

フジウ モトヒロ

氏名(本籍)	藤生 基弘 (兵庫県)
学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	論博第 51 号
学位授与年月日	2023 年 1 月 24 日
学位授与の条件	学位規程第 3 条第 2 項該当者
学位論文の題名	2 位に硫黄官能基を有する 1,6-ジアザビシクロ [3.2.1] オクタン系新規経口 β -ラクタマーゼ阻害剤の創製
論文審査委員	主 査 教 授 上田 昌史 副 査 教 授 小西 守周 副 査 教 授 奥田 健介 副 査 教 授 波多野 学

論文内容の要旨

緒言

β -ラクタム系抗菌薬は有効性と安全性を兼ね備えた抗生物質として、数多くの誘導体が開発され、広く利用されてきた。これらの誘導体が開発された背景の一つには、耐性菌への対応に主眼を置いた研究が数多くなされてきたことがあり、その研究によって見出されたカルバペネム系抗菌薬は、現在、耐性菌に対する切り札として臨床で使用されている。^[1] 一方で、近年、多剤耐性菌の問題が深刻化しており、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE, carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*) をはじめとした、多剤耐性グラム陰性菌への対応は喫緊の課題である。^[2]

グラム陰性菌における β -ラクタム系抗菌薬に対する主要な耐性化機構は、 β -ラクタムを分解する酵素である β -ラクタマーゼの産生であり、 β -ラクタマーゼ阻害剤 (BLI) を β -ラクタム系抗菌薬と併用することで、多剤耐性グラム陰性菌の β -ラクタムへの感受性を回復させることができる。^[3] しかしながら、近年問題となっている多剤耐性グラム陰性菌が産生する *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) などの β -ラクタマーゼは、既存の BLI で阻害することができない。

これに対して、近年、1,6-ジアザビシクロ[3.2.1]オクタン (DBO) 誘導体が前述の KPC 等の β -ラクタマーゼを阻害可能な BLI として注目されており、複数の誘導体が上市・開発段階にある (Figure 1)。^[3] しかしながら、DBO 骨格は化学的に不安定で誘導体合成の難易度が高いこともあり、これらの化合物の 2 位の置換基はアミドまたはシアノ基に限定されている。また、上市されている DBO 誘導体は全て注射薬であり、開発段階に目を向けても経口薬は限られている。一方で、患者や医療従事者の負担軽減や医療コストの低減といった観点からは、経口吸収性が改善された誘導体の創製が求められている。このような背景の下、本研究では新規経口 β -ラクタマーゼ阻害剤の創出を目的とし、DBO 骨格 2 位の新たな置換基探索を行うこととした。

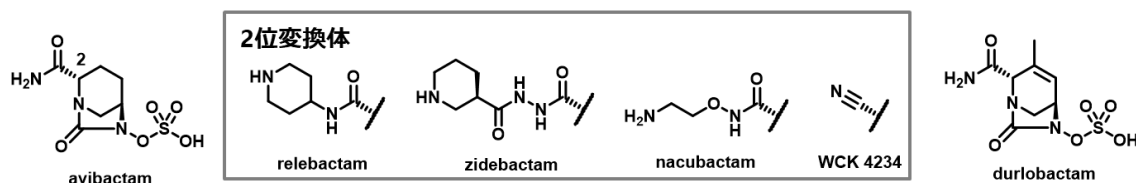


Figure 1. DBO derivatives on the market or under clinical development.

DBO系BLIはセリン型 β -ラクタマーゼの活性中心のセリン残基に対して共有結合を形成し、加水分解に対して安定なカルバモイル-酵素複合体を形成することで、 β -ラクタマーゼを阻害している (Figure 2a). [4] すなわち、DBO骨格の β -ラクタマーゼ阻害活性を向上させるためには、セリン残基に対するアシル化速度 (k_{acyl}) を向上させる必要があり、そのためには、DBO骨格2位に対してより強力な電子求引基を導入し、カルボニル炭素の化学的反応性を高めることが有効であると考えた。既存のDBO誘導体は2位にアミドを有しているが、アミドの電子求引性の指標であるHammett則の置換基定数は $\sigma_m = 0.28$ である。[5] そこで、より σ_m 値が大きいスルホン等の硫黄系官能基 ($\sigma_m = 0.52 \sim 0.60$) [5] を導入した分子をデザインし、合成に着手することとした (Figure 2b).

