応液に水を加え AcOEtで抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub>で乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:AcOEt=2:1)を用いて精製し、油状化合物 **56f** (430 mg, 97.3%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):δ 0.93 (2H, m), 1.17 (6H, m), 1.35 (3H, t, *J*=7.2 Hz), 1.37 (3H, t, *J*=7.2 Hz), 1.70(7H, m), 3.98 (2H, t, *J*= 6.5 Hz), 4.33 (2H, q, *J*= 7.2 Hz), 4.42 (2H, q, *J*=7.2 Hz), 7.09 (1H, d, *J*=8.2 Hz), 7.37 (1H, dd, *J*=8.2, 8.2 Hz), 7.58 (1H, d, *J*=8.2 Hz).EIMS: *m/z* 362 (M<sup>+</sup>).

### 3-(3-Cyclohexylpropyloxy)phthalic acid (43f) の合成

化合物 **56f** (430 mg, 1.19 mmol)の 1,4-dioxane (2.0 mL)溶液に 5.0M NaOH (10 mL)を加え、80℃で1晩攪拌した。反応液に 1.0M HClを加え pH=2にした後、AcOEtで抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub>で乾燥後減圧濃縮し、淡赤色固体 **43f** (283mg, 77.4%)を得た。Mp:157℃. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):δ 0.90 (2H, m), 1.09-1.37 (6H, m), 1.67 (5H, m), 1.83 (2H, m), 4.06 (2H, t, *J*=6.7 Hz), 7.19 (1H, d, *J*=8.3 Hz), 7.46 (1H, dd, *J*=7.8, 8.3 Hz), 7.65 (1H, d, *J*=7.8 Hz). ESIMS: *m/z* 307 (M+H)<sup>+</sup>.

### Diethyl 3-(3-phenylpropyloxy)phthalate (56g) の合成

化合物 **55** (82.0 mg, 0.34 mmol)の DMF (3.0 mL)溶液に、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (120 mg, 0.87 mmol)、3-phenylpropylbromide (81.0 mg, 0.41 mmol)を加え室温で1晩攪拌した。反応液に水を加え AcOEtで抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub>で乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:AcOEt=2:1)を用いて精製し、油状化合物 **56g** (90.0 mg, 74.4%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):δ 1.37 (3H, t, *J*=6.8 Hz), 1.40 (3H, t, *J*=7.1 Hz), 2.09

(2H, m), 2.79 (2H, t,  $J=7.4$  Hz), 3.99 (2H, t,  $J=5.1$  Hz), 4.35 (2H, q,  $J=6.8$  Hz), 4.45 (2H, q,  $J=7.1$  Hz), 7.05 (1H, d,  $J=8.1$  Hz), 7.27 (5H, m), 7.37 (1H, dd,  $J=8.1$  Hz), 7.60 (1H, d,  $J=8.1$  Hz). EIMS:  $m/z$  356( $M^+$ ).

### 3-(3-Phenylpropyloxy)phthalic acid (43g) の合成

化合物 **56g** (90.0 mg, 0.188 mmol)の 1,4-dioxane (1.0 mL)溶液に、5.0 M NaOH (5.0 mL)を加え、80°Cで3時間攪拌した。反応液に1.0Mを加えpH=2にした後、AcOEtで抽出した。有機層を無水  $MgSO_4$ で乾燥後減圧濃縮し、無色固体 **43g** (54.0 mg, 95.7%)を得た。Mp:135°C.  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3+CD_3OD$ ): $\delta$  2.11 (2H, m), 2.81 (2H, t,  $J=7.6$  Hz), 4.02 (2H, t,  $J=6.2$  Hz), 7.08 (1H, d,  $J=8.3$  Hz), 7.23 (5H, m), 7.38 (1H, dd,  $J=7.8, 8.3$  Hz), 7.62 (1H, d,  $J=7.8$  Hz). ESIMS:  $m/z$  299( $M-H$ ) $^-$ .

### Diethyl 3-(4-phenylbutoxy)phthalate (56h) の合成

化合物 **55** (170 mg, 0.71 mmol)の DMF (5.0 mL)に溶液に、 $K_2CO_3$  (245 mg, 1.77 mmol)と 4-phenylbuthylbromide (180 mg, 0.84 mmol)を加え室温で1晩攪拌した。反応液に水を加え AcOEtで抽出した。有機層を無水  $MgSO_4$ で乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣を分取 TLC (hexane:AcOEt=7:3)を用いて精製し、油状化合物 **56h** (180 mg, 68.5%)を得た。 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ): $\delta$  1.33 (3H, t,  $J=7.1$  Hz), 1.36 (3H, t,  $J=7.1$  Hz), 1.80 (4H, m), 2.67 (2H, t,  $J=7.1$  Hz), 4.02 (2H, t,  $J=5.7$  Hz), 4.34 (2H, q,  $J=7.1$  Hz), 4.38 (2H, q,  $J=7.1$  Hz), 7.07 (1H, d,  $J=0.7, 8.2$  Hz), 7.18 (3H, m), 7.29 (2H, m), 7.37 (1H, dd,  $J=8.2, 8.2$  Hz), 7.59 (1H, d,  $J=0.7, 8.2$  Hz). ESIMS: $m/z$  371 ( $M+H$ ) $^+$ .

### 3-(4-Phenylbutoxy)phthalic acid (43h) の合成

化合物 **56h** (160 mg, 0.43 mmol)を 1,4-dioxane(1.0 mL)および 5.0 M NaOH(5.0 mL)に溶解し、80°Cで3時間攪拌した。反応液に 1M HClを加え pH=2にした後、AcOEtで抽出した。有機層を無水  $MgSO_4$ で乾燥後減圧濃縮し、無色固体 **43h** (124 mg, 91.8%)を得た。Mp:154-155°C.  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3+CD_3OD$ ): $\delta$  1.82 (4H, m), 2.67 (2H, m), 4.04 (2H, m), 7.10-7.27 (6H, m), 7.38 (1H, dd,  $J=8.0, 8.0$  Hz), 7.60 (1H, d,  $J=8.0$  Hz).ESIMS: $m/z$  313 ( $M-H$ ) $^-$ .

### Diethyl 3-(5-ethoxy-5-oxopentyloxy)phthalate (56i) の合成

化合物 **55** (100 mg, 0.42 mmol)の DMF (5.0 mL)に溶液に、 $K_2CO_3$  (150 mg, 1.08 mmol)および ethyl 5-bromovalerate (0.10 mL, 6.94 mmol)を加え室温で1晩攪拌した。反応液に水を加え AcOEtで抽出した。有機層を無水  $MgSO_4$

で乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:AcOEt=7:3) で精製し、アモルファス **56i** (149 mg, 96.9%) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.25 (3H, t, *J*=7.2 Hz), 1.36 (3H, t, *J*=7.1 Hz), 1.38 (3H, t, *J*=7.1 Hz), 1.81 (4H, m), 2.36 (2H, m), 4.03 (2H, m), 4.12 (2H, q, *J*=7.2 Hz), 4.34 (2H, q, *J*=7.1 Hz), 4.41 (2H, q, *J*=7.1 Hz), 7.09 (1H, d, *J*=8.0 Hz), 7.39 (1H, dd, *J*=8.0, 8.0 Hz), 7.60 (1H, d, *J*=8.0 Hz). EIMS: *m/z* 366 (M<sup>+</sup>).

### 3-(4-Carboxybutoxy)phthalic acid (**43i**) の合成

化合物 **56i** (140 mg, 0.38 mmol) の 1,4-dioxane (1.0 mL) 溶液に 5.0 M NaOH (5.0 mL) を加え、80°C で 1 晩攪拌した。反応液を 1 M HCl で pH=2 にした後、AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮し、無色固体 **43i** (67.7 mg, 62.5%) を得た。Mp: 180 - 181 °C. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD): δ 1.84 (4H, m), 2.40 (2H, m), 4.06 (2H, m), , 7.12 (1H, dd, *J*=1.9, 8.0 Hz), 7.40 (1H, dd, *J*=8.0 Hz), 7.62 (1H, dd, *J*=1.9, 8.0 Hz). ESIMS: *m/z* 283 (M+H)<sup>+</sup>.

### Diethyl 3-(2-hydroxyethoxy)phthalate (**56j**) の合成

化合物 **55** (100 mg, 0.42 mmol) の DMF (4.0 mL) 溶液に、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (170 mg, 1.23 mmol)、2-bromoethanol (0.10 g, 0.80 mmol) を加え室温で 2 日間攪拌した。反応液に水を加え AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣を分取 TLC (hexane:AcOEt=1:1) で精製し、油状化合物 **56j** (45.0 mg, 53.0%) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.37 (3H, t, *J*=7.2 Hz), 1.38 (3H, t, *J*=7.2 Hz), 3.87 (2H, t, *J*=4.8 Hz), 4.20 (2H, t, *J*=4.8 Hz), 4.34 (2H, q, *J*=7.2 Hz), 4.42 (2H, q, *J*=7.2 Hz), 7.17 (1H, dd, *J*=1.0, 7.9 Hz), 7.43 (1H, dd, *J*=7.9, 7.9 Hz), 7.64 (1H, dd, *J*=1.0, 7.9 Hz). EIMS: *m/z* 282 (M<sup>+</sup>).

