

## Sulbactam 유도체의 베타락타마제 효소억제력과 베타락탐항생제 병용시 활성비교

임채욱 · 박희석 · 김용현 · 임철부\*

중앙대학교 약학대학 의약품화학 교실

(Received November 5, 2002; Revised December 5, 2002)

### $\beta$ -Lactamase Inhibitory Activity and Comparative Activity of Sulbactam Derivatives Combined with $\beta$ -Lactam Antibiotics

Chaeuk Im, Hee Suk Park, Yong Hyun Kim and Chul Bu Yim\*

Division of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, Chung-ang University, Seoul 156-756, Korea

**Abstract** — *In vitro*  $\beta$ -lactamase inhibitory activity of 6-exomethylene sulbactam compounds (CH-120, 130, 140, 145, 150, 155) was compared with clavulanic acid, sulbactam and tazobactam. The inhibitory activity of CH-140 was stronger than sulbactam and clavulanic acid against Type II, III, IV, TEM enzymes and stronger than tazobactam against Type IV enzyme. The inhibitory activity of CH-145 was stronger than sulbactam and clavulanic acid against Type I, II, III, IV, TEM enzymes and stronger than tazobactam against Type III, IV enzymes. The *in vitro* antimicrobial activity of CH-140 and CH-145 combined with piperacillin and ceftriaxone was compared with the sulbactam and tazobactam against  $\beta$ -lactamase producing 31 strains. But, synergistic activity of CH-140 and CH-145 was inferior to tazobactam.

**Keywords** □ Antimicrobial activity,  $\beta$ -Lactamase inhibitors

Pericillin의 항균작용이 발견된 이후, 많은  $\beta$ -lactam 구조를 모핵으로 하는 penicillin 및 cephalosporin계의 항생제가 개발되어 각종 감염성 질환의 치료에 이용되어 왔다. 그러나, 이들 항생제에 대한 내성균주가 알려지면서 내성균과 새로운 항생제들 사이에 경쟁이 계속되어 왔다. 가장 일반적인  $\beta$ -lactam계 항생제에 대한 세균의 내성기전은  $\beta$ -lactam 항생제를 불활성화시키는  $\beta$ -lactamase라는 효소를 내성균이 분비하여 항생제의 약효를 제거하는 것이다. 이러한 내성균 문제를 극복하는 방법으로  $\beta$ -lactamase 효소에 안정한 항생제를 개발하는 방법이 있으나, 이들도 곧 새로운  $\beta$ -lactamase 효소에 파괴되는 경향을 보여 주고 있다. 내성균을 치료할 수 있는 보다 근본적인 방법은  $\beta$ -lactamase 효소를 파괴하는  $\beta$ -lactamase 억제제를 개발하고,  $\beta$ -lactam 항생제와 병용 투여하여  $\beta$ -lactam 항생제를  $\beta$ -lactamase 효소로부터 보호하는 것이다.<sup>1-3)</sup>

*Streptomyces clavuligerus*에서 분리한 clavulanic acid를 시작으로 sulbactam, tazobactam 등이 개발되었고, 이들을 amoxicillin, ampicillin, piperacillin 등 기존항생제와 병용 투여하여  $\beta$ -

lactamase를 만드는 내성균의 치료에 사용하고 있다.  $\beta$ -Lactamase 억제제들의 항균력은 약하지만,  $\beta$ -lactamase 효소에는 강한 친화력이 있는 suicide inhibitor로 작용한다. Sulbactam의 경우,  $\beta$ -lactamase의 활성부위에 들어가서 효소의 serine OH기와 억제제의  $\beta$ -lactam carbonyl bond 사이에 acyl결합이 발생하고, 효소의 활성부위에 단단히 결합하여  $\beta$ -lactamase의 기능을 정지시킨다. 특히, tazobactam은 다양한 플라스미드 매개형 베타락타마제를 억제하고, 기존의  $\beta$ -lactam 항생제와 병용하여 우수한 효소억제력을 보여주었다.<sup>4-8)</sup>