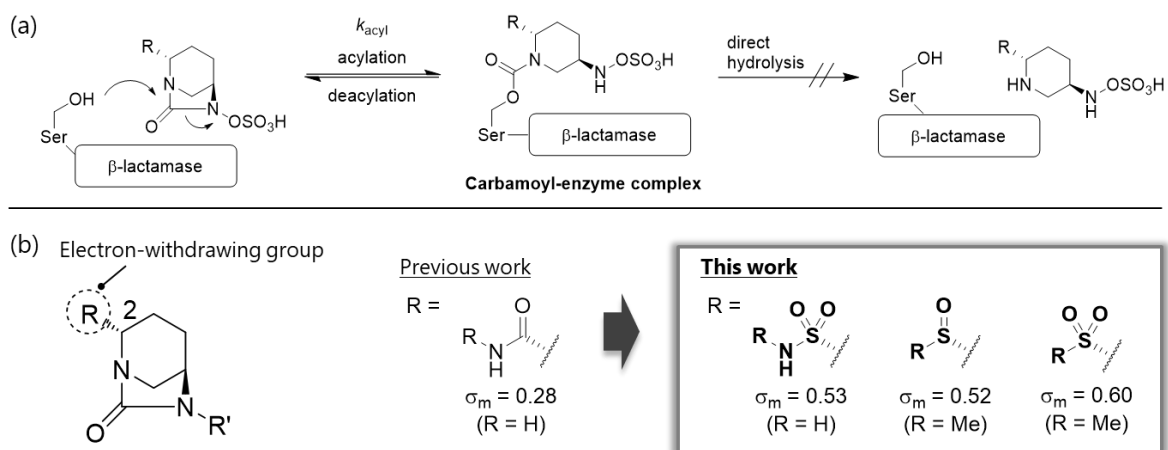


Figure 2. (a) Mode of action of DBO-mediated serine β -lactamase inhibition. (b) Design of 2-thio-substituted novel DBO compounds.

第1章 2位に硫黄官能基を有する1,6-ジアザピシクロ[3.2.1]オクタン誘導体の合成

目的とする2位に硫黄官能基を有するDBO誘導体は、2位にスルフィドをもった中間体Aから酸化反応等の官能基変換を経ることで合成できると考えた (Figure 3)。また、スルフィド中間体Aは、市販のDBO骨格をもつカルボン酸1から脱炭酸的ラジカル反応によって合成できると考えた。

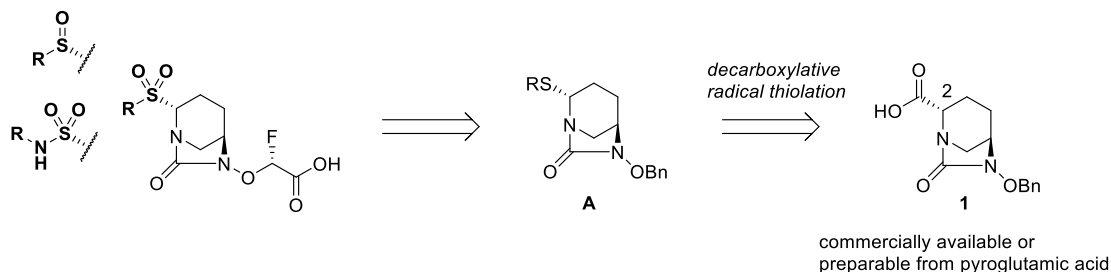
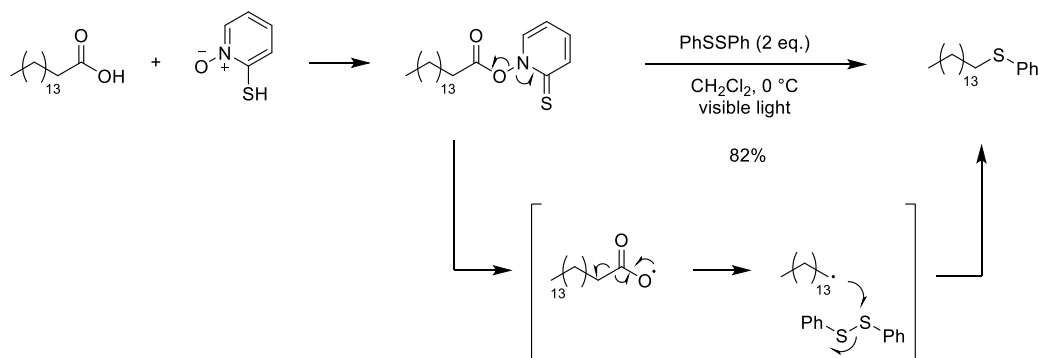


Figure 3. Synthetic strategy for 2-thio-substituted DBO derivatives.