### 3-(2-Hydroxyethoxy)phthalic acid (**43j**) の合成

化合物 **56j** (45.0 mg, 0.16 mmol) の 1,4-dioxane (0.6 mL) 溶液に、5.0 M NaOH (3.0 mL) を加え、80°C で 3 時間攪拌した。反応液に 1 M HCl を加え pH=2 にした後、減圧濃縮した。得られた残渣をセパビーズ SP207 (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN=1:0~4:1) で精製し、淡黄色固体 **43j** を (18.2 mg, 38.9%) 得た。Mp: 164-165 °C. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD): δ 3.88 (2H, t, *J*=4.3 Hz), 4.16 (2H, t, *J*=4.3 Hz), 7.17 (1H, d, *J*=8.5 Hz), 7.42 (1H, dd, *J*=7.8, 8.5 Hz), 7.64 (1H, d, *J*=7.8 Hz). ESIMS: *m/z* 225 (M-H)<sup>-</sup>.

### Diethyl 3-(3-hydroxypropyloxy)phthalate (**56k**) の合成

化合物 **55** (100 mg, 0.42 mmol) の DMF (4.0 mL) 溶液に、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (170 mg,

1.23 mmol)、および 3-bromo-1-propanol (0.12 g, 0.86 mmol)を加え、室温で 2 日間攪拌した。反応液に水を加え AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣を分取 TLC (hexane:AcOEt=1:1)で精製し、油状化合物 **56k** (110 mg, 88.5%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): $\delta$  1.36 (3H, t,  $J=7.2$  Hz), 1.38 (3H, t,  $J=7.2$  Hz), 2.03 (2H, m), 3.84 (2H, m), 4.19 (2H, t,  $J=5.7$  Hz), 7.14 (1H, d,  $J=7.8$  Hz), 7.41 (1H, dd,  $J=7.8, 7.8$  Hz), 7.60 (1H, d,  $J=7.8$  Hz). EIMS:  $m/z$  296(M<sup>+</sup>).

### 3-(3-Hydroxypropyloxy)phthalic acid (**43k**) の合成

化合物 **371** (110 mg, 0.37 mmol)の 1,4-dioxane (1.0 mL)溶液に、5.0M NaOH(5.0 mL)を加え、80°Cで 3 時間攪拌した。反応液に 1M HClを加え pH=2 にした後、減圧濃縮した。得られた残渣をセパビーズ SP207(H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN=1:0~4:1)で精製し、無色固体 **43k** (35.0 mg, 39.4%)を得た。Mp:173°C.<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD): $\delta$  2.02 (2H, m), 3.80 (2H, t,  $J=5.7$  Hz), 4.18 (2H, t,  $J=5.7$  Hz), 7.16 (1H, d,  $J=8.3$  Hz), 7.41 (1H, dd,  $J=7.9, 8.3$  Hz), 7.64 (1H, d,  $J=7.9$  Hz). EIMS:  $m/z$  240(M<sup>+</sup>).

### Diethyl 3-(butylamino)phthalate (**58d**) の合成

Diethyl aminophthalate **57** (237 mg, 1.00 mmol)の 1,2-dichloroethane (10 mL)に溶解した。この溶液に *n*-butylaldehyde (0.13 mL, 1.50 mmol)、AcOH (0.11 mL, 2.00 mmol)、および NaBH(OAc)<sub>3</sub> (420 mg, 2.00 mmol) を加え室温で 1 晩攪拌した。反応液に飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液を加え攪拌した後、AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣を分取 TLC (hexane:AcOEt=7:3)で精製し、アモルファス **58d** (190 mg, 64.8%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): $\delta$  0.96 (3H, t,  $J=7.5$  Hz), 1.32 (3H, t,  $J=7.1$  Hz), 1.35 (3H, t,  $J=7.1$  Hz), 1.43 (2H, m), 1.64 (2H, m), 3.15 (2H, m), 4.30 (4H, m), 6.76 (1H, d,  $J=7.9$  Hz), 6.77 (1H, d,  $J=7.9$  Hz), 7.31 (1H, dd,  $J=7.9$  Hz). ESIMS:  $m/z$  294 (M+H)<sup>+</sup>.

### 3-(Butylamino)phthalic acid (**44b**) の合成

化合物 **58d** (190 mg, 0.64 mmol)の 1,4-dioxane (1.0 mL)溶液に 5.0 M NaOH(5.0 mL)を加え 80°Cで 1 晩攪拌した。反応液に 1.0M HClを加え pH=2 にした後、AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮し、黄色固体 **44b** (112 mg, 73.8%)を得た。Mp:100°C.<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD): $\delta$  0.96 (3H, t,  $J=7.4$  Hz), 1.45 (2H, m), 1.64 (2H, m), 3.16 (2H, t,  $J=7.1$  Hz), 6.78 (2H, m), 7.30 (1H, dd,  $J=7.9, 7.9$  Hz). ESIMS : $m/z$  236(M-H)<sup>-</sup>.

### Diethyl 3-(pyridin-3-ylmethylamino)phthalate (58c) の合成

化合物 **57** (100 mg, 0.42 mmol)の 1,2-dichloromethane (5.0 mL)溶液に、nicotinaldehyde (0.060 mL, 0.63 mmol)、AcOH (0.048 mL, 0.87 mmol)および、NaBH(OAc)<sub>3</sub> (180 mg, 0.84 mmol) を加え室温で5日間攪拌した。反応液に NaHCO<sub>3</sub> 水溶液を加え攪拌した後、AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣を分取 TLC (hexane : AcOEt = 7:3)で精製し、アモルファス **58c** (34.0 mg, 24.7%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): $\delta$  1.33 (3H, t,  $J=7.2$  Hz), 1.36 (3H, t,  $J=7.2$  Hz), 4.30 (2H, q,  $J=7.2$  Hz), 4.32 (2H, q,  $J=7.2$  Hz), 4.46 (2H, d,  $J=5.6$  Hz), 6.68 (1H, d,  $J=7.9$  Hz), 6.84 (1H, d,  $J=7.9$  Hz), 7.28 (2H, m), 7.65 (1H, d,  $J=7.8$  Hz), 8.53 (1H, d,  $J=3.7$  Hz), 8.60 (1H, s). FABMS:  $m/z$  329 (M+H)<sup>+</sup>.

### 3-(Pyridin-3-ylmethylamino)phthalic acid (44c) の合成

化合物 **58c** (34.0 mg, 0.10 mmol)の 1,4-dioxane (0.5 mL)溶液に 5.0 M NaOH 2.5 mLを加え、80°Cで1晩攪拌した。反応液に 1.0 M HClを加え pH=2にした後、減圧濃縮した。残渣を、セパビーズ SP207(H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN=1:0~4:1)で精製し、無色固体 **44c** (10.0 mg, 36.6%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): $\delta$  4.50 (2H, s), 6.52 (1H, d,  $J=8.0$  Hz), 6.75 (1H, d,  $J=7.6$  Hz), 7.03 (1H, dd,  $J=6.3, 7.6$  Hz), 7.69 (1H, m), 8.24 (1H, d,  $J=8.0$  Hz), 8.41 (1H, brs), 8.51 (1H, brs). ESIMS:  $m/z$  273(M+H)<sup>+</sup>.

### Dimethyl 3-aminophthalate (57) の合成

3-nitrophthalic acid **49** (4.22 g, 20.0 mmol)の MeOH (100 mL)溶液に、cH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(10 mL)に溶解し5時間加熱還流した。反応液を減圧濃縮後、水を加え AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮した。残渣を DMF(20 mL)に溶解し、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(8.30 g, 60.1 mmol)と methyl iodide(1.86 mL, 29.1 mmol)を加え室温で1晩攪拌した。反応液に水を加え AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮して油状化合物(dimethyl 3-nitro phthalate) (3.80 g, 79.5%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): $\delta$  3.95 (3H, s), 4.03 (3H, s), 7.69 (1H, dd,  $J=7.8, 7.8$  Hz), 8.35 (1H, d,  $J=7.8$  Hz), 8.38 (1H, d,  $J=7.8$  Hz). EIMS: $m/z$ 239(M<sup>+</sup>). この化合物(3.68 g, 15.4 mmol)を EtOH : H<sub>2</sub>O = 1 : 1(30mL)の混合溶媒に溶解し、アルゴン気流下 10% Pd-C (740 mg)を加えた後、水素置換を行い室温で1晩攪拌した。反応液をセライト濾過後、濾液を減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:AcOEt=1:1)で精製し、油状化合物 **57** (3.06 g, 95.0%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): $\delta$  3.85 (3H, s), 3.86 (3H, s), 5.20 (2H, brs), 6.78 (1H, dd,

$J=0.9, 8.0$  Hz), 6.90 (1H, dd,  $J=0.9, 8.0$  Hz), 7.23 (1H, dd,  $J=8.0, 8.0$  Hz).  
EIMS:  $m/z$  209 ( $M^+$ ).

### Dimethyl 3-butynamidophthalate (58d) の合成

化合物 **57** (255 mg, 1.22 mmol)の  $CH_2Cl_2$  (5.0 mL)溶液に、 $Et_3N$  (0.25 mL)と butyrylchloride (0.16 mL)を加え、室温で2日間攪拌した。反応液に水を加え AcOEt で抽出した。AcOEt 層を無水  $MgSO_4$  で乾燥後減圧濃縮し、油状化合物 **58d** (290 mg, 85.2%)を得た。 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ): $\delta$  1.01 (3H, t,  $J=7.4$  Hz), 1.76 (2H, dddd,  $J=7.4$  Hz), 2.38 (2H, dd,  $J=7.4$  Hz), 3.88 (6H, s), 7.42 (1H, d,  $J=7.8$  Hz), 7.52 (1H, dd,  $J=7.2, 7.8$  Hz), 8.58 (1H, d,  $J=7.2$  Hz), 9.35 (1H, brs). EIMS:  $m/z$  279 ( $M^+$ ).