$\beta$ -Lactamase 효소의 억제력이 향상된 새로운 억제제를 개발하기 위하여 페니실린 골격의 2위치와 6위치에 다양한 치환기를 붙이는 연구들이 꾸준히 보고되고 있다. 특히, 6-exomethylene penam구조와 penem구조가  $\beta$ -lactamase를 효과적으로 불활성화시킨다고 알려졌다.<sup>9-11)</sup>

본 실험에서는 기존의  $\beta$ -lactamase 억제제보다 우수한 억제 효과가 있는 신규화합물을 개발하기 위하여 합성된 6-exomethylene penamsulfone 유도체 6종에 대한 약효검색의 기초자료를 얻으려고 *in vitro*  $\beta$ -lactamase 효소 억제력을 측정하였고,  $\beta$ -lactamase를 생산하는 내성균주를 대상으로 현재 임상에서 사용되고 있는  $\beta$ -lactamase 억제제와 *in vitro* 항균력을 비교 실험하였다.

\*본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 820-5603 (팩스) 815-2199  
(E-mail) chaeuk@cau.ac.kr

## 실험방법

시약 및 균주  $\beta$ -Lactamase Type I(from *Bacillus cereus*), Type II(from *Bacillus cereus*), Type III(from *Enterobacter cloacae*), Type IV(from *Enterobacter cloacae*) 및 TEM(from *Escherichia coli* 205) 효소는 Sigma 회사에서 구입하여 사용하였다. 대조약물로 clavulanic acid(Smithkline Beecham), sulbactam(Pfizer Korea), tazobactam(한미약품)을 이용하였고, cuvette(quartz, USA), Mueller Hinton broth(Difco, U.S.A) 및 membrane filter paper(0.2  $\mu$ m, 22 mm: Gilman, U.S.A) 등도 사용하였다. Sulbactam 유도체는 중앙대학교 약학대학 의약품화학 교실에서 합성한 것을 사용하였다.  $\beta$ -Lactamase를 생산하는 균주 31종은 한미약품에서 제공받아 사용하였다.

### *In vitro* $\beta$ -Lactamase 효소 억제활성 측정<sup>12,13)</sup>

UV/Vis Spectrophotometer를 이용하여 합성한 화합물 6종의  $\beta$ -lactamase 효소의 억제활성을 측정하였다(Table I). 효소 활성을 50% 억제하는데 필요한 화합물의 농도 즉,  $\beta$ -lactamase에 의한 기질의 가수분해를 50% 억제하는 억제제의 농도를 IC<sub>50</sub> 수치로 계산하였다. 합성된 화합물들은 5가지의 농도(0.01, 0.1, 1, 10, 100  $\mu$ M)로 조제하여 사용하였다.

### $\beta$ -Lactamase Type I에 대한 억제제의 IC<sub>50</sub>

Cuvett에 phosphate 완충용액(pH 7.0, 2.875 ml),  $\beta$ -lactamase 효소 Type I(15  $\mu$ l, 0.2 unit/assay) 및 합성 화합물 용액 50  $\mu$ l를 넣고 잘 섞은 후, 30°C에서 10분간 방치한다. 여기에 효소에 대한 기질로 penicillin G(60  $\mu$ l, 10 mM)를 가하고 233 nm에서 2분간 흡광도를 측정하여 각 화합물 농도에 대한 억제율(%)을 구하고 IC<sub>50</sub>값을 계산하였다.

### $\beta$ -Lactamase Type II에 대한 억제제의 IC<sub>50</sub>

$\beta$ -Lactamase Type II를 이용하여  $\beta$ -lactamase Type I와 동일

한 방법으로 IC<sub>50</sub>값을 계산하였다.

