

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 143279 B

- (21) Ansøgning nr. 6506/72 (51) Int.Cl.³ C 07 D 501/36
(22) Indleveringsdag 28. dec. 1972
(24) Løbedag 17. apr. 1970
(41) Alm. tilgængelig 28. dec. 1972
(44) Fremlagt 3. aug. 1981
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. 1945/70
(30) Prioritet 18. apr. 1969, 817556, US

(71) Ansøger ELI LILLY AND COMPANY, Indianapolis, US.

(72) Opfinder Charles Wilbur Ryan, US.

(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Hofman-Bang & Boutard.

- (54) 3-Mercaptothiadiazol- eller 3-mer=
captotetrazolcephalosporiner til
anvendelse som mellemprodukter ved
fremstilling af cephalosporinfor=
bindelser.

Den foreliggende opfindelse angår 3-mercaptothiadiazol- eller 3-mercaptotetrazolcephalosporiner til anvendelse som mellemprodukter ved fremstilling af de i dansk patent nr. 132.119 omhandlede hidtil ukendte terapeutisk aktive cephalosporinforbindelser.

De omhandlede mellemprodukter er ejendommelige ved, at de har den i kravets kendetegnende del anførte almene formel I.

De ovennævnte terapeutisk aktive cephalosporinforbindelser har samme almene formel I, bortset fra, at X er OH eller NH₂.

De ved hjælp af de omhandlede mellemprodukter fremstillede cephalosporinforbindelser udviser en meget høj aktivitet og er usædvanlig stabile. Således er slutprodukterne ikke blot stabile over for

DK 143279 B

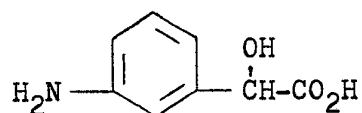
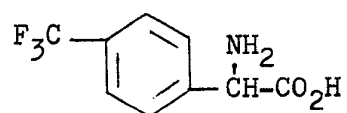
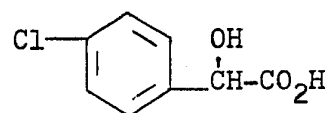
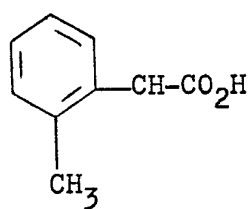
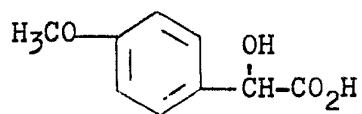
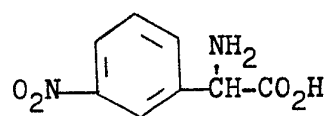
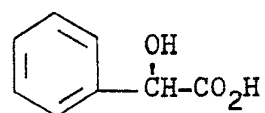
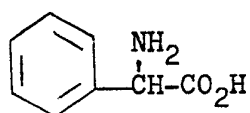
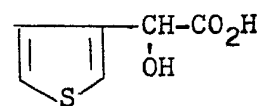
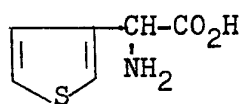
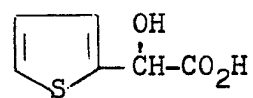
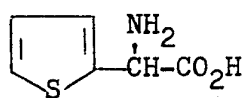
leverenzymmer, men er tillige stabile over for cephalosporinase, der produceres af gram-negative bakterier. Som følge heraf udviser forbindelserne en langvarig antimikrobiel aktivitet.