### 3-Butynamidophthalic acid (44d) の合成

化合物 **58d** (250 mg, 0.89 mmol)の 1,4-dioxane (10 mL)溶液に、1.0 M NaOH (3.6 mL)を加え、室温で5時間攪拌した。反応液に 1.0M HClを加え pH=2にした後、AcOEt で抽出した。有機層を無水  $MgSO_4$  で乾燥後減圧濃縮して淡黄色固体 **44d** (206 mg, 92.2%)を得た。Mp:156-157 °C.  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3+CD_3OD$ ): $\delta$  1.00 (3H, t,  $J=7.3$  Hz), 1.75 (2H, m), 2.38 (2H, t,  $J=7.3$  Hz), 7.49 (2H, m), 8.47 (1H, brd). ESIMS:  $m/z$  250( $M-H$ ) $^-$ .

### Diethyl 3-fluorophthalate (60) の合成

3-fluorophthalic acid **59** (9.35 g, 50.8 mmol)の EtOH (200 mL)溶液に  $cH_2SO_4$  (20 mL)を加え、6時間加熱還流した。反応液を減圧濃縮後、残渣に水を加え AcOEt で抽出した。有機層を無水  $MgSO_4$  で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣の DMF (150 mL)溶液に、 $K_2CO_3$  (21.0 g, 152 mmol)と iodoethane (6.1 mL, 76.2 mmol)を加え室温で2日間攪拌した。反応液に水を加え、AcOEt で抽出した。有機層を無水  $MgSO_4$  で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:AcOEt=1:1)で精製して、油状化合物 **60** (9.13 g, 74.9%)を得た。 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ): $\delta$  1.37 (6H, m), 4.36 (2H, q,  $J=7.2$ Hz), 4.42 (2H, q,  $J=7.2$ Hz), 7.30 (1H, dd,  $J=8.0$  Hz), 7.50 (1H, ddd,  $J=5.2, 8.0, 8.0$  Hz), 7.79 (1H, dd,  $J=8.0$  Hz). EIMS: $m/z$  240 ( $M^+$ ).

### Diethyl 3-(dimethylamino)phthalate (61) の合成

化合物 **60** (120 mg, 0.500 mmol)に dimethylamine (2.0M THF 溶液 3.0 mL)を加え、封管中 90°C で1晩攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣を分取 TLC (hexane:AcOEt=4:1)を用いて精製し、油状化合物 **61** (130 mg,



98.0%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):δ 1.35 (3H, t, *J*=7.2 Hz), 1.37 (3H, t, *J*=7.2 Hz), 2.75 (6H, s), 4.33 (2H, q, *J*=7.2 Hz), 4.41 (2H, q, *J*=7.2 Hz), 7.34 (1H, d, *J*=8.0 Hz), 7.38 (1H, dd, *J*=7.5, 8.0 Hz), 7.64 (1H, d, *J*=7.5 Hz). FABMS: *m/z* 266(M+H)<sup>+</sup>.

### 3-(Dimethylamino)phthalic acid (44e) の合成

化合物 **61** (140 mg, 0.53 mmol)の 1,4-dioxane (1.0 mL)溶液に 5.0 M NaOH(5.0 mL)を加え、80℃で3時間攪拌した。反応液に 1.0M HClを加え pH=2 にした後、減圧濃縮した。得られた残渣をセパビーズ SP207(H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN=1:0~4:1)で精製し、黄色固体 **44e** (23.0 mg, 22.4%)を得た。Mp:125℃。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O):δ 3.12 (6H, s), 7.47 (1H, dd, *J*=1.0, 7.6 Hz), 7.62 (1H, dd, *J*=7.6, 8.3 Hz), 7.73 (1H, dd, *J*=1.0, 8.3 Hz). FABMS:*m/z* 210 (M+H)<sup>+</sup>.

### Diethyl 3-(pyrrolidine-1-yl)phthalate (62a) の合成

化合物 **60** (120 mg, 0.500 mmol)の pyrrolidine (1.0 mL)溶液を、80℃で1晩攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:AcOEt=1:1)で精製し、油状化合物 **62a** (27.0 mg, 18.6%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):δ 1.35 (6H, t, *J*=7.1 Hz), 1.93 (2H, m), 3.30 (2H, m), 4.31 (2H, q, *J*=7.1 Hz), 4.34 (2H, q, *J*=7.1 Hz), 6.89 (1H, d, *J*=8.2 Hz), 7.20 (1H, d, *J*=7.5 Hz), 7.26 (1H, dd, *J*=7.5, 8.2 Hz). FABMS: *m/z* 292(M+H)<sup>+</sup>.

### 3-(Pyrrolidine-1-yl)phthalic acid (45a) の合成

化合物 **62a** (27.0 mg, 0.092 mmol)の 1,4-dioxane (1.0mL) 溶液に 5.0M NaOH (5.0 mL)を加え、80℃で1晩攪拌した。反応液に 1.0M HClを加え pH=2 にした後、減圧濃縮した。得られた残渣をセパビーズ SP207(H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN=1:0~4:1)で精製し、淡黄色固体 **45a** (21.0 mg, 97.1%)を得た。Mp:150-151℃。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O):δ 2.79 (4H, m), 4.24 (4H, m), 8.03 (1H, dd, *J*=2.7, 5.8 Hz), 8.20 (1H, d, *J*=5.8 Hz), 8.21(1H, d, *J*=2.7 Hz). ESIMS:*m/z* 236 (M+H)<sup>+</sup>.

### Diethyl 3-(piperidine-1-yl)phthalate (62b) の合成

化合物 **60** (200 mg, 0.83 mmol)を piperidine (0.82 mL)に溶解し、80℃で1晩攪拌した。反応液に水を加え、AcOEtで抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub>で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣を分取 TLC (hexane:AcOEt=7:3)で精製し、油状化合物 **62b** (166mg, 65.6%)を得た。MS(EIMS:*m/z*305(M<sup>+</sup>))で構

造を確認し、次の反応を行った。

### 3-(Piperidine-1-yl)phthalic acid (45b) の合成

化合物 **62b** (160 mg, 0.52 mmol)の 1,4-dioxane (1.0 mL)溶液に、5.0 M NaOH (5.0 mL)を加え、80°Cで1晩攪拌した。反応液に 1.0M HClを加え pH=2 にした後、減圧濃縮した。得られた残渣をダイヤイオン HP20 (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN=1:0~4:1)で精製し、淡黄色固体 **45b** (70.0 mg, 53.8%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O):δ 1.88 (2H, m), 2.09 (4H, m), 3.63 (4H, m), 7.67 (1H, d, *J*=7.8 Hz), 7.87 (1H, dd, *J*=7.8, 8.5 Hz), 7.91 (1H, d, *J*=8.5 Hz). FABMS: *m/z* 250(M+H)<sup>+</sup>. FAB-HMS(M+H)<sup>+</sup> calcd for C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>4</sub>:250.1079, found: 250.1079.

### Diethyl 3-(3-hydroxypyrrolidine-1-yl)phthalate (62c) の合成

化合物 **60** (280 mg, 1.16 mmol)の DMSO (3.0 mL)溶液に、3-hydroxypyrrolidinol HCl 塩 (580 mg, 4.66 mmol)、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (806 mg, 5.84 mmol)を加え、80°Cで1晩攪拌した。反応液に水を加え、AcOEtで抽出し、有機層を無水 MgSO<sub>4</sub>で乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:AcOEt=1:1)を用いて精製し、油状化合物 **62c** (107mg, 30.0%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):δ 1.37 (6H, m), 1.67 (1H, m), 2.01 (1H, m), 2.10 (1H, m), 3.19 (1H, brd, *J*=10.2 Hz), 3.31 (1H, m), 3.56 (2H, m), 4.34 (4H, m), 4.52 (1H, brs), 6.94 (1H, dd, *J*=5.8, 7.8 Hz), 7.46 (1H, d, *J*=5.8 Hz), 7.79 (1H, d, *J*=7.8 Hz). ESIMS: *m/z* 308(M+H)<sup>+</sup>.

### 3-(3-Hydroxypyrrolidine-1-yl)phthalic acid (45c) の合成

化合物 **62c** (100 mg, 32.5 mmol)の 1,4-dioxane (1.0 mL)溶液に、5.0 M NaOH (5.0 mL)を加え、80°Cで1晩攪拌した。反応液に 1.0M HClを加え pH=2 にした後、減圧濃縮した。得られた残渣をセパビーズ SP207 (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN=1:0~4:1)で精製し、褐色固体 **45c** (80.0 mg, 98.0%)を得た。Mp:141-142°C. <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O):δ 2.11 (1H, m), 2.41 (1H, m), 3.50 (1H, m), 3.61 (1H, m), 3.73 (1H, m), 3.82 (1H, m), 4.67 (1H, m), 7.43 (1H, d, *J*=7.6 Hz), 7.61 (1H, dd, *J*=7.6, 8.2 Hz), 7.67 (1H, d, *J*=8.2Hz). ESIMS: *m/z* 252(M+H)<sup>+</sup>.

### Diethyl 3-(3-hydroxypiperidine-1-yl)phthalate (62d) の合成

化合物 **60** (375 mg, 1.56 mmol)の DMSO (3.0 mL)溶液に、3-hydroxypiperidine (1.26 g, 12.4 mmol)を加え、80°Cで1晩攪拌した。反応液に水を加え、AcOEtで抽出し、有機層を無水 MgSO<sub>4</sub>で乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー

(hexane:AcOEt=1:1)を用いて精製し、アモルファス **62d** (410 mg, 81.9%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): $\delta$  1.36 (3H, t,  $J=7.2$  Hz), 1.40 (3H, t,  $J=7.2$  Hz), 1.60 (2H, m), 1.92 (2H, m), 2.80 (2H, m), 3.02 (2H, m), 3.91 (1H, m), 4.34 (2H, q,  $J=7.2$  Hz), 4.42 (2H, q,  $J=7.2$  Hz), 7.36 (1H, dd,  $J=0.7, 7.8$  Hz), 7.43 (1H, dd,  $J=7.8, 7.8$  Hz), 7.79 (1H, dd,  $J=0.7, 7.8$  Hz). EIMS:m/z 321 (M<sup>+</sup>).

