



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 27.01.73 (P. 160440)

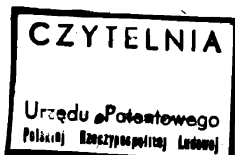
Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 15.11.73

Opis patentowy opublikowano: 30.07.1977

MKP C07d 99/24

Int. Cl.² C07D 501/06



Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Eli Lilly and Company, Indianapolis (Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób wytwarzania kwasów chlorowcofenyltioacetamidocefalosporanowych

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania kwasów chlorowcofenyltioacetamidocefalosporanowych, które skutecznie hamują rozwój mikroorganizmów *Staphylococcus* odpornych na działanie metycyliny.

Liczne publikacje omawiają skutki, jakie powoduje brak skuteczności działania wielu antybiotyków na różne szczepy *Staphylococcus aureus* odporne na działanie metycyliny. Szczepy nie występują wprawdzie zbyt często i prawdopodobnie pojawiają się przeważnie u chorych obłożnie i osłabionych, ale obecność ich stwierdzono w kulturach pobranych u chorych cierpiących na schorzenia nowotworowe, chroniczne schorzenia kości i/lub stawów, chroniczne zaburzenia krążenia, zaburzenia świadomości i chroniczne schorzenia płuc.

Znane są dwie metody odróżniania *in vitro* szczepów *Staphylococcus aureus* odpornych od nieodpornych na działanie metycyliny. Jedna z nich polega na stosowaniu różnych temperatur hodowli mikroorganizmów, a druga na stosowaniu różnych stężeń chlorku sodowego w środowisku hodowlanym.

Z opisu patentowego Stanów Zjedn. Ameryki nr 3 335 136 znane są pewne kwasy chlorowcofenyltioacetamidocefalosporanowe odporne na działanie penicyliny, trwałe w środowiskach kwaśnych oraz skuteczne przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i niektórym bakteriom Gram-ujemnym. W opisie tym nie ma jednak mowy o identyfikowaniu szcze-

2

pów *Staphylococcus aureus* odpornych na działanie metycyliny, ani o tym, że związki te mogą być stosowane do zwalczania takich uodpornionych szczepów.

- 5 Nieoczekiwanie stwierdzono, że niektóre kwasy polichloro- i chlorofluorofenyltioacetamidocefalosporanowe, należące do grupy podanej ogólnie w opisie patentowym Stanów Zjedn. Am. nr 3 335 136, w którym nie ma żadnej wzmianki o możliwości
- 10 stosowania takich kwasów do skutecznego zwalczania zakażeń spowodowanych przez szczepy *Staphylococcus aureus* uodpornione na działanie metycyliny, skutecznie hamują rozwój takich szcze-
- 15 pów i mogą być stosowane do skutecznego ich zwalczania. Związkami tymi są związki o ogólnym wzorze 1, w którym R' oznacza atom wodoru, grupę dwucykloheksyloaminową lub farmakologicznie dopuszczalny kation, a R oznacza grupę o ogólnym wzorze 2, w którym, gdy R¹ oznacza atom
- 20 fluoru, wówczas R² i R⁴ oznaczają atomy wodoru lub chloru i R³ oznacza atom wodoru, a gdy R¹ oznacza atom chloru, wówczas R² oznaczają atom wodoru i jeden z symboli R³ i R⁴ oznacza atom chloru, a drugi oznacza atom wodoru, albo R² ozna-
- 25 cza atom chloru, a R³ i R⁴ oznaczają atomy wodoru lub chloru, zaś gdy R² oznacza atom fluoru, wówczas R³ oznacza atom chloru, a R¹ i R⁴ oznaczają atomy wodoru.

Sposobem według wynalazku związki o wzorze 1, w którym wszystkie symbole mają wyżej

podane znaczenie, wytwarza się przez acylowanie kwasu 7-aminocefalosporynowego za pomocą kwasu o ogólnym wzorze 3, w którym R¹, R², R³ i R⁴ mają wyżej podane znaczenie, albo za pomocą bezwodnika, mieszanego bezwodnika lub halogenku tego kwasu.

Jako produkt wyjściowy w procesie prowadzonym sposobem według wynalazku można stosować cefalosporynę C, otrzymaną na drodze fermentacyjnej. Cefalosporynę C rozszczepia się znanymi sposobami, otrzymując kwas 7-aminocefalosporynowy, który acyluje się znanymi sposobami, wprowadzając do grupy aminowej w pozycji 7 żądany łańcuch boczny. Jako środki acylujące stosuje się korzystnie chlorki lub bromki acylowe albo mieszane bezwodniki alkilowe, wytworzone in situ. Przykłady procesów acylowania podano poniżej, a poza tym można stosować warunki acylowania podane w opisie patentowym Stanów Zjedn. Am. nr 3 335 136.

Otrzymane sposobem według wynalazku kwasy można przeprowadzać w ich estry acetoksymetylowe, których zdolność do ulegania absorpcji jest większa niż kwasów.

Związki o ogólnym wzorze 1, w którym wszystkie symbole mają wyżej podane znaczenie, wytwarza się i stosuje korzystnie w postaci soli zawierającej kation w grupie karboksylowej. Korzystnie stosuje się sole dopuszczalne farmakologicznie, na przykład sodowe, potasowe, litowe, amonowe lub amoniowe, na przykład metyloamoniowe lub etyloamoniowe, a także trudniej rozpuszczalne w wodzie sole wapniowe, barowe, prokainowe, chininowe, cykloheksylo-dwumetyloamoniowe lub dwubenzylodwumetyloamoniowe. W celu wyosobniania z mieszanin reakcyjnych i badania wytwarzanych związków na zwierzętach niekiedy stosuje się sole dwucykloheksyloaminiowe.

Związki wytwarzane sposobem według wynalazku stosuje się korzystnie w postaci wyjałowionych roztworów w wodzie lub w izotonicznych roztworach soli albo dekstrozy jako preparaty do wstrzykiwania śródmięśniowego. Dawka dla chorych wynosi 0,25–0,5 g co 4–6 godzin. Związki te można również stosować doustnie, w nieco większych dawkach, wynoszących przeważnie 0,5–1,0 g co 4–6 godzin. Preparaty do podawania doustnego mają postać tabletek, kapsulek żelatynowych lub zawieszin, wytwarzanych znanymi sposobami.

Stwierdzono, że większość związków wytwarzanych sposobem według wynalazku, badana w nieobecności ludzkiej surowicy typową metodą skośnej płytki, wykazuje skuteczność przeciwko szczepom *Staphylococcus aureus* odpornym na działanie metycyliny przy minimalnym stężeniu (MIC) wynoszącym mniej niż 11 mikrogramów/ml. Wartości te ustalono metodą opisaną przez Bryson'a i Szybalskiego (*Science*, 116, str. 45–46, 1952), zaś wartości w odniesieniu do szczepów gronkowców odpornych na działanie penicyliny ustalono metodą opisaną przez Godzeskiego i in. w *Antimicrobiol Agents and Chemotherapy*, maj 1969, str. 547–554.

W badaniach stosuje się typowe, kwadratowe płytki Petriego, wykonane z tworzywa sztucznego. Na jedną z płytek wlewa się warstwę agaru w

ilości 10 ml, odchyła płytkę o 5 mm od poziomu i pozostawia w tej pozycji do stwardnienia agaru. Ta dolna warstwa agaru zawiera antybiotyk, surowicę i/lub inny materiał poddawany badaniu. Jako środowisko stosuje się Difco Penassay Agar zawierający 2% agaru. W celu zbadania „inaktywacji surowicy” stosuje się z reguły 4 ml surowicy ludzkiej lub końskiej. Surowicę można dodawać również do warstwy górnej, a więc nie stosując gradientu, ale próby wykonane z wieloma antybiotykami wykazały, że nie ma zasadniczych różnic pomiędzy wynikami uzyskiwanymi przy użyciu obu tych płytek, toteż surowicę z reguły dodaje się tylko do warstwy górnej. Gdy dolna, skośna warstwa agaru stwardnieje, płytkę umieszcza się poziomo, nakłada drugą warstwę pożywki w ilości 10 ml i pozostawia do stwardnienia.

Szczepionkę odpornych gronkowców przygotowuje się rozcieńczając wodną zawiesinę w stosunku 1:50 roztworem wodnym lub solankowym zawierającym 0,25% agaru. Przy badaniu mikroorganizmów Gram-ujemnych, brzeczkę hodowlaną otrzymaną w ciągu nocy rozcieńcza się w stosunku 1:50 wodą zawierającą 0,25% agaru. Po rozcieńczeniu zawiesinę wytrząsa się dokładnie i do prób odmierza pipetą 1 ml zawiesiny zawierającej podwielokrotność końcowego stężenia agaru wynoszącego 0,05%. Próbkę powinna być naniesiona na płytkę w postaci pasma równomiernie i jednym, bardzo szybkim ruchem. Hodowlę prowadzi się w ciągu 24 godzin w temperaturze 35–37°C, po czym odczytuje wynik mierząc wzrost bakterii jako procent w stosunku do całkowitej długości pasma i następnie przelicza w odniesieniu do stężenia antybiotyku na płytce. Jeżeli linijkę o długości 100 mm zmniejszy się fotograficznie tak, aby jej długość odpowiadała dokładnie wnętrzu płytki, wówczas długość zmierzona w milimetrach jest równa stężeniu w procentach.

Ustala się wyniki średnie z dwóch pomiarów i podane niżej minimalne stężenia hamujące (MIC) są średnimi z dwóch pasm na płytce i 2–3 płytek. Na jednej płytce można łatwo umieścić 8 pasm. Jeżeli pasmo nie ma wyraźnie zurpowanego zakończenia, wówczas mierzy się średnie stężenie pomiędzy początkiem hamowania wzrostu w paśmie do końca wzrostu. Stężenie badanego antybiotyku w poszczególnych seriach płytek w mikrogramach/ml zmienia się jak podano w tablicy I.

Tablica I

Nr płytki	Stężenie antybiotyku
1 i 2	200
3 i 4	100
5 i 6	50
7 i 8	20
9 i 10	10
11 i 12	1

Opisana wyżej metoda badania daje w przypadku penicylin i cefalosporyn zadowalającą dokładność wyników. W celu oznaczenia aktywności badanych związków w odniesieniu do gronkowców uodpornionych stosuje się płytki kontrolne,

zawierające penicylinę i stafcylinę lub prostaflinę albo inne antybiotyki porównawcze. Metoda skośnej płytki wykazuje różnice pomiędzy antybiotykami nie dające się uchwycić przy użyciu innych metod. Istnienie tych różnic potwierdzają inne, bardziej szczegółowe badania, na przykład terapia zwierzęca. Wydaje się, że metoda skośnej płytki umożliwia lepiej niż inne metody uchwycenia niewielkich różnic, w działaniu antybiotyków, a przy tym wyniki uzyskiwane tą metodą można przechowywać w postaci fotografii. Poza tym można stosować łatwo modyfikacje tej metody do specjalnych celów, na przykład gradienty krzyżowe.

Poniżej podano przykłady związków wytwarzanych sposobem według wynalazku, przy czym w większości przypadków po nazwie związku podano w mikrogramach/ml minimalne stężenie hamujące tego związku w nieobecności surowicy krwi i w obecności 20% surowicy krwi: kwas 7-[2'/2'',5''-dwuchlorofenylotio/-acetamido]-3-metylo-3-cefemokarboksylowy-4,

sól sodowa kwasu 7-[2'/3'',5''-dwuchlorofenylotio/-acetamido]-cefalosporanowego, MIC=2,0 i 8,7, sól sodowa kwasu 7-[2''-/2'',4''-dwuchloro-5''-fluorofenylotio/-acetamido]-cefalosporanowego, MIC=3,0 i >20,0,

sól sodowa kwasu 7-[2'-/3'',4''-dwuchlorofenylotio/-acetamido]-cefalosporanowego, MIC=1,0 i 1,7, sól sodowa kwasu 7-[2'/2'',5''-dwuchlorofenylotio/-acetamido]-cefalosporanowego, MIC=0,8 i 1,0, kwas 7-[2'-/3''-chloro-4''-fluorofenylotio/-acetamido]-cefalosporanowy, MIC=9,3 i 12,2.

Sposób według wynalazku jest dokładniej wyjaśniony w niżej podanych przykładach.

Przykład I. Do roztworu 7,1 g (30 milimoli) kwasu 3,4-dwuchlorofenylomerkaptooctowego w 100 ml bezwodnego benzenu dodaje się 7,5 g (5,0 ml, 60 milimoli) chlorku oksalilu i jedną kroplę N,N-dwumetyloformamidu. Roztwór miesza się w temperaturze 25°C w ciągu 3 godzin, po czym odparowuje benzen w obrotowej wyparce i pozostałość w postaci syropu o barwie żółtej ponownie rozpuszcza w benzenie i odparowuje w celu usunięcia reszty chlorku oksalilu. Otrzymany syrop rozpuszcza się w 50 ml acetonu i w ciągu 1 godziny wkrapla w temperaturze -5°C do roztworu 8,5 g kwasu 7-aminocefalosporanowego w 200 ml 502 wodnego roztworu acetonu, zawierającego 8,5 g wodorowęglanu sodowego, po czym miesza się w ciągu 2 godzin, ogrzewając powoli do temperatury 25°C.

Następnie odparowuje się aceton w obrotowej wyparce i pozostały wodny roztwór wytrząsa z 100 ml octanu etylu, zakwasza kwasem solnym do wartości pH2, miesza się i rozdziela warstwy. Roztwór wodny ekstrahuje się ponownie 2 porcjami po 50 ml octanu etylu, łączy roztwory organiczne, suszy nad siarczanem magnezu, przesącza i odparowuje w obrotowej wyparce, otrzymując klarowny syrop o barwie żółtej.

Produkt ten rozpuszcza się w 250 ml metanolu, dodaje roztwór 30 milimoli 2-etyloheksanolanu sodowego w 100 ml etanolu, zagęszcza i chłodzi. Otrzymuje się sól sodową kwasu 7-/3,4-dwuchlorofenylotioacetamido/-cefalosporanowego w postaci

kryształów o barwie białej. Widmo produktu w ultrafiolecie wykazuje maksimum przy długości fali 258 milimikronów (E=13 400), a widmo w podczerwieni wykazuje pasmo przy długości fali 1760 cm⁻¹.

Przykład II. W sposób analogiczny do opisanego w przykładzie I wytwarza się sól sodową kwasu 7-/2,5-dwuchlorofenylotioacetamido/-cefalosporanowego. Widmo produktu w ultrafiolecie wykazuje maksimum przy długości fali 253 milimikrony (E=12 550), a widmo w podczerwieni ma pasmo przy długości fali 1760 cm⁻¹.

Przykład III. W sposób analogiczny do opisanego w przykładzie I wytwarza się sól sodową kwasu 7-/3,5-dwuchlorofenylotioacetamido/-cefalosporanowego. Widmo produktu w ultrafiolecie wykazuje maksimum przy długości fali 260 milimikronów (E=15 600), a widmo w podczerwieni ma pasmo przy długości fali 1760 cm⁻¹.

Przykład IV. W sposób analogiczny do opisanego w przykładzie I wytwarza się sól sodową kwasu 7-/2,4-dwuchloro-5-fluorofenylotioacetamido/-cefalosporanowego. Widmo produktu w ultrafiolecie wykazuje maksimum przy długości fali 257 milimikronów (E=17 500), a widmo w podczerwieni ma pasmo przy długości fali 1760 cm⁻¹.

Przykład V. W sposób analogiczny do opisanego w przykładzie I, przez acylowanie kwasu 7-aminocefalosporanowego kwasem 3-chloro-4-fluorofenylomerkaptooctowym, wytwarza się sól sodową kwasu 7-/3'-chloro-4-fluorofenylotioacetamido/-cefalosporanowego. Widmo produktu w ultrafiolecie wykazuje maksimum przy długości fali 254 milimikronów (E=10 400), a widmo w podczerwieni ma pasmo długości fali 1760 cm⁻¹.

Przykład VI. W przykładzie tym porównuje się właściwości antybiotyczne trzech znanych związków, mianowicie metycyliny, cefalotyny i cefalorydyny z właściwościami trzech związków wytworzonych w sposób opisany w wyżej podanych przykładach. Porównuje się minimalne stężenie hamujące tych związków w odniesieniu do różnych wyosobnionych kultur *Staphylococcus aureus*. Numery kultur bakterii i sposób prowadzenia badań oparto na artykule W. E. Wick i D. A. Preston p.t. *Heterogenecus* *McHricillin-Resistant* *Staphylococcus Aureus*, opublikowanym w *Progress in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, sprawozdanie z VI International Congress of Chemotherapy, tom 1, Tokyo, 1970.

W próbach tych szczepionkę rozcieńczono do 10⁴ bakterii w jednej plamie. Jako próby porównawcze stosowano wrażliwe na działanie benzylopenicyliny kultury 3055 i uodpornione na działanie tego antybiotyku kultury H232. Pozostałe kultury są odporne na działanie metycyliny i za wyjątkiem kultury 3136 są otrzymane klicznie. Kultura 3136 stanowi mutant po czterokrotnym przeniesieniu laboratoryjnym.

Wyniki prób podano w tabeli II.

Wyniki podane w tablicy II świadczą o tym, że związki wytworzone w sposób opisany w przykładach I, II i III są w badaniach in vitro bardziej skuteczne przeciwko różnym kulturom *Staphylococcus aureus* odpornym na metycylinę niż

Tablica II

Minimalne stężenie hamujące w mikrogramach/ml dla kultur *S. aureus*

Pożywka	Badany antybiotyk	Badane bakterie															
		Próby kontrolne															
		3055	H 232	3130	3131	3132	3133	3134	3135	3136	3137	3138	3139	966 Setle	1138501 S 61 kavarmak		
agar i 0,5% NaCl	metycylina	1	2	8	8	8	8	16	8	8	>128	16	8	8	8	8	8
	cefalotyna	<0,25	<0,25	8	1	2	2	8	2	2	64	8	2	1	1	2	2
	cefalorydyna z przykładu III	<0,06	<0,06	4	1	2	4	8	1	0,25	8	8	0,25	1	1	1	1
	z przykładu I	<0,06	<0,06	0,5	0,5	0,2	1	0,5	0,5	0,25	2	2	0,25	0,5	0,25	0,5	4
	z przykładu II	<0,06	<0,06	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5	2	1	0,5	1	0,5	0,5	0,5
agar i 5,0% NaCl	metycylina	2	2	128	128	32	128	64	64	64	>128	>128	64	>128	64	128	128
	cefalotyna	<0,25	<0,25	64	32	16	64	64	32	32	128	64	32	32	32	64	64
	cefalorydyna z przykładu III	<0,25	<0,06	8	16	2	16	16	8	16	32	16	16	4	0,25	4	16
	z przykładu I	<0,06	<0,06	1	1	0,5	1	1	1	2	4	1	2	1	0,5	2	2
	z przykładu II	<0,06	<0,06	1	1	0,25	1	0,5	0,25	0,5	2	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5	1

Tablica III

Minimalne stężenie hamujące w mikrogramach/ml dla kultur *S. aureus*

Pożywka	Badany antybiotyk	Próby kontrolne		Badane bakterie														
		3035	H 232	3130	3131	3132	3133	3134	3135	3136	3137	3138	3139	966 Seattle	1138501 Kavar-mick	S 35	S 61	
sojowa i 0,5% NaCl	metycylina	2,0	4,0	16	16	32	8	32	32	32	32	>128	128	16	8,0	32	16	16
	cefalotyna	0,5	0,5	8	2,0	2,0	2,0	32	2,0	2,0	2,0	64	32	4,0	2,0	4,0	8	8
	cefalorydyna z przykładu III	ND	ND	ND	2,0	2,0	1,0	ND	2,0	<5	<5	8	4,0	1,0	4,0	2,0	4	4
	z przykładu I z przykładu II	0,06	0,12	<5	<5	<5	<5	1,0	<5	0,5	<5	2,0	1,0	2,0	1,0	0,5	0,5	0,5
sojowa i 5% NaCl	metycylina	2,0	4,0	64	128	64	128	64	64	128	64	>128	128	>128	64	128	64	64
	cefalotyna	0,5	0,5	64	64	64	64	64	64	64	64	128	64	32	32	64	64	64
	cefalorydyna z przykładu III	ND	ND	ND	16	16	16	ND	16	16	16	32	16	8	8	16	16	16
	z przykładu I z przykładu II	0,06	0,12	2,0	1,0	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	4,0	2,0	2,0	8	1,0	2,0	1,0
	metycylina	0,06	0,25	8,0	2,0	2,0	2,0	4,0	2,0	4,0	2,0	4,0	2,0	<0,5	2,0	2,0	2,0	2,0
	cefalotyna	0,06	0,25	4,0	2,0	2,0	2,0	4,0	2,0	4,0	2,0	4,0	1,0	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0
	cefalorydyna z przykładu III	0,06	0,12	4,0	2,0	2,0	2,0	4,0	2,0	4,0	2,0	4,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
	z przykładu I z przykładu II	0,06	0,25	8,0	2,0	2,0	2,0	4,0	2,0	4,0	2,0	4,0	2,0	<0,5	2,0	2,0	2,0	2,0

Tablica IV

Badany szczep S. aureus	Związek opisany w przykładzie V				Związek opisany w przykładzie III				Cefalotyna		
	30 mg	Tarcza	zmiana w mm 37°-30°C	37°C	30 mg	Tarcza	zmiana w mm 37°-30°C	37°C	30 mg	Tarcza	zmiana w mm 37°-30°C
3125	33,8	36,0	+2,2	34,2	37,0	37,0	+2,8	33,4	33,8	33,8	+0,4
3130	33,2	31,0	-2,2	32,0	33,6	33,6	+1,6	32,8	20,2	20,2	-12,6
3131	26,6	29,0	+2,4	30,6	31,8	31,8	+1,2	29,6	16,6	16,6	-13,0
3132	29,4	28,0	-1,4	31,0	32,6	32,6	+1,6	28,6	17,6	17,6	-11,0
3133	27,6	24,8	-2,8	29,0	30,8	30,8	+1,8	28,8	12,8	12,8	-16,0
3134	28,0	27,8	-0,2	29,8	33,0	33,0	+3,2	27,8	12,1	12,1	-15,7
3135	28,2	26,2	-2,0	28,3	29,6	29,6	+1,3	28,0	11,8	11,8	-16,2
3136	35,0	31,0	-4,0	35,0	29,8	29,8	+5,2	35,6	20,8	20,8	-14,8
3137	24,4	22,1	-2,3	26,2	26,0	26,0	-0,2	17,8	0	0	>17,8
3138	25,6	25,2	-0,4	27,0	29,4	29,4	+2,4	26,2	11,3	11,3	-14,9
3139	34,0	31,6	-2,4	36,0	32,2	32,2	-3,8	32,0	27,0	27,0	-5,0
3140	28,4	26,4	-2,0	28,8	30,2	30,2	+1,4	29,7	10,4	10,4	-13,3
3055	>35	>35	0	>35	35	35	0	>35	>35	>35	-
3074	36,0	36,0	+0,9	34,1	>35,0	>35,0	-	31,8	32,1	32,1	+0,3
H232	33,4	34,3			32,6	32,6	-1,5	33,4	33,2	33,2	-

znane antybiotyki metycylina, cefalotyna i cefalorydyna.

Przykład VII. W próbie tej porównuje się za pomocą badań prowadzonych przez rozcieńczanie brzeźki właściwości antybiotyczne związków wytworzonych w sposób opisany w przykładach I, II i III z właściwościami metycyliny, cefalotyny i cefalorydyny. Wartości minimalnych stężeń hamujących oblicza się w stosunku do kultur *Staphylococcus aureus* opisanych w przykładzie VI,

ale hodowlę prowadzi się w dwóch pożywkach sojowych, z których jedna zawiera tylko 0,5%, a druga 5,0% chloru sodowego. Ma to na celu umożliwienie odróżnienia szczepów odpornych na działanie metycyliny od szczepów nieodpornych.

Wartości minimalnego stężenia hamującego w przypadku metycyliny dla hodowli o niskiej zawartości chlorku sodowego różnią się bardzo od odpowiednich wartości dla hodowli o wysokiej zawartości tej soli, przy czym różnica ta nasuwa wniosek, że kultury takie są odporne na działanie metycyliny, ale nie dotyczy to kultur ulegających działaniu antybiotyków, na przykład 3055 i H232 [patrz Y. A. Chalbert, 1967 Postgrad Med. J. 43 (dodatek), str. 40-46]. Należy się spodziewać, że zmiany wartości minimalnego stężenia hamującego dla tego typu kultur również będą oznaczały to samo