DBO化合物は立体的なひずみによって1位の窒素原子の孤立電子対とカルボニル炭素が共鳴しておらず、酸や塩基によって容易に開環するという性質を持っている。このため、DBO環に対して-SR基

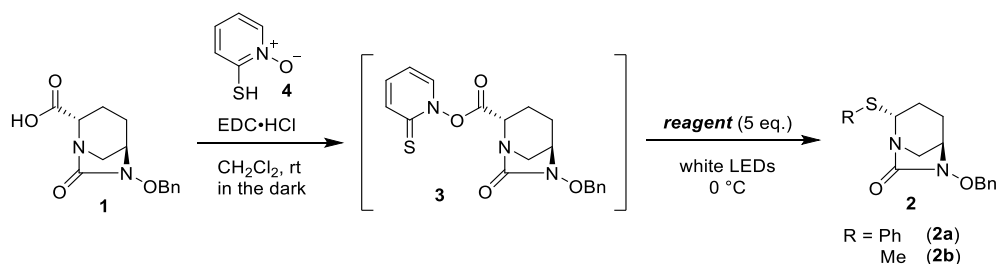
を導入する場合には反応条件に注意する必要がある。カルボン酸をスルフィドに変換する反応例としては、チオヒドロキサム酸エステルを経由した脱炭酸的ラジカル反応が古くから知られている (Scheme 1)。^{6]} この反応は光照射条件下、中性条件で進行するため、化学的に不安定な DBO 化合物に対しても適用できる可能性が高い。そこで、本反応を用いて目的とする 2 位に硫黄官能基を有する DBO 誘導体を合成することとした。

Scheme 1. Photo-Induced Decarboxylative Thiolation



カルボン酸 **1** を原料として、2-チオキソピリジニルエステル **3** (Barton エステル) を経由した脱炭酸的ラジカル反応によるスルフィド **2** の合成を検討した (Table 1)。カルボン酸 **1** を遮光条件下、EDC・HCl を用いて 2-メルカプトピリジン-*N*-オキソド **4** と縮合し、ラジカル前駆体の Barton エステル **3** を得た。この Barton エステル **3** を単離することなく、系中に 5 当量のジフェニルジスルフィド **5a** を加え、氷冷下、LED ランプを用いて白色光を照射したところ、目的の **2a** を NMR 収率で 61%、単離収率 46% でジアステレオ選択的に得ることが出来た (entry 1)。一方で、脂肪族ジスルフィドであるジメチルジスルフィド **6** を同様の条件で用いると収率の低下が見られた (entry 2)。これに対して、-SMe 源の検討を行ったところ、チオスルホネート **7** や-SPh 基をもった非対称ジスルフィド **5b** を用いることで収率を改善できることを見出した (entry 4 and 5)。過去の例においても脂肪族ジスルフィドは反応性が低いいため、大過剰量の試薬を必要とすることが報告されている。^{6]} 一方で、演者らが知る限り-SR 源を変更することによる収率の改善は報告されておらず、本結果は硫黄含有化合物の合成に有用な知見を与えるものである。

Table 1. Optimization of Reaction Conditions for Photo-Induced Decarboxylative Thiolation

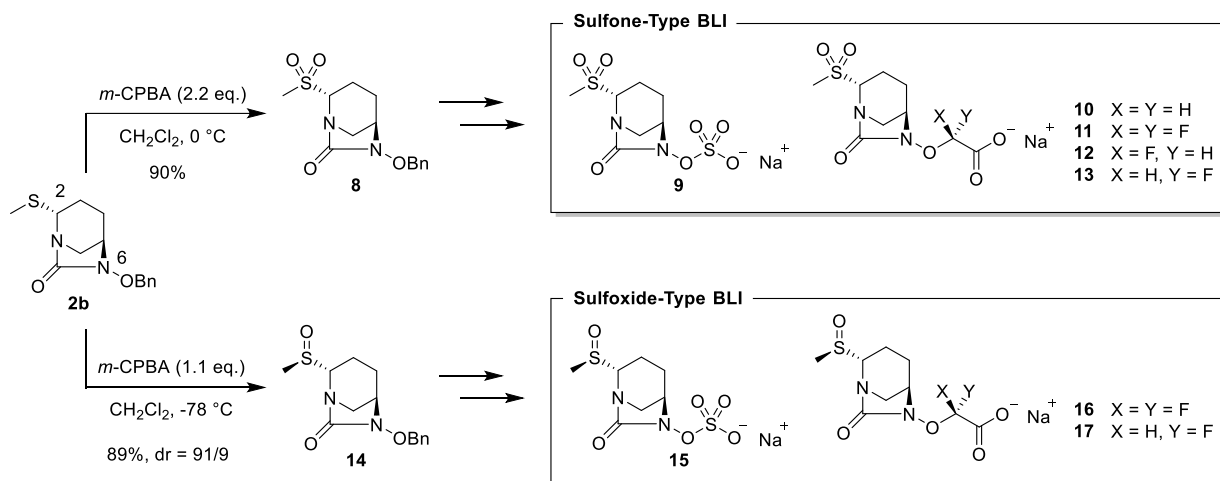


entry	reagent	R	yield (%) ^a
1	PhSSPh (5a)	Ph	61 (46) ^b
2	MeSSMe (6)	Me	30
3	MeSO ₂ SMe (7)	Me	47
4	PhSSMe (5b)	Me	48 (33) ^b