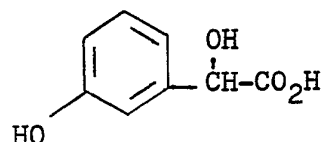
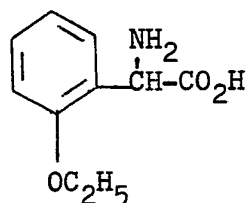
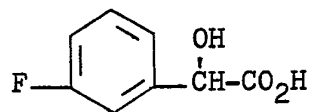
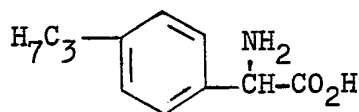
De omhandlede mellemprodukter kan fremstilles ved at erstatte 3-acetoxylgruppen i 7-aminocephalosporansyren med enten 1-alkyl-1,2,3,4-tetrazol-5-thiol eller en 1,3,4-thiadiazol-5-thiol fulgt af en acylering af 7-aminogruppen med den ønskede blokerede hydroxy- eller aminoeddikesyre. Udskiftning af en estergruppe med en thiolgruppe er en velkendt reaktion, som kan udføres i vandig opløsning ved en temperatur på 50-100°C under nærværelse af en svag base som natriumhydrogencarbonat. Der anvendes fortrinsvis et overskud af thiolen. Alkylgruppen i den anvendte tetrazols 1-stilling kan være methyl, ethyl eller propyl. Den anvendte thiadiazol kan have et hydrogenatom eller en methyl-, ethyl- eller propylgruppe i 2-stillingen.

Acyleringen af cephalosporinforbindelsers 7-aminogruppe er en velkendt reaktion, som kan udføres ved hjælp af syrehalogenidet eller et blandet anhydrid. Den anvendte acyleringsmetode er uden betydning for den foreliggende opfindelse.

Af typiske syrer, som kan anvendes ved acylering af thioforbindelserne til fremstilling af de foreliggende forbindelser, kan nævnes phenyleddikesyrer, substituerede phenyleddikesyrer og thienyleddikesyrer, der ved α -carbonatomet har substituenten X, hvis betydning er angivet i kravet. Af substituenten, der kan sidde i syrens phenylring, kan nævnes chlor, brom, fluor, trifluormethyl, amino, nitro, hydroxy, alkyl eller alkoxy med 1-3 carbonatomer.

Eksempler på egnede syrer er forbindelser med efterfølgende formler, der er vist uden den blokerende substituent ved α -hydroxy- eller α -aminogruppen:





Der optræder stereoisomere forbindelser grundet disse syrers asymmetriske α -carbonatom. Som bekendt er det sædvanligvis D-isomeren, der udviser biologisk aktivitet.

Det vil forstås, at syrernes α -amino- og α -hydroxygrupper er beskyttet under acyleringen. Hydroxylgruppen kan således omdannes til formiatesteren, medens aminogruppen beskyttes af tert.-butyloxycarbonyl, 2,2,2-trichlorethoxycarbonyl eller den med methylacetoacetat fremstillede enamin.

Eksempler på specifikke cephalosporinmellemprodukter, der omfattes af opfindelsen, er nævnt i det efterfølgende sammen med nogle fysiske data til identifikation af forbindelserne.

- 1) 7-(D-2-formyloxy-2-phenylacetamido)-3-(1-methyl-1,2,3,4-tetrazol-5-thiomethyl)- Δ^3 -cephem-carboxylsyre. Natriumsaltet har $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 269 nm = 215. NMR-spektret udviste toppe ved 3,4-3,5 (dublet), 4,0, 4,2, 4,7, 4,9-5,1 (dublet), 5,6-5,7 (dublet), 6,2, 7,4 og 8,3 ppm.
- 2) tert-butyloxycarbonyl-substitueret 3-(1-methyl-1,2,3,4-tetrazol-5-thiomethyl)-7-D-(3'-hydroxyphenyl)-glycylamido- Δ^3 -cephem-carboxylsyre. $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 271 nm = 197.
- 3) tert-butyloxycarbonyl-substitueret 3-(2-methyl-1,3,4-thiadiazol-5-thiomethyl)-7-D-(3'-hydroxyphenyl)-glycylamido- Δ^3 -cephem-carboxylsyre. $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 273 nm = 226.