### 3-(3-Hydroxypiperidine-1-yl)phthalic acid (**45d**) の合成

化合物 **62d** (400 mg, 1.25 mmol)の 1,4-dioxane (1.0 mL)溶液に、5.0M NaOH (5.0 mL)に溶解し、80°Cで1晩攪拌した。反応液に 1M HClを加え pH=2にした後、減圧濃縮した。得られた残渣をダイヤイオン HP-20 (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN=1:0~4:1)で精製し、無色固体 **45d** (150 mg, 45.2%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): $\delta$  1.80 (3H, m), 2.15 (1H, m), 3.28 (1H, dd,  $J=4.2, 12.4$  Hz), 3.39 (2H, m), 3.66 (1H, dd,  $J=1.6, 12.4$  Hz), 4.21 (1H, m), 7.46 (1H, dd,  $J=1.0, 7.6$  Hz), 7.64 (1H, dd,  $J=7.6, 8.1$  Hz), 7.70 (1H, dd,  $J=8.1$  Hz). FABMS: m/z 266 (M+H)<sup>+</sup>. FAB-HMS (M+H)<sup>+</sup> calcd for C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>4</sub>:266.1028, found:266.1028.

### Diethyl 3-(4-hydroxypiperidine-1-yl)phthalate (**62e**) の合成

化合物 **60** (1.00 g, 4.20 mmol)の DMSO (10 mL)溶液に、4-hydroxypiperidine(4.2 g, 41.5 mmol)を加え、80°Cで1晩攪拌した。反応液に水を加え、AcOEtで抽出した。有機層を無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt=1:1)で精製し、油状化合物 **62e** (1.35 g, 100%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): $\delta$  1.36 (3H, t,  $J=7.1$  Hz), 1.40 (3H, t,  $J=7.1$  Hz), 1.67 (2H, m), 1.96 (2H, m), 2.80 (2H, m), 3.18 (2H, m), 3.83 (1H, m), 4.34 (2H, q,  $J=7.1$  Hz), 4.41 (2H, q,  $J=7.1$  Hz), 7.41 (2H, d,  $J=4.5$  Hz), 7.78 (1H, dd,  $J=4.5, 4.5$  Hz). EIMS:m/z 321 (M<sup>+</sup>).

### 3-(4-Hydroxypiperidine-1-yl)phthalic acid (**45e**) の合成

化合物 **62e** (1.0 g, 3.13 mmol)の 1,4-dioxane (5.0 mL)溶液に、5.0M NaOH (25 mL)を加え、80°Cで1晩攪拌した。反応液に 1.0M HClを加え pH=2にした後、減圧濃縮し得られた。残渣をセパビーズ SP207 (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN=1:0~20:1)で精製し、淡黄色固体 **45e** (500 mg, 60.2%)を得た。Mp:187–188°C.<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): $\delta$  1.88 (2H, m), 2.16 (2H, m), 3.44 (2H, m), 3.58 (2H, m), 4.05 (1H, m), 7.46 (1H, dd,  $J=0.97, 7.5$  Hz), 7.65 (1H, dd,  $J=7.5, 8.1$  Hz), 7.70(1H, dd,  $J=0.97, 8.1$ Hz). FABMS: m/z 266 (M+H)<sup>+</sup>. FAB-HMS(M+H)<sup>+</sup> calcd for C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>4</sub>:266.1028, found:266.1028.

### Diethyl 3-(3-(hydroxymethyl)piperidine-1-yl)phthalate (62f) の合成

化合物 **60** (200 mg, 0.83 mmol) の DMSO (3.0 mL) 溶液に、3-(hydroxymethyl)piperidine (960 mg, 8.34 mmol) を加え、80°C で 1 晩攪拌した。反応液に水を加え、AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:AcOEt=1:1) で精製し、アモルファス **62f** (220 mg, 79.1%) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.36 (3H, t, *J*=7.3 Hz), 1.39 (3H, t, *J*=7.3 Hz), 1.74 (2H, m), 1.90 (2H, m), 2.80 (2H, m), 3.03 (2H, m), 3.56 (2H, m), 3.72 (1H, m), 4.34 (2H, q, *J*=7.3 Hz), 4.41 (2H, q, *J*=7.3 Hz), 7.41 (2H, d, *J*=4.3 Hz), 7.78 (1H, dd, *J*=4.3 Hz). EIMS: *m/z* 335(M<sup>+</sup>).

### 3-(3-(Hydroxymethyl)piperidine-1-yl)phthalic acid (45f) の合成

化合物 **62f** (220 mg, 65.7 mmol) の 1,4-dioxane (1.0 mL) 溶液に、5.0 M NaOH (5.0 mL) を加え、80°C で 1 晩攪拌した。反応液に 1.0 M HCl を加え pH=2 にした後、減圧濃縮した。得られた残渣をセパビーズ SP207 (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN=1:0~4:1) で精製し、無色固体 **45f** (150 mg, 81.5%) を得た。Mp: 190-191°C. <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): δ 1.36 (1H, m), 1.83 (2H, m), 2.06 (2H, m), 3.21-3.55 (6H, m), 7.44 (1H, d, *J*=7.3 Hz), 7.62-7.69 (2H, m); FABMS: *m/z* 280 (M+H)<sup>+</sup>. FAB-HMS (M+H)<sup>+</sup> Calcd for C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>5</sub>: 280.1185, found: 280.1185.

### Diethyl 3-(4-(hydroxymethyl)piperidine-1-yl)phthalate (62g) の合成

化合物 **60** (200 mg, 0.84 mmol) に 4-(hydroxymethyl)piperidine (960 mg, 8.40 mmol) を加え、80°C で 1 晩攪拌した。反応液を分取 TLC (hexane:AcOEt=1:1) で精製し、油状化合物 **62g** (220 mg, 78.0%) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.36 (3H, t, *J*=7.1 Hz), 1.39 (3H, t, *J*=7.1 Hz), 1.40 (2H, m), 1.62 (1H, m), 1.80 (2H, m), 2.77 (2H, m), 3.54 (2H, d, *J*=6.3 Hz), 4.34 (2H, q, *J*=7.1 Hz), 4.40 (2H, q, *J*=7.1 Hz), 7.42 (1H, dd, *J*=8.0 Hz), 7.45 (1H, d, *J*=8.0 Hz), 7.51 (1H, brs), 7.78 (1H, d, *J*=8.0 Hz). EIMS: *m/z* 335(M<sup>+</sup>).

### 3-(4-(Hydroxymethyl)piperidine-1-yl)phthalic acid (45g) の合成

化合物 **62g** (50.0 mg, 0.15 mmol) の 1,4-dioxane (1.0 mL) 溶液に、5.0 M NaOH (5.0 mL) を加え、80°C で 1 晩攪拌した。反応液に 1.0 M HCl を加え pH=2 にした後、減圧濃縮した。得られた残渣をダイヤイオン HP-20 (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN=1:0~4:1) で精製し、無色固体 **45g** (30.0 mg, 71.4%) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): δ 1.55 (2H, m), 1.85 (1H, m), 2.06 (2H, m), 3.48 (6H, m), 7.37 (1H, dd, *J*=2.5, 6.5 Hz), 7.60 (1H, d, *J*=6.5 Hz), 7.61 (1H, d, *J*=2.5 Hz).

FABMS:  $m/z$  280 (M+H)<sup>+</sup>. FAB-HMS(M+H)<sup>+</sup> calcd for C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>5</sub>:280.1185, found:280.1185.

### Diethyl 3-(4-(hydroxyethyl)piperidine-1-yl)phthalate (62h) の合成

化合物 **60** (152 mg, 0.63 mmol) の DMSO (5.0 mL) 溶液に、4-(hydroxyethyl)piperidine (810 mg, 6.30 mmol) を加え、80°C で 1 晩攪拌した。反応液に水を加え、AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣を分取 TLC (hexane:AcOEt=1:1) で精製し、油状化合物 **62h** (52.0 mg, 23.6%) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.33 (4H, m), 1.39 (3H, t,  $J=7.1$  Hz), 1.39 (3H, t,  $J=7.1$  Hz), 1.75 (2H, m), 2.67 (2H, m), 3.19 (2H, m), 3.72 (2H, m), 4.30 (1H, m), 4.33 (2H, q,  $J=7.1$  Hz), 4.40 (2H, q,  $J=7.1$  Hz), 7.39 (2H, m), 7.75 (1H, dd,  $J=2.6, 6.3$  Hz). ESIMS:  $m/z$  350 (M+H)<sup>+</sup>.

### 3-(4-(Hydroxyethyl)piperidine-1-yl)phthalic acid (45h) の合成

化合物 **62h** (50.0 mg, 0.14 mmol) の 1,4-dioxane (1.0 mL) 溶液に 5.0 M NaOH (5.0 mL) を加え、80°C で 1 晩攪拌した。反応液に 1.0M HCl を加え pH=2 にした後、減圧濃縮した。得られた残渣をダイヤイオン HP-20 (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN=1:0~7:3) で精製し、無色固体 **45h** (16.0 mg, 39.0%) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): δ 1.55 (2H, m), 1.85 (1H, m), 2.06 (2H, m), 3.48 (6H, m), 7.37 (1H, dd,  $J=2.5, 6.5$  Hz), 7.60 (1H, d,  $J=6.5$  Hz), 7.61 (1H, d,  $J=2.5$  Hz). ESIMS:  $m/z$  292 (M-H)<sup>-</sup>.