^aYield was determined by ¹H NMR using 1,1,2,2-tetrachloroethane as an internal standard. ^bIsolated yield.

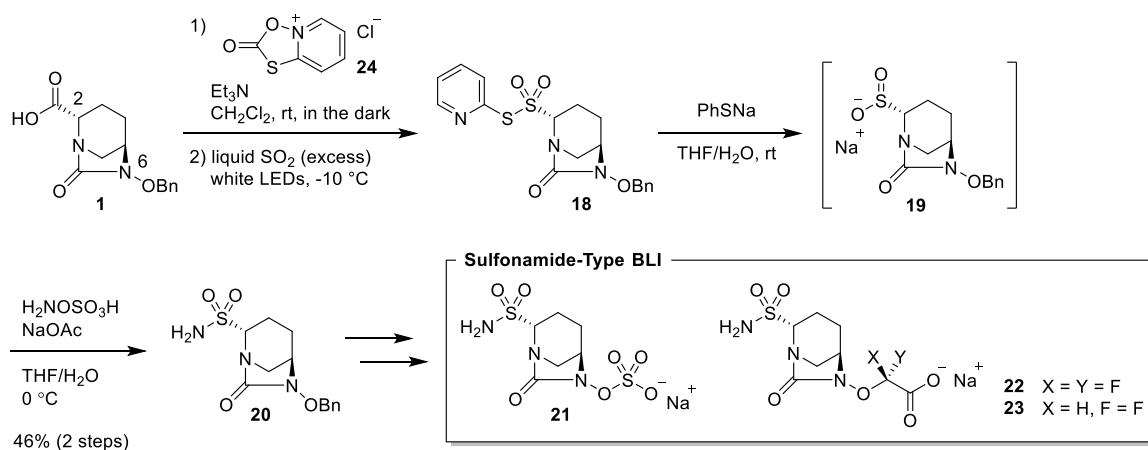
合成したスルフィド **2b** に対して、2.2 当量の *m*-CPBA を用いてスルホン **8** へと酸化した後、6 位の官能基変換を経て、目的の 2 位にスルホンをもった DBO 型 BLI **9–13** の合成を達成した (Scheme 2)。また、スルフィド **2b** に対して 1.1 当量の *m*-CPBA を用いて酸化することでジアステレオ選択的にスルホキシド **14** を得た。この化合物 **14** に対して 6 位を変換することで、2 位にスルホキシドをもった DBO 型 BLI **15–17** の合成も達成した。

Scheme 2. Synthesis of Sulfone-Type BLI 9-13 and Sulfoxide-Type BLI 15-17



脱炭酸的ラジカル反応を鍵反応として、スルホンアミドの合成も試みた (Scheme 3)。Baron エステルを用いたスルホンアミドの合成においてはスルホニルハライドを経由するルートが報告されている。^[7] しかしながら、本基質を用いた場合は α 位のエピ化が進行してしまったため、スルホニルハライドを経由しない合成ルートを検討した。Barton らの報告例を参考に、^[7] カルボン酸 **1** から脱炭酸的ラジカル反応によってチオスルホネート **18** を合成した。この化合物 **18** を PhSNa と反応させることでスルフィン酸 **19** を遊離させ、これに対する求電子的アミノ化反応によって、エピ化することなくスルホンアミド **20** を単一の異性体として得た。得られた **20** は 6 位の変換によってスルホンアミドをもった BLI **21–23** へと誘導した。

