

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 792124 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 792124

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC⁴)
A61K 31/43

(22) Tekemispäivä - Ingningsdag - Filing date 05.07.1979

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 05.07.1979

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 01.01.1981

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

01.11.1971 GB 50675/71

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Astra Läkemedel Aktiebolag, 151 85 Södertälje, SVERIGE, (SE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Bamberg, P., Sverige, SVERIGE, (SE)

2 • Ekström, Bertil Åke, TOWN UNKNOWN, SVERIGE, (SE)

3 • Forsgren, Ulf Erik, TOWN UNKNOWN, SVERIGE, (SE)

4 • Sjöberg, Berndt Olof Harald, Sverige, SVERIGE, (SE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Yhdiste.

Ämneskomposition.

ASTRA LÄKEMEDEL AKTIEBOLAG, Södertälje, Ruotsi

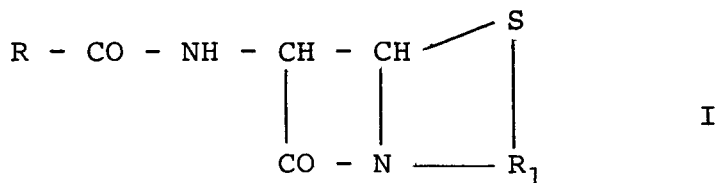
Yhdiste - Ämneskomposition

Jakamalla erotettu hakemuksesta 2717/74 - Avdelad från ansökan 2717/74

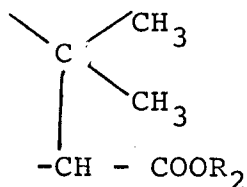
Tämä keksintö koskee uusia, bakteereja tuhoavia synergistisiä aine-seoksia, jotka sisältävät penisilliini- tai kefalosporiinijohdan-naisia, tällaisten aineseosten valmistusmenetelmiä ja infektiosai-rauksien hoitomenetelmää.

Keksintö koskee erityisesti erästä bakteereja tuhoavaa synergistis-tä aineseosta, joka muodostuu olennaisesti seuraavista aineista:

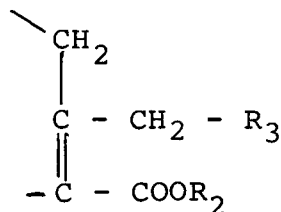
a) tunnetusta, kliiniseen käyttöön soveltuvasta penisilliinistä tai kefalosporiinista, jonka kaava on



jossa kaavassa R on orgaaninen happojäännös ja R₁ on valittu ryh-mästä, johon kuuluvat kaksoisvalenssiset radikaalit

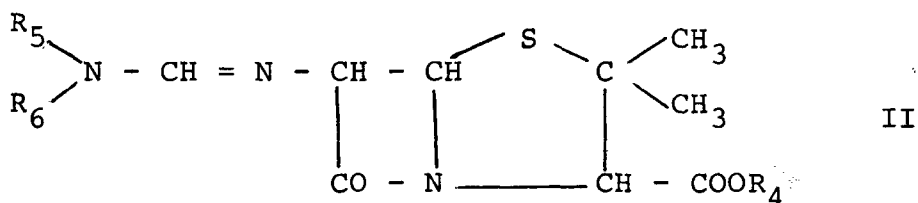


ja



joiden kaavassa R_2 on valittu ryhmästä, johon kuuluvat vety, farmaseuttisesti soveltuva kationi tai farmaseuttisesti soveltuva esteriryhmä, joka hydrolysoituu nopeasti in vivo, ja R_3 on valittu ryhmästä, johon kuuluvat H, $\text{CH}_3\text{COO}-$, 1-pyridiniumi ja 2-metyyli-1,3,4-tiadiatsoli-5-yyli-5-tiio; ja

b) tunnetusta, kliiniseen käyttöön soveltuvasta penisilliinistä, jonka kaava on



jossa kaavassa R_4 on valittu ryhmästä, johon kuuluvat vety, farmaseuttisesti soveltuva kationi tai farmaseuttisesti soveltuva esteriryhmä, joka hydrolysoituu nopeasti in vivo, ja jossa R_5 ja R_6 , jotka voivat olla samat tai erilaiset, on valittu ryhmästä, johon kuuluvat alkyyliryhmä, mono- tai bisyklinen aryyli-ryhmä, aralkyyli-ryhmä, sykloalkyyli-ryhmä, sykloalkyyli-alkyyli-ryhmä tai heterosyklinen ryhmä, tai R_5 ja R_6 muodostavat yhdessä rengassysteemin.

Edellä kuvattu ainesos sisältää kaavojen I ja II mukaisia yhdisteitä painosuhteessa, joka vaihtelee 10:1 - 1:10, etupäässä painosuhteessa 2:1 - 1:2. Seokseen voidaan liittää, mikäli niin halutaan, jokin farmaseuttisesti sopiva kantoaine.

Yllättäen on osoittautunut, että yhdistettäessä yleisen kaavan I mukaista yhdistettä ja yleisen kaavan II mukaista yhdistettä, jolloin muodostuu edellä kuvattu ainesos, aiheutuu siitä molempien yhdisteiden bakteereja tuhoavan vaikutuksen huomattava kohoaminen. Näin ollen tämä keksintö koskee myös menetelmää, jonka avulla voidaan lisätä edellä olevan kuvauksen a) kohdassa mainitun kliiniseen käyttöön soveltuvan penisilliinin tai kefalosporiinin bakteereja tuhoavaa vaikutusta, ja tässä menetelmässä niihin lisätään jokin määrä kuvauksen b) kohdassa mainittua penisilliiniä.