- 4) tert-butyloxycarbonyl-substitueret 3-(1-methyl-1,2,3,4-tetrazol-5-thiomethyl-7-D-(4'-hydroxyphenyl)-glycylamido- Δ^3 -cephem-carboxylsyre. NMR-spektret udviser toppe ved 1,9-2,1 (kvartet), 3,7, 4,0, 4,4, 5,0-5,1 (dublet), 6,7-6,9 (dublet) og 7,3-7,4 (dublet).
- 5) tert-butyloxycarbonyl-substitueret 3-(2-methyl-1,3,4-thiadiazol-5-thiomethyl)-7-D-phenylglycylamido- Δ^3 -cephem-carboxylsyre. NMR-spektret udviser toppe ved 2,0-2,1 (kvartet), 2,7, 3,7, 4,4-4,5 (dublet), 5,0-5,1 (dublet), 5,4-5,6 (triplet), 5,7-6,0 (kvartet), 7,2-7,6 (kvartet).
- 6) 7-(D-2-formyloxy-2-phenylacetamido)-3-(2-methyl-1,3,4-thiadiazol-5-thiomethyl)- Δ^3 -cephem-carboxylsyre. NMR-spektret udviser toppe ved 2,7, 3,3-3,5 (triplet), 3,8, 4,1, 4,3, 4,5, 4,9-5,0 (dublet), 5,5-5,7 (dublet), 6,2 og 7,4.

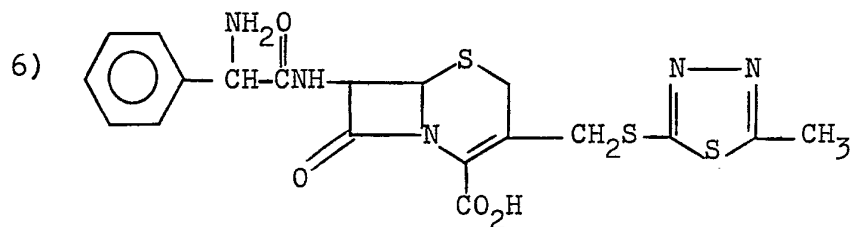
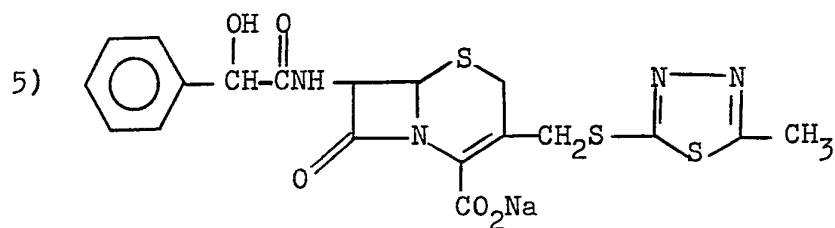
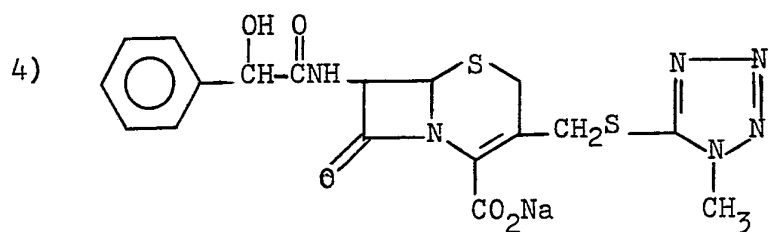
Fremstillingen af de biologisk aktive forbindelser ud fra de omhandlede mellemprodukter sker ved fjernelse af de beskyttende eller blokerende grupper, f.eks. ved hydrolyse, med efterfølgende isole-ring af slutproduktet med en fri hydroxylgruppe eller aminogruppe ved α -carbonatomet.

Til bedømmelse af slutprodukternes biologiske aktivitet er udført målinger af den inhiberende virkning af tre typiske forbindelser i sammenligning med de kendte antibiotica cephalothin, cephalixin og cephaloridine. Resultaterne fremgår af efterfølgende tabel, hvori tallene angiver de minimale koncentrationer af det antibiotiske stof, som er nødvendige til inhibering af væksten af de pågældende mikroorganismer.

