

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY

132 001

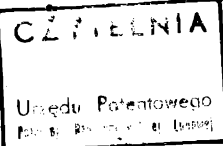
**Patent dodatkowy
do patentu —**

Zgłoszono: 81 09 17 (P. 233058)

Pierwszeństwo: 80 09 17 Stany
Zjednoczone Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 82 10 11

Opis patentowy opublikowano: 87 12 31



**Int. Cl.³ C07D 501/36
C07D 501/18
//A61K 31/545**

Twórca wynalazku: —

Uprawniony z patentu:

**Eli Lilly and Company, Indianapolis (Stany
Zjednoczone Ameryki)**

SPOSÓB WYTWARZANIA NOWYCH POCHODNYCH CEFALOSPORYN

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych pochodnych cefalosporyn.

Antybiotyki cefalosporynowe zawierające w pozycji 3 rozmaite heterocykliczne podstawniki tiometylowe są znane. Np. w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3 516 997 opisano tetrazolotio- i tiadiazolotio- podstawione cefalosporyny zawierające heterocykliczną grupę acyloaminową w pozycji 7. W opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3 641 021 opisano tetrazolotio- i tiadiazolotio- podstawione cefalosporyny zawierające w pozycji 7 podstawnik migdaloilowy lub fenyloglicylowy. W opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 4 110 535 opisano pewne związki cefalosporynowe zawierające w pozycji 3 podstawnik 3-ketopirydazyliotiometylowy. W opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 4 107 173 opisano związki cefalosporynowe podstawione w pozycji 3' grupą 3-sulfometylo-1,2,4-triazol-5-ilotiometylową. W opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 4 103 008 opisano związki cefalosporynowe podstawione w pozycji 7 grupą dwuketopiperazyn-1-ilorbonyloaminową, a w pozycji 3- podstawioną lub nie podstawioną grupą 1,3,4-tiadiazolo-2-ilotiometylową. W opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 4 101 656 opisano 7-acetyloamino- podstawione cefalosporyny zawierające w pozycji 3 podstawnik tetrazolotiometylowy, podstawiony grupą alkilosulfonamidoalkilową. W opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 4 100 346 opisano pewne o-aminofenyloacetamido- podstawione cefalosporyny zawierające w pozycji 3 podstawnik tetrazolotiometylowy podstawiony grupą karboksyetylową lub karboksypropylową. W opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 4 080 498 ujawniono 2-amino-1,2,4-triazoloacetamidocefalosporynę podstawioną w pozycji 3 heterocykliczną grupą tiometylową. W opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3 968 226 opisano liczne 3-heterocykliczne-tiometylo- podstawione cefalosporyny. W opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 4 082 912 ujawniono 7-acyloamidocefalosporyny ze sprzężoną heterocykliczną grupą /2-karboksyal kilo/-2,3-dwuwodoro-5-triazolo/[4,3-b]/-pirydazyn-3-on-6-ylo-metylową w pozycji 3.

W opisie patentowym Wielkiej Brytanii nr 1 525 626 opisano pewne związki cefalosporynowe zawierające w pozycji 3 podstawnik 1-karboksymetylo-1H-tetrazol-5-ilotiometylowy. W opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3 985 739 opisano 7-fenyloglicylo- lub 7-migdaloiilo-podstawione cefalosporyny, podstawione w pozycji 3 grupą 1,3,4- lub 1,2,3-triazolotiometylową. W opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3 985 738 opisano 7-migdalamidocefalosporyny zawierające w pozycji 3 podstawnik tetrazolo[4,5-b]pirydazyn-6-yliotiometylowy. W opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3 966 719 ujawniono związki cefalosporynowe, w których grupa 4-karboksylowa zastąpiona jest grupą tetrazol-5-ilową.

3-heterocyklotiolo-podstawione metylocefalosporyny na ogół wytwarza się przez zastąpienie grupy acetoksylowej 3-acetoksymetylo-3-cefemu, lub chlorowca 3-chlorowcometylo-3-cefemu, żądanym heterocyklicznym tiolem. W opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 4 144 391 opisano niezawodny sposób podstawiania zastosowany do wytwarzania 3-heterocyklotiometylo-podstawionych cefalosporyn.

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania antybiotyków cefalosporynowych o szerokim spektrum działania, różniących się budową od znanych cefalosporyn. W szczególności, wynalazek obejmuje swym zakresem sposób wytwarzania 7-amino i 7-acyloaminocefalosporyn podstawionych w pozycji 3 pierścienia dwuwodorotriazyny grupą bis-tetrazolilometylową.

7-aminocefalosporyny wytwarzane sposobem według wynalazku są podstawione w pozycji 3 1-/1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H-tetrazol-5-ilotiometylową o wzorze 13, lub grupą 2-/1H-tetrazol-5-ilometylo/-2H-tetrazolil-5-ilotiometylową o wzorze 14, w których to wzorach R_4 oznacza atom wodoru lub grupę C_1-C_5 -alkilową i stanowią antybiotyki o szerokim spektrum działania, hamujące wzrost drobnoustrojów chorobotwórczych dla człowieka i zwierząt. Związki te są użyteczne przy podawaniu pozajelitowym w odpowiednich dawkach i postaciach farmaceutycznych. Związki wytwarzane sposobem według wynalazku, w których podstawnikiem w pozycji 3 jest grupa 1-/1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H-tetrazol-5-ilotiometylowa, zachowując u zwierząt skuteczny poziom we krwi przez dłuższy czas.

Sposób wytwarzania związków cefalosporynowych o wzorze 1, w którym R_3 oznacza ugrupowanie o wzorze 2, w którym R_4 oznacza atom wodoru lub grupę C_1-C_3 -alkilową, R oznacza atom wodoru lub grupę acylową pochodzącą od kwasu karboksylowego o wzorze 5, R_1 oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą grupę karboksylową, dającą się łatwo usunąć na drodze hydrolizy lub hydrogenolizy, a R_2 oznacza atom wodoru lub grupę metoksyloową, według wynalazku polega na tym, że poddaje związek o wzorze 3, w którym R, R_1 i R_2 mają wyżej podane znaczenie, a R_{10} oznacza grupę C_1-C_4 -acyloksylową lub atom chlorowca, reakcji z bis-tetrazolometylotiolem o wzorze 4, w którym R^4 ma wyżej podane znaczenie, ewentualnie w postaci soli, w środowisku rozpuszczalnika organicznego i ewentualnie gdy R_1 nie oznacza atomu wodoru, usuwa się grupę ochraniającą grupy karboksylowej i ewentualnie gdy R_1 oznacza atom wodoru otrzymany związek przeprowadza się w farmaceutycznie dopuszczalną sól.

Określenie "grupa acylowa pochodząca od kwasu karboksylowego" odnosi się do reszty acylowej przyłączonej w pozycji 6 i 7 łańcucha bocznego podstawników acyloaminowych znanych antybiotyków penicylinowych i cefalosporynowych. Przykładami kwasów karboksylowych dostarczających takich grup acylowych są kwasy tioenooctowe, oksymy kwasu furanoglioksalowego i 2-amino-1,3-tiazologlioksalowego, oraz pochodne ich funkcji oksyiminowej, takie jak niskoalkilowe pochodne oksymu, np. pochodne metoksyiminowe lub etoksyiminowe.

We wzorze ogólnym 1 i 3 R_1 oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą grupę karboksylową, łatwą do usuwania w warunkach hydrolizy lub hydrogenolizy. Grupy takie są dobrze znane w dziedzinie chemii cefalosporyn i należą do nich łatwo odszczepialne grupy estrowe, takie jak grupa benzylowa, dwufenylometylowa, p-nitrobenzylowa, p-metoksybenzylowa, fenacylowa, chlorowcowana fenacylowa, chlorowcoalkilowa, taka jak jodometylowa, 2,2,2-trójchloroetylowa i 2,2,2-trójbromoetylowa, rozgałęzione estry alkilowe, alkenylowe i alkinyłowe, takie jak ester III-rzęd. butylowy, 3-metylobut-1-en-3-ylowa i izopentenylowa.

W przypadku, gdy we wzorze ogólnym 1 i 3 R_1 oznacza atom wodoru, związki wytwarzane sposobem według wynalazku można przekształcać w farmaceutycznie dozwolone sole, takie jak sole metali alkalicznych i sole metali ziem alkalicznych, np. sól sodową, sól potasową, sól litową i sól wapniową, sole z aminami, np. sole utworzone z farmaceutycznie dozwolonymi aminami, takimi jak prokaina, abietiloamina, etanoloaminy, takie jak jednoetanoloamina i dwuetanoloamina i podobne sole z aminami i sole metali, oraz sole amoniowe. Sole te można formułować w farmaceutycznie użyteczne dawki i postaci do pozajelitowego podawania antybiotyku.

Korzystnymi związkami wytwarzanymi sposobem według wynalazku są związki o wzorze ogólnym 1, w którym symbol R_3 oznacza grupę 1-/1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H-tetrazol-5-ilową, w której grupa HN końcowego tetrazolu może być podstawiona grupą C_1-C_3 -alkilową.

Dalszą korzystną grupę związków wytwarzanych sposobem według wynalazku stanowią związki przedstawione wzorem ogólnym 1, w którym R oznacza atom wodoru lub grupę acylową o wzorze 5, gdzie R_5 oznacza grupę o wzorze 6, albo R oznacza grupę o wzorze 7, albo R oznacza grupę oksymino-podstawioną o wzorze 8, w którym R_6 oznacza grupę o wzorze 9 lub 10, a R_7 oznacza grupę C_1-C_4 -alkilową, R_1 oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą grupę karboksylową, R_2 oznacza atom wodoru lub grupę metoksylową, R_3 oznacza grupę bis-tetrazolilometylową o wzorze 11 lub 12, w których to wzorach R_4 oznacza atom wodoru lub grupę C_1-C_3 -alkilową, a w przypadku gdy R_1 oznacza atom wodoru, ich farmaceutycznie dopuszczalne sole.