Toinen yllättävä havainto on, että bakteeriorganismeissa ei kehity niin helposti resistenssiä kaavojen I ja II mukaisten yhdisteiden yhdistelmän suhteen, kun näiden yhdisteiden suhteen sellaisenaan.

Useilla yleisen kaavan I mukaisilla penisilliineillä ja kefalosporiineilla on tunnetusti vahva bakteereja tuhoava vaikutus ja sellaisia penisilliinejä ja kefalosporiineja käytetään suuressa mitassa infektiosairauksien hoitamiseen, jotka ovat gram-positiivisten tai gram-negatiivisten bakteerien aiheuttamia. Keksinnön mukaiseen aine-seokseen parhaiten sopivia penisilliinejä tai kefalosporiineja ovat kliinisesti käytetyt penisilliinit tai kefalosporiinit, kuten bent-syylipenisilliini, fenoksimetyylipenisilliini, fenoksietyylipenisilliini, fenoksi-propyyli-penisilliini, 2,6-metoksifenyyli-penisilliini, 3-fenyyli-5-metyyli-4-isoksatsolyylipenisilliini, 3-o-kloorifenyyli-5-metyyli-4-isoksatsolyylipenisilliini, 3-(2,6-dikloorifenyyli)-5-metyyli-4-isoksatsolyylipenisilliini, 3-(2-fluori-6-kloorifenyyli)-5-metyyli-4-isoksatsolyylipenisilliini, 6-(2-etoksi-1-naftamido)-penisillaanihappo, α -karboksibentsyyli-penisilliini, 6-(D- α -aminofenyyliasetamido)-penisillaanihappo, 6-(D- α -amino-p-hydroksi-fenyyliasetamido)-penisillaanihappo, α -karboksi-3-tienyyli-metyyli-penisilliini, 6-(D- α -sulfoaminofenyyliasetamido)-penisillaanihappo, α -hydroksisulfonyyli-bentsyyli-penisilliini, α -indanyylioksi-karbonyyli-bentsyyli-penisilliini ja vielä 6-(D- α -amino-3-tienyyliasetamido)-penisillaanihappo, 6-(D- α -atsidofenyyliasetamido)-penisillaanihappo ja 6-(D- α -atsido-m-fluorifenyyliasetamido)-penisillaanihappo, 2-tenyylikefalosporiini, bentsyylikefalosporiini, syanometyylikefalosporiini, 4-pyridyylitiometyylikefalosporiini, 7-(D- α -aminofenyyliasetamido)-kefalosporaanihappo, 7-(D- α -amino-fenyyliasetamido)-desasetoksi-kefalosporaanihappo, 7-(2-tienyyli)-asetamido-3-(1-pyridyylimetyyli)-3-kefem-4-karboksylaattibetaiini, 7-(1H-tetratsol-1-yyli)-asetamido-3-(2-metyyli-1,3,4-tiadiatsoli-5-yyli)-metyyli-3-kefem-4-karboksyylihappo ja niiden farmaseuttisesti sopivat suolat, jotka on muodostettu farmaseuttisesti sopivien orgaanisten tai epäorgaanisten emästen avulla. Koska keksinnön mukaisia ainesekoja annetaan lääkkeeksi oraalisesti, voivat kaavan I mukaiset penisilliinit tai kefalosporiinit käsittää myös niiden estereitä, jotka hydrolysoituvat nopeasti in vivo. Esimerkkeinä sellaisista sopivista esteriryhmistä mainittakoon asyylioksi-alkyyli-ryhmät, kuten asetoksi-metyyli, pivaloyylioksi-metyyli tai 1'-asetoksi-etyyli-ryhmä; tai alkyylioksi-karbonyylioksi-alkyyli-ryhmät kuten etoksi-karbonyylioksimetyyli tai 1'-etoksi-karbonyylioksi-etyyli-ryhmä.

Yleisen kaavan II mukaisilla penisilliineillä on myöskin voimakas antibakteerinen vaikutus; näitä tähän asti tuntemattomia penisil-

liinejä kuvaillaan hollantilaisessa patenttihakemuksessa n:o 70 16 435. Keksinnön mukaisessa aineseksessa suosituimpia kaavan II mukaisia penisilliinejä tai penisilliiniestereitä ovat: 6- β -(heksahydro-1H-atsepin-1-yyli)-metyleeniamino-7-penisillaanihappo, pivaloyylioksimetyyli-6- β -(heksahydro-1H-atsepin-1-yyli)-metyleeniamino-7-penisillanaatti, 6- β -(piperidyyli-1)-metyleeniamino-7-penisillaanihappo, 6- β -(etyyli)-isopropyyli-metyleeniamino-7-penisillaanihappo, asetoksimetyyli-6- β -(heksahydro-1H-atsepin-1-yyli)-metyleeniamino-7-penisillanaatti, pivaloyylioksimetyyli-6- β -(heksahydro-1-(2H)-atsosinnyyli)-metyleeniamino-7-penisillanaatti, etoksi-karbonyylioksimetyyli-6- β -(heksahydro-1H-atsepin-1-yyli)-metyleeniamino-7-penisillanaatti, 1'-etoksi-karbonyylioksi-etyyli-6- β -(piperidyyli-1)-metyleeniamino-7-penisillanaatti, 1'-asetoksietyyli-6- β -(heksahydro-1H-atsepin-1-yyli)-metyleeniamino-7-penisillanaatti, etoksikarbonyylioksimetyyli-6- β -(N-etyyli-N-isopropyyli-formamido)-N'-amino-7-penisillanaatti, 1'-etoksikarbonyylioksi-etyyli-6- β -(heksahydro-1-(2H)-atsosinnyyli)-metyleeniamino-7-penisillanaatti ja 1'-etoksikarbonyylioksietyyli-6- β -(heksahydro-1H-atsepin-1-yyli)-metyleeniamino-7-penisillanaatti ja niiden farmaseuttisesti sopivat suolat.