Scheme 3. Synthesis of Sulfonamide-Type BLI 51 from Carboxylic Acid 1

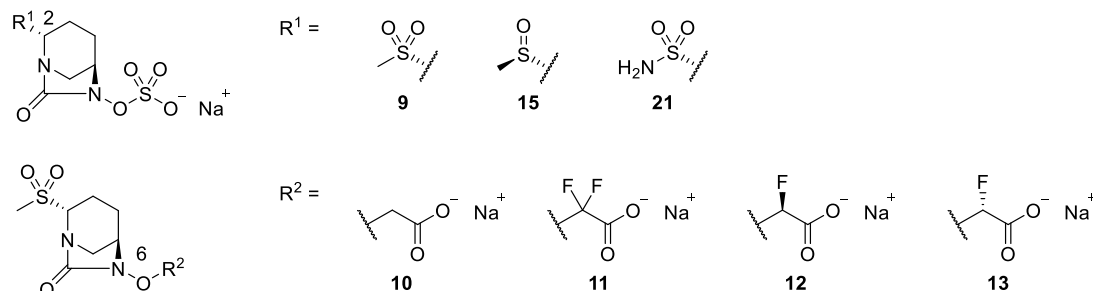


第2章 2位に硫黄官能基を有する1,6-ジアザピシクロ[3.2.1]オクタン誘導体の活性・動態評価

合成した2位に硫黄官能基を有するDBO誘導体の β -ラクタマーゼ阻害活性を評価した (Table 2). スルホン **9**、および、スルホキシド **15** は、各種 β -ラクタマーゼ (KPC-2, CTX-M-15, CMY-2) に対する阻害活性 (IC_{50}) において、既存薬であるアビバクタム (AVI) と同等以上の活性を示した. さらに、これらの β -ラクタマーゼを産生する株 (ATCC-BAA-1705, SR34100) に対して、セフェム系抗菌薬であるセフィキシム (CFM) は単剤では抗菌活性を示さないが (alone), **9** や **15** を併用することで CFM の抗菌活性を AVI 以上に回復させることも確認できた. スルホンアミド **21** については、CTX-M-15, および、CMY-2 に対する阻害活性が、**9** や **15** と比較して減弱したものの、CFM との併用において、その抗菌活性を十分に回復させた.

2位スルホン体において強力な β -ラクタマーゼ阻害活性と CFM の抗菌活性回復効果が認められたため、6位の構造を変換した (化合物 **10**–**13**). その結果、無置換の酢酸構造 **10** では IC_{50} の大きな減弱が見られたものの、ジフルオロ酢酸 **11** や (*R*)-フルオロ酢酸 **13** が、硫酸構造 **9** と同等の活性を示すことを見出した. 2位にアミドを有する AVI の構造活性相関において、6位をフルオロ酢酸構造に変換すると β -ラクタムの抗菌活性回復効果が大きく減弱することが報告されている.^[8] 一方で、今回見出した2位にスルホンをもった DBO 誘導体は、6位をフルオロ酢酸構造に変換しても活性を維持しており、本知見は新たな DBO 系 BLI の研究・開発に有用な知見を与えるものである.

Table 2. Structure-Activity Relationship at the C2 and the 6-position^a



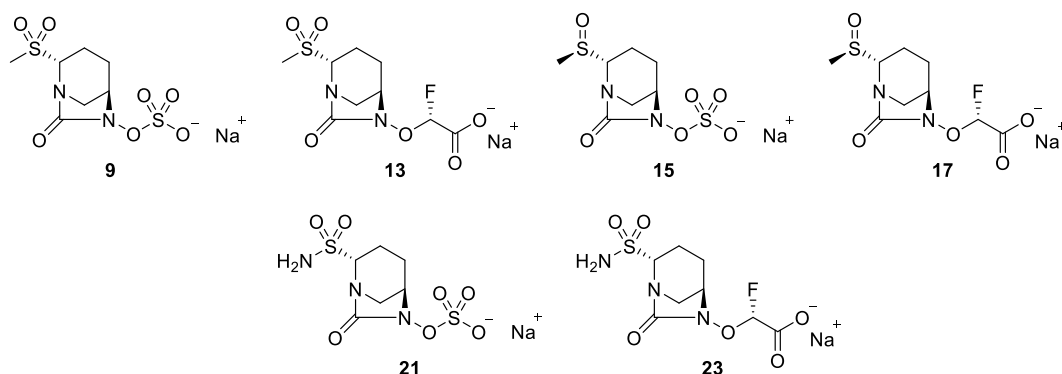
comp.	IC_{50} (μM) ^b			MIC ($\mu g/mL$) of CFM in the presence of 4 $\mu g/mL$ of BLI	
	KPC-2 (class A)	CTX-M-15 (class A)	CMY-2 (class C)	<i>K. pneumoniae</i> ATCC-BAA-1705 KPC-2 ^c	<i>E. coli</i> SR34100 CTX-M-15 ^c
9	0.004	0.017	0.003	0.125	≤ 0.031
15	0.006	0.012	0.041	0.25	0.5
21	0.044	0.140	0.116	0.125	0.125
10	0.536	2.24	1.05	no data	no data
11	0.007	0.022	0.042	0.25	≤ 0.031
12	0.217	0.378	1.06	0.5	1
13	0.031	0.055	0.042	0.25	≤ 0.031
AVI	0.072	0.013	0.059	1	1
alone	-	-	-	$>32^d$	$>32^d$

^aAVI: avibactam. CFM: cefixime. MIC: Minimum inhibitory concentration. ^bThe values of IC_{50} were determined without enzyme-inhibitor preincubation. ^cExpressed β -lactamase on each strain. ^dMIC of CFM alone.