### Diethyl 3-(4-hydroxy-4-phenylpiperidine-1-yl)phthalate (62l) の合成

化合物 **60** (120 mg, 0.5 mmol) の DMSO (2.0 mL) 溶液に、4-hydroxy-4-phenylpiperidine (440 mg, 2.48 mmol) を加え、80°C で 1 晩攪拌した。反応液に水を加え、AcOEt で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣を分取 TLC (hexane:AcOEt=1:1) で精製し、油状化合物 **62l** (41.0 mg, 20.6%) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.37 (3H, t,  $J=7.2$  Hz), 1.41 (3H, t,  $J=7.2$  Hz), 1.83 (2H, m), 2.21 (2H, m), 3.12 (2H, m), 3.23 (2H, m), 4.34 (2H, q,  $J=7.2$  Hz), 4.43 (2H, q,  $J=7.2$  Hz), 7.30 (1H, d,  $J=7.8$  Hz), 7.39 (2H, m), 7.45 (1H, dd,  $J=7.8, 7.8$  Hz), 7.53 (3H, m), 7.79 (1H, d,  $J=7.8$  Hz). ESIMS:  $m/z$  398 (M+H)<sup>+</sup>.

### 3-(4-Hydroxy-4-phenylpiperidine-1-yl)phthalic acid (45l) の合成

化合物 **62l** (60.0 mg, 0.15 mmol) の 1,4-dioxane (1.0 mL) 溶液に、5.0 M NaOH (5.0 mL) に加えて、80°C で 1 晩攪拌した。反応液に 1.0M HCl を加

え pH=2 にした後、減圧濃縮した。得られた残渣をセパピーズ SP207 (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN=1:0~7:3)で精製し、黄色固体 **45l** (20.0 mg, 39.1%)を得た。Mp:140-141°C. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD):δ 2.05 (2H, d, *J*=13.4 Hz), 2.64 (2H, m), 3.14 (2H, m), 3.66 (2H, m), 7.33 (1H, d, *J*=7.6 Hz), 7.41 (1H, dd, *J*=7.3, 7.6 Hz), 7.54 (1H, d, *J*=7.3 Hz), 7.66 (5H, brs). FABMS:m/z342(M+H)<sup>+</sup>.

### Diethyl 3-(4-benzylpiperidine-1-yl)phthalate (**62m**) の合成

化合物 **60** (100 mg, 0.420 mmol)に 4-benzylpiperidine(0.74 g, 4.20 mmol)を加え、80°Cで1晩攪拌した。反応液に水を加え、AcOEtで抽出した。有機層を1.0M HClで洗浄、無水 MgSO<sub>4</sub>で乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣を分取 TLC (hexane:AcOEt=7:3)で精製し、アモルファス **62l** (110 mg, 66.3%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):δ 1.35 (3H, t, *J*=7.2 Hz), 1.37 (3H, t, *J*=7.2 Hz), 1.41 (2H, m), 1.60 (1H, m), 1.69 (2H, m), 2.56 (2H, m), 2.63 (2H, m), 3.18 (2H, m), 4.33 (2H, q, *J*=7.2 Hz), 4.40 (2H, q, *J*=7.2 Hz), 7.37 (7H, m), 7.74 (1H, dd, *J*=2.0, 6.9 Hz). ESIMS: m/z 396(M+H)<sup>+</sup>

### 3-(4-Benzylpiperidine-1-yl)phthalic acid (**45m**) の合成

化合物 **62l** (100 mg, 0.250 mmol)の 1,4-dioxane (1.0 mL)溶液に、5.0 M NaOH (5.0 mL)を加え、80°Cで1晩攪拌した。反応液に 1.0M HClを加え pH=2 にした後、AcOEtで抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub>で乾燥後減圧濃縮した。逆相カラムクロマトグラフィー(ODS、H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN=9:1~3:2)で精製し、淡黄色固体 **45m** (18.0 mg, 20.0%)を得た。Mp:92-93°C. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):δ 1.62 (2H, m), 1.84 (2H, m), 1.91 (2H, m), 2.65 (2H, d, *J*=7.1 Hz), 3.00 (2H, m), 3.22 (2H, m), 7.39 (8H, m). ESIMS: m/z 338 (M-H)<sup>-</sup>. FAB-HMS(M+H)<sup>+</sup> calcd for C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>:340.1549, found:340.1549.

### Diethyl 3-(4-methoxypiperidine-1-yl)phthalate (**63**) の合成

化合物 **62e** (0.20 g, 0.620 mmol)の THF (5.0 mL)に溶液に、NaH (75.0 mg, 30.1 mmol)および iodomethane (0.15 mL, 2.41 mmol)を加え室温で1晩攪拌した。反応液に水を加え、AcOEtで抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub>で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:AcOEt=7:3)で精製し、アモルファス **63** (58.0 mg, 27.9%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):δ 1.35 (3H, t, *J*=7.1 Hz), 1.39 (3H, t, *J*=7.1 Hz), 1.68 (2H, m), 1.97 (2H, m), 2.77 (2H, m), 3.16 (2H, m), 3.32 (1H, m), 3.37 (3H, s), 4.33 (2H, q, *J*=7.1Hz), 4.40 (2H, q, *J*=7.1Hz), 7.40 (1H, d, *J*=4.8 Hz), 7.41 (1H, d, *J*=3.8Hz), 7.77 (1H, dd, *J*=3.8, 4.8 Hz). FABMS: m/z 336(M+H)<sup>+</sup>.

### 3-(4-Methoxypiperidine-1-yl)phthalic acid (**45i**) の合成

化合物 **63** (58.0 mg, 0.17 mmol)の 1,4-dioxane (1.0 mL)溶液に、5.0 M NaOH (5.0 mL)を加え、80°Cで1晩攪拌した。反応液に 1.0M HClを加え pH=2 にした後、減圧濃縮した。得られた残渣をセパピーズ SP207(H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN=1:0~4:1)で精製し、淡黄色固体 **45i** (40.0 mg, 84.3%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): $\delta$  1.95 (2H, m), 2.16 (2H, m), 3.33 (3H, s), 3.40 (2H, m), 3.56 (2H, m), 3.70 (1H, m), 7.41 (1H, d,  $J=6.6$  Hz), 7.62 (2H, m). ESIMS: m/z 278(M-H). FAB-HMS (M+H)<sup>+</sup> calcd for C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>5</sub>:280.1185, found:280.1185.

### Diethyl 3-(4-aminopiperidine-1-yl)phthalate (**64**) の合成

化合物 **62e** (200 mg, 0.62 mmol)の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5.0 mL)溶液に、Et<sub>3</sub>N (0.17 mL, 1.24 mmol)および MsCl (0.057 mL, 0.074 mmol)を加え室温で1時間攪拌した。反応液に水を加え、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub>で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣をDMF (5.0 mL)に溶解し、NaN<sub>3</sub> 50 mg(0.74 mmol)を加え 100°Cで3時間攪拌した。反応液に水を加え、AcOEtで抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub>で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt=2:1)で精製し、油状化合物 (170 mg, 79.2%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): $\delta$  1.36 (3H, t,  $J=7.2$  Hz), 1.40 (3H, t,  $J=7.2$  Hz), 1.74 (2H, m), 1.98 (2H, m), 2.82 (2H, m), 3.18 (2H, m), 3.54 (1H, m), 4.34 (2H, q,  $J=7.2$  Hz), 4.43 (2H, q,  $J=7.2$  Hz), 7.40 (1H, d,  $J=7.0$  Hz), 7.42 (1H, dd,  $J=7.0$  Hz), 7.79 (1H, d,  $J=7.0$  Hz). EIMS: m/z 346 (M<sup>+</sup>). この化合物 (80.0 mg, 0.23 mmol)を EtOH:H<sub>2</sub>O=5:1の混合溶媒(6.0 mL)に溶解し、10%Pd-C(16.0 mg)を加えた。この混合物を水素気流下室温で1晩攪拌した。反応液をセライト濾過後、濾液を減圧濃縮し、油状化合物 **64** (54.0 mg, 73.3%)を得た。ESIMS:m/z 321 (M+H)<sup>+</sup>

### 3-(4-Aminopiperidine-1-yl)phthalic acid (**45j**) の合成

化合物 **64** (50.0 mg, 0.16 mmol)の 1,4-dioxane (2.0 mL)溶液に、5.0 M NaOH (2.0 mL)を加え、80°Cで1晩攪拌した。反応液に 1.0M HClを加え pH=2 にした後、減圧濃縮した。得られた残渣をセパピーズ SP207 (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN=1:0~4:1)で精製し、無色固体 **45j** (20.0 mg, 47.5%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): $\delta$  1.61 (2H, m), 1.98 (2H, m), 3.06-3.66 (5H, m), 7.05 (1H, dd,  $J=2.4, 6.5$  Hz), 7.21-7.27 (2H, m). ESIMS:m/z 263 (M-H)<sup>-</sup>.

### Diethyl 3-(4-carbamoylpiperidin-1-yl)phthalate (**65**) の合成

化合物 **48** (240 mg, 1.0 mmol)の DMSO (2.5 mL)溶液に、isonipecotamide (640 mg, 5.0 mmol)を加え 80°Cで1晩攪拌した。反応液に水を加え、AcOEtで抽出した。有機層を無水 MgSO<sub>4</sub>で乾燥後、減圧濃縮した。得られた残

渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:AcOEt =1:1~CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=9:1)で精製し、油状化合物 **65** (250 mg, 72.0%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):δ 1.36 (3H, t, *J*=7.2 Hz), 1.39 (3H, t, *J*=7.2 Hz), 1.84 (2H, m), 1.95 (2H, m), 2.27 (1H, m), 2.72 (2H, m), 3.27 (2H, m), 4.33 (2H, q, *J*=7.2 Hz), 4.41 (2H, q, *J*=7.2 Hz), 5.30 (1H, brs), 5.47 (1H, brs), 7.40 (2H, m), 7.78 (1H, dd, *J*=1.7, 7.0 Hz). EIMS:m/z 348 (M<sup>+</sup>).