Keksinnön mukaisia ainesekoiksi voidaan valmistaa erilaisilla yhdistämismenetelmillä, jotka tunnetaan penisilliinejä tai kefalosporiineja sisältävien ainesekosten valmistuksesta. Yhdistämistä voi seurata kemiallisia reaktioita uuden ainesekoksen komponenttien välillä. Yhdistämiseen voidaan liittää myös keksinnön mukaiseen seokseen kuuluvien penisilliinien ja kefalosporiinien esterien ja suolojen valmistaminen samanaikaisesti. On otettava myös huomioon, että uutta keksinnön mukaista seosta on pidettävä määrättyssä mielessä uutena kemiallisena yksilönä, koska uudella aineseksella on ainutlaatuisen antibakteerinen vaikutus, joka eroaa täysin siitä vaikutustehosta, joka voidaan laskemalla johtaa yksityisten aineosasten vaikutuksesta.

Kyseessä olevan keksinnön mukaista ainesekosta voidaan antaa joko oraalisesti tai ruiskeena. Ainesekseen voidaan yhdistää valinnanvaraisesti muita aineita, kuten farmaseuttisesti sopivia kiinteitä tai nestemäisiä kanto- tai laimennusaineita, ja ne voivat olla mitä tahansa yleisesti käytössä olevia farmaseuttisia valmisteita, jotka ovat tunnettuja penisilliiniterapiasta, esimerkiksi valmisteita, jotka soveltuvat annettaviksi oraalisesti kuten tabletteja, jyvä-

siä, kapseleita, kolloidoituvia jauheita, joista voidaan valmistaa vesilietteitä annettaviksi oraalisesti, liuoksia, suspensioita tai emulsioita, tai valmisteita, jotka soveltuvat annettaviksi paren-
teraaalisesti, esimerkiksi vesiliuoksia tai liuoksia, joissa ei ole vettä, tai suspensioita, tai hajautuvia jauheita, joista voidaan valmistaa steriilejä vesidispersioita, tai ulkonaisesti käytettäviä valmisteita, esimerkiksi voiteita.

Keksinnön mukaisten aineoseosten toksisuus on pieni ja ne siedetään hyvin. Kun hoidetaan bakteeri-infektioita ihmisellä, annetaan keksinnön mukaista aineoseosta esimerkiksi niin paljon, että se vastaa 5-200 mg/kg/päivässä aktiivista ainetta, ensisijassa 10-100 mg/kg/-päivässä jaettuna annoksiin, esimerkiksi kaksi, kolme tai neljä kertaa päivässä. Niitä annetaan esimerkiksi annosyksikköinä, jotka sisältävät 175, 350, 500 ja 1000 mg aineoseoksen aktiivisia aineosia.

On itsestään selvää, ettei ole tarpeen antaa molempia aktiivisia edellä olevan kaavan I ja II mukaisia komponentteja siten, että käytetään keksinnön mukaista aineoseosta, joka sisältää molempia aktiivisia komponentteja. Olennaista on, että näitä molempia aktiivisia aineosia annetaan lääkkeeksi sillä tavoin, että ne ruumiin sisällä voivat vaikuttaa synergistisesti. Tämä merkitsee tavallisesti sitä, että molemmat komponentit on annettava samanaikaisesti, so. niin lyhyen ajan sisällä, että yhdisteet voivat vaikuttaa synergistisesti.

Seuraavat esimerkit valaisevat keksinnön mukaisten aineoseosten huomion arvoista antibakteerista synergististä vaikutusta.

Esimerkki 1

6-(D- α -amino-fenyyliasetamido)-penisillaanihapon ja 6- γ -(heksahydro-1H-atsepin-1-yyli)-metyleeniamino- γ -penisillaanihapon yhdistelmän
in vitro vaikutus

Määrättiin 6-(D- α -aminofenyyliasetamido)-penisillaanihapon I, 6- γ -(heksahydro-1H-atsepin-1-yyli)-metyleeniamino- γ -penisillaanihapon II ja yhdistelmän III, joka sisälsi yhtä suuret osat näitä yhdisteitä, in vitro-vaikutus kliinisesti eristettyihin enterobakteereihin sarjalla laimennuskokeita. Tryptofosfaattisubstraattiin, joka sisälsi sopivat konsentraatiot yhdisteitä tai niiden yhdistelmää, istutettiin $0,5 \cdot 10^4$ - $5 \cdot 10^4$ erilaisia mikroeliöitä, joita tutkittiin ja inkuboitiin yli yön lämpötilassa 37°C. Pienimmäksi inhiboita-

vaksi konsentraatioksi (M.I.C.) määriteltiin se yhdisteiden tai niiden seoksen konsentraatio, joka esti näkyvän lisääntymisen.