6位をフルオロ酢酸構造に変換しても活性が維持される可能性が示されたため、2位と6位の最適な

構造の組み合わせを探索した (Table 3). 前述の通り, 2位スルホン体 **9**, **13** は良好な β -ラクタマーゼ阻害活性を示したものの, ラット血漿中の安定性が非常に低く, 血中からの化合物の消失速度の指標であるトータルクリアランス (CL_{tot}) が大きな値を示した. また, 2位スルホキシド体 **15** も同様に CL_{tot} が大きかったが, 6位をフルオロ酢酸に変換した **17** では, IC_{50} , CL_{tot} とともに良好な値を示した. 2位スルホンアミド体 **21** も IC_{50} , CL_{tot} とともに比較的良好な値を示したが, 酵素阻害活性の点でスルホキシド **17** の方が優れていた. また, 2位スルホンアミドと 6位フルオロ酢酸を組み合わせさせた **23** では IC_{50} の大きな減弱が確認された. 以上より, 2位スルホキシドと 6位フルオロ酢酸を組み合わせさせた **17** をリード化合物として選抜し, 2位側鎖の最適化検討を行うこととした.

Table 3. Combination of Thio-Functional Groups at the C2 Position and Acidic Moiety at the 6-Position



compound	IC_{50} (μM) ^a			CL_{tot} (mL/min/kg) ^b	rat serum stability (%) ^c
	KPC-2	CTX-M-15	CMY-2		
9	0.004	0.017	0.003	39.8	<1
13	0.031	0.055	0.042	n.c. ^d	<1
15	0.006	0.012	0.041	88.7	no data
17	0.014	0.012	0.028	27.0	85
21	0.044	0.140	0.116	17.6	58
23	0.977	0.249	1.11	19.8	78

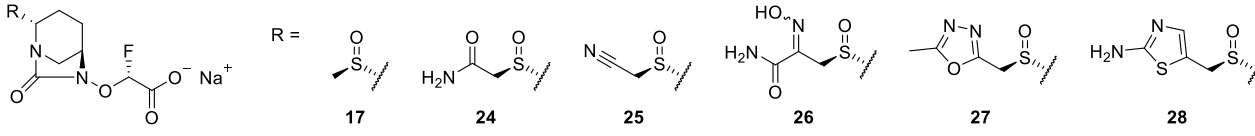
^aThe values of IC_{50} were determined without enzyme-inhibitor preincubation. ^bTotal clearance in rats. ^cRemaining amount in rat serum after 30 min incubation. ^dn.c. = not calculated because of its low stability in rat serum.

第3章 2位にスルホキシドを有する1,6-ジアザビシクロ[3.2.1]オクタン誘導体の構造最適化

前章で見出したリード化合物 **17** の 2 位側鎖の最適化検討を行った (Table 4). 側鎖の構造としては, アミド (**24**), ニトリル (**25**), オキシム (**26**), ヘテロ芳香環 (**27, 28**) といった多様な構造を検討したが, β -ラクタマーゼ阻害活性 (IC_{50}) に関しては, オキシム **26** において減弱が確認されたのを除いて大きな違いは見られなかった. 一方で, β -ラクタマーゼ産生株に対して経口セフェムであるセフチブテン (CTB) の抗菌活性を回復させる効果 (MPC_1 : CTB が $MIC = 1 \mu g/mL$ を達成するために必要な, BLI の最小濃度) は, 化合物の分子量の増大に伴って減弱し, 分子量が 350 を超えた **27, 28** は, 分子量の小さい **17, 24, 25** と比較して MPC_1 が大きな値を示した. グラム陰性菌は, 細胞壁の外側に外膜という膜構造を有しており, 一般的にこの外膜を透過するためにはポーリンと呼ばれる膜タンパクを經由する必要がある.^[9] β -ラクタム系抗菌薬の研究において, ポーリンを通過するには分子量や脂溶性が低い分子が有利であると報告されており,^[10] 今回も分子量の違いに起因した外膜透過性の違いによって,