### $\beta$ -Lactamase Type III에 대한 억제제의 IC<sub>50</sub>

Cuvett에 phosphate 완충용액(pH 7.0, 2.875 ml),  $\beta$ -lactamase Type III(15  $\mu$ l, 0.2 unit/assay) 및 합성 화합물 용액 50  $\mu$ l 넣고 잘 섞은 후, 30°C에서 10분간 방치한다. 여기에 효소에 대한 기질로 cephaloridine(60  $\mu$ l, 5 mM)을 가하고 260 nm에서 2분간 흡광도를 측정하여 각 화합물 농도에 대한 억제율(%)을 구하고 IC<sub>50</sub>값을 계산하였다.

### $\beta$ -Lactamase Type IV에 대한 억제제의 IC<sub>50</sub>

$\beta$ -Lactamase Type IV를 이용하여  $\beta$ -lactamase Type III와 동일한 방법으로 IC<sub>50</sub>값을 계산하였다.

### TEM 효소에 대한 억제제의 IC<sub>50</sub>

$\beta$ -Lactamase TEM 효소를 이용하여  $\beta$ -lactamase Type III와 동일한 방법으로 IC<sub>50</sub>값을 계산하였다.

### 항균력실험(MIC)<sup>14)</sup>

시판하는  $\beta$ -lactamase 억제제와 유사하거나 우수한 효소억제력을 보여주는 새로운 sulbactam유도체 2종(CH-140, CH-145)의 합성물에 대하여  $\beta$ -lactamase를 생산하는 내성균주를 대상으로 현재 임상에서 사용되고 있는  $\beta$ -lactamase 억제제(sulbactam, tazobactam)와 *in vitro*에서 상대적인 항균력 활성을 비교 실험하였다. 본 실험에서는 억제제와 항생제의 혼합비율을 고정하고 2배 희석법으로 희석하여 결과를 나타냈다. 항균시험은 National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)의 "Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria"의 규정에 따라 액체배지 희석법으로 실시하였다.  $\beta$ -Lactamase 억제제와  $\beta$ -lactam 항생제의 혼합 용량비를 최종농도가 1.00 mg/ml가 되게 하였고, 합성된 화합물도  $\beta$ -lactam 항생제를 혼합하여 1.00 mg/ml 정도로 맞추었다. 균주는 10<sup>8</sup> CFU가 되도록 제조한 후, 10<sup>5</sup>까지 희석하여 100  $\mu$ l씩 접종하였다. 세균의 접종은 Mueller Hinton broth로 표준 2배희석법으로 실시하였다. 완성된 well plate는 35~37°C에서 16~24시간 배양하였다. 배양 후 육안으로 탁도를 살펴서 생존여부를 조사하였고, 균의 성장이 억제된 최소한의 농도를 MIC(Minimal Inhibitory Concentration)로 하였다.

## 실험결과 및 고찰

### 효소억제효과(IC<sub>50</sub>)

$\beta$ -Lactamase Type I에 대하여 화합물 CH-145의 IC<sub>50</sub>가 3.26  $\mu$ M으로 sulbactam과 clavulanic acid보다 효소억제력이 우수하

**Table I** - *In vitro*  $\beta$ -lactamase inhibitory activity of synthesized compounds (IC<sub>50</sub>,  $\mu$ M)

Inhibitor	Enzymes				
	Type I	Type II	Type III	Type IV	TEM
Sulbactam	17.7	29.1	10.8	26	1.0
Tazobactam	0.12	0.22	1.82	3.8	0.022
Clavulanic acid	>100	>100	>100	15	0.15
CH 120	>100	>100	>100	>100	>100
CH 130	>100	>100	>100	>100	11
CH 140	>100	17.79	7.43	2.2	0.25
CH 145	3.26	6.11	0.32	0.02	0.8
CH 150	>100	>100	>100	36	2.7
CH 155	>100	>100	6.47	5.9	8.2