Mikro-organismi	Kantanumero	M.I.C. ($\mu\text{g/ml}$)		
		I	II	III
Koliformi	3/70	1,56	12,5	0,78
"	9/70	3,12	3,12	0,39
"	10/70	3,12	3,12	0,78
"	17/70	3,12	0,78	0,39
Proteus mirabilis	35895	25	0,78	0,39
Proteus vulgaris A		0,78	0,19	0,08
Proteus vulgaris B		50	1,56	0,78
Proteus	12/70	100	3,12	0,78
"	13/70	100	3,12	0,78
"	20/70	>100	>100	25

Esimerkki 2

6- γ -(heksahydro-1H-atsepin-1-yyli)-metyleeniamino-7-penisillaani-
hapon ja erilaisten penisilliinien yhdistelmän in vitro-vaikutus

Käytettiin samaa tekniikkaa kuin esimerkissä 1 on kuvattu ja määrättiin

6- γ -(heksahydro-1H-atsepin-1-yyli)-metyleeniamino-7-penisillaanin hapon II, eri penisilliinien, ja yhdistelmien, jotka sisälsivät suhteessa 1:1 yhdistettä II ja kulloinkin jotakin penisilliiniä in vitro-vaikutus kliinisesti eristettyyn koliform-bakteeriin (n:o 9/70).

Penisilliini	M.I.C. ($\mu\text{g/ml}$)		
	I	II	1:1 seos
bentsyylipenisilliini	25	3,12	0,78
fenoksimetyylipenisilliini	100	3,12	1,56
6-(D- α -atsidofenyyliasetamido)- penisillaanihappo	50	3,12	1,56
6-(D- α -atsido-m-fluorifenyyli- asetamido)-penisillaanihappo	50	3,12	1,56
α -karboksibentsyylipenisilliini	12,5	3,12	0,38
3-(o-kloorifenyyli-5-metyyli- 4-isoksatsolyyli)-penisilliini	100	3,12	0,78

Esimerkki 3

6-(D- α -aminofenyyliasetamido)-penisillaanin hapon ja 6- γ -(heksahydro-

1H-atsepin-1-yyli)-metyleeniamino $\overline{7}$ -pensillaanihapon seoksen
in vivo-vaikutus

Ryhmille, jotka muodostuivat 10:stä valkoisesta naarashiirestä (NMRI), ruumiinpainoltaan 17-19 g, annettiin intraperitoneaalisesti E. coli III testibakteerien viljelmää. Välittömästi tämän jälkeen niitä käsiteltiin subkutaanisesti sopivasti laimennetuilla 6-(D- α -aminofenyyliasetamido)-penisillaanihapon I, 6- $\overline{7}$ (heksahydro-1H-atsepin-1-yyli)-metyleeniamino $\overline{7}$ -penisillaanihapon II ja näiden molempien yhdisteiden 1:1 suhteessa olevan seoksen III vesiliuoksilla. Kuolemantapaukset eri ryhmissä 96 tunnin jälkeen merkittiin muistiin ja laskettiin "keskimääräinen parantava annos", CD_{50} . (Tuloksessa tarkoittaa LD_{50} sitä yhden yön ikäisen viljemän laimennusta, joka aiheuttaa 50-prosentille eläimistä kuoleman, jos eläimet eivät saa mitään hoitoa; LD_{50} -annosten lukumäärä on eläinten saaman infektion voimakkuuden mitta).

LD_{50}	LD_{50} -annokset	CD_{50} (mg/kg)		
		I	II	III
$1,5 \cdot 10^{-3}$	6,6	5,5	2,0	1,0
$8,1 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	250	> 500	210

Esimerkki 4

6-(D- α -aminofenyyliasetamido)-penisillaanihapon ja 6- $\overline{7}$ (piperidyyli-1)-metyleeniamino $\overline{7}$ -penisillaanihapon seoksen in vitro-vaikutus

Käyttäen samaa tekniikkaa kuin on kuvattu esimerkissä 1 määrättiin 6-(D- α -aminofenyyliasetamido)-penisillaanihapon I ja 6- $\overline{7}$ (piperidyyli-1)-metyleeniamino $\overline{7}$ -penisillaanihapon IV, ja näitä yhdisteitä yhtä suuret määrät sisältävän seoksen V in vitro-vaikutukset kliinisesti eristettyyn enterobakteeriin sarjalaimennustestissä.

Mikro-organismi	Kantanumero	M.I.C. (μ g/ml)		
		I	IV	V
Koliiformi	3/70	3,12	3,12	0,78
	7/70	3,12	1,56	0,78
	8/70	3,12	6,25	0,78
	14/70	6,25	3,12	1,56
	16/70	3,12	1,56	0,78
	17/70	6,25	1,56	0,78
Proteus	4/70	1,56	25	0,78

(jatkoa taulukkoon)

Mikro-organismi	Kantanumero	M.I.C. ($\mu\text{g/ml}$)		
		I	IV	V
Proteus	6/70	0,39	3,12	0,18
	7/70	1,56	50	0,78
	9/70	6,25	100	1,56
	10/70	1,56	25	0,78
Klebsiella- enterobakteeri	1/70	50	>100	3,12
	2/70	25	12,5	3,12
	5/70	100	>100	12,5
	7/70	>100	>100	100
	9/70	50	3,12	1,56
	10/70	50	>100	25
	431	100	>100	12,5

Esimerkki 5

6- γ -(piperidyyli-1)-metyleeniamino- γ -penisillaanihapon IV ja eri penisilliinien seoksen in vitro-vaikutus

Käyttäen samaa tekniikkaa kuin on kuvattu esimerkissä 1, määrättiin 6- γ -(piperidyyli-1)-metyleeniamino- γ -penisillaanihapon IV, eri penisilliinien ja yhdistettä IV ja aina jotakin näistä eri penisilliineistä suhteessa 1:1 sisältävien seosten in vitro-vaikutus kliinisesti eristettyyn koliform-bakteeriin.