### 3-(4-Carboxypiperidin-1-yl)phthalic acid (**45k**) の合成

化合物 **65** (45.0 mg, 0.13 mmol)の 1,4-dioxane (1.0 mL)溶液に、5.0 M NaOH(5.0 mL)を加え、80°Cで1晩攪拌した。反応液に1.0M HClを加えpH=2にした後、AcOEtで抽出した。有機層を無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣をセパビーズ SP207 (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN=40:1~10:1)で精製し、無色固体 **45k** (20.0 mg, 52.5%)を得た。Mp:238-240°C. <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O):δ 2.00 (2H, m), 2.24 (2H, m), 2.76 (1H, m), 3.46 (4H, m), 7.42 (1H, d, *J*=6.8 Hz), 7.63 (2H, m). ESIMS: m/z 294 (M+H)<sup>+</sup>.

### Diethyl 3-amino-6-bromophthalate (**69**) の合成

化合物 **57** (250 mg, 1.05 mmol)の DMF (5.0 mL)溶液に、*N*-bromosuccinimide (224 mg, 1.25 mmol)を加え、50°Cで1晩攪拌した。反応液に水を加え、AcOEtで抽出した。有機層を無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣を分取TLC (hexane:AcOEt=1:1)を用いて精製し、高極性画分より油状化合物 **69** (216 mg, 57.9%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):δ 1.34 (3H, t, *J*=7.3 Hz), 1.40 (3H, t, *J*=7.3 Hz), 4.31 (2H, q, *J*=7.3 Hz), 4.39 (2H, q, *J*=7.3 Hz), 5.77 (2H, brs), 6.60 (1H, d, *J*=8.8 Hz), 7.38 (1H, d, *J*=8.8 Hz). EIMS: m/z 315 (M<sup>+</sup>). 低極性画分より副生成物の diethyl 3-amino-4,6-dibromophthalate (85.0 mg, 20.5%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):δ 1.34 (3H, t, *J*=7.1 Hz), 1.40 (3H, t, *J*=7.1 Hz), 4.32 (2H, q, *J*=7.1 Hz), 4.38 (2H, q, *J*=7.1 Hz), 6.35 (2H, brs), 7.76 (1H, s). EIMS: m/z 315 (M<sup>+</sup>).

### Diethyl 3-amino-6-methylphthalate (**70**) の合成

化合物 **63** (280 mg, 1.05 mmol)の DMF (4.0 mL)溶液に、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (360 mg, 2.60 mmol)、Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (520 mg, 0.26 mmol)および trimethylboroxine (111 mg, 2.60 mmol)を加え80°Cで1晩攪拌した。反応液をセライト濾過した後、濾液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:AcOEt=7:3)で精製し、油状化合物 **70** (97.0 mg, 48.9%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):δ 1.34 (3H, t, *J*=7.1 Hz), 1.36 (3H, t, *J*=7.1 Hz), 2.19 (3H, s), 4.32 (2H, q, *J*=7.1 Hz), 4.34 (2H, q,



$J=7.1$  Hz), 5.44 (2H, brs), 6.64 (1H, d,  $J=8.5$  Hz), 7.08 (1H, d,  $J=8.5$  Hz).  
EIMS:  $m/z$  251 ( $M^+$ ).

#### Diethyl 3-methyl-6-(4-oxopiperidin-1-yl)phthalate (71) の合成

化合物 **70** (50.0 mg, 0.20 mmol) の EtOH (2.0 mL) 溶液に、1,5-dichloropentane-3-one (93.0mg, 0.60 mmol) を加え、60°C で 4 時間攪拌した。反応液に水を加え、AcOEt で抽出した。有機層を飽和  $\text{NaHCO}_3$  水溶液で洗浄、無水  $\text{MgSO}_4$  で乾燥して、減圧濃縮した。得られた残渣を 1,4-dioxane (2.0 mL) に溶解し、5.0M HCl (5.0 mL) を加え室温で二日間攪拌した。反応液に水を加え、AcOEt で抽出した。有機層を無水  $\text{MgSO}_4$  で乾燥後減圧濃縮した。得られた残渣を分取 TLC (hexane:AcOEt=3:1) で精製し、化合物 **71** (20.0 mg, 30.0%) を得た。 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.37 (6H, m), 2.42 (3H, s), 2.54 (4H, m), 3.28 (4H, m), 4.35 (4H, m), 7.17 (1H, d,  $J=8.3$  Hz), 7.25 (1H, d,  $J=8.3$  Hz). EIMS:  $m/z$  333 ( $M^+$ ).

#### Diethyl 3-(4-hydroxypiperidin-1-yl)-6-methylphthalate (72) の合成

化合物 **71** (58.0 mg, 0.174 mmol) の EtOH (5.0 mL) 溶液に、 $\text{NaBH}_4$  (8.0 mg, 0.20 mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、残渣に水を加え、AcOEt で抽出した。有機層を無水  $\text{MgSO}_4$  で乾燥後減圧濃縮し、油状化合物 **72** (47.0 mg, 82.4%) を得た。 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.35 (3H, t,  $J=7.1$  Hz), 1.37 (3H, t,  $J=7.1$  Hz), 1.65 (2H, m), 1.96 (2H, m), 2.39 (3H, s), 2.78 (2H, m), 3.16 (2H, m), 3.80 (1H, m), 7.15 (1H, d,  $J=7.2$  Hz), 7.25 (1H, d,  $J=7.2$  Hz). FABMS:  $m/z$  336 ( $M+H$ )<sup>+</sup>

#### 3-(4-Hydroxypiperidin-1-yl)-6-methylphthalic acid (66) の合成

化合物 **72** (45.0 mg, 0.13 mmol) の 1,4-dioxane (1.0 mL) 溶液に、5.0 M NaOH (5.0 mL) を加え、80°C で 3.5 時間攪拌した。反応液に 1.0 M HCl を加え pH=2 にした後、減圧濃縮した。得られた残渣をセパビーズ SP207 ( $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}=1:0\sim 4:1$ ) で精製し、淡黄色固体 **66** (6.0 mg, 16.5%) を得た。 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  1.80 (2H, m), 2.08 (2H, m), 2.69 (3H, s), 3.30 (2H, m), 3.46 (2H, m), 4.02 (1H, m), 7.65 (1H, d,  $J=8.5$  Hz), 7.83 (1H, d,  $J=8.5$  Hz). FABMS:  $m/z$  280 ( $M+H$ )<sup>+</sup>

#### Diethyl 3,6-difluorophthalate (74) の合成

3,6-difluorophthalic anhydride **73** (500 mg, 2.70 mmol) を EtOH (20 mL) に溶解し、 $c\text{H}_2\text{SO}_4$  (2.0 mL) を加え 1 晩加熱還流した。反応液に水を加え、AcOEt で抽出した。有機層を無水  $\text{MgSO}_4$  で乾燥後減圧濃縮した。得られ

た残渣を DMF (10 mL)に溶解し、 $K_2CO_3$  (1.10 g, 7.97 mmol)、ethyl iodide (0.33 mL, 4.10 mmol)を加え、室温で2日間攪拌した。反応液に水を加え、AcOEtで抽出した。有機層を無水  $MgSO_4$  で乾燥後減圧濃縮し、油状化合物 **74** (460 mg, 66.0%)を得た。 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ): $\delta$  1.38 (6H, t,  $J=7.1$  Hz), 4.41 (4H, q,  $J=7.1$  Hz), 7.21 (2H, dd,  $J=5.8, 7.2$  Hz). ESIMS: $m/z$  259 (M+H) $^+$ .

### Diethyl 3-fluoro-6-(4-hydroxypiperidine-1-yl)phthalate (**75**) の合成

#### Diethyl 3,6-bis(4-hydroxypiperidine-1-yl)phthalate (**76**) の合成

化合物 **69** (100 mg, 0.380 mmol)を DMSO (1.0 mL)に溶解し、4-hydroxypiperidine (980 mg, 3.80 mmol)を加え 80°Cで1晩攪拌した。反応液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:AcOEt=1:1~AcOEt:MeOH=10:1)を用いて精製し、第1画分より化合物 **75** (86.0 mg, 60.5%)を、第2画分より化合物 **76** (33.0 mg, 20.7%)をそれぞれ油状物として得た。化合物 **75**:  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ): $\delta$  1.36 (3H, t,  $J=7.2$  Hz), 1.39 (3H, t,  $J=7.2$  Hz), 1.65 (2H, m), 1.95 (2H, m), 2.78 (2H, m), 3.13 (2H, m), 3.82 (1H, m), 4.36 (2H, q,  $J=7.2$  Hz), 4.37 (2H, q,  $J=7.2$  Hz), 7.12 (1H, dd,  $J=9.0, 9.0$  Hz), 7.29 (1H, dd,  $J=4.4, 9.0$  Hz). ESIMS:  $m/z$ 340(M+H) $^+$ . 化合物 **76**:  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ): $\delta$  1.36 (6H, t,  $J=7.1$  Hz), 1.65 (4H, m), 1.93 (4H, m), 2.77 (4H, m), 3.16 (4H, m), 3.80 (2H, m), 4.32 (4H, q,  $J=7.1$  Hz), 7.13 (2H, s). ESIMS:  $m/z$  421 (M+H) $^+$ .