였으나, tazobactam보다는 약하였다. Type II 효소에 대해서는 화합물 CH-140과 CH-145의 IC<sub>50</sub>가 각각 17.79 μM과 6.11 μM으로 sulbactam과 clavulanic acid보다 효소억제력이 강력하였으나, tazobactam보다는 약하였다. 그러나, Type III 효소에 대해서는 화합물 CH-140의 IC<sub>50</sub>가 7.43 μM으로 sulbactam과 clavulanic acid보다 우수한 효소억제력을 보였고, 화합물 CH-145의 IC<sub>50</sub>는 0.32 μM으로 sulbactam과 clavulanic acid는 물론, tazobactam보다도 6배 강력한 효소억제력을 보여주었다. Type IV 효소에 대해서는 화합물 CH-155의 IC<sub>50</sub>는 5.9 μM으로 sulbactam과 clavulanic acid보다 우수한 효소억제력을 보였다. 특히, CH-140과 CH-145의 IC<sub>50</sub>가 각각 2.2 μM과 0.02 μM으로 sulbactam, clavulanic acid는 물론, 가장 강력한 억제제인 tazobactam보다도 각각 2배와 190배 강력한 효소억제력을 보여주었다. TEM 효소에 대해서는 화합물 CH-140과 CH-145의 IC<sub>50</sub>가 각각 0.25 μM과 0.8 μM으로 효소 억제력이 sulbactam 및 clavulanic acid와 유사하였으나, tazobactam보다는 낮은 활성을 보였다.

화합물 CH-120, CH-130 및 CH-150은 모든 β-lactamase 효소에 대하여 거의 활성을 보여주지 못하였고, CH-155의 경우, Type III와 Type IV 효소에 대해서만 약간의 효소억제력을 보여주었다. 그러나, 화합물 CH-140과 CH-145는 시판하는 β-

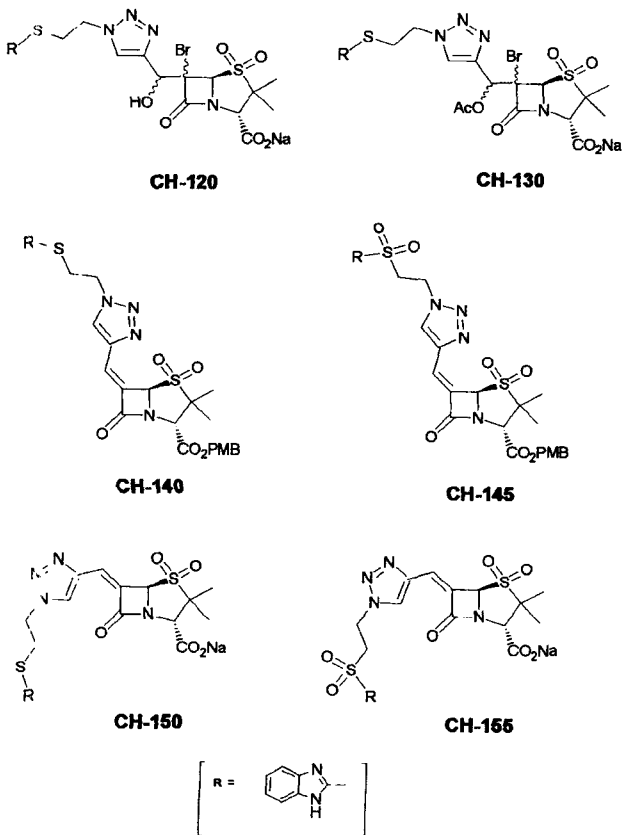


Fig. 1. - Structure of synthesized compounds.

Table II - Antimicrobial activity of piperacillin alone and in combination with CH-140 or CH-145