Penisilliini	M.I.C. ($\mu\text{g/ml}$)		
	-	IV	1:1 seos
Bentsyylipenisilliini	25	6,25	1,56
Fluoksimetyylipenisilliini	>100	6,25	3,12
6-(D- α -atsidofenyyliaasetamido)- penisillaanihappo	50	6,25	1,56
α -karboksibentsyylipenisilliini	12,5	6,25	1,56
3-(2-kloorifenylyli)-5-metyyli-4- isoksatsolyylipenisilliini	>100	6,25	3,12

Esimerkki 6

Resistenssin kehittyminen E. coli III bakteereissa 6-(D- α -amino-fenyyliaasetamido)-penisillaanihapon, 6- γ -(piperidyyli-1)-metyleeniamino- γ -penisillaanihapon ja suhteessa 1:1 näitä yhdisteitä sisältävän seoksen suhteen

viljelmät pidettiin nesteen sisässä ja suoritettiin kaksinkertainen sarjalaimennus käyttäen 6-(D- -amino-fenyyli-asetamido)-penisillaa-nihappoa I, 6- $\overline{\text{[piperidyyli-1]}}$ -metyleeniamino $\overline{7}$ -penisillaanihappoa IV ja yhdisteiden I ja IV seosta suhteessa 1:1. Istutukseen käytettiin bakteereja koeputkesta, joka sisälsi suurimman väkevyyden yhdisteitä, ja jossa vielä näkyi paljaalla simällä lisääntymistä yli yön kestäneen inkubaation jälkeen lämpötilassa 37°C. Seuraavat lisäykset MIC-arvoissa havaittiin.

Vaiheet	M.I.C. ($\mu\text{g/ml}$)		
	I	IV	I + IV
0	1,56	0,78	0,38
1	6,25	6,25	1,56
2	25	6,25	0,78
3	50	25	0,78
4	50	25	1,56
5	100	25	3,12
6	100	25	3,12

Esimerkki 7

Resistenssin kehittyminen eräässä koliform-mikro-organismissa 6-(D- α -aminofenyyliasetamido)-penisillaanihapon, 6- $\overline{\text{[heksahydro-1H-atsepin-1-yyli]}}$ -metyleeniamino $\overline{7}$ penisillaanihapon ja näiden molempien yhdisteiden seoksen suhteen

Viljelmät pidettiin nesteen sisässä ja suoritettiin kaksinkertainen sarjalaimennus käyttäen 6-(D- α -aminofenyyliasetamido)-penisillaanihappoa I, 6- $\overline{\text{[heksahydro-1H-atsepin-1-yyli]}}$ -metyleeniamino $\overline{7}$ -penisillaanihappoa II ja yhdisteiden I ja II seosta suhteessa 1:1. Käytetty kanta oli kliinisesti eristetty koliformi. Istutukseen käytettiin bakteereja koeputkesta, joka sisälsi suurimman väkevyyden yhdisteitä, ja jossa vielä näkyi paljaalla silmällä lisääntymistä yli yön kestäneen inkubaation jälkeen lämpötilassa 37°C. Seuraavat lisäykset M.I.C-arvossa havaittiin.

Vaiheet	M.I.C. ($\mu\text{g/ml}$)		
	I	II	I + II
0	1,56	0,39	0,38
1	3,12	6,25	0,78
2	3,12	25	0,38
3	6,25	25	0,78
4	6,25	25	0,78
5	6,25	25	0,78

(jatkoa taulukkoon)

Vaiheet	M.I.C. (μ g/ml)		
	I	II	I + II
6	6,25	12,5	1,56
7	12,5	25	1,56
8	12,5	25	1,56

Esimerkki 8

Kefalotiinin ja 6- $\angle$ (N,N-dietyyli-formamidiini)-N'-amino-7-penisillaanihapon seoksen in vitro-vaikutus

Käytettiin esimerkissä 1 kuvattua tekniikkaa ja määrättiin kefalotiinin VI, 6- $\angle$ (N,N-dietyyli-formamidiini)-N'-amino-7-penisillaanihapon VII ja näitä yhdisteitä yhtä paljon sisältävän seoksen in vitro-vaikutus kliinisesti eristettyihin Coliforma- ja Klebsiella-enterobakteereihin sarjalaimennustestin avulla.

Mikro-organismi	Kantanumero	M.I.C. (μ g/ml)		
		VI	VII	VI + VII
Coliforma	3	6,25	6,25	1,56
	7	12,5	6,25	1,56
	14	12,5	12,5	6,25
	16	6,25	6,25	3,12
Klebsiella-enterobakteeri	5	25	> 100	12,5

Esimerkki 9

6-(D- α -aminofenyyliasetamido)-penisillaanihapon ja 6- $\angle$ (N,N-dietyyli-formamidiini)-N'-amino-7-penisillaanihapon erilaisten seosten in vitro-vaikutus

Käytettiin esimerkissä 1 kuvattua tekniikkaa ja määrättiin 6-(D- α -aminofenyyliasetamido)-penisillaanihapon I ja 6- $\angle$ (N,N-dietyyli-formamidiini)-N'-amino-7-penisillaanihapon VII suhteessa 1:1, 1:2 ja 2:1 olevien seosten in vitro-vaikutus kliinisesti eristettyihin Coliforma-, Klebsiella-enterobakteeri- ja Proteus-kantoihin sarjalaimennustestin avulla.