### 3,6-Bis(4-hydroxypiperidine-1-yl)phthalic acid (**67**) の合成

化合物 **76** (100 mg, 0.23 mmol)の 1,4-dioxane (2.0 mL)溶液に、5.0 M NaOH(10 mL)を加えて、80°Cで1晩攪拌した。反応液に 1.0 M HClを加え pH=2にした後、減圧濃縮しした。得られた残渣をセパビーズ SP207 ( $H_2O:CH_3CN=1:0\sim 4:1$ )で精製し、淡黄色固体 **67** (61.0 mg, 72.9%)を得た。Mp:156-160°C (dec).  $^1H$ -NMR ( $D_2O$ ): $\delta$  1.72 (4H, m), 2.00 (4H, m), 3.12 (4H, m), 3.33 (4H, m), 3.90 (2H, m), 7.61 (2H, brs). FABMS: $m/z$  365(M+H) $^+$ . FAB-HMS (M+H) $^+$  calcd for  $C_{18}H_{25}N_2O_6$ : 365.1713, found:365.1713.

### Diethyl 3-(dimethylamino)-6-(4-hydroxypiperidine-1-yl)phthalate (**77**) の合成

化合物 **75**(160 mg, 0.47 mmol)を dimethylamine (2.0M THF 溶液、3.0 mL, 6.0 mmol)に溶解し、封管中 80°Cで二日間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣を分取 TLC(hexane:AcOEt=4:1)で精製し、油状化合物 **77** (100 mg, 54.9%)を得た。 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  :1.35 (3H, t,  $J=7.3$  Hz), 1.37 (3H, t,  $J=7.3$  Hz), 1.67 (2H, m), 1.94 (2H, m), 2.75 (2H, m), 2.76 (6H, s), 3.13 (2H,

m), 4.35 (2H, q,  $J=7.3$  Hz), 4.36 (2H, q,  $J=7.3$  Hz), 7.01 (1H, d,  $J=9.1$  Hz), 7.13 (1H, d,  $J=9.1$  Hz). EIMS:  $m/z$ 364 ( $M^+$ ).

### 3-(Dimethylamino)-6-(4-hydroxypiperidine-1-yl)phthalic acid (68) の合成

化合物 75 (100 mg, 0.27 mmol)の 1,4-dioxane (1.0 mL)溶液に、5.0M NaOH (5.0 mL)を加え、80°Cで二日間攪拌した。反応液を 1.0M HClで pH=2にした後、減圧濃縮した。得られた残渣をセパピーズ SP207 (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN=1:0~4:1)で精製し、橙色固体 68 (60.0 mg, 72.1%)得た。Mp:160-170°C (dec.). <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 1.77 (2H, m), 2.06 (2H, m), 3.08 (6H, s), 3.21 (2H, m), 3.41 (2H, m), 3.94 (1H, m), 7.72 (1H, d,  $J=9.0$  Hz), 7.82 (1H, d,  $J=9.0$  Hz). FABMS: $m/z$  309 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

## 第2章 生物活性評価に関する実験

### 抗菌活性の測定

in vitro活性はCLSIのmicrobroth dilution 法<sup>73</sup>に従い実施した。Mueller-Hinton II 培地 (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD)を測定培地に使用し、接種菌量は約5×10<sup>4</sup> cfu/wellとした。BIPMのMIC値はBIPM単独と50 µg/mlの阻害剤存在下の2条件で測定した。抗菌活性測定には以下の菌株を使用した。

感受性分布試験には、2000~2003年に分離された臨床分離株を使用した。

Strain	異物排出ポンプ	IMP-1産生	性状
<i>E. coli</i> W4680	正常	×	
<i>E. coli</i> WZM120	acrAB 欠損	×	W4680の <i>acrAB</i> を欠損させた株
<i>E. coli</i> WZM120/pHSG blaimp	acrAB 欠損	○	市販のpHSGベクターに pMS363よりIMP-1産生遺伝子挿入、クローニング
<i>E. coli</i> W4680/pHSG blaimp	正常	○	市販のpHSGベクターに pMS363よりIMP-1産生遺伝子挿入、クローニング
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	正常	×	受容菌として使用 実験室株
<i>P. aeruginosa</i> KG5002 <sup>59</sup>	mexAB欠損	×	受容菌として使用 PAO1株の <i>mexAB</i> 遺伝子を欠損させた株
<i>P. aeruginosa</i> KG5002 <sup>59</sup> /pMS363 <sup>58</sup>	mexAB欠損	○	臨床分離緑膿菌由来のプラスミド pMS363を形質転換
<i>P. aeruginosa</i> PAO1/pMS363 <sup>58</sup>	正常	○	臨床分離緑膿菌由来のプラスミド pMS363を形質転換

### 形質転換による菌株の作製方法

受容菌のコンピテントセルを調製した後に、エレクトロポレーション法 (Gene Pulser II (Bio Rad Lab.)) を用いて、電圧、コンデンサー容量、および抵抗値をそれぞれ 2.5kv、25µF、および 200Ω に設定し、DNA のトランスフォームを行った。大腸菌のトランスフォーム用のプラスミドは、市販のプラスミドベクターpHSG393 に PCR で増幅した IMP-1 遺伝子をクローニングして作製した。緑膿菌のトランスフォーム用

のプラスミド DNA pMS363 は、QIA prep<sup>R</sup> Spin Miniprep kit (QIAGEN) で抽出した。得られた形質転換株は、IMP-1 遺伝子検出用プライマー (F1 : 5'-CTACCGCAGCAGAGTCTTTG-3'、R1 : 5'-AACCAGTTTTGCCTTACCAT-3') を用いる PCR 法により IMP-1 領域を増幅することで確認した。

### MBL (IMP-1) 阻害活性

まず、カルバペネム耐性緑膿菌 (MSC15369) から調製したプラスミド DNA を用いて、IMP-1 遺伝子を PCR で増幅した。この PCR 産物を pTrcHis2TOPO ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA) に組み込み、大腸菌 DH5 $\alpha$ (Toyobo, Osaka, Japan)に形質転換した。この大腸菌を室温で 3 時間、0.5 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (Wako, Osaka, Japan)存在下で培養し IMP-1 の発現を誘導した。大腸菌抽出液から、Ni-NTA slurry (Qiagen, Valencia, CA)を用いて IMP-1 酵素を精製した。MBL (IMP-1) 阻害活性はニトロセフィン (Oxoid, Basingstoke, England) を基質として分光光度法で以下のようにして測定した<sup>53</sup>。すなわち、IMP-1 (1.0 nM)、HEPES (pH7.5, 50 mM)、ZnSO<sub>4</sub>(100 $\mu$ M)、BSA (20 $\mu$ g/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、およびのニトロセフィン (100  $\mu$ M) の混合液に、濃度の異なる阻害剤を添加後、室温にて 20 分間インキュベーションした。その後、Wallac ARVOsx 96-well plate reader (Perkin Elmer, Waltham, MA)で、490 nm の測定波長でそれぞれの混合溶液の吸光度を測定した。IMP-1 酵素非添加時の吸光度を 100%阻害、阻害剤非添加時の吸光度を 0%阻害として、阻害剤の IC<sub>50</sub> 値を算出した。

### 複合体の結晶構造解析

N 末端 18 アミノ酸残基のシグナルペプチドを除いた緑膿菌由来 IMP-1 遺伝子を pET-28a(+)ベクター (Novagen) に挿入し、大腸菌 BL21(DE3) (Novagen) の菌体内に過剰発現させた (なお、His-tag は付加していない)。菌体を超音波で破碎し、抽出液から陽イオン交換カラム (SP Sepharse、GE ヘルスケア・ジャパン) およびゲル濾過カラム (Superdex 75、GE ヘルスケア・ジャパン) を用いて IMP-1 を精製した<sup>53</sup>。

誘導体 45e と IMP-1<sup>53</sup> との複合体結晶は、誘導体 45e の存在下、結晶化溶液として 0.1 M sodium acetate, pH 4.8, 24% polyethylene glycol monomethyl ether 2000, 0.2 M ammonium sulfate, 2 mM dithiothreitol を用いるシッティングドロップ蒸気拡散法<sup>71</sup>により作製した。X 線回折データは、SPring-8 (兵庫県) の BL41XU ビームラインで収集した。回折データはソフトウェア *CrystalClear* (株式会社リガク、東京都) を用いて解析した。複合体の結晶構造はソフトウェア *Molrep*<sup>74</sup> を用いて分子置換法により決定した。モデル構築と構造精密化にはソフトウェア *Coot*<sup>75</sup> と *REFMAC5*<sup>76</sup> を使用した。原子座標と構造因子は Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) にアクセス番号 3WXC として登録した。