Związki wytwarzane sposobem według wynalazku charakteryzują się normalną stereochemią antybiotyków cefalosporynowych, to znaczy łańcuch boczny w pozycji 7, podstawnik o symbolu R ma konfigurację β , a grupa 7-metoksylowa o symbolu R_2 ma konfigurację α .

Bis-tetrazolometylo-podstawione cefalosporyny wytwarzane sposobem według wynalazku przekształcać można poddając reakcji kwas 7-aminocefalosporanowy (7-ACA) z odpowiednim bis-tetrazolometylotiolem w celu utworzenia kwasu 7-amino-3-bis-tetrazolometylotiometylo-3-cefemo-4-karboksylowego. Alternatywnie, kwas 7-acyloamino-cefalosporanowy można poddać reakcji z odpowiednim bis-tetrazolometylotiolem w celu otrzymaniażądanego związku.

Sposobem według wynalazku wytwarza się również rdzeń bis-tetrazolometylotiometylo-podstawionej cefalosporyny, zawierającej w pozycji 7 grupę aminową. Ten związek zawierający rdzeń 7-aminowy jest użyteczny przy wytwarzaniu 7-acyloaminocefalosporyn.

Związki zawierające rdzeń 7-amino-3-/bis-tetrazolometylowy o wzorach 15 i 16 wytwarza się przy użyciu kwasu 7-aminocefalosporanowego (7-ACA). Przy wytwarzaniu związków o tego rodzaju rdzeniu, poddaje się kwas 7-aminocefalosporanowy, lub jego ester, reakcji z 1-/1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H-tetrazol-5-tiolem lub 2-/1H-tetrazol-5-ilometylo/-2H-tetrazol-5-tiolem, w wyniku czego powstają związki o wspomnianych wzorach. Reakcję tę, której rezultatem jest zastąpienie grupy acetoksylowej w pozycji 3 7-ACA grupą bis-tetrazolometylotiolową, można przeprowadzić w warunkach niewodnych wtedy, kiedy we wzorach 16 i 15 R_1 oznacza atom wodoru lub ester, natomiast w obecności wody, gdy R_1 oznacza atom wodoru.

W warunkach niewodnych otrzymywanie związków z rdzeniem takim jak na wspomnianych wzorach dokonuje się w sposób następujący. Kwas 7-aminocefalosporanowy poddaje się reakcji z bis-tetrazolometylotiolem w temperaturze od około 25°C do około 80°C, w środowisku kwasu octowego lodowatego w obecności związku trójfluorku boru z eterem. Reakcja zachodzi z dogodną szybkością w temperaturze około 60-80°C, a wyższe wydajności uzyskuje się w przypadku użycia tiolu w nadmiarze. Po zejściu reakcji mieszaninę rozcieńcza się wodą i pH doprowadza do punktu izoelektrycznego charakterystycznego dla wolnego kwasu o podstawionym rdzeniu. W punkcie izoelektrycznym, przy pH około 4,0-5,0 produkt wytrąca się z mieszaniny reakcyjnej.

Zastąpienia grup w warunkach wodnych dokonuje się w następujący sposób. Wodny roztwór 7-ACA przy zasadowym pH około 7,0-9,0 miesza się z roztworem bis-tetrazolometylotioliu w postaci soli sodowej lub potasowej i mieszaninę reakcyjną miesza się przy łagodnym ogrzewaniu.

Otrzymaną mieszaninę reakcyjną zakwasza się kwasem mineralnym, takim jak kwas solny, do osiągnięcia punktu izoelektrycznego. 3-podstawiony 7-aminozwiązek w postaci wolnego kwasu wytrąca się z mieszaniny reakcyjnej i zostaje wyodrębniony za pomocą odsączenia. Podstawiony rdzeń można oczyścić, jeśli jest to potrzebne, przez krystalizację z odpowiedniego rozpuszczalnika, albo, alternatywnie, poprzez jego sól, taką jak chlorowodorek lub tosyłan.

3-podstawione 7-aminozwiązki przedstawione wzorami 15 i 16 są wartościowymi związkami pośrednimi użytecznymi przy wytwarzaniu antybiotyków. Jak wyżej zauważono, grupę 7-aminową rdzenia można zacylować żądanym kwasem karboksylowym, a korzystnie jego aktywną pochodną. N-acylowanie powyższego 7-aminopodstawionego rdzenia jest reakcją między kwasem karboksylowym a związkiem aminowym i można ją przeprowadzić metodami acylowania stosowanymi przy acylowaniu rdzenia 7-aminocefalosporynowego, takiego jak 7-ACA i 7-ADCA.

W innym przykładzie realizacji sposobu według wynalazku kwas 7-acyloamino-3-acetoksymetylo-3-cefemo-4-karboksylowy o wzorze 17, w którym R oznacza grupę acylową zdefiniowaną wyżej przy omawianiu budowy związku o wzorze 1, poddaje się reakcji z bis-tetrazolometylotiolem o wzorze 4, w którym R_4 oznacza atom wodoru lub grupę C_1-C_3 -alkilową, w wyniku czego tworzy się związek o wzorze 1. Reakcję można prowadzić w temperaturze od około 20°C do około 75°C w warunkach wodnych, w pH od około 7 do około 9, korzystnie w obecności mieszającego się z wodą rozpuszczalnika organicznego, takiego jak acetonitryl lub czterowodorofuran.

Powyższą reakcję można także prowadzić w warunkach niewodnych postępując zgodnie ze sposobem opisanym w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 4 144 391.

Związki o wzorze 1, w którym R_2 oznacza grupę metoksyłową, wytwarza się przez zastąpienie grupy 3-acetoksyłowej kwasu 7-acyloamino-7-metoksycefalosporynowego, albo przez zastąpienie 3'-chlorowcowej grupy estru kwasu 7-acyloamino-7-metoksy-3-chlorowcometylo-3-cefemo-4-karboksylowego.

Kwas 7-acyloamino-7-metoksy-3-acetoksymetylo-3-cefemo-4-karboksylowy można poddać reakcji z bis-tetrazolometylotiolem w celu wytworzenia omawianego związku zgodnie ze sposobami opisanymi w powyższej części opisu w przypadku cefalosporyn niemetaksyloowanych.

Jeszcze inny alternatywny sposób realizacji wynalazku prowadzący do wytwarzania 7-metoksycefalosporyn o wzorze 1 polega na tym, że poddaje się ester kwasu 7-acyloamino-7-metoksy-3-bromometylo-3-cefemo-4-karboksylowego reakcji z bis-tetrazolometylotiolem, w wyniku czego otrzymuje się omawiany związek. I tak, ester p-nitrobenzylowy kwasu 7-(2-tienyloacetamido)-7-metoksy-3-bromoetylo-3-cefemo-4-karboksylowego poddaje się reakcji z 1-(1H-tetrazolo-5-ilometylo)-1H-tetrazol-5-tiolem, użytym w molowym nadmiarze, w środowisku dwumetyloformamidu, w temperaturze pokojowej, w wyniku czego otrzymuje się ester p-nitrobenzylowy kwasu 7-(2-tienyloacetamido)-7-metoksy-3-(1-(1H-tetrazol-5-ilometylo)-1H-tetrazol-5-ilometylo)-3-cefemo-4-karboksylowego. W rezultacie odszczepienia estrowej grupy p-nitrobenzylowej otrzymuje się związek o wzorze 1, w którym R_1 oznacza atom wodoru. Odszczepienie estrowej grupy p-nitrobenzylowej prowadzi się znanymi metodami rozszczepienia połączonego z redukcją, takiego jak hydrogenoliza katalityczna z użyciem 5% katalizatora palladowego na węglu w środowisku rozpuszczalnika obojętnego, takiego jak czterowodorofuran lub acetonitryl, lub rozszczepienie elektrolityczne połączone z redukcją przy katodzie rtęciowej o dużej powierzchni.

Przy wytwarzaniu 7-metoksypodstawionych cefalosporyn sposobem według wynalazku można także użyć innych łatwych do usunięcia grup estrowych zabezpieczających grupę karboksylową. Np. dobrze znanymi w tej dziedzinie techniki grupami zabezpieczającymi grupę karboksylową są: estrowa grupa dwufenylo-metylowa i grupa p-metoksybenzylowa, przy czym obie one dają się usunąć przez poddanie estru działaniu kwasem trójfluorooctowym w obecności anizolu, korzystnie w temperaturze od około 0°C do około 10°C. Zastosować można także inne grupy estrowe, takie jak grupy chlorowcoalkilowe, np. grupa 2,2,2-trójchloroetylowa i grupa 2-jodoetylowa, które usuwa się przez redukcję cynkiem z użyciem kwasu.

Tetrazole o wzorze ogólnym 4, w którym R_4 oznacza grupę C_1-C_3 -alkilową, wytwarza się za pomocą alkilowania odpowiednich S-zabezpieczonych izomerycznych tetrazoli bromkiem lub jodkiem C_1-C_3 -alkilu w obecności zasady. W rezultacie alkilowania otrzymuje się mieszaninę izomerów, które można oddzielić od siebie metodą HPLC. Po rozdzieleniu poszczególnych izomerycznych tetrazoli lub produktów ich alkilowania, jak wyżej opisano, grupę S-zabezpieczającą, taką jak grupa benzylowa, usuwa się z tiolu za pomocą redukcji elektrolitycznej przy użyciu katody rtęciowej o dużej powierzchni.