Mikro- organismi	Kanta n:o	M.I.C. ($\mu\text{g/ml}$)				
		I	VIII	I+VIII 1:1	I+VIII 1:2	1+VIII 2:1
Coliforma	1	1,56	3,12	1,56	0,39+0,78	0,73+0,39
	4	3,12	3,12	3,12	0,78+1,56	1,56+0,78
	7	1,56	6,25	3,12	0,78+1,56	0,78+0,39
	13	3,12	12,5	3,12	0,78+1,56	0,78+0,39
	16	3,12	6,25	1,56	0,78+1,56	0,78+0,39
Klebsiella ente- robakteeri	1	50	>100	12,5	6,25+12,5	12,5+6,25
	5	100	>100	12,5	6,25+12,5	12,5+6,25
	7	>100	>100	50	25+50	100+50
	8	25	12,5	25	1,56+3,12	6,25+3,12
Proteus	9	3,12	100	3,12	3,12+6,25	1,56+0,78

Seuraavat esimerkit esittävät havainnollisesti joitakin farmaseuttisia valmisteita, jotka on tehty keksinnön puitteissa.

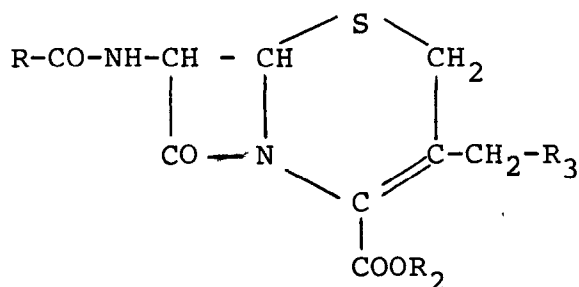
Esimerkki 10

6- β -(heksahydro-1H-atsepin-1-yyli)metyleeniamino- γ -penisillaanin ja muutamien kefalosporiinien yhdistelmien in vitro-vaikutus

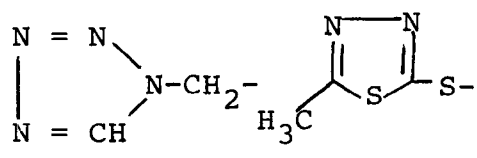
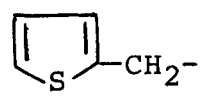
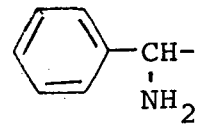
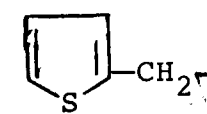
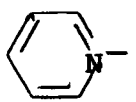
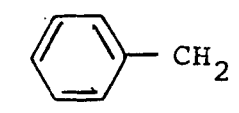
Soveltaen esimerkissä 1 selostettua tekniikkaa määritettiin 6- β -(heksahydro-1H-atsepin-1-yyli)metyleeniamino- γ -penisillaanin (II), erilaisten kefalosporiinien ja näiden kefalosporiinien sekä yhdisteen II 1:1-yhdistelmien in vitro-vaikutus Klebsiella-enterobakteerin (kanta 4/71) kliinisesti eristettyyn kantaan.

Kefalosporiini	-	M.I.C. ($\mu\text{g/ml}$)	
		II	1:1-yhdistelmä
Cefacetriini	50	>100	50
Cefazoliini	12,5	>100	6,25
Cefalotiini	50	>100	6,25
Cefalexiini	50	>100	6,25
Cefaloridiini	25	>100	3,12
EPC 807/26	>100	>100	12,5

Taulukossa yllä mainitut yhdisteet voidaan esittää kaavalla



jossa R, R₂ ja R₃ tarkoittavat samaa kuin alla olevassa taulukossa. Jos ei muuta sanota tarkoittaa R₂ vetyä.

<u>R</u>	<u>R₃</u>	<u>Nimi</u>
NC-CH ₂	CH ₃ COO	syanometyylikefalosporiini (R=Na; cefacetriili)
		7-[1-(1H)-tetratsolyyliasetamido]-3-(2-metyyli-1,3,4-tiadiatsol-5-yyli)-3-kefem-4-karbonihappo (R ₂ =Na; Cefatsoliini)
	CH ₃ COO-	2-tenyylikefalosporiini (R ₂ =Na; Cefalotiini)
	H-	7-(D-α-aminofenyyliasetamido)-desasetoksi-kefalosporaanihappo (R ₂ =H; Cefalexiini)
		7-(2-tienyyli)-asetamido-3-(1-pyridyyli-metyyli)-3-kefem-4-karboksulaattibetaiini (R ₂ =H; Cefaloridiini)
	CH ₃ COO-	bentsyylikefalosporiini (R ₂ =K; EPC 807/26)

Esimerkki 11

6-(D-α-amino-p-hydroksifenyyliasetamido)-penisillaanihapon ja 6-[7-(heksahydro-1H-atsepin-1-yyli)metyleeniamino]-penisillaanihapon yhdistelmän in vitro-vaikutus

Käyttämällä samaa menetelmää, joka on kuvattu esimerkissä 1 määri-

tettiin 6-(D- α -amino-p-hydroksifenyyliasetamido)-penisillaanihapon (I), 6- γ -(heksahydro-1H-atsepin-1-yyli)metyleeniamino- γ -penisillaanihapon (II) ja näiden kahden yhdisteen yhtä suurien määrien muodostaman yhdistelmän (III) in vitro-aktiiviteetti kliinisesti eristettyihin enterobakteereihin nähden.