MPC₁の違いが見られたものと考えられる。化合物 **17**, **24**, **25** はほぼ同等の活性を示したが、最もシンプルな構造をした **17** を選抜し、さらなる検討を行った。

Table 4. Optimization of Side Chain of Sulfoxide^a



comp	Mw	clogP	IC ₅₀ (μM) ^b			MPC ₁ (μg/mL) ^c		
			KPC-2	CTX-M-15	CMY-2	<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1705 ^d 8 μg/mL ^e	<i>E. coli</i> SR34100 ^d >32 μg/mL ^e	<i>E. coli</i> SR09613 ^d >32 μg/mL ^e
17	280	-0.30	0.014	0.012	0.028	0.063	0.125	0.125
24	323	-1.04	0.035	0.050	0.057	0.063	0.25	0.125
25	305	-0.52	0.039	0.007	0.096	≤0.031	0.25	0.125
26	366	-0.86	0.132	0.070	0.143	2	2	0.25
27	362	-1.88	0.016	0.024	0.036	1	1	0.125
28	378	-0.51	0.088	0.010	0.041	0.25	1	0.5

^aCTB: ceftibuten. ^bThe values of IC₅₀ were determined without enzyme-inhibitor preincubation. ^cMPC₁ to reduce the MIC of CTB to 1 μg/mL. ^dThe following are the expressed β-lactamases and the deletion of porin on each strain: ATCC BAA-1705, KPC-2 and ΔompK35; SR34100, CTX-M-15; SR09613, CMY-2 type. ^eThe MIC of CTB alone.

続いて、化合物 **17** の経口吸収性を確認した (Figure 4)。しかしながら、化合物 **17** は脂溶性も低く (clogP = -0.30)、ラットにおける生物学的利用率 (*F*) はわずか 1.4% であった。一方で、フルオロ酢酸構造を脂溶性のシクロヘキシルエステル **29** (clogP = 1.81) へと変換すると、経口吸収性が改善され、ラット、イヌ、および、サルにおいて良好な生物学的利用率を示した。なお、プロドラッグ **29** は吸収後速やかに **17** へと代謝され、**29** 自体は血中で観測されなかった。

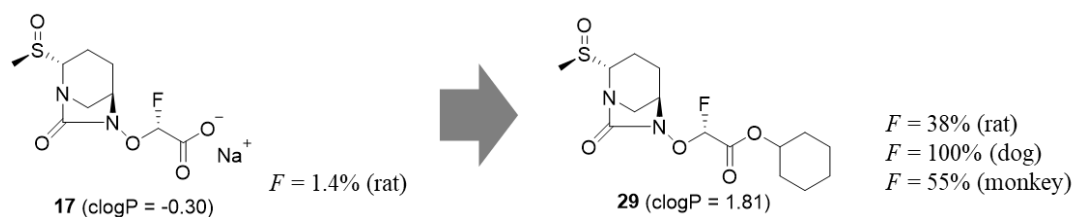
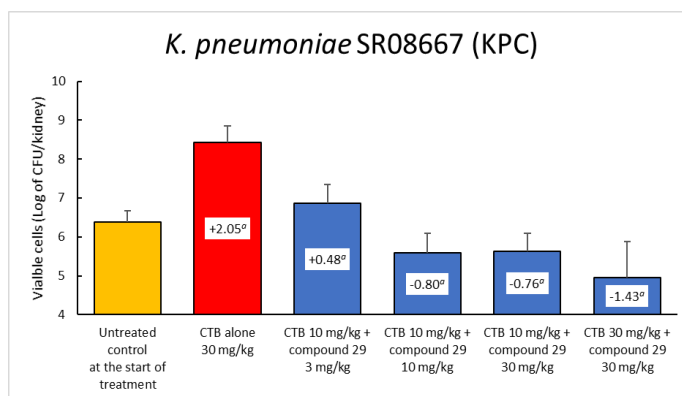


Figure 4. Prodrug 29 to improve bioavailability of compound 17.

プロドラッグ **29** を用いて、マウス尿路感染モデルを用いた *in vivo* 薬効試験を行った (Figure 5)。試験は、薬物投与前後の腎臓内の菌数を比較することで、薬剤の効果を評価した。本試験において、経口セフェムである CTB 単剤を投与すると 48 時間後の腎臓内の菌数は増加する (CTB alone)。これに対して、**29** を併用で経口投与すると菌数の減少が確認され、投与量が 10 mg/kg の場合に、治療開始時と比較して腎臓内の菌数を約 1/6 (-0.8log) に減少させることが確認された。この結果は、化合物 **29** と CTB の併用経口投与によって、多剤耐性グラム陰性菌感染症を治療できる可能性を示唆するものである。

Figure 5. *In vivo* efficacy in a murine urinary tract infectious model after oral administration of CTB and prodrug **29**. MIC of CTB against SR08667 = >32 µg/mL. MPC₁ of **17** = 1 µg/mL. CTB: ceftibuten. CFU: colony forming unit. ^aChange in log CFU/kidney compared to the untreated control at the start of treatment. *N* = 5 determination.