Gm+, Gm- prøver for cephalosporiner (Gradient plade-screen)

Forbin- delse	Gm+, mic			Gm-, mic					
	V32	X400	V84	N9	N10	N26	X26	X528	X68
1	0,5	> 20	0,4	8,8	6,4	10,4	0,75	>200	2,4
2	4,8	> 20	3,8	10,4	9,7	9,3	6,6	>200	6,4
3	1,0	12 0	0,8	3,4	3,3		3,3	>200	2,9
4	0,8	13 4	0,6	0,5	1,3	0,6	0,6	> 50	0,5
5	4,3	> 20	4,2	1,1	1,2	1,9	1,7	>100	3,4
6	4,2	> 20	6,9	1,9	3,4	5,2	1,2	>100	2,4

- 1) Cephalothin
- 2) Cephalexin
- 3) Cephaloridine



- V32 = *Staphylococcus aureus*
 X400 = *Staphylococcus aureus*
 V84 = *Staphylococcus aureus*
 N9 = *Shigella* sp.
 N10 = *E. coli*
 N26 = *E. coli*
 X26 = *Klebsiella pneumoniae*
 X528 = *Pseudomonas* sp.
 X68 = *Enterobacter aerogenes*

Af ovennævnte tabel fremgår det, at de af de omhandlede mellemprodukter fremstillede forbindelser udviser forøget aktivitet over for visse gram-negative organismer i sammenligning med beslægtede kendte antibiotiske stoffer.

EKSEMPEL 1

Fremstilling af mellemproduktet 7-(D-2-formyloxy-2-phenylacetamido)-3-(2-methyl-1,3,4-thiadiazol-5-thiomethyl)- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre

D-mandelsyre (15,2 g, 0,1 mol) omrørtes i 250 ml myresyre, og blandingen henstod ved stuetemperatur i 2 dage. Opløsningen indampedes i vacuum, og indampningsresten opløstes i benzen, hvorefter benzenopløsningen vaskedes med vand, tørredes over magnesiumsulfat, filtreredes og indampedes til tørhed, hvorved der isoleredes 13,2 g D-mandelsyreformiat. Til en opløsning af 3,6 g (0,02 mol) D-mandelsyreformiat og 25 ml tør benzen ved stuetemperatur sættes 5 ml oxalylchlorid og 1 dråbe dimethylformamid. Efter omrøring i 2 timer ved stuetemperatur indampedes opløsningen under vacuum under dannelse af formiatesteren af D-mandelylchlorid i form af en olie, der opløstes i 40 ml acetone. Syrechloridopløsningen sættes til en iskold opløsning af 3,44 g (0,01 mol) 7-amino-3-(2-methyl-1,3,4-thiadiazol-5-thiomethyl)- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre og 5 g natriumhydrogencarbonat i 100 ml vand og 100 ml acetone. Denne blanding omrørtes i kulden i 1 time og derpå ved stuetemperatur i 2 timer. Acetonen afdestilleredes under reduceret tryk, og den fremkomne vandige blanding sættes til en kold, omrørt blanding af 100 ml vand og 200 ml ethylacetat. pH indstilledes på 2,0 ved tilsætning af 6N saltsyre. Efter filtrering gennem en filterkage bortkastedes vandlaget, og ethylacetatlaget vaskedes med vand, tørredes over magnesiumsulfat og indampedes under vacuum til en olie. Olien behandles med ether for at fremkalde krystallisation, og det faste stof isoleredes og tørredes, hvorved der udvandt 4 g 7-(D-2-formyloxy-2-phenylacetamido)-3-(2-methyl-1,3,4-thiadiazol-5-thiomethyl)- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre. NMR-spektret udviste toppe ved 2,7, 3,3-3,5 (triplet) 3,8 4,1, 4,3, 4,5, 4,9-5,0 (doublet), 5,5-5,7 (doublet), 6,2 og 7,4.