Mikro-organismi	Kanta n:o	M.I.C. (μ g/ml)		
		I	II	III
Escherichia coli	1/71	250	31,2	1,0
	7/71	31,2	31,2	2,0
	17/71	62,5	15,6	3,9
Coliform	19	100	25	0,78
	51	3,12	0,39	0,09
Proteus	20/75	0,78	100	0,18
	27/75	> 100	> 100	0,78
	34/75	0,78	50	0,09
Klebsiella	26/75	50	50	0,39
Enterobacter	18	> 250	62,5	3,9

Esimerkki 12

Pidennetty antibakteerinen vaikutus annettaessa oraalisesti bakampisilliinia γ -etoksikarbonyloksi-etyyli-6-(D- α -aminofenyyliasetamido)penisillanaattia, bakmesillinamia γ -etoksikarbonyloksi-etyyli-6- γ -(heksahydro-1H-atsepin-1-yyli)metyleeniamino- γ -penisilla-naattia ja näiden yhdistelmiä

Koe suoritettiin valkoisilla NMRI-naarashiirillä (paino 18-20 g). Eläimet eivät saaneet mitään ravintoa koetta edeltäneen yön aikana, mutta niillä on vapaa vedensaanti. Koe yhdisteitä bakampisilliinia ja bakmesillinamia annettiin oraalisesti, joko puhtaina yhdisteinä tai seoksina painosuhteissa 5:1, 1:1 ja 1:5. Kokonaisannos oli kaikissa tapauksissa 4 mg eläintä kohti, laskettuna ampisilliinina ja mesillinamina, ja tämä annos annettiin liuoksena 0,2 ml:ssa vettä. Verinäyte otettiin eläimistä sydänpunktiona joka 20. minuutti alkaen 1 tunnin kuluttua antamisesta. Eläimet puudutettiin hiilidioksidilla jokaisessa näytteenotossa. Viisi eläintä käytettiin joka kokeessa molemmilla koe yhdisteillä ja niiden kolmella yhdistelmällä. Kaikkien viiden hiiren verinäytteet yhdistettiin ja seerumi erotettiin.

Antibakteerinen aktiviteetti (koebakteeri: coliform K) seerumissa mitattiin sarjalaimennustekniikan avulla tryptofosfaatti-liemessä, Difco (TPB). Testattava seeruminäyte (100 μ l) kaadettiin 96-koloinen koealtaan ensimmäiseen koloon. Tästä ensimmäisestä näytteestä tehtiin enintään viisi sarjalaimennusta (50 μ l + 50 μ l; konsentraatio puolitettiin joka vaiheessa) viereisissä syvennyksissä, mikropipetin avulla. Tämän jälkeen lisättiin 50 μ l yhden yön vanhaa koebakteerin viljelmää, kliinisesti eristettyä coliform K, joka oli laimennettu 500 kertaa tryptofosfaatti-liemessä, jokaiseen syvennykseen. Saatiin täten laimennuksia, jotka vaihtelivat 2:sta (enintään) 64 osaan alkuperäisen näytteen väkevyydestä. Kun oli inkuboitu yli yön 37°C:ssa todettiin se pienin laimennus (1, 2, 4, 8, 16 jne.), joka edelleen antoi näkyvää bakteerin kasvua.

Tulokset on esitetty alla olevassa taulukossa.

Näytteenoton ajankohta	Bakampi- silliini	Bakmesil- linami	Bakampi.-Bakmek.-yhdistelmät		
			1:1	1:5	5:1
60 min	16	4	32	32	8
80 min	8	4	16	32	16
100 min	2	≤ 1	8	4	4
120 min	2	≤ 1	4	4	2
140 min	≤ 1	≤ 1	2	4	2
160 min	≤ 1	≤ 1	4	4	2
180 min	≤ 1	≤ 1	2	≤ 1	≤ 1

Kuten taulukosta ilmenee säilyy antibakteerinen aktiviteetti seerumissa noin 100 minuuttia bakmesillinamilla yksin, noin 140 minuuttia bakampisilliinilla yksin, mutta kauemmin kuin 160 minuuttia kaikilla kolmella bakampisilliinin ja bakmesillinamin testatulla yhdistelmällä. Tämä vaikutuksen pidentys (noin 40 minuutin pidentys keskimäärin) on verrattavissa ampisilliinin ja mesillinamin puoliintumisaikaan hiirien verenkiertojärjestelmässä, joka kumpikin on noin 30 minuuttia.

Esimerkki 13 Tablettien valmistus

Tehtiin seuraavia valmisteita tabletteja varten:

a)	6-(D- α -aminofenyyliasetamido)-penisillaanihappo	250 mg
	Pivaloyylioksimetyyli-6- $\angle$ (heksahydro-1H-atsepin-1-yyli)-metyleeniamino $\angle$ -penisillanaatti	250 mg
	Tärkkelys	100 mg
	Magnesiumstearaatti	10 mg
b)	6-(D- α -aminofenyyliasetamido)-penisillaanihappo	250 mg
	1'-etoksikarbonyylioksi-etyyli-6- $\angle$ (piperidyyli-1-metyleeniamino $\angle$ -penisillanaatti	250 mg
	Laktoosi	100 mg
	Magnesiumstearaatti	10 mg
c)	6-(D- α -aminofenyyliasetamido)-penisillaanihappo	250 mg
	1'-asetoksietyyli-6- $\angle$ (N,N-dietyyliformamidiini)-N'-amino $\angle$ -penisillanaatti	250 mg
	Laktoosi	100 mg
	Magnesiumstearaatti	10 mg

Esimerkki 14 Oraalisesti annettaviksi tarkoitettujen suspensioi-
den valmistaminen

Tehtiin seuraavia valmisteita annettaviksi oraalisina suspensioina:

a)	1'-asetoksietyyli-6-(D- α -aminofenyyliasetamido)-penisillanaatti	17 mg
	1'-pivaloyylioksimetyyli-6- $\angle$ (heksahydro-1H-atsepin-1-yyli)-metyleeniamino $\angle$ -penisillanaatti	17 mg
	Aluminiummonostearaatti	50 mg
	Tween-80 [®]	1,2 mg
	Maapähkinäöljyä	ad 100 mg
b)	1'-etoksikarbonyylioksietyyli-6-(D- α -aminofenyyliasetamido)-penisillanaattihydrokloridi	18 g
	1'-etoksikarbonyylioksietyyli-6- $\angle$ (piperidyyli-1)-metyleeniamino $\angle$ -penisillanaatti	18 g
	Natriumbentsoaatti	0,48 g
	Natriumkloridi	0,75 g

Makua parantavia lisäaineita	4,7	g
Aerosil ®	0,3	g
Antifoam ®	0,0375	g
Polysakkaridisulfiaattien alkalisuoloja	4,0	g
Natriumsakkarinaatti	0,4	g
Sorbitolia	ad	100 g

Esimerkki 15

Parenteraalisesti annettavan liuoksen valmistaminen

Steriiliin ampulliin (tilavuus 5 ml) kaadetaan 250 mg steriloitua 6- γ -(heksahydro-1H-atsepin-1-yyli)-metyleeniamino-7-penisillaanihappoa ja 250 mg steriloitua natrium-(D- α -aminofenyyliasetamido)-penisillanaattia. Juuri ennen lääkkeen antamista ampulli täytetään steriilillä vedellä.

Patenttivaatimus

Menetelmä antibakteerisen preparaatin valmistamiseksi, joka antaa pidennetyn ja tehostetun antibakteerisen vaikutuksen ja hidastetun bakteerien resistenssin kehittymisen, t u n n e t t u siitä, että sekoitetaan:

- a) tunnettua kliinisesti käyttökelpoista penisilliiniä, joka on valittu bentsyylipenisilliinin, α -karboksibentsyylipenisilliinin, 6-(D- α -aminofenyyli-asetamido)penisillaanihapon, 6-(D- α -amino-p-hydroksifenyyliasetamido)penisillaanihapon ja 6-(D- α -atsidofenyyliasetamido)-penisillaanihapon sekä näiden farmaseuttisesti hyväksyttävien estereiden ja suolojen joukosta, ja
- b) tunnettua kliinisesti käyttökelpoista penisilliiniä, joka on valittu 6- $\overline{[(\text{heksahydro-1H-atsepin-1-yyli})\text{metyleeniamino}]}$ penisillaanihapon, 6- $\overline{[(\text{piperidyyli-1})\text{metyleeniamino}]}$ penisillaanihapon ja 6- $\overline{[(\text{N,N-dietyyliformamidino})\text{-N'-amino}]}$ penisillaanihapon ja näiden farmaseuttisesti hyväksyttävien estereiden ja suolojen joukosta, sellaisin määrin, että saatu seos sisältää yhdisteitä a) ja b) painosuhteessa, joka vaihtelee 10:1 ja 1:10 välillä, ja haluttaessa lisätään farmaseuttisesti hyväksyttävää kantajaa.

Patentkrav

Förfarande för framställning av ett antibakteriellt preparat som ger förlängd och förhöjd antibakteriell effekt och förlångsammad utveckling av resistens hos bakterier, k ä n n e t e c k n a t av att man blandar:

- a) en känd klinisk användbar penicillin vald bland bensylpenicillin, α -karboxibensylpenisicillin, 6-(D- α -aminofenylacetamido)penicillansyra, 6-(D- α -amino-p-hydroxifenylacetamido)penicillansyra och 6-(D- α -azidofenylacetamido)-penicillansyra och farmaceutiskt acceptabla estrar och salter därav; och
- b) en känd kliniskt användbar penicillin vald bland 6- $\overline{[(\text{hexahydro-1H-azepin-1-yl})\text{-metylenamino}]}$ -penicillansyra, 6- $\overline{[(\text{piperidyl-1})\text{metylenamino}]}$ -penicillansyra och 6- $\overline{[(\text{N,N-dietylformamidino})\text{-N'-amino}]}$ -penicillansyra, och farmaceutiskt acceptabla estrar och salter därav; i sådana mängder att den erhållna blandningen innehåller föreningarna a) och b) i ett viktsförhållande som varierar mellan 10:1 och 1:10, och om så önskas tillsätter en farmaceutiskt acceptabelt bärare.