結語

本論文は、DBO 骨格を有する新規経口 BLI の探索研究の成果に関するものである。DBO 骨格において 2 位の置換基の電子求引性基が β-ラクタマーゼ阻害活性を向上させるという仮説のもと、2 位に硫黄置換基をもった新規 DBO 系 BLI に着目し、脱炭酸的ラジカル反応を鍵反応として、この新規 DBO 誘導体の合成法を確立した。硫黄置換基の導入は、β-ラクタマーゼ阻害活性を向上させることで、これまで積極的に許容されなかった 6 位へのフルオロ酢酸構造の導入を可能とし、これによって、活性だけでなく、医薬品として必要な動態、物性特性を兼ね備えた経口 BLI を同定した。本研究成果は、新規 DBO 系 BLI の研究・開発に有用な知見を与えるものである。

(参考文献)

- 1) Singh, G. S. β-Lactams in the New Millennium. Part-I: Monobactams and Carbapenems. *Mini. Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 69-92.
- 2) WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017.
- 3) González-Bello, C.; Rodríguez, D.; Pernas, M.; Rodríguez, Á.; Colchón, E. β-Lactamase Inhibitors To Restore the Efficacy of Antibiotics against Superbugs. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 1859-1881.
- 4) King, D. T.; King, A. M.; Lal, S. M.; Wright, G. D.; Strynadka, C. J. Molecular Mechanism of Avibactam-Mediated β-Lactamase Inhibition. *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1*, 175-184.
- 5) Hansch, C.; Leo, A.; Taft R. W. A Survey of Hammett Substituent Constants and Resonance and Field Parameters. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 165-195.
- 6) Barton, D. H. R.; Bridon, D.; Zard, S. Z. The Invention of New Radical Reactions. Part XIII. High Yielding Decarboxylative Chalcogenation of Aliphatic and Alicyclic Acids. *Heterocycles* **1987**, *25*, 449-462.
- 7) Barton, D. H. R.; Lacher, B.; Misterkiewicz, B.; Zard, S. Z. The Invention of Radical Reactions. Part XVII. A Decarboxylative Silphonylation of Carboxylic Acids. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 1153-1158.
- 8) Ledoussal, B.; Gourdel, M. E. Azabicyclic Compounds, Preparation Thereof and Use of Same as Drugs, Especially Beta-Lactamase Inhibitors. WO2009133442.
- 9) Nikaido, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *36*, 340-363.
- 10) Yoshimura, F.; Nikaido, H. Diffusion of β-Lactam Antibiotics Through the Porin Channels of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *27*, 84-92.

論文審査の結果の要旨

グラム陰性菌における β -ラクタム系抗菌薬に対する主要な耐性化機構は β -ラクタムを分解する酵素である β -ラクタマーゼの産生であり、 β -ラクタマーゼ阻害剤 (BLI) を β -ラクタム系抗菌薬と併用することで、耐性菌の β -ラクタム系抗菌薬への感受性を回復させることができる。近年、1,6-ジアザビシクロ[3.2.1]オクタン (DBO) 誘導体が BLI として注目を集めており、本研究では新規経口 DBO 系 BLI の創出を目的とし、創薬研究を行った。

DBO 系 BLI はセリン型 β -ラクタマーゼの活性中心のセリン残基に対して共有結合を形成することで β -ラクタマーゼを阻害する。そこで、2 位への電子求引基の導入によって活性中心セリンとの反応性が向上するとの仮説の下、2 位に強力な電子求引性基であるスルホンやスルホキシド等の硫黄系官能基を有する DBO 誘導体をデザインし、合成法を検討した。その結果、既知の 2 位にカルボン酸をもった DBO 誘導体に対する脱炭酸的ラジカル反応を鍵反応として上記 DBO 誘導体の合成を達成し、これらの誘導体が強力な β -ラクタマーゼ阻害活性を有することを明らかにした。さらに、構造最適化研究の結果、既存の DBO 系 BLI と同等以上の β -ラクタマーゼ阻害活性と優れた経口吸収性を併せ持つ新規化合物を見出した。これらの研究成果は、新規抗菌薬の研究・開発に有用な知見を与えるものである。

上記の論文は博士 (薬学) 論文として、適当と判定する。