Mellemproduktets anvendelse

Til 2,64 g (0,54 mol) af den ovenfor fremstillede formiatbeskyttede tetrazolcephalosporansyre i 30 ml vand sættes 2,5 g natriumhydrogen-

carbonat, og blandingen omrørtes i 3 timer ved stuetemperatur. Blandingen fortyndedes derpå til 50 ml med vand, hvorefter der tilsattes 50 ml ethylacetat, og blandingen afkøledes i et isbad, medens pH indstilledes på 2 ved tilsætningen af saltsyre. Der foretoges en adskillelse af lagene, hvorefter ethylacetatlaget vaskedes med vand og tørredes over magnesiumsulfat. Der tilsattes ether for at bringe produktet til udfældning, hvorefter dette isoleredes, hvilket gav 1,4 g 7-D-mandelamido-3-(2-methyl-1,3,4-thiadiazol-5-thiomethyl)- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyreråprodukt.

Til 1,3 g (0,0026 mol) af råproduktet i 5 ml absolut ethanol sættes 2,6 ml 1N natriumacetat i methanol. Blandingen omrørtes og afkøledes, hvorefter det udfældede stof isoleredes, hvilket gav 1,1 g af cephalosporinsyrens natriumsalt. Dette natriumsalt omkrystalliseredes ved at opløse det i methanol og tilsætte iso-propanol til fornyet udfældning. Denne behandling resulterede i natrium-7-D-mandelamido-3-(2-methyl-1,3,4-thiadiazol-5-thiomethyl)- Δ^3 -cephem-4-carboxylat.

NMR-spektret udviste kvartetter ved 3,2-4,0 og 3,8-4,5 ppm og singletter ved 2,8, 5,2, 5,4, 5,7 og 7,5 ppm. Forbindelsen havde en pK_a -værdi på 4,9.

EKSEMPEL 2

Fremgangsmåden i eksempel 1 gentoges med den ændring, at udgangsmaterialet erstattedes med 7-amino-3-(1-methyl-1,2,3,4-tetrazol-5-thiomethyl)- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre. Der isoleredes 1,1 g natrium-7-D-mandelamido-3-(1-methyl-1,2,3,4-tetrazol-5-thiomethyl)- Δ^3 -cephem-4-carboxylat.

Produktet havde en pK_a -værdi på 5,2. NMR-spektret udviste kvartetter ved 3,3-3,8 og 3,9-4,5 og singletter ved 4,0, 5,1, 5,35, 5,7 og 7,55 ppm.

EKSEMPEL 3

Fremstilling af mellemproduktet:

En opløsning af 2,46 g (0,01 mol) D-phenylglycin, hvis aminogruppe var beskyttet med t-butyloxycarbonylgruppen i 50 ml tetrahydrofuran

afkøledes til -10°C i et is-acetone bad. Til denne kolde opløsning sættes 1,4 ml triethylamin og 1,3 ml isobutylchlorformiat. Opløsningen af det fremkomne blandede anhydrid omrørtes i kulden i 20 minutter og sættes derpå til en kold omrørt opløsning af 3,44 g (0,01 mol) 7-amino-3-(2-methyl-1,3,4-thiadiazol-5-thiomethyl)- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre og 1,4 ml triethylamin i 50 ml vand og 50 ml tetrahydrofuran. Denne reaktionsblanding omrørtes 1 time i kulden og 2 timer ved stuetemperatur. Tetrahydrofuran afstrippedes under vacuum, og den vandige blanding holdtes i en kold, omrørt blanding bestående af 50 ml vand og 100 ml ethylacetat. pH indstilledes på 2 ved tilsætning af 6N saltsyre. Blandingen filtreredes gennem et filtermateriale, og vand- og ethyl-acetatlaget adskiltes. Ethyl-acetatlaget vaskedes med vand, tørredes over magnesiumsulfat, filtreredes og indampedes til tørhed under vacuum. Inddampningsresten behandledes med ether og filtreredes; udbytte: 4 g tert.-butyloxy-carbonyl-substitueret 3-(2-methyl-1,3,4-thiadiazol-5-thiomethyl)-7-D-phenylglycylamido- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre.