Alternatywnie, 1-[1- C_1-C_3 -alkilo/-1H-tetrazol-5-ilometylo]-1H-tetrazolo-5-tiol wytwarza się przy użyciu 5-chloro-1H-tetrazolo-1-octanu etylu. Octan 5-chlorotetrazolu poddaje się reakcji z C_1-C_3 -alkiloaminą, w wyniku czego otrzymuje się odpowiedni N- C_1-C_3 -alkilo/amid. Następnie otrzymany amid poddaje się reakcji z fosgenem użytym w nadmiarze, w temperaturze od około -5°C do około 10°C , w środowisku rozpuszczalnika obojętnego, takiego jak pochodna chlorowcowa węglowodoru, np. chlorek metylenu lub dwuchloroetan, w wyniku czego otrzymuje się odpowiedni N-chlorokarbonylo-N- C_1-C_3 -alkilo/amid. Następnie otrzymany N-chlorokarbonyloamid poddaje się reakcji z azydkiem czterometyloguanidynowym w środowisku dioksanu w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną, w wyniku czego otrzymuje się 1-[1- C_1-C_3 -alkil/-1H-tetrazol-5-ilometylo]-5-chloro-1H-tetrazol, po czym otrzymany związek poddaje się reakcji z wodorosiarczkiem sodowym w celu zastąpienia grupy 5-chloro grupą tiolową.

Korzystną grupę związków wytwarzanych sposobem według wynalazku przedstawia wzór ogólny 18, w którym R_6 oznacza grupę o wzorze 9 lub 10, a R_7 grupę C_1-4 alkilową.

Szczególnie korzystne są te związki o wzorze ogólnym 18, w którym R_7 oznacza grupę C_1-C_3 -alkilową, a R_4 oznacza atom wodoru, a zwłaszcza te związki, w których wzorze R_6 oznacza grupę 2-furylową lub 2-amino-1,3-tiazol-4-ilową lub jej tautomeryczną odmianę 2-iminową, jak przedstawiono na wspomnianym wzorze strukturalnym. Jest rzeczą wiadomą, w tej dziedzinie techniki, że funkcja izonitrozowa w łańcuchu bocznym występować może albo w konfiguracji syn albo anti, oraz, że związki o konfiguracji syn są korzystniejsze, dzięki ich wzmożonej aktywności, od związków anti. Przykładami korzystnych związków są: kwas syn-7 β -[α -metoksyimino- α -2-amino-1,5-tiazol-4-ilo/-acetamido]-3-[1-1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H-tetrazol-5-ilotiometylo]-3-cefamo-4-karboksylowy oraz kwas 7- β -[2-tienyloacetoamido/-3-[1-1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H-tetrazol-5-ilotiometylo]-3-cefemo-4-karboksylowy.

Bis-tetrazolotiometylo-podstawione cefalosporyny wytwarzane sposobem według wynalazku są antybiotykami o szerokim spektrum działania, hamującymi wzrost zarówno Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych drobnoustrojów patogennych dla człowieka i zwierząt. Przeciwbakteryjną aktywność tych związków wykazano in vitro metodą rozcieńczeniową w agarze. W poniższej tabelicy 1 przedstawiono najmniejsze stężenie hamujące reprezentatywnych związków wytwarzanych sposobem według wynalazku.

T a b l i c a 1

Aktywność przeciwbakteryjna bis-tetrazoilometylo podstawionych cefalosporyn in vitro

Związek badany ¹

Najmniejsze stężenie hamujące ($\mu\text{g/ml}$)

Drobnoustrój	Szczep	A	B	C	D	E	F
1	2	3	4	5	6	7	8
Staphylococcus aureus	XI.1	2	0,5	1	4	2	4
"	V41	2	2	8	8	4	8
"	X400	16	32	128	>128	>128	>128
"	S13E	8	4	16	16	8	32
Staphylococcus epidermidis	EPI1	16	4	8	16	8	32
"	EPI1	8	4	32	64	32	64

od. tablicy 1 na str. 6

c.d. tablicy 1

1	2	3	4	5	6	7	8
Streptococcus Group A	C203	0,5	1	0,5	0,06	0,03	0,03
Streptococcus pneumoniae	PARK	4	2	0,25	0,03	0,015	0,03
Streptococcus Group D	X66	64	128	>128	>128	>128	>128
"-	9960	>128	64	128	16	16	>128
Haemophilus influenzae	Brun ²	--	--	4	0,125	0,125	0,06
"-	251 ³	--	--	4	0,125	0,125	0,06
"-	C.L. ²	0,25	1	--	--	--	--
"-	76 ³	0,25	0,5	--	--	--	--
Shigella sonnei	N9	8	4	1	0,125	0,125	2
Escherichia coli	N1C	8	4	2	0,25	0,25	0,25
"-	EC14	4	2	0,25	0,06	0,06	0,125
"-	TEM	4	8	8	0,125	0,125	0,125
Klebsiella sp.	X26	1	0,5	2	0,06	0,06	0,125
"-	KAE	4	>128	>128	16	4	8
Enterobacter aerogenes	X68	4	0,5	0,25	0,06	0,125	0,06
"-	C32	>128	32	4	0,25	0,125	0,25
"-	EB17	>128	16	2	0,25	0,25	0,25
"- cloacae	EB5	>128	>128	128	2	1	2
"-	265A	>128	>128	>128	64	32	64
Salmonella sp.	X514	1	0,5	1	0,125	0,25	0,125
"-	1335	2	1	2	0,25	0,5	0,5
Pseudomonas aeruginosa	X528	128	128	128	8	32	16
"-	X239	128	128	128	16	32	16
"-	Bs18	128	128	128	8	32	32
Serratia marcescens	X93	16	128	32	0,25	0,125	0,25
"-	SE3	64	128	128	1	0,5	2
Proteus morgani	FR15	64	64	2	0,06	0,125	0,5
Proteus inconstans	FR33	4	64	2	0,125	0,5	1
Proteus rettgeri	FR7	4	4	4	0,125	0,03	0,03
"-	C24	1	8	0,5	0,125	0,25	2
Citrobacter freundii	CF17	128	128	128	32	16	64
Bordetella bronchiseptica	16	128	8	16	32	128	64

W powyższej tablicy 1 użyto następujących oznaczeń:

- 1) A. Kwas 7 β -2-tienyloacetamido/-7 α -metoksy-3-[1-/1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H-tetrazol-5-ilotiometylo]-3-cefemo-4-karboksylowy.
- B. Kwas 7 β -2-tienyloacetamido-3-[1-/1-metylo-1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H-tetrazol-5-ilotiometylo]-3-cefemo-4-karboksylowy,
- C. Kwas 7 β -D-O-formylomigdalamid/-3-[1-/1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H-tetrazol-5-ilotiometylo]-3-cefemo-4-karboksylowy,

- D. Kwas syn- 7β - $[\alpha$ -metoksyimino- α -/2-amino-1,3-tiazol-4-ilo/acetamido]-3- $[\gamma$ -/1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H-tetrazol-5-ilotiometylo]-3-cefemo-4-karboksyowy,
 E. Kwas syn- 7β - $[\alpha$ -metoksyimino- α -/2-amino-1,3-tiazol-4-ilo/acetamido]-3- $[\gamma$ -/1-metylo-1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H-tetrazol-5-ilotiometylo]-3-cefemo-3-karboksyowy,
 F. Kwas syn 7β - $[\alpha$ -metoksyimino- α -/2-amino-1,3-tiazol-4-ilo/-acetamido]-3- $[\gamma$ -/2-1H-tetrazol-5-ilometylo/-2H-tetrazol-5-ilotiometylo]-3-cefemo-4-karboksyowy.

- 2) Szczep H. influenzae wrażliwy
 3) Szczep H. influenzae oporny.

Dane zamieszczone w tablicy 1 otrzymano metodą rozcieńczeniową w agarze z użyciem agaru Muellera-Hintona zawierającego 2% Supplement C (Difco). Wykonano dwukrotnie seryjne rozcieńczenie z najwyższym stężeniem wynoszącym w tym badaniu 128 μ g/ml.

Związek D z tablicy 1, korzystny związek wytwarzany sposobem według wynalazku, podawano myszom zakażonym różnymi patogenami w celu oznaczenia skutecznej dawki związku (ED_{50}). Otrzymane wartości ED_{50} zamieszczono w poniższej tablicy 2 ze wskazaniem drobnoustrojów zakażających.

T a b l i c a 2
 Aktywność związku E in vivo w organizmie myszy

Bateria (szczep)	ED_{50} (mg/kg x 2) s.c. ¹
Escherichia coli (EC14)	0,16
Proteus vulgaris (PV26)	0,12
Serratia marcescens (SE3)	1,0
Staphylococcus aureus (3055)	7,6
Streptococcus pyogenes (0203)	0,21

W powyższej tablicy 2 użyto następujących oznaczeń:

- 1) Dawki podane podskórnie po 1 i 5 godzinach po zakażeniu.

Związek D okazał się również skuteczny w leczeniu zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych spowodowanego przez odporne na ampicylinę bakterie Haemophilus influenzae u noworodków szczurzych. Stwierdzono, że związek E obecny jest w płynie mózgowo-rdzeniowym szczurów po podaniu związku podskórnie w dawce 20 mg/kg.