Antibiotics β-Lactamase Producing strains	Minimal Inhibitory Concentration (MIC μg/ml)				
	PIP	PIP+ TAZ	PIP+ SUL	PIP+ CH140	PIP+ CH145
<i>C. freundii</i> NIH10018-68	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
<i>E. aerogenes</i> 37	25	6.25	6.25	25	12.5
<i>K. pneumoniae</i> F11035	>100	3.13	3.13	>100	>100
<i>S. marcescens</i> 1	>100	25	>100	>100	>100
<i>S. marcescens</i> 2	>100	12.5	50	>100	>100
<i>P. vulgaris</i> 20	0.78	0.39	0.39	0.78	0.78
<i>P. vulgaris</i> GN 76	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2
<i>M. morgani</i> 2	12.5	0.39	1.56	6.25	12.5
<i>P. aeruginosa</i> F0013	50	50	50	50	50
<i>P. aeruginosa</i> 5164	25	12.5	12.5	25	25
<i>P. aeruginosa</i> 6390	6.25	3.13	6.25	3.13	6.25
<i>P. aeruginosa</i> GN 918	12.5	12.5	12.5	12.5	6.25
<i>A. calcoaceticus</i> S21	>100	3.13	0.78	>100	50
<i>E. coli</i> ML4901/Rms213	25	3.13	1.56	12.5	12.5
<i>E. coli</i> ML1401/RNG 14	50	3.13	3.13	25	25
<i>E. coli</i> ML1401/RNG238	6.25	3.13	3.13	3.13	3.13
<i>E. coli</i> ML1401/RNG823	>100	3.13	12.5	>100	>100
<i>E. coli</i> 1193E	>100	1.56	6.25	>100	50
<i>E. coli</i> 3455E	>100	1.56	3.13	>100	50
<i>E. coli</i> 3739E	25	1.56	1.56	25	25
<i>E. coli</i> 3457E	>100	0.78	0.78	50	50
<i>E. coli</i> 2639E	>100	1.56	1.56	>100	>100
<i>S. aureus</i> MS15009/1258	6.25	0.39	0.78	3.13	3.13
<i>C. diversus</i> 2046E	6.25	0.78	1.56	6.25	6.25
<i>E. cloacae</i> 1194E	>100	25	25	50	50
<i>E. cloacae</i> P99	>100	12.5	12.5	50	25
<i>E. cloacae</i> 11	>100	12.5	12.5	>100	50
<i>E. cloacae</i> GN7471	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25
<i>K. aerogenes</i> 1976E	>100	3.13	50	25	50
<i>K. aerogenes</i> 1082E	>100	12.5	>100	>100	>100
<i>H. influenzae</i> 1788E	6.25	3.13	3.13	3.13	3.13

PIP=Piperacillin, SUL=Sulbactam, TAZ=Tazobactam.

lactamase 억제제와 유사하거나 더욱 강력한 효소억제력을 보여주었다(Table D).

**In vitro 항균력실험**

β-Lactamase를 생산하는 내성균주를 대상으로 sulbactam유도체 2종(CH-140, CH-145)의 합성물이 항생제와 병용시 보여주는 항균력을 sulbactam 및 tazobactam과 비교하여 Table II와 III에 나타내었다.

Piperacillin의 경우 CH-140과 병용할때, 31종의 내성균주 가운데 10종의 균주에서 sulbactam과 유사한 병용효과를 보여주었고, 21종의 균주에서는 sulbactam보다 낮은 병용효과를 보여주었다. 그리고, 7종의 균주에서 tazobactam과 유사한 병용효과를 보여주었고, 24종의 균주에서는 tazobactam보다 병용효과가 낮