## 引用文献

1. 紺野昌俊 日本臨床微生物学雑誌 **2004**, *14*, 1-23.
2. 厚生労働省統計 <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/life/life10/01.html>
3. 厚生労働省 平成 23 年人口動態統計月報年計（概数）の概況
4. 一山智; 山口恵三 監修, 飯沼由嗣; 舘田一博 編 医薬ジャーナル社  
「感染症治療の基礎と臨床 ～耐性菌の制御に向けて～」
5. 河野茂 編 医薬ジャーナル社「MRSA 一基礎・臨床・対策一」
6. 公益社団法人 日本化学療法学会・一般社団法人 日本感染症学会 MRSA 感染症  
の治療ガイドライン作成委員会編「MRSA 感染症の治療ガイドライン改訂版 2014」
7. 厚生労働省 薬剤耐性緑膿菌感染症  
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-05-42-01.html>
8. 谷田憲俊 著 診断と治療社 「感染症学 改訂第四版」
9. 伊藤輝代 相羽由詞; 片山由紀; 平松啓一; 化学療法の領域 **2014**, *30* 72-79.
10. 日本化学療法学会 抗 MRSA 薬使用の手引き
11. 萩原恵理; 松瀬健 化学療法の領域 **2004**, *20*, S-1, 100-105.
12. 舘田一博 臨床検査 **2014**, *58*, 1333-1336.
13. 野口薫; 後藤直正 化学療法の領域 **2007**, *23*, 215-219.
14. 厚生労働省 感染症法に基づく届け出
15. 後藤直正 医学のあゆみ **2007**, *221*, 511-515.
16. Tateda, K.; Ishii, Y.; Matsumoto, T.; Yamaguchi, K. *Scand. J. Infect. Dis.*, **2006**, *38*,  
268-272.
17. 清水喜八郎 監修 中外医学社 「アミノ配糖体薬の新しい使い方」.
18. Vincens, Q.; Westhof, E. *Structure* **2001**, *9*, 647-658.
19. ハベカシン®注射液インタビューフォーム Meiji Seika ファルマ
20. Shaw, K. J.; Rather, P. N.; Hare, R. S.; Miller, G. H. *Microbiol. Rev.* **1993**, *57*, 138-163.
21. Boehr, D. D.; Daigle, D. M.; Wright, G. D.; *Biochemistry* **2004**, *43*, 9846-9855.
22. Tabata, M.; Shimizu, M.; Araake, M.; Ogawa, H. *Jpn. J. Antibiot.* **2003**, *56*, 36-43.
23. Ambler, R. P. *Philos. Trans. R. Soc, London, Ser. B.* **1980**, *289*, 321-331.
24. 井田孝志 化学療法の領域 **2007**, *23*, 227-234.
25. 竹村弘 化学療法の領域 **2003**, *19*, 1279-1283.
26. クラバモックス®小児用配合ドライシロップインタビューフォーム グラクソ・ス  
ミスクライン株式会社
27. ユナシン®-S 静注用インタビューフォーム ファイザー株式会社
28. Kurosaki, H.; Yamaguchi, Y.; Higashi, T.; Soga, K.; Matueda, S.; Yumoto, H.; Misumi,  
S.; Yamagata, Y.; Arakawa, Y.; Goto, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3861-3864.
29. Hammond, G. G.; Huber, J. L.; Greenlee, M. L.; Laub, J.B.; Young, K.; Silver, L. L.;

- Balkovec, J. M.; Pryor, K.D.; Wu, J. K.; Leiting, B.; Pomliano, D. L.; Toney, J. H. *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, *459*, 289-296.
30. Buynak, J. D.; Chen, H.; Vogeti, L.; Gadhachhanda, V. R.; Buchanan, C. A.; Palzkill, T.; Shaw, R. W.; Spencer, J.; Walsh, T.R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1299-1304.
31. Patent WO2001019971 SmithKline Beecham Corporation
32. Toney, J. H.; Hammond, G. G.; Fitzgerald, P. M. D.; Sharma, N.; Balkovec, J. M.; Rouen, G. P.; Olson, S. H.; Hammond, M. L.; Greenlee, M. L.; Gao, Y. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 31913-31918.
33. Umezawa, H.; Ueda, M.; Maeda, K.; Yagishita, K.; Kondo, S.; Okami, Y.; Utahara, R.; Osato, Y.; Nitta, K.; Takeuchi, T. *J. Antibiot.* **1957**, *A10*, 181.
34. 近藤信一 有合化 **1991**, *49*, 858-863.
35. Kondo, S.; *Jpn. J. Antibiotics* **1994**, *47*, 561-574.
36. Vincens, Q.; Westhof, E. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 747-755.
37. Vincens, Q.; Westhof, E. *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 1175-1188.
38. Kondo, J.; Francois, B.; Russell J.M.R.; Murray. B. J.; Westhof E. *Biochimie* **2006**, *88*, 1027-1031.
39. Kurazono, M.; Yamada, K.; Hirai, Y.; Ida, T.; Inoue, M. *Jpn. J. Chemother.* **2002**, *50*, 494-499.
40. Shitara, T.; Umemura, E.; Tsuchiya, T.; Matsuno, T. *Carbohydr. Res.* **1995**, *276*, 75-89.
41. Minowa, N.; Hiraiwa, Y.; Akiyama, Y.; Maebashi, K.; Usui T.; Ikeda D. *Heterocycles* **2007**, *71*, 1715-1721.
42. Albright, J. D.; Goldman, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 4214-4216.
43. Hiraiwa, Y.; Usui T.; Akiyama, Y.; Maebashi, K.; Minowa, N.; Ikeda D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3540-3543.
44. Masuda, N.; Sakagawa, E.; Ohya, S.; Gotoh, N.; Tsujimoto, H.; Nishino, T. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 2242-2246.
45. Hiraiwa, Y.; Minowa, N.; Usui T.; Akiyama, Y.; Maebashi, K.; Ikeda D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6369-6372.
46. 村谷哲郎, 山田陽司, 小林とも子, 清祐麻紀子, 木戸直徳, 中村たまき, 朔晴久, 松本哲朗 化学療法の領域, **2008**, *24*, 100-110.
47. Maesaki, S.; Yamaguchi, T.; Sasaki, K.; Hashikita, G.; Shibuya, S.; Watanabe, M.; Takayama, S.; Kawakami, S.; Nagasawa, M.; Suzuki, N.; Uchida, T.; Okabe, T.; Kobayashi, S. *Jpn. J. Antibiotics*, **2006**, *59*, 11-20.
48. Wermuth, C.G. 編著, 長瀬博 監訳 最新創薬化学上巻 113-142.
49. Gotoh, N. *Nippon Rinsho*, **2001**, *59*, 712-718.
50. 柴田尚宏, 荒川宜親 臨床と微生物 **2007**, *34*, 83-88.
51. メロペン®点滴用 インタビューフォーム 大日本住友製薬株式会社

52. モダシン®静注用 インタビューフォーム グラクソ・スミスクライン株式会社
53. Livermore, D. M.; Mushtaq, S.; Morinaka, A.; Ida, T.; Maebashi, K.; Hope, R. *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68*, 153-158.
54. Queenan, A. M.; Bush, K. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, *20*, 440-458
55. Notake, S.; Matsuda, M.; Tamai, K.; Yanagisawa, H.; Hiramatsu, K.; Kikuchi, K. *J. Clin. Microbiology* **2013**, *51*, 1762-1768.
56. Nishino, K.; Yamaguchi, A.; *Jpn. J. Chemother.* **2008**, *56*, 443-452.
57. Hiraiwa, Y.; Morinaka, A.; Fukushima, T.; Kudo T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5162-5165.
58. Iyobe, S.; Tsunoda, M.; Mitshuhashi, S. *FEMS Microbiol. Lett.* **1994**, *121*, 175.
59. Okamoto, K.; Gotoh, N.; Nishino, T. *J. Infect. Chemother.* **2002**, *8*, 371.
60. オメガシン®点滴用 インタビューフォーム Meiji Seika ファルマ株式会社
61. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-fifth informational supplement. 2014; M100-S24.
62. Hiraiwa, Y.; Morinaka, A.; Fukushima, T.; Kudo T. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 5841-5850.
63. Safety Data Sheet Toluene 日本芳香族工業会
64. Safety Data Sheet Aniline 東京化成工業株式会社
65. Miyaura, N.; Suzuki, A. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1979**, 866-867.
66. Hodgson, H. H.; *Chem. Rev.* **1947**, *40*, 251-277.
67. Heck, R. F.; Nolley, J. P. Jr. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2320-2322.
68. Williamson, W. *J. Chem. Soc.* **1852**, *4*, 229-239.
69. Mitsunobu, O. *Synthesis*, **1981**, 1-28.
70. Hiraiwa, Y.; Saito, J.; Watanabe, T.; Yamada, M.; Morinaka, A. Fukushima, T.; Kudo T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 4891-4894.
71. McRee, D. E. *Practical Protein Crystallography*. San Diego: Academic Press, **1993**.
72. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 5th ed. Approved standard M7-A5. ; National committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa., 2000.
73. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-seventh edition, M7-A7: Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, Pa.
74. Vagin, A.; Teplyakov, A. *Acta Crystallogr. Sect. D* **2010**, *66*, 22.
75. Emsley, P.; Cowtan, K. *Acta Crystallogr. Sect. D* **2004**, *60*, 2126.
76. Murshudov, G. N.; Skubak, P.; Lebedev, A. A.; Pannu, N. S.; Steiner, R. A.; Nicholls, R. A.; Winn, M. D.; Long, F.; Vagin, A. A. *Acta Crystallogr. Sect. D* **2011**, *67*, 355.

## 謝辞

本論文の作成および発表にあたり、終始御懇篤なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました東京薬科大学分子機能解析学教室教授 横松力先生に深く感謝の意を表します。

また、本論文に関して審査および御指導、御助言を賜りました東京薬科大学病原微生物学教室教授 野口雅久先生、薬品化学教室教授 林良雄先生、漢方資源応用学教室教授 三巻祥浩先生に厚く御礼申し上げます。

本論文提出の機会を与えていただくとともに学生時代より、御指導、御鞭撻を賜りました太田明廣先生に心より御礼申しあげます。

本研究の遂行及び論文の作成にあたり、御指導、御助言を賜りました Meiji Seika ファルマ株式会社 工藤利秋博士、箕輪宣人博士、前橋一紀博士に心より感謝の意を表します。

Meiji Seika ファルマ株式会社秋山佳央氏、盛中明裕氏、渡邊尚志氏、山田雅胤氏 齋藤淳氏、福島崇恵氏、村瀬えるみ氏をはじめとする共同研究者に心から感謝いたします。

本論文作成にあたり、御協力、御支援いただきました Meiji Seika ファルマ株式会社 営業本部、くすり相談室の方々に感謝いたします。

最後に、常に温かく見守り続けてくれた家族に心から感謝いたします。