Związki wytwarzane sposobem według wynalazku są skuteczne w leczeniu różnych chorób człowieka i zwierząt po pozajelitowym podaniu skutecznej dawki od około 50 mg/kg do około 500 mg/kg. Związki można podawać domięśniowo lub dożylnie w odpowiednich postaciach farmaceutycznych. Preparaty do podawania domięśniowego można przygotowywać jałowo w postaci odpowiednich soli związków wytwarzanych sposobem według wynalazku, np. w postaci soli sodowej w rozcieńczalniku farmaceutycznym takim, jak woda do iniekcji, fizjologiczny roztwór soli lub odpowiednia farmaceutycznie dozwolona zaróbka olejowa, taka jak ester długołańcuchowego kwasu tłuszczowego, np. oleinian etylu. Do podawania dożylnego, przygotowuje się związek otrzymany sposobem według wynalazku w postaci farmaceutycznie dozwolonej soli w płynie fizjologicznym, takim jak roztwór Rignera, 5% roztwór glukozy lub inny odpowiedni płyn fizjologiczny. Jak to zazwyczaj spotyka się przy leczeniu antybiotykami, ilość podawanego antybiotyku zależy głównie od stopnia zakażenia, wrażliwości określonego pacjenta i typu drobnoustroju lub drobnoustrojów, wywołującego zakażenie. Zazwyczaj związki podaje się 2-4 razy dziennie w trakcie leczenia zakażenia.

Wynalazek objaśniają następujące przykłady.

W przykładach tych użyto aparatury do cieczowej chromatografii ciśnieniowej (HPLC) i, jeśli tego nie zaznaczono inaczej, kolumny (żel krzemionkowy) Waters and Associates Model 500.

Widma jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) otrzymano na spektrometrze Varian Associates Model T-60, a oprócz tego w celu uzyskania widm do 90 MHz użyto aparatu Jeol Model FX-900, a do 100 MHz - Jeol Model PFT-100. Jako standardu w widmach NMR użyto trójmetrylosilanu (TMS). Skrótory użyte przy przedstawianiu widm NMR są następujące: s = singlet, q = kwartet, m - multiplet, d - dublet, t = tryplet.

W przykładach użyto następujących skrótów odnoszących się do określonych rozpuszczalników:

THF = czterowodorofuran,
DMF = dwumetyloformamid,
DMAC = dwumetyloacetamid,
MSA = trójmetrylosililoacetamid,
BSA = bis-trójmetrylosililoacetamid.

P r z y k ł a d I. Otrzymanie kwasu 7-amino-3-[1-/1-metylo-1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H-tetrazol-5-ilotiometylo]-3-cefemo-4-karboksylowego.

Roztwór 1,54 g kwasu 7-aminocefalosporanowego i 1,0 g 1-/1-metylo-1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H-tetrazol-5-tiolu w 7,0 ml kwasu octowego lodowatego ogrzewa się w łaźni olejowej do temperatury około 65-70°C. Do otrzymanej gorącej mieszaniny reakcyjnej dodaje się 3,6 ml związku trójfluorku boru z eterem, po czym mieszaninę reakcyjną ogrzewa się w temperaturze 65-70°C przy mieszaniu w ciągu 1 godziny. Następnie mieszaninę reakcyjną oziębia się do temperatury pokojowej i dodaje 10 ml wody. Otrzymaną mieszaninę reakcyjną miesza się w ciągu 15 minut licząc od dodania wody, po czym sączy, a następnie oziębia w łaźni lodowej, pH otrzymanej zimnej mieszaniny doprowadza się do 4,5 stężonym wodorotlenkiem amonowym i utworzony osad odsącza, po czym przemywa wielokrotnie wodą, acetonem i w końcu eterem etylowym. Otrzymane ciało stałe o barwie białawej suszy się pod zmniejszonym ciśnieniem w ciągu 1 godziny w temperaturze 40°C, w wyniku czego otrzymuje się 1,5 g (80% wydajności) związku tytułowego.

Dla otrzymanego związku otrzymano następujące dane analityczne. Analiza elementarna.

Obliczono dla $C_{12}H_{14}N_{10}O_3S_2$: C 35,12; H 3,44; N 34,13; S 15,62.
Znaleziono: C 35,62; H 3,53; N 31,63; S 14,52.
IR (KBr): absorpcja grupy karbonylowej przy 1800 cm^{-1} NMR (T-60, $NaHCO_3/D_2O$) δ : 4,1 (s, 3H, N-metyl), 4,9 (d, 1H, wodór przy C-6), 5,95 (s, 2H, grupa metylenowa łącząca grupy tetrazolilowe) ppm.

P r z y k ł a d II. Otrzymywanie kwasu 7-amino-3-[1-/1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H-tetrazol-5-ilotiometylo]-3-cefemo-4-karboksylowego.

Zawiesinę 5,3 g (29 milimoli) 1-/1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H-tetrazol-5-tiolu i 6,8 g (25 milimoli) kwasu 7-aminocefalosporanowego zawiesza się w 38 ml kwasu octowego lodowatego i otrzymaną zawiesinę ogrzewa się w temperaturze od około 62°C do około 65°C w łaźni olejowej. Do otrzymanej gorącej zawiesiny dodaje się 16,6 ml związku trójfluorku boru z eterem (przedestylowanego), w wyniku czego uzyskuje się niemal całkowite rozpuszczenie. Otrzymaną mieszaninę ogrzewa się przy mieszaniu w ciągu 1 godziny w temperaturze od około 60°C do około 65°C. Mieszaninę reakcyjną oziębia się i miesza w ciągu 1 godziny w temperaturze pokojowej, po czym dodaje 45 ml wody. Następnie rozcieńczoną mieszaninę reakcyjną oziębia się do temperatury 0°C, po czym pH doprowadza do 4,0 stężonym wodorotlenkiem amonowym. Wytrącony osad przemywa się wodą, acetonem i eterem etylowym, po czym suszy w suszarce próżniowej w ciągu 2 godzin w temperaturze 50°C. Otrzymuje się 8,0 g tytułowego związku (wydajność 88%) w postaci proszku o barwie jasnobiałej.

NMR (T-60, wodorowęglan sodowy (D_2O)) δ : 4,3 (m, 2H, C-3 metylenu) i 5,9 (s, 2H, metylen łączący pierścienie tetrazolowe) ppm.

P r z y k ł a d III. Otrzymanie kwasu 7- β -[α -metoksyimino- α -/2-amino-1,3-tiazol-4-ilo/acetamido]-3-[2-/1H-tetrazol-5-ilometylo/-2H-tetrazol-5-ilotiometylo]-3-cefemo-4-karboksylowego.

Do roztworu 202 mg (1,1 milimola) 2-/1H-tetrazol-5-ilometylo/-2H-tetrazol-5-tiolu w 6 ml buforu o pH 7 (roztwór uzyskany z użyciem 176 mg, 2,1 milimola, wodorowęglanu sodowego) dodaje się 460 mg (1 milimol) kwasu 7- β -[α -metoksyimino- α -/2-amino-1,3-tiazol-4-ilo/-acetamido]-3-cefalosporanowego. Otrzymany roztwór ogrzewa się w łaźni olejowej w ciągu 22 godzin w temperaturze od około 55°C do około 60°C. Po upływie tego czasu badanie mieszaniny reakcyjnej metodą chromatografii cienkowarstwowej wykazuje, że reakcja zaszła mniej więcej w połowie. Do mieszaniny reakcyjnej dodaje się wtedy dodatkowo 100 mg tiolu i równoważną ilość wodorowęglanu sodowego, po czym mieszaninę reakcyjną ogrzewa się w ciągu około 12 godzin w temperaturze 55-60°C. Mieszaninę reakcyjną oziębia się do temperatury pokojowej i przemywa 2 razy po 50 ml octanu etylu. Fazę wodną suszy się i otrzymany przesącz oziębia na łaźni lodowej do temperatury około 0°C, pH fazy wodnej doprowadza się do 3,2 przy energicznym mieszaniu i produkt wytrąca się w postaci osadu o barwie żółto-pomarańczowej, który odsącza się, przemywa wodą i suszy w temperaturze pokojowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymuje się 153 mg mieszaniny odmian syn i anti tytułowego związku. Izomery rozdziela się na żelu krzemionkowym metodą odwróconych faz przy użyciu układu acetonitryl: kwas octowy: woda 15%, 2%, 83% (obj./obj./obj.). Izomer syn NMR (360 MHz, DMSO- d_6): δ 3,65 (m, 2H, C-2 metylenu), 3,85 (s, 3H, metylooksymu), 4,27 (m, 2H, C-3 metylenu), 5,13 (d, 1H, C-6H), 5,82 (q - 1H, C-7H), 6,42 (s, 2H, metylen łączący pierścienie tetrazolowe), 6,78 (s, 1H, H tiazolu), 7,29 (szeroki s, 2H, tiazoloamino) i 9,61 (d, 1H, H 7-amidowy) ppm. Izomer anti NMR (360 MHz, DMSO- d_6): δ 3,60 (m, 2H, C-2 metylenu), 3,95 (s, 3H, metylooksymu), 4,27 (m, 2H, C-3' metylenu), 4,97 (d, 1H, C-6H), 5,76 (q, 1H, C-7H), 6,33 (s, 2H, metylen łączący pierścienie tetrazolowe), 7,14 (szeroki s, 2H, H tiazoloaminowy), 7,46 (s, 1H, H tiazolu) i 9,43 (d, 1H, H 7-amidu) ppm.

P r z y k ł a d IV. Otrzymywanie kwasu 7-/2-tienyloacetamido/-3-[1-/1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H-tetrazol-5-ilotiometylo]-3-cefemo-4-karboksylowego.