**Table III** – Antimicrobial activity of ceftriaxone and in combination with CH-140 or CH-145

Antibiotics β-Lactamase Producing strains	Minimal Inhibitory Concentration (MIC µg/ml)				
	CEF	CEF + TAZ	CEF + SUL	CEF + CH140	CEF + CH145
<i>C. freundii</i> NIH10018-68	0.1	0.02	0.05	0.1	0.05
<i>E. aerogenes</i> 37	25	6.25	6.25	25	12.5
<i>K. pneumoniae</i> F11035	>100	0.2	1.56	50	50
<i>S. marcescens</i> 1	25	12.5	12.5	25	25
<i>S. marcescens</i> 2	12.5	6.25	12.5	25	12.5
<i>P. vulgaris</i> 20	0.1	0.01	0.05	0.05	0.02
<i>P. vulgaris</i> GN 76	0.05	0.01	0.02	0.02	0.02
<i>M. morgani</i> 2	3.13	0.78	0.78	1.56	1.56
<i>P. aeruginosa</i> F0013	>100	>100	50	>100	>100
<i>P. aeruginosa</i> 5164	>100	25	50	>100	>100
<i>P. aeruginosa</i> 6390	>100	25	25	>100	>100
<i>A. calcoaceticus</i> S21	>100	3.13	0.78	50	50
<i>E. coli</i> ML4901/Rms213	6.25	1.56	1.56	6.25	3.13
<i>E. coli</i> ML1401/RNG 14	0.1	0.05	0.1	0.1	0.02
<i>E. coli</i> ML1401/RNG238	0.2	0.05	0.1	0.1	0.1
<i>E. coli</i> ML1401/RNG823	0.1	0.05	0.1	0.1	0.1
<i>E. coli</i> 1193E	0.1	0.02	0.05	0.05	0.02
<i>E. coli</i> 3455E	6.25	0.2	0.2	3.13	3.13
<i>E. coli</i> 3739E	3.13	0.39	0.78	3.13	1.56
<i>E. coli</i> 3457E	0.39	0.1	0.2	0.39	0.2
<i>E. coli</i> 2639E	1.56	0.39	0.78	1.56	0.78
<i>P. aeruginosa</i> GN 918	50	12.5	25	50	50
<i>S. aureus</i> MS15009/1258	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56
<i>C. diversus</i> 2046E	6.25	0.1	0.39	1.56	3.13
<i>E. cloacae</i> 1194E	>100	50	25	>100	50
<i>E. cloacae</i> P99	25	6.25	6.25	25	25
<i>E. cloacae</i> GN7471	6.25	3.13	3.13	6.25	3.13
<i>E. cloacae</i> 11	>100	25	12.5	>100	50
<i>K. aerogenes</i> 1976E	0.39	0.1	0.1	0.2	0.2
<i>K. aerogenes</i> 1082E	6.25	3.13	3.13	6.25	3.13
<i>H. influenzae</i> 1788E	12.5	1.56	1.56	12.5	12.5

CEF=Ceftriaxone, SUL=Sulbactam. TAZ=Tazobactam.

았다. CH-145와 병용할때, 31종의 내성균주 가운데 9종의 균주에서 sulbactam과 유사한 병용효과를 보여주었고, 22종의 균주에서는 sulbactam보다 약한 병용효과를 보여주었다. 그리고, 6종의 균주에서 tazobactam과 유사한 병용효과를 보여주었고, 25종의 균주에서는 tazobactam보다 병용효과가 낮았다(Table II).

Ceftriaxone의 경우 CH-140과 병용할때, 31종의 내성균주 가운데 7종의 균주에서 sulbactam과 유사한 병용효과를 보여주었고, 24종의 균주에서는 sulbactam보다 낮은 병용효과를 보여주었다. 그리고, 2종의 균주에서 tazobactam과 유사한 병용효과를 보여주었고, 29종의 균주에서는 tazobactam보다 병용효과가 낮았다. CH-145와 병용할때, 31종의 내성균주 가운데 13종의 균주에서 sulbactam과 유사한 병용효과를 보여주었고, 18종의 균주에서는 sulbactam보다 약한 병용효과를 보여주었다. 그리고, 6

종의 균주에서 tazobactam과 유사한 병용효과를 보여주었고, 25종의 균주에서는 tazobactam보다 병용효과가 낮았다(Table III).

## 결 론

합성화합물 6종에 대한 β-lactamase 효소억제 활성실험에서 6-exomethylene의 구조(CH-140, CH-145, CH-150 및 CH-155)가 β-lactamase 효소 억제력에 중요하고, 6-exomethylene에서도 (Z)-form의 구조(CH-140, CH-145)가 (E)-form의 구조(CH-150, CH-155)보다 효소 활성억제 효과에 중요하다는 결과를 얻었다. 그리고, sulfone 구조의 화합물(CH-145, CH-155)이 sulfide 구조의 화합물(CH-140, CH-150)보다 효소 억제력이 우수하게 나타났다. 그리고, 화합물 CH-140과 CH-145는 현재 임상에서 사용하는 sulbactam과 tazobactam과 유사하거나 더욱 우수한 효소억제력을 보여주어서, β-lactamase를 생산하는 내성균주를 대상으로 항생제와 병용시 보여주는 항균력을 sulbactam 및 tazobactam과 비교하였다. 화합물 CH-140은 ceftriaxone보다 piperacillin과 병용효과가 좋았고, CH-145는 piperacillin보다 ceftriaxone과 병용효과가 좋았으나, 일반적으로 sulbactam과 tazobactam보다 항생제와 병용시 보여주는 항균력의 병용효과가 낮았다.