NMR-spektret udviste toppe ved 2,0-2,1 (kvartet), 2,7, 3,7, 4,4-4,5 (dublet), 5,0-5,1 (dublet), 5,4-5,6 (triplet), 5,7-6,0 (kvartet), 7,2-7,6 (kvartet).

Mellemproduktets anvendelse

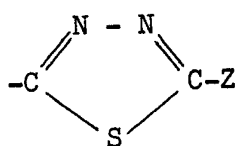
Det ovenfor fremstillede mellemprodukt omrørtes i 20 ml iskold trifluoreddikesyre i 5 minutter, og blandingen indampedes derpå under vacuum. Der tilsattes 10 ml ethylacetat, og blandingen indampedes på ny under vacuum. Inddampningsresten omrørtes med 30 ml vand og 30 ml methylisobutylketon, og der tilsattes tributylamin indtil pH var 4,0. Den udfældede forbindelse isoleredes, hvorved der vandtes 0,75 g af urent 3-(2-methyl-1,3,4-thiadiazol-5-thiomethyl)-7-D-phenylglycylamido- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre.

Vandlaget vaskedes med methylisobutylketon og indampedes til tørhed, hvorefter indampningsresten opslemmedes med acetonitril og filtreredes, hvilket yderligere gav 0,86 g råprodukt. For at opnå et rent materiale af det ved pH 4 udfældede råprodukt, omrørtes 0,59 g heraf med 3 ml formamid, 3 ml vand og 1 ml methanol, hvorefter opløsningen filtreredes, og der tilsattes 20 ml acetonitril til filtratet. Denne blanding afkøledes i adskillige timer, og det

udfældede stof isoleredes, hvorved der vandtes 0,15 g rent slutprodukt. I NMR-spektret fandtes toppe ved 3,0, 3,5-3,7, 4,3-4,5, 5,1-5,15, 5,4, 5,7-5,8 og 6,0 ppm.

EKSEMPEL 4

Fremgangsmåden i eksempel 3 gentoges, idet der i stedet for 2-methyl-1,3,4-thiadiazolyforbindelsen anvendtes 1-methyl-1,2,3,4-tetrazolyforbindelsen, hvorved der vandtes 3-(1-methyl-1,2,3,4-tetrazol-5-thiomethyl)-7-D-phenylglycylamido- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre. Udbytte: 43%. NMR-spektret indeholdt følgende toppe: 2,1, 3,95, 4,95-5,1, 5,3-5,4 og 5,6 ppm.

$$\begin{array}{c}
 \text{O} \\
 || \\
 \text{R}-\underset{\overset{|}{X}}{\text{CH}}-\text{C}-\text{NH}-\underset{\overset{|}{\text{O}=\text{C}}}{\text{CH}}-\underset{\overset{|}{\text{N}}}{\text{CH}}-\text{CH} \\
 | \qquad \qquad \qquad | \qquad \qquad \qquad / \qquad \backslash \\
 \text{S} \qquad \qquad \qquad \text{CH}_2 \\
 \backslash \qquad \qquad \qquad / \\
 \text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{R}^1 \\
 | \\
 \text{CO}_2\text{H}
 \end{array}$$
C1=CC=C(S1)C2=CC=CC=C2 R^1 er[O-]C1=NC=NC=N1

Q er alkyl med 1 - 3 carbonatomer,

$$\text{R}^2 \text{ er } \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{O}-\text{C}-(\text{CH}_3)_3; \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CCl}_3 \end{array} \text{ eller } \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}=\text{CH}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_3 \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array}$$

Fremdragne publikationer: