

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY

55613

Patent dodatkowy
do patentu _____

Kl. 12 p, 4/01

Zgłoszono: 13. XII. 1963 (P 103 247)

Pierwszeństwo: 14. XII. 1962

Wielka
Brytania

MKP C 07 d 99/24

Opublikowano: 20. IX. 1968

UKD

Współtwórcy wynalazku: Vincent Arkley, Stephen Eardley, Alan Gibson Long

Właściciel patentu: Glaxo Laboratories Limited, Greenford (Wielka Brytania)

Sposób wytwarzania pochodnej kwasu 7-aminocefalosporanowego

1

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania nowej pochodnej kwasu 7-aminocefalosporanowego (7-ACA) o wzorze 1.

Stwierdzono, że związek o wzorze 1 działa na bakterie gram-dodatnie i gram-ujemne oraz posiada na ogół dużą odporność na działanie gronkowców wytwarzających penicilinazy. Związek ten wykazuje także dużą trwałość w żywym ustroju i wysoki stopień rozpuszczalności w wodzie.

Według wynalazku związek o wzorze 1 wytwarza się przez reakcję pirydyny ze związkiem o wzorze 2, w którym R oznacza atom wodoru lub grupę 2-tienyloacetylową lub z jego solą rozpuszczalną w wodzie, w środowisku silnie polarnym, a następnie w przypadku, gdy R we wzorze 2 oznacza atom wodoru, przez 2-tienyloacetylowanie otrzymanego produktu.

Korzystnie reakcji z pirydyną poddaje się związek o wzorze 3, lub jego sól rozpuszczalną w wodzie, w silnie polarnym środowisku. Jako sole związku o wzorze 3, stosuje się np. sól sodową, potasową lub amonową. Najodpowiedniejszym środowiskiem jest woda, można jednak dodać rozpuszczalnika mieszającego się z wodą, takiego jak N,N-dwumetyloformamid, co jednak może obniżyć wydajność. Reakcję prowadzi się korzystnie w temperaturze co najmniej 15°C, lecz zasadniczo poniżej 70°C. Czas reakcji zależy od temperatury, można go jednak określić za pomocą wstępnej próby.

2

Korzystny stosunek reagentów wynosi około 1 równoważnika molowego związku o wzorze 3 na 1—10 równoważników molowych pirydyny. Wartość pH roztworu utrzymuje się w granicach 5—8, korzystnie w granicach 6—7. W razie potrzeby pH roztworu nastawia się na żadaną wartość przez dodawanie środka buforującego, takiego jak octan amonowy, a w przypadku stosowania soli metalu alkalicznego związku o wzorze 3, przez dodawanie np. kwasu octowego.

Produkt reakcji, zawierający np. nieprzereagowany związek o wzorze 3 i inne substancje, wyosabia się z mieszaniny reakcyjnej drogą krystalizacji, elektroforezy, chromatografii bibułowej lub zastosowania żywicy jonitowej.

Korzystnie postępuje się w ten sposób, że nadmiar pirydyny poddaje się reakcji ze związkiem o wzorze 3 w wodzie, aż do uzyskania optymalnej wydajności związku o wzorze 1. Nadmiar pirydyny i część nieprzereagowanego związku o wzorze 3 ekstrahuje się następnie rozpuszczalnikami organicznymi np. chlorkiem metylenu, a pozostały roztwór poddaje perkolacji na żywicy anionowej, np. pod postacią octanu, w celu usunięcia wolnych związków karboksylowych, łącznie z resztą nieprzereagowanego związku o wzorze 3. Pozostały roztwór zatęża się np. w wyparce obrotowej i suszy przez wymrażanie. Następnie osad przekrystalizowuje się z odpowiedniego rozpuszczalnika np.

metanolu i oczyszcza przez strącanie acetonem z roztworu metanolowego.

Związek o wzorze 3 wytwarza się przez reakcję kwasu 7-aminocefalosporanowego z czynnikiem 2-tienyloacetylującym. Takimi czynnikami są związki nadające się do 2-tienyloacetylowania aminoamidów, np. peptydów, takie jak halogenki 2-tienyloacetylu, zwłaszcza chlorek i bromek oraz mieszane bezwodniki pochodne np. kwasu 2-tienylooctowego oraz chlorowcomrówczanu alkilowego. Acylowanie prowadzi się korzystnie w środowisku wodnym np. w mieszącym się z wodą ketonie, jak aceton lub w wodnym roztworze czterowodorofuranu, korzystnie także w obecności czynnika wiążącego kwas, np. wodorowęglanu sodowego. Wartość pH w czasie reakcji korzystnie utrzymuje się w granicach 5–7, przy czym reakcję prowadzi się w temperaturze 0–25°C. Acylowanie można również prowadzić w rozpuszczalniku organicznym, np. octanie etylu, stosując np. ogrzewanie pod chłodnicą zwrotną.

Związek o wzorze 1 wytwarza się również przez reakcję pirydyny z kwasem 7-aminocefalosporanowym, przy czym otrzymuje się związek o wzorze 4, który następnie acyluje się czynnikiem 2-tienyloacetylującym. Reakcję tę prowadzi się zasadniczo w warunkach opisanych wyżej.

Związek o wzorze 4 można wytworzyć również ze związku o wzorze 5, metodami znanymi dla przeprowadzania cefalosporyny C w kwas 7-aminocefalosporanowy, to znaczy sposobem opisanym w brytyjskim opisie patentowym nr 953 695. Związek o wzorze 5 można wytworzyć z cefalosporyny C w reakcji z pirydyną, w sposób analogiczny jak opisany wyżej dla reakcji związku o wzorze 3 z pirydyną, to znaczy sposobem opisanym w brytyjskim opisie patentowym nr 912 541.

Nazwy związków cefalosporyny (z wyjątkiem kwasu 7-aminocefalosporanowego) wyprowadza się od nazwy substancji „cefam”, opisanej w J.A.C.S. 1962, 84, 3400.

Wytwarzany sposobem według wynalazku związek o wzorze 1 ma szeroki zakres aktywności w żywym ustroju (in vivo) przeciwko szczepom bakterii *Staph. aureus* (łącznie ze szczepami odpornymi na penicylinę), *Streptococcus pneumoniae*, *Strept. pyogenes*, *Strept. viridans*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Neisseria catarrhalis* oraz *N. gonorrhoeae*, *Clostridium septicum*, *Cl. welchii*, *E. coli*, *Salmonella typhi*, *S. typhimurium*, *S. paratyphi*, różne szczepy *Shigella* sp., *Proteus mirabilis*, *H. pertussis*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *L. pomona* i *L. canicola*. Stwierdzono również, że związek ten jest także bardzo odporny na penicilinazę gronkowcową, utrzymuje wysoki poziom surowicy w żywym ustroju i posiada dużo większą trwałość w żywym ustroju niż związek o wzorze 3 (jak wskazuje wysoki jego poziom w moczu) oraz większą rozpuszczalność w wodzie (około 20% wagowych w temperaturze około 20°C).

Związek o wzorze 1 wykazuje niższy stopień toksyczności ogólnoustrojowej u zwierząt doświadczalnych. Dożylnie i podskórnie podane dawki śmiertelne dla 50% przypadków (LD₅₀) wyniosły

u myszy 1,3 i 8,5 g/kg, a podskórna dawka LD₅₀ u szczurów wyniosła 5,5 g/kg. Pojedyncze dawki domięśniowe nie spowodowały ogólnoustrojowej, ani miejscowej toksyczności u królików (0,2 g/kg), 5 kotów (0,2 lub 1 g/kg), psów (0,1, 0,2 lub 0,5 g/kg) i małą (0,2 g/kg), przy czym myszy, szczury i koty przyjmowały bez zakłóceń doustne dawki odpowiednio 15, 3 i 0,1 g/kg. Histologiczne badanie miejsc wstrzyknięć wykazało, że związek ten jest 10 mniej niszczący niż sól sodowa penicyliny G. Nie stwierdzono śladów toksyczności nerkowej u królików, myszy, świnek morskich, małą i szczurów, którym wstrzykiwano związek w dawkach jednostkowych odpowiednio 50, 200, 200, 200 i 100 mg/kg. 15 Badanie funkcji nerek u kotów pod narkozą, którym wstrzyknięto ten związek dożylnie, wykazało, że substancję tę usuwało jedynie filtrowanie kłębkowe i że nie miała ona wpływu na przepływ osocza nerkowego, przejrzystość moczu lub zdolność 20 reabsorpcji glikozy. Badania podostrej toksyczności u myszy, szczurów, królików i kotów potwierdziły bardzo niską toksyczność związku.

W celu lepszego zrozumienia wynalazku podaje się poniżej przykłady dla jego zilustrowania. 25 Absorbpcja w nadfiolecie odnosi się do roztworów w wodzie lub wodnym, buforowym roztworze fosforanowym przy wartości pH = 6,0. Temperatury topnienia oznaczono w rurkach włoskowatych.

Chromatografię bibułową prowadzono na papierze Whatmana nr 1 z zastosowaniem jako buforu 30 0,1 n roztworu octanu sodowego przy wartości pH = 5.

Elektroforezę przeprowadzono na papierze Whatmana 3 MM przy gradiencie potencjału 30 V na 35 1 cm. Jako roztwory buforowe zastosowano: a) pH = 1,9 — 84 części objętościowych kwasu octowego, 17 części objętościowych kwasu mrówkowego, 105 części objętościowych acetonu i 495 części objętościowych wody; b) pH = 7 — 0,05 n roztwór wodorofosforanu dwusodowego, przy czym 40 wartość pH ustala się za pomocą kwasu fosforowego.

Fracje na bibułowych chromatogramach i elektroforetogramach występowały jako ciemne miejsca 45 przy naświetlaniu promieniami nadfioletowymi. W przypadku elektroforezy przy pH = 1,9 jony dwubiegunowe poruszały się jako kationy, natomiast nie poruszały się przy pH = 7.

Przykład I. a) kwas 7-2'-tienyloacetyloamido-cefalosporanowy. 50

5 g kwasu 7-aminocefalosporanowego przepuszczonego przez sito o średnicy oczek 0,107 mm (100 oczek/cal kwadratowy), zawieszono w 200 ml wrzącego octanu etylowego i dodano 4,42 g (1,5 55 mola) chlorku 2-tienyloacetylu (Cagniant, Bull, Soc. Chim. France, 1949, 847) w 20 ml octanu etylowego, po czym mieszaninę ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu 40 minut, a następnie ochłodzono i przesączono. Dodano 5,03 ml 60 aniliny i po upływie godziny mieszaninę ekstrahowano 1 × 150 ml, 2 × 100 ml i 1 × 50 ml 3% roztworu wodorowęglanu sodowego i alkaliczne ekstrakty wymyto trzy razy 100 ml porcjami octanu 65 etylowego. Następnie zakwaszono wodny roztwór

do wartości $\text{pH} = 1,2$ i ekstrahowano 2×150 ml octanu etylu. Uzyskany ekstrakt wymyto 4×40 ml wody, wysuszono nad siarczanem magnezowym i stężono w próżni do małej objętości, po czym odsączono 2,5 g wytrącającego się kwasu 7-2'-tienyloacetyloamidocefalospiranowego. Po odparowaniu przesączu uzyskano dalsze 2,68 g (łącznie 71%) surowego produktu, który oczyszczono przez krystalizację z octanu etylu i następnie wodnego roztworu acetonu; temperatura topnienia $156\text{--}157^\circ\text{C}$ (rozkład); λ max. 237 m μ (E 14,400), 261 m μ (E 8,900) $[\alpha]_D + 84^\circ$ (c, 0,5, dioksan); Sól sodową o temperaturze topnienia $204\text{--}205^\circ\text{C}$ (rozkład), $[\alpha]_D + 135^\circ$ (c, 1,0, H_2O) wytworzono traktując kwas w roztworze octanu etylowego 10% roztworem etylokapronianu sodowego w n-butanolu.

Dla $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{S}$ wyliczono: C = 45,9%; H = 3,6%; N = 6,7%; S = 15,3%;
znaleziono: C = 46,2%; H = 3,6%; N = 6,3%; S = 15,2%.

b) betainą kwasu 7-2'-tienyloacetyloamido-3-N-pirydynometylo- Δ^3 -cefemokarboksylowego-4.

10 ml pirydyny dodano mieszając do zawiesiny 5 g kwasu 7-2'-tienyloacetyloamidocefalospiranowego w 45 ml wody, uzyskując roztwór o wartości $\text{pH} = 6,5$. Roztwór ten pozostawiono 16 godzin w temperaturze 46°C w atmosferze azotu, po czym ekstrahowano 4×20 ml chlorku metylenu. Po stężeniu roztworu w wyparce obrotowej w temperaturze poniżej 40°C roztwór wprowadzono do kolumny, wypełnionej żywicą Dowex-1, przy czym produkt wprowadza się na szczyt kolumny i stosuje w niej obieg octanu etylu. Eluaty zawierające żadaną pochodną pirydynową (co stwierdzono polarymetrycznie) połączono i wysuszono przez wymrożenie. Roztarcie 1,75 g wysuszonego produktu stałego z metanolem dało wydzielenie stałego osadu w ilości 994 mg (19%) pochodnej pirydynowej w postaci białej substancji, λ max. 237 m μ (E $\frac{1}{1\text{ cm}}$ 365), λ (przebieg) 256 m μ (E $\frac{1}{1\text{ cm}}$ 328) $[\alpha]_D + 45^\circ$ (c, 0,64, woda).

Dla $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ wyliczono: C = 52,6%; H = 4,4%; N = 9,7%; S = 14,8%;
znaleziono: C = 52,3%; H = 4,4%; N = 9,8%; S = 14,4%.

Pozostały roztwór metanolowy stężono w wyparce obrotowej w temperaturze do 40°C i dodano do około 500 ml mieszanego mieszałem magnetycznym acetonu, dzięki czemu otrzymano dalszą ilość pochodnej pirydynowej (301 mg, 6%) w postaci jasnożółtej substancji λ max. 237 m μ (E $\frac{1}{1\text{ cm}}$ 288), λ (przebieg) 255 m μ (E $\frac{1}{1\text{ cm}}$ 207).

Przykład II. a) betaina kwasu 7-amino-3-N-pirydynometylo- Δ^3 -cefemokarboksylowego-4.

10 g kwasu 7-aminocefalospiranowego zawieszono w 1 litrze wody i dodano 40 ml pirydyny. Uzyskany roztwór o wartości $\text{pH} = 6,4$ utrzymywano w temperaturze 35°C w ciągu 60 godzin, po czym pozostawiono w ciągu 3 dni w chłodni. Następnie mieszaninę ekstrahowano 3×1 litrowymi porcjami chlorku metylenu, po czym warstwę wodną przypuszczono przez kolumnę $40 \times 3,3$ cm, wypeł-

nioną żywicą Dowex-1, pod postacią octanu o wartości $\text{pH} = 4,5$. Żywicę eluowano następnie 700 ml wody, aż do uzyskania zerowej skręcalności optycznej eluatu, który wymieszano następnie z nad-

miarem żywicy Dowex-50, aż do uzyskania wartości $\text{pH} = 2,5$. Żywicę odsączono, wymyto wodą do bezbarwnej płuczki i wymieszano w 250 ml wody, po czym pH roztworu nastawiono na wartość 7,0 przez dodawanie 7 n wodorotlenku amonowego. Po ponownym odsączeniu żywicy, wymyciu wodą i wysuszeniu połączonych płuczek przez wymrożenie, otrzymano surową próbkę 1,03 g (9,6%) betainy kwasu 7-amino-3-N-pirydynometylo- Δ^3 -cefemokarboksylowego-4 λ max. 255—256 m μ (E $\frac{1}{1\text{ cm}}$ 349,

E 10,150) ν_{max} 1760 (β -laktam) i 1605 cm ($-\text{CO}_2-$) R_f 0,25 (n-propanol, woda = 7:3). Elektroforeza przy wartości $\text{pH} = 1,9$ wykazała ruch kationu 6,3 cm względem naturalnego wyznacznika, przy gradencie potencjału 15,5 V/cm.

b) betaina kwasu 7-2'-tienyloacetyloamido-3-N-pirydynometylo- Δ^3 -cefemokarboksylowego-4.

Roztwór 10 mg betainy kwasu 7-amino-3-N-pirydynometylo- Δ^3 -cefemokarboksylowego-4 w 10 ml wody potraktowano nadmiarem (5 moli) chlorku tienylo-2-acetylu i mieszaninę wstrząsano w ciągu godziny w temperaturze pokojowej, po czym zabrano metodą chromatografii bibulowej (n-propanol i woda w stosunku 7:3) w systemie wstępującym i metodą elektroforezy przy wartości $\text{pH} = 1,9$. Stwierdzono obecność betainy kwasu 7-2'-tienyloacetyloamido-3-N-pirydynometylo- Δ^3 -cefemokarboksylowego-4 o $R_f = 0,66$. Związek wykazywał w elektroforezie ruch kationu 1,8 cm przy gradencie potencjału 15,5 V/cm, czyli zachowywał się identycznie jak substancja wytworzona w przykładzie I b i przyjęta jako wzorzec standardowy.

Właściwości biologiczne związku wytworzonego sposobem według wynalazku pokazuje tablica.
40 Szczepy Staph. aureus A i C były odporne na penicylinę, podczas gdy szczep B był wrażliwy na działanie penicyliny.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania pochodnej kwasu 7-aminocefalospiranowego o wzorze 1, **znamienny tym**, że związek o ogólnym wzorze 2, w którym R oznacza atom wodoru lub grupę 2-tienyloacetylową, względnie rozpuszczalną w wodzie sól tego związku wprowadza się w reakcję z pirydyną w silnie polarnym środowisku, po czym w przypadku gdy w wyjściowym związku o wzorze 2 R oznacza atom wodoru, do otrzymanego produktu wprowadza się grupę 2-tienyloacetylową.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że reakcji z pirydyną poddaje się związek o wzorze 3 lub jego sól rozpuszczalną w wodzie, w silnie polarnym środowisku.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w temperaturze powyżej 15°C .
4. Sposób według zastrz. 2 i 3, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w temperaturze nie przekraczającej 70°C .

5. Sposób według zastrz. 1—4, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w środowisku wodnym.
6. Sposób według zastrz. 1—4, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w środowisku wody i rozpuszczalnika organicznego mieszającego się z wodą.
7. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że jako mieszający się z wodą rozpuszczalnik organiczny stosuje się N,N-dwumetyloformamid lub aceton.
8. Sposób według zastrz. 2—7, **znamienny tym**, że reakcji poddaje się 1 równoważnik molowy związku o wzorze 3 z 1—10 równoważnikami molowymi pirydyny.
9. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że nadmiar pirydyny i część nieprzereagowanego związku o wzorze 3 ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym, a pozostały roztwór poddaje perkolacji przez żywicę jonitową w celu usunięcia związków karboksylowych łącznie

5

10

15

20

z resztą nieprzereagowanego związku o wzorze 3, a następnie roztwór zateża się i suszy przez wymrożenie, po czym z pozostałości po rozpuszczeniu w odpowiednim rozpuszczalniku, krystalizuje się lub wytrąca związek o wzorze 1.

10. Sposób według zastrz. 2—9, **znamienny tym**, że reakcję związku o wzorze 3 z pirydyną prowadzi się w środowisku o wartości pH = 5—8, korzystnie 6—7.

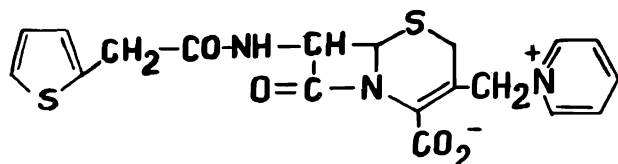
11. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że grupę tienyloacetylową wprowadza się przez tienyloacetylowanie związku o wzorze 5.

12. Sposób według zastrz. 1 i 11, **znamienny tym**, że tienyloacetyluje się związek o wzorze 5 otrzymany przez reakcję pirydyny z kwasem 7-aminocefalosporanowym.

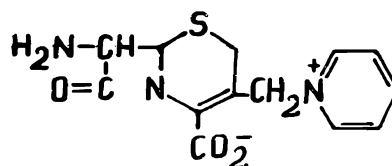
13. Sposób według zastrz. 12, **znamienny tym**, że tienyloacetylowanie prowadzi się za pomocą chlorku lub bromku 2-tienyloacetylu.

Tablica

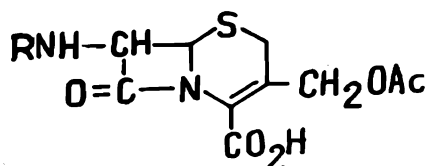
Przy- kład	Rurkowa próba rozcieńczenia (γ) ml						Myszy dawka skuteczna w 50 % przypadków (ED ₅₀) mg/kg Stosowanie podskórne	
	Gram — dodatnie			Gram — ujemne				
	Staph. aureus szczep A	Staph. aureus szczep B	Staph. aureus szczep C	E. coli	Staph. typhi- murium	Pr. mirabilis	Staph. aureus szczep B	E. coli
	I b	0,62	0,02	poniżej 0,5	8	4	8	2



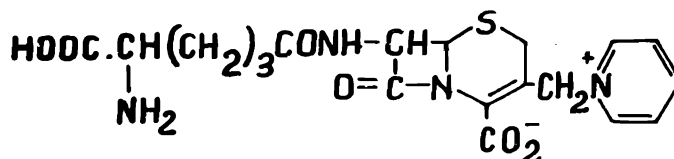
WZÓR 1



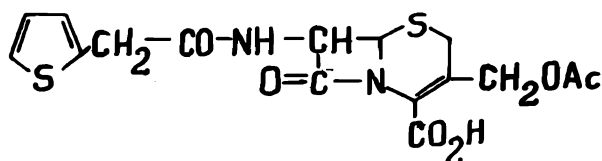
WZÓR 4



WZÓR 2



WZÓR 5



WZÓR 3