Roztwór 808 g (2 milimoli) soli sodowej kwasu 7-/2-tienyloacetamido/-3-acetoksymetylo-3-cefemo-4-karboksylowego (soli sodowej cefalotryny), 368 mg (2 milimoli) 1-/1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H-tetrazol-5-tiolu i 168 mg (2 milimoli) wodorowęglanu sodowego w 16 ml wody ogrzewa się w łaźni olejowej w ciągu 7 godzin w temperaturze od około 55°C do około 60°C. Mieszaninę reakcyjną zatęża się pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości około 8 ml, po czym poddaje preparatywnej HPLC przy użyciu żelu krzemionkowego z odwróconymi fazami. Rozdział uzyskuje się stosując wpierw układ acetonitryl: kwas octowy 15%:2% (obj./obj.) w wodzie. Zbiera się szereg frakcji po 20 ml każda i po zebraniu około 90 frakcji, eluent zmienia się na 20% roztwór acetonitrylu w wodzie. Frakcje 133-153 zawierające związek tytułowy łączy się i odparowuje. Otrzymuje się 350 mg produktu krystalicznego, którym jest ester p-nitrobenzylowy. Frakcje 181-193 zawierają sól sodową cefalotryny, będącą związkiem wyjściowym.

Dla produktu krystalicznego otrzymano następujące dane analityczne.

NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 3,63 (m, 2H, C-2 metylenu), 3,73 (s, 2H, metylen tiofenyloacetylu), 4,32 (m, 2H, C-3' metylenu), 5,04 (d, 1H, C-6H), 5,63 (q, 1H, C-7H), 5,97 (s, 2H, metylen tetrazolu), 6,8-7,4 (m, 5H, H tiofenu) i 9,08 (d, 1H, H 7-amidu) ppm.

Analiza elementarna.

Obliczono	C 39,22;	H 3,10;	N 26,91
Znaleziono:	C 38,86;	H 3,33;	N 25,11.

IR (KBr): absorpcja grupy karbonylowej β -laktamu przy 1775 cm^{-1} . Masa cząsteczkowa oznaczona na podstawie widma masowego wynosi 521.

P r z y k ł a d V. Otrzymywanie kwasu 7-/2-tienyloacetamido/-7-metoksy-3-[1-/1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H-tetrazol-5-ilotiometylo]-3-cefemo-4-karboksylowego.

Roztwór 3,1 g (5,3 milimola) estru p-nitrobenzylowego kwasu 7-/2-tienyloacetamido/-7-metoksy-3-bromometylo-3-cefemo-4-karboksylowego i 1,38 g (7,5 milimola) 1-/1H-tetrazol-5-ilo-

metyle/-1H-tetrazol-5-tiolu w 20 ml DMF miesza się w temperaturze pokojowej w ciągu około 16 godzin. Otrzymaną mieszaninę reakcyjną wlewa się do 150 ml mieszaniny takich samych objętości 1N kwasu solnego i octanu etylu. Warstwę organiczną oddziela się, przemywa 2 razy 1N kwasem solnym, 1 raz wodnym roztworem chlorku sodowego i suszy siarczanem sodowym, po czym sączy i odparowuje do sucha. Otrzymuje się 3 g produktu surowego w postaci piany o barwie jasnobrazowej. Produkt ten poddaje się chromatografii na 75 g żelu krzemionkowego przy użyciu do elucji 1 litra chlorku metylenu, a następnie 2 litrów chlorku metylenu zawierającego 2% alkoholu metylenowego. W trakcie elucji kolumnę utrzymuje się pod ciśnieniem azotu. Frakcje zawierające produkt łączy się i odparowuje do sucha. Oleistą pozostałość rozpuszcza się w octanie etylu i otrzymany roztwór sączy. Przesącz zatęża się pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha, w wyniku czego otrzymuje się 0,84 g tytułowego związku w postaci estru.

Związek ten poddaje się deestryfikacji metodą redukcji elektrolitycznej w następujący sposób. Roztwór 700 mg (1 milimola) estru p-nitrobenzylowego w 30 ml 1N kwasu siarkowego w DMF umieszcza się w elektrolizerze wyposażonym w katodę rtęciową o dużej powierzchni oraz anodę z drutu platynowego. Elektrody rozdziela splek szklany. Redukcję prowadzi się przy potencjale - 64V w ciągu 3 godzin. Roztwór redukcyjny usuwa się z elektrolizera i wlewa do 100 ml mieszaniny takich samych objętości octanu etylu i 1N kwasu solnego. Warstwę organiczną oddziela się i przemywa 2 razy 1N kwasem solnym. Następnie produkt reakcji poddaje się ekstrakcji z warstwy organicznej 50 ml wodnego roztworu wodorotlenku sodowego o pH 7,5 i ekstrakt wodny przemywa octanem etylu. Na fazę wodną nakłada się warstwę świeżego octanu etylu i zakwasza do pH 2,2 kwasem solnym. Warstwę organiczną oddziela się, przemywa 2 razy 1N kwasem solnym i wodnym roztworem chlorku sodowego, suszy siarczanem sodowym i odparowuje do sucha, w wyniku czego otrzymuje się 290 mg tytułowego związku w postaci wolnego kwasu w postaci piany o barwie żółtej. Związek ten oczyszcza się w sposób następujący. 270 mg związku rozpuszcza się w 0,05 M roztworze octanu amonowego za pomocą dodania dwu kropli stężonego wodorotlenku amonowego do zawiesiny związku. Otrzymany roztwór sączy się i wstrzykuje do kolumny do preparatywnej HPLC na żelu krzemionkowym z odwróconymi fazami. Kolumnę eluuje się wpierv mieszaniną acetonitryl: kwas octowy:woda 12%:2%, a następnie mieszaniną acetonitryl:kwas octowy:woda 15:2%. Zbiera się szereg frakcji po 20 ml każda, łączy się frakcje 72-89 i liofilizuje, w wyniku czego otrzymuje się 75 mg tytułowego związku w postaci suchego proszku, dla którego otrzymano następujące dane analityczne. IR (KBr) absorpcja grupy karbonylowej β -laktamu przy 1775 cm^{-1} . Masa cząsteczkowa oznaczona na podstawie widma masowego wynosi 551.

NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 3,34 (m, 3H, 7-metoksy), 3,51 (m, 2H, C-2 metylenu), 3,80 (s, 2H, metylen tiofenoacetylu), 4,29 (m, 2H, C-3'-metylen), 5,06 (s, 1H, C-6H), 5,97 (s, 2H, metylen tetrazolu), 6,9-7,4 (m, 3H, H pierścienia tiofenu) i 9,42 (s, 1H, H 7-amidu) ppm.

P r z y k ł a d VI. Otrzymywanie kwasu 7-/O-formylomigdałamido/-3- β -1-/1H-tetrazol-5-ilometyle/-1H-tetrazolo-5-tiolu/-3-cefemo-4-karboksylowego.

Do roztworu 1,01 m (5,5 milimola) 1-/1H-tetrazol-5-ilometyle/-1H-tetrazolo-5-tiolu w 15 ml buforu o pH 7,0 zawierającego 0,88 g wodorowęglanu sodowego, dodaje się 2,28 g (5 milimoli) soli sodowej kwasu 7-/O-formylmigdałamido/-3-acetoksymetylo-3-cefemo-4-karboksylowego i otrzymany roztwór ogrzewa się, przy mieszaniu, w temperaturze od około 60°C do około 65°C w ciągu 16 godzin. Mieszaninę reakcyjną oziębia się do temperatury pokojowej i zatęża do objętości 6,5 ml za pomocą odparowania pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany koncentrat poddaje się chromatografii metodą HPLC na żelu krzemionkowym z odwróconymi fazami, stosując do elucji mieszaninę acetonitryl: kwas octowy: woda 12%:2%. Zbiera się szereg frakcji po 20 ml każda i bada w świetle UV na obecność chromofora cefemowego. Łączy się frakcje 94-107 i liofilizuje. Otrzymuje się 120 ml związku tytułowego.

NMR (90 MHz, DMSO- d_6): sygnały przy δ 3,84 (m, C-2 metylenu), 4,54 (m, c-3' metylenu), 5,26 (d, C-6R) 5,32 (s, H metynu migdałamidowego łańcucha bocznego), 5,94 (q, C-7H), 6,24 (s, metylen tetrazolu), 7,4-7,8 (m, H fenylu) i 9,04 (d, H-7-amidu) ppm.

Poniższe sposoby otrzymywania objaśniają sposób wytwarzania bis-tetrazolometylotiolu, stosowanych w sposobie według wynalazku wytwarzania cefalosporyn.

P r z y k ł a d VII. Otrzymywanie 1-cyjanometylo-1H-tetrazol-5-ilotiolu.

A. Azydoocetan etylu.

Do roztworu 490 g (4 mole) chlorooctanu etylu w 1500 ml acetonitrylu dodaje się 260 g (4 mole) azydku sodowego i otrzymaną mieszaninę ogrzewa się w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu 20 godzin. Po ogrzewaniu, mieszaninę reakcyjną wlewa się do 1 litra wody przy mieszaniu w ciągu 1/2 godziny. Fazę organiczną oddziela się od fazy wodnej i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha. Pozostałość w postaci oleju o barwie żółtej rozpuszcza się w 1200 ml eteru etylowego i otrzymany roztwór suszy się siarczanem magnezowym. Po odparowaniu eteru pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymuje się 391 g (76% wydajności) azydoocetanu etylu.

B. 5-chloro-1H-tetrazol-1-iloocetan etylu.

Mieszaninę 130 g (1 mola) azydoocetanu etylu otrzymanego sposobem wyżej opisanym w części A, oraz 96 g (1,56 mola) chlorku cyjanu ogrzewa się w temperaturze 125°C w ciągu 20 godzin. Po oziębieniu mieszaniny reakcyjnej, otrzymaną mieszaninę rozpuszcza się w octanie etylu i otrzymany roztwór sączy, a następnie odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem, w wyniku czego otrzymuje się krystaliczną masę o barwie żółtej. Kryształy o barwie żółtej rekrystalizuje się z mieszaniny alkoholu etylowego i sody, w wyniku czego otrzymuje się 149 g (wydajność 78%) 5-chloro-1H-tetrazol-1-iloocetanu etylu w postaci kryształów o barwie białej, o temperaturze topnienia około 57-60°C.

C. 6-tiolo-1H-tetrazol-1-iloocetan etylu.

Roztwór 209 g estru chlorotetrazolowego, otrzymanego w sposób jak wyżej opisano w części B i 250 g wodorosiarczku sodowego w 5 litrach alkoholu etylowego ogrzewa się w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu 24 godzin, po czym otrzymaną mieszaninę reakcyjną zakwasza się stężonym kwasem solnym, a następnie zmniejsza się objętość tak otrzymanej zakwaszonej mieszaniny do 1/4 objętości pierwotnej za pomocą odparowania pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany koncentrat poddaje się ekstrakcji octanem etylu i otrzymany ekstrakt osusza się i odparowuje do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość poddaje się krystalizacji z mieszaniny toluen:chlorek metylenu:heksan, w wyniku czego otrzymuje się 129 gżądanego związku.

D. Sól amonowa 5-tiolo-1H-tetrazol-1-iloacetamidu.

Roztwór 20 g (0,106 mola) estru tetrazolotiolowego otrzymanego w sposób jak wyżej opisano w części C, w 320 ml stężonego wodorotlenku amonowego i 200 ml alkoholu etylowego, zawierającego 500 ml chlorku amonowego, ogrzewa się w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu około 12 godzin. Po ogrzewaniu, mieszaninę reakcyjną odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem i krystaliczną pozostałość o barwie żółtej poddaje się rekrystalizacji z gorącego alkoholu etylowego, w wyniku czego otrzymuje się 13,7 g produktu pierwszego rzutu (wydajność 73%) w postaci kryształów o barwie białej, o temperaturze topnienia od około 197°C do około 199°C (po wysuszeniu pod zmniejszonym ciśnieniem). Uzyskuje się też 1,4 g produktu w drugim rzucie, o temperaturze topnienia około 191-193°C.

E. 1-cyjanometylo-1H-tetrazolo-5-tiol.

Zawiesinę 5,28 g soli amonowej tetrazoloamidu otrzymanej w sposób jak wyżej opisano w części D, w 90 ml chlorku metylenu zawierającego 14,4 ml pirydyny, oziębia się do temperatury około 0°C. Do zawiesiny tej dodaje się kroplami, przy mieszaniu, roztwór 4,6 g (30 milimoli) tlenochlorku fosforowego w 40 ml chlorku metylenu. Po dodaniu całej ilości, miesza-

ninę reakcyjną ogrzewa się w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu 30 minut, po czym oziębia do temperatury pokojowej przy mieszaniu. Po ogrzaniu barwa mieszaniny zmienia się na pomarańczową. Mieszanina zawiera pewną ilość osadu. Mieszaninę reakcyjną odparowuje się do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostałość rozpuszcza w mieszaninie octan etylu: woda 1:1 (obj/obj). pH roztworu doprowadza się do 2 za pomocą 20% kwasu solnego. Następnie zakwaszony roztwór poddaje się ekstrakcji 2 razy po 75 ml octanu etylu. Łączy się ekstrakty i przemywa kwasem solnym 5% i wodnym roztworem chlorku sodowego, po czym osusza siarczanem sodowym i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem. Jako pozostałość otrzymuje się olej o barwie brązowej, który krystalizuje w trakcie odstawiania. Wydzielone kryształy suszy się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze pokojowej i po wysuszeniu otrzymuje się 2,6 g (wydajność 61%) związku o barwie jasnobrązowej, o temperaturze topnienia około 113–114°C.

Proces powyższy powtarza się z użyciem 10,6 g soli amonowej tetrazoloamidu i otrzymuje się 3,7 g nitrylu w postaci kryształów o barwie białawej, o temperaturze topnienia około 116–118°C.

Dla produktu krystalicznego otrzymano następujące dane analityczne.

Analiza elementarna.

Obliczono dla $C_3H_3N_5S$:	C 25,53;	H 2,14;	N 49,62
Znaleziono:	C 25,82;	H 2,40;	N 49,91

Badanie widma masowego produktu krystalicznego wykazało masę cząsteczkową 141, zgodnie z przewidywaną dla produktu.

P r z y k ł a d VIII. Otrzymywanie 1-/1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H-tetrazolo-5-tiolu.

Roztwór 6,0 g (42,5 milimola) 1-cyjanometylo-1H-tetrazolo-5-tiolu i 10,0 g (6,5 milimola) azydki czterometyloguanidyniowego w 90 ml dioksanu ogrzewa się w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu 3 godzin. Po oziębieniu, mieszaninę reakcyjną odparowuje się do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem i otrzymaną pozostałość rozpuszcza się w mieszaninie octan etylu:woda 1:1. Warstwa octanu etylu oddziela się i pH warstwy wodnej doprowadza do 1,8 20% kwasem solnym. Zakwaszoną warstwę wodną poddaje się następnie ekstrakcji 3 razy po 75 ml octanu etylu, po czym ekstrakty łączy się, przemywa 5% kwasem solnym i wodnym roztworem chlorku sodowego, po czym osusza siarczanem sodowym i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha. Jako pozostałość otrzymuje się olej o barwie czerwonej. Pozostałość ta krystalizuje po zaszczepleniu. Kryształy przemywa się octanem etylu oraz eterem etylowym i suszy. W wyniku tego otrzymuje się 3,7 g bis-tetrazolometylotiolu o temperaturze topnienia od około 173°C do około 175°C. Przesącz po pierwszym rzucie odparowuje się do konsystencji oleju i po zaszczepleniu otrzymuje się 0,3 g produktu krystalicznego drugiego rzutu. W ten sam sposób otrzymuje się 0,3 g produktu trzeciego rzutu. Ogólna wydajność produktu wynosi 4,3 g (wydajność 55%).

Widmo NMR otrzymanego związku (w DMSO- d_6) wykazuje singlet przy 5,9 ppm δ dla protonów grupy metylenowej łączącej pierścienie tetrazolowe.

P r z y k ł a d IX. Otrzymywanie 1-/1-metylo-1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H-tetrazolo-5-tiolu.

A. 5-chloro-N-metylo-1H-tetrazolo-1-acetamid:

Roztwór 19,5 g (0,102 mola) 5-chloro-1H-tetrazolo-1-octanu etylu w 50 ml alkoholu etylowego oziębia się w łaźni z suchym lodem i alkoholem propylowym, po czym do otrzymanego roztworu wpuszcza się w ciągu 5 minut gazową metyloaminę. Otrzymaną mieszaninę reakcyjną zestawia się. Po przemyciu alkoholem etylowym i eterem etylowym, oraz wysuszeniu na łaźni parowej, otrzymuje się 13,2 g (wydajność 74%) N-metyloamidozwiązku w postaci kryształów o barwie białej, o temperaturze topnienia od około 146°C do około 148°C.

Dla produktu krystalicznego otrzymano następujące dane analityczne:

Analiza elementarna.

Obliczono dla $C_4H_6N_5OCl$:	C 27,36;	H 3,44;	N 39,89;	Cl 20,19;
Znaleziono:	C 27,59;	H 3,35;	N 39,65;	Cl 20,49.

NMR (DMSO- d_6): δ 2,7 (d, $J=5\text{Hz}$, 3H, metyl amidu), 5,28 (s, 2H, CH_2), 8,53 (s, poszerzony, 1H, N-H) ppm.

Masa cząsteczkowa na podstawie widna masowego = 175,5.

B. 1- α -metylo-1H-tetrazol-5-ilometylo/-5-chloro-1H-tetrazol.

Do zawiesiny 1,75 g (10 milimoli) 5-chloro-N-metylo-1H-tetrazolo-1-acetamidu, otrzymanego w sposób jak wyżej opisano w części A, w 50 ml chlorku metylenu, zawierającej 0,8 g pirydyny utrzymywanej w temp. ok. 0°C , dodaje się przy mieszaniu w nadmiarze fosgenu. Po zakończeniu dodawania, mieszaninę reakcyjną miesza się w ciągu 10 minut bez dalszego oziębienia. Otrzymany tak przezroczysty roztwór odparowuje się do sucha w temperaturze około 30°C , pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymaną pozostałość zawierającą produkt reakcji zawiesza się w 50 ml dioksanu i do zawiesiny tej dodaje się 2,4 g (15,2 milimola) azydki czterometyloguanidyniowego. Otrzymaną mieszaninę ogrzewa się w ciągu 2 godzin w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną i po całkowitym mieszaniu w temperaturze pokojowej, otrzymaną mieszaninę reakcyjną zatęża się prawie do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany koncentrat rozpuszcza się w 30 ml wody, w wyniku czego tworzy się roztwór o barwie bladożółtej. Z roztworu tego wykrystalizowuje produkt w postaci barwnych igieł i po odsączeniu otrzymuje się 0,4 g krystalicznego produktu o temperaturze topnienia od około 138°C do około 140°C . Z przesączu wyodrębnia się 0,5 g produktu drugiego rzutu o temperaturze topnienia od około 136°C do około 139°C .

Dla produktu krystalicznego otrzymano następujące dane analityczne.

Analiza elementarna.

Obliczono dla $\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_8\text{Cl}$:	C 23,95;	H 2,51;	N 55,86;	Cl 17,45
Znaleziono:	C 24,17;	H 2,75;	N 55,81;	Cl 17,85

NMR (DMSO- d_6): δ 4,27 (s, 3H, N-CH_3), 6,33 (s, 2H, CH_2) ppm.

C. 1-/1-metylo-1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H-tetrazolo-5-tiol.

Do zawiesiny 0,5 g (2,5 milimola) 5-chloro-bis-tetrazolu, otrzymanego w sposób jak wyżej opisano w części B, w 40 ml alkoholu etylowego dodaje się 0,6 g wodorosiarczku sodowego. Otrzymaną mieszaninę ogrzewa się w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu 16 godzin, po czym oziębia do temperatury pokojowej i sączy. Otrzymany przesącz zatęża się prawie do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, po czym dodaje się 30 ml 5% kwasu solnego. Zakwaszony koncentrat poddaje się ekstrakcji 3 razy po 30 ml octanu etylu, ekstrakty łączy się i przemywa 5% kwasem solnym i wodnym roztworem chlorku sodowego, po czym suszy siarczanem sodowym. Osuszony ekstrakt zatęża się do niewielkiej objętości. W tych warunkach wytrąca się krystaliczny produkt, który rekrystalizuje się z mieszaniny octan etylu:heksan w wyniku czego otrzymuje się 0,3 g związku w postaci prawie bezbarwnych kryształów o temperaturze topnienia od około 190°C do około 192°C .

Dla produktu krystalicznego otrzymano następujące dane analityczne.

Analiza elementarna.

Obliczono dla $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_8\text{S}$:	C 24,24;	H 3,05;	N 56,53
Znaleziono:	C 24,21;	H 3,28;	N 56,43.

NMR (DMSO- d_6): δ 4,22 (s, 3H, CH_3), 5,95 (s, 2H, CH_2), 10,57 (szeroki s, 1H, SH).

Masa cząsteczkowa oznaczona na podstawie widna masowego wynosi 198.

P r z y k ł a d X. Otrzymywanie 2-/1H-tetrazol-5-ilometylo/-2H-tetrazolo-5-tiolu.

A. 5-benzylotio-1H-tetrazol.

Roztwór 30 g (0,33 mola) tiosemikarbazydu i 51 g (0,40 mola) chlorku benzylu w 500 ml alkoholu etylowego ogrzewa się w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu około 3 1/2 godziny. Po ogrzewaniu, mieszaninę reakcyjną odparowuje się do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem i otrzymaną pozostałość rozpuszcza się w wodzie. Otrzymany roztwór przemywa się octanem etylu i dodaje do roztworu 25 g (0,36 mola) azotynu sodowego w 50 ml wody. Otrzymany roztwór miesza się w ciągu 15 minut, po czym dodaje się octan etylu. Warstwę organiczną oddziela się i przemywa wodą oraz wodnym roztworem chlorku sodowego, po czym osusza siarczanem sodowym. Otrzymany osuszony roztwór octanu etylu odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem,

po czym pozostałość, stanowiącą produkt reakcji, przemywa się chlorkiem metylenu i poddaje krystalizacji z octanu etylu. W wyniku tego otrzymuje się 21 g związku o temperaturze topnienia od około 134°C do około 136°C.

Dla tego związku otrzymano następujące dane analityczne.

Analiza elementarna.

Obliczono dla $C_8H_8N_4S_2$:	C 49,98;	H 4,19;	N 29,14
Znaleziono:	C 49,81;	H 4,17;	N 28,95.

B. 1- i 2-cyjanometylo-5-benzylotio-1H-tetrazol.

Roztwór 2,7 g wodorotlenku potasowego w 5 ml alkoholu metylowego dodaje się przy mieszaniu do roztworu 7,9 g (0,041 mola) 5-benzylotio-1H-tetrazolu w 25 ml alkoholu metylowego, a następnie, po dalszym mieszaniu w ciągu 15 minut w temperaturze pokojowej, dodaje się 3,4 g (0,045 mola) chloroacetonitrylu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewa się w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu 12 godzin i odsącza się utworzone ciało stałe o barwie białej. Otrzymany przesącz zatęża się pod zmniejszonym ciśnieniem, w wyniku czego otrzymuje się oleistą pozostałość, którą rozpuszcza się w mieszaninie eteru etylowego i wody. Warstwę eterową oddziela się i przemywa wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego, a następnie wodą i wodnym roztworem chlorku sodowego. Po osuszeniu i odparowaniu do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymuje się 3,4 g mieszaniny 1- i 2-cyjanometylo-5-benzylotio-1H-tetrazolu w postaci oleju o barwie czerwonej. Badanie widma NMR wykazało, że olej ten stanowi mieszaninę 50%:50% obu tych izomerów.

C. 5-benzylotio-2-/1H-tetrazol-5-ilometylo/-2H-tetrazol.

Do 70 ml suchego czterowodorofuranu oziębnego w łaźni z lodem i etanolem dodaje się w małych porcjach 4,04 g (0,03 mola) bezwodnego chlorku glinowego. Po zakończeniu dodawania, dodaje się przy mieszaniu 5,85 g (0,09 mola) subtelnie rozdrobnionego azydku sodowego. Mieszaninę miesza się przez 5 minut, po czym dodaje się roztwór 3,93 g (0,017 mola) izomerycznej mieszaniny 1- i 2-cyjanometylo-5-benzylotiotetrazoli w 20 ml suchego czterowodorofuranu i otrzymaną mieszaninę ogrzewa się w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu 24 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną oziębia się w mieszaninie lodu i etanolu i zakwasza za pomocą wkroplenia 30 ml 20% kwasu solnego. Zakwaszoną mieszaninę zatęża się pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości około 30 ml i otrzymany koncentrat poddaje ekstrakcji 3 razy po 30 ml octanu etylu. Ekstrakt łączy się, przemywa wodnym roztworem chlorku sodowego i suszy bezwodnym siarczanem sodowym. Otrzymany osuszony ekstrakt odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha, w wyniku czego otrzymuje się 4,5 g (wydajność 97%) mieszaniny izomerycznych 5-benzylotio-1- i 2-/1H-tetrazol-5-ilometylo/-1H- i 2H tetrazoli w postaci oleju o barwie brunatnej. Po odstawieniu na kilka dni, w oleju tworzą się kryształy. Otrzymaną mieszaninę rozciera się z chlorkiem metylenu i sączy, w wyniku czego otrzymuje się 0,85 g kryształów o barwie kremowej, o temperaturze topnienia od około 115°C do około 117°C. Z przesączu uzyskuje się 0,2 g kryształków drugiego rzutu.

Proces powtarza się w sposób jak wyżej opisano, poddając reakcji 7,1 g izomerycznej mieszaniny 1- i 2-cyjanometylo-5-benzylotiotetrazoli z azydkiem glinowym (wytworzonym sposobem wyżej opisanym z 7,3 g chlorku glinowego i 10,7 g azydku sodowego). Mieszaninę reakcyjną ogrzewa się w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu 24 godzin, po czym zakwasza 20% kwasem solnym, odparowuje do objętości około 60 ml i poddaje ekstrakcji octanem etylu. Otrzymany ekstrakt przemywa się wodnym roztworem chlorku sodowego i odparowuje do sucha. Pozostałość krystalizuje w czasie odstawiania. Kryształy o barwie kremowej zawiesza się w chlorku metylu i sączy, w wyniku czego otrzymuje się 3,5 g materiału krystalicznego. Przesącz odparowuje się do sucha, w wyniku czego otrzymuje się 4,9 g oleju o barwie pomarańczowej.

Widmo NMR produktu krystalicznego (w DMSO- d_6) wykazało głównie obecność jednego izomeru, a mianowicie 2-izomeru, podczas gdy widmo NMR oleju wykazało obecność głównie 1-izomeru.

D. 2-/1H-tetrazol-5-ilometylo/-2H-tetrazol-5-tiol.

175 mg 5-benzylotio-2-/1H-tetrazol-5-ilometylo/-2H-tetrazolu, wytworzonego w sposób jak wyżej opisano w części C, rozpuszcza się w 40 ml destylowanego DMF, po czym poddaje redukcji z użyciem rtęciowej katody o dużej powierzchni ($14 \text{ cm}^2 \text{ Hg}$) i anody z drutu platynowego. Elektrody oddziela od siebie spiek szklany. Elektrolit stanowi nadchloran czteroetyloamonowy w postaci 0,1M roztworu w roztworze substratu reakcji w DMF. Elektrolizę prowadzi się pod napięciem od -2,7 woltów do -2,85 woltów przez 500 sekund, oraz 2,8 woltów w ciągu około 630 sekund.

Otrzymaną mieszaninę redukcyjną po redukcji jednoelektronowej odparowuje się do sucha i otrzymaną pozostałość rozpuszcza się w octanie etylu. Otrzymany roztwór przemywa się 3 razy mieszaniną nasyconego roztworu chlorku sodowego i 0,1N kwasu solnego 9:1 (obj./obj.), po czym osusza bezwodnym siarczanem magnezowym. Otrzymany osuszony roztwór zatęża się pod zmniejszonym ciśnieniem, w wyniku czego wytrąca się z koncentratu 111 mg związku tytułowego, który odsącza się i suszy.

Z a s t r z e ż e n i a p a t e n t o w e

1. Sposób wytwarzania nowych pochodnych cefalosporyn o wzorze ogólnym 1, w którym R oznacza atom wodoru lub grupę o wzorze 5, w którym R_5 oznacza grupę o wzorze 6, lub R oznacza grupę o wzorze 7, lub R oznacza grupę oksyiminopodstawioną o wzorze 8, w którym R_6 oznacza grupę o wzorze 9 lub 10, a R_7 oznacza grupę C_1-C_4 alkilową, R_1 oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą grupę karboksylową taką jak grupa benzylowa, dwufenylometylowa, p-nitrobenzylowa, p-metoksybenzylowa, fenacylowa ewentualnie podstawiona atomem chlorowca, chlorowcoal-kilowa, rozgałęziona alkilowa, alkenylowa lub alkinyłowa, R_2 oznacza atom wodoru lub grupę metoksyłową, R_3 oznacza grupę bis-tetrazolometylową o wzorze 2, w którym R_4 oznacza atom wodoru lub grupę C_1-C_3 alkilową, a w przypadku, gdy R_1 oznacza atom wodoru, również ich farmaceutycznie dopuszczalnych soli, z n a m i e n n y t y m, że związek o wzorze 3, w którym R, R_1 i R_2 mają wyżej podane znaczenie, a R_{10} oznacza grupę C_1-C_4 acyloksylową lub atom chlorowca, poddaje się reakcji z bis-tetrazolometylotiolem o wzorze 4, w którym R_4 ma wyżej podane znaczenie, ewentualnie w postaci soli, w środowisku obojętnego rozpuszczalnika organicznego i ewentualnie, w przypadku, gdy R_1 nie oznacza atomu wodoru, usuwa się grupę ochraniającą grupy karboksylowej i ewentualnie, w przypadku gdy R_1 oznacza atom wodoru, otrzymany związek przeprowadza się w farmaceutycznie dopuszczalną sól.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że jako bis-tetrazolometylotiol stosuje się związek o wzorze 4a, w którym R_4 oznacza atom wodoru lub grupę C_1-C_3 -alkilową.

3. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że jako bis-tetrazolometylotiol stosuje się związek o wzorze 4b, w którym R_4 oznacza atom wodoru lub grupę C_1-C_3 -alkilową.

4. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że jako związek wyjściowy stosuje się związek o wzorze 3, w którym R_{10} oznacza grupę acetoksyłową, a R, R_1 i R_2 każdy, oznacza atom wodoru.

5. Sposób według zastrz. 4, z n a m i e n n y t y m, że reakcję prowadzi się w środowisku kwasu octowego lodowatego.

6. Sposób według zastrz. 4 albo 5, z n a m i e n n y t y m, że temperatura reakcji utrzymuje się w granicach od około 25°C do około 80°C .

7. Sposób według zastrz. 6, z n a m i e n n y t y m, że do środowiska reakcji dodaje się związek trójfluorku boru z eterem.

8. Sposób według zastrz. 4, z n a m i e n n y t y m, że reakcję prowadzi się w środowisku wodnym.

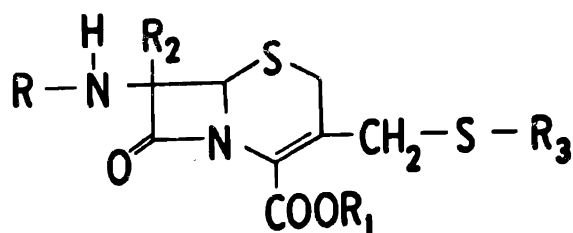
9. Sposób według zastrz. 8, z n a m i e n n y t y m, że reakcję prowadzi się w pH od około 7,0 do około 9,0.

10. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że jako związek wyjściowy stosuje się związek o wzorze 3, w którym R_{10} oznacza grupę acetoksylową, R oznacza grupę acylową, zdefiniowaną powyżej w definicji wzoru 1, a R_1 i R_2 mają znaczenie zdefiniowane powyżej w definicji wzoru 1.

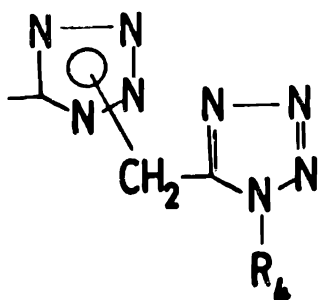
11. Sposób według zastrz. 10, z n a m i e n n y t y m, że reakcję prowadzi się w temperaturze od około 20°C do około 75°C.

12. Sposób według zastrz. 10 albo 11, z n a m i e n n y t y m, że reakcję prowadzi się w pH od około 7,0 do około 9,0.

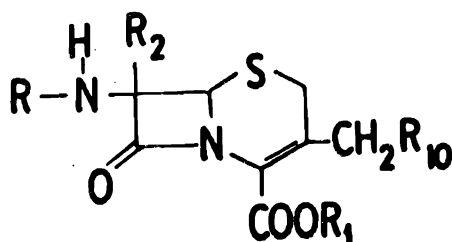
13. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że w reakcji stosuje się molowy nadmiar bis-tetrazolometyloliolu o wzorze 4, w którym R_4 ma wyżej podane znaczenie.



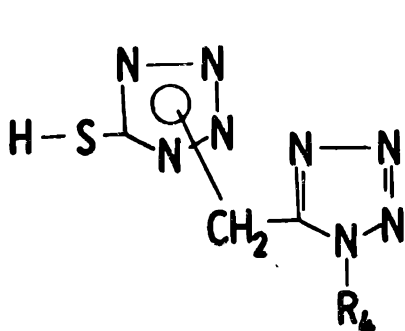
Wzór 1



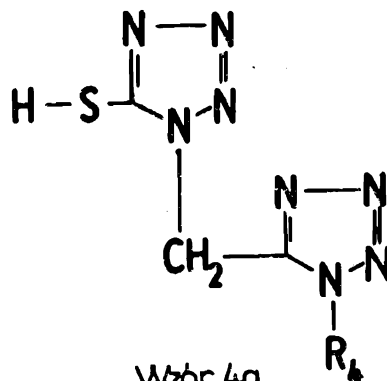
Wzór 2



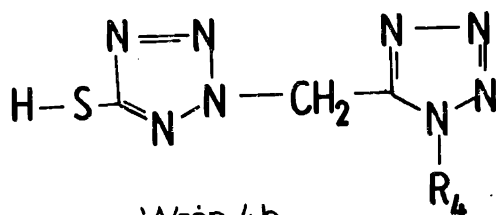
Wzór 3



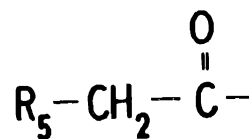
Wzór 4



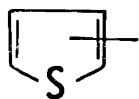
Wzór 4a



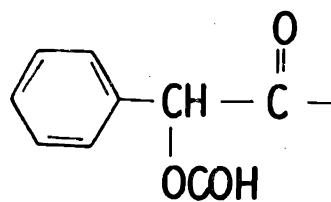
Wzór 4b



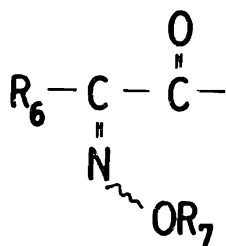
Wzór 5



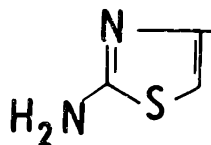
Wzór 6



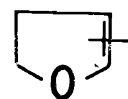
Wzór 7



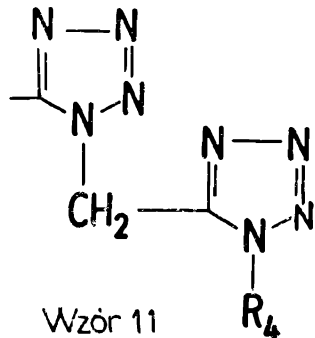
Wzór 8



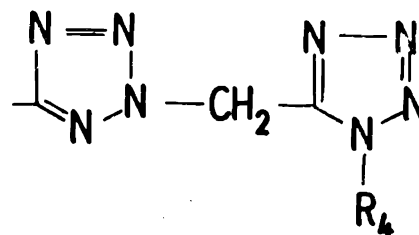
Wzór 9



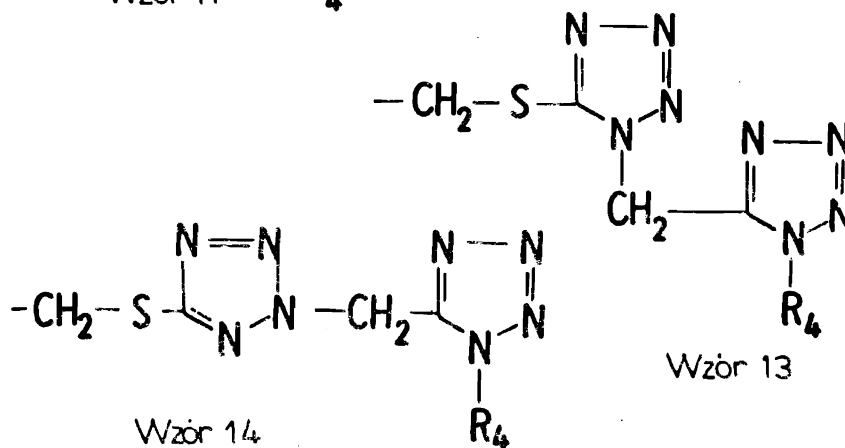
Wzór 10



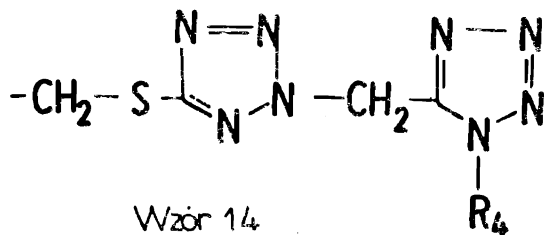
Wzór 11



Wzór 12



Wzór 13



Wzór 14