## 감사의 말씀

본 연구는 2001년도 중앙대학교 연구지원처 학술연구비의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Sandanayaka, V. P., Prashad, A. S. : Resistance to β-lactam antibiotics: Structure and mechanism based design of β-lactamase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry* 9, 12, 1145 (2002).
- 2) Jacoby, G. A., Archer, G. L. : New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *New Eng. J. Med.* 324, 60, 1 (1991).
- 3) Moland, E. S., Black, J. A., Ourada, J., Reisbig, M. D., Hanson, N. D., Thomson, K. S. : Occurrence of newer β-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 U.S. Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 12, 3837 (2002).
- 4) Laura, J. V., Piddock, Yu Fang Jin, Turner, H. L. : Activity of 13 β-lactam agents combined with BRL 42715 against β-lactamase producing Gram-negative bacteria compared to combinations with clavulanic acid, tazobactam and sulbactam. *J. Antimicrob. Chemother.* 31, 89 (1993).
- 5) Smith, J. T., Hamilton-Miller, J. M. T., Knox, R. : Bacterial resistance to penicillins and cephalosporins. *J. Pharm.*

- Pharmac.* **21**, 337 (1969).
- 6) Quinn, J. P. : Clinical significance of extended spectrum beta-lactamases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**, (Suppl. 1), S39 (1994).
  - 7) Aronoff, S. C., Jacobs, M. R., Johanning, S., Yamabe, S. : Comparative activities of the  $\beta$ -lactamase inhibitors YTR830, sodium clavulanate, and sulbactam combined with amoxicillin or ampicillin. *J. Antimicrob. Chemother.* **26**, 580 (1984).
  - 8) Fassand, J. R., Prior, B. R. : Comparative *In vitro* activities of piperacillin-tazobactam and ticarcillin-clavulanate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 1268 (1989).
  - 9) Bennet, I., Broom, N. J. P., Bruton, G. S., Alvert, C., Clarke, B. P., Coleman, K., Edmondson, R., Edwards, P., Jones, D., Osborne, N. F., Walker, G. : 6-(Substituted methylene)penems, potent broad spectrum inhibitors of bacterial  $\beta$ -lactamase. *J. Antibiotics* **44**, 331 (1990).
  - 10) Lin, Y. I., Bitha, P., Li, Z., Francisco, G. D. : Preparation of 3,6-disubstituted penam sulfone derivatives with  $\beta$ -lactamase inhibiting activity for use as antibacterial agents, US Patent 6395726 B1 20020528 (2002).
  - 11) Sandanayaka, V. P., Prashad, A. S. : Preparation of 6-(spirocyclopropyl) penicillanic acid 4,4-dioxides as  $\beta$ -lactamase inhibitors. U.S. Pat. Appl. 2002147178 A1 20021010 (2002).
  - 12) Waley, S. G. : A spectrophotometric assay of  $\beta$ -lactamase action on penicillins. *Biochem. J.* **139**, 789 (1974).
  - 13) Ross, G. W., Chanter, K. V., Harris, A. M., Kirby, S. M., Marshall, M. J., O'Callaghan, C. H. : Comparison of assay techniques for  $\beta$ -lactamase activity. *Anal. Biochem.* **54**, 9 (1973).
  - 14) American national standards institute : *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow Aerobically*. 2nd. NCCLS Document M7-A2. **10**, 1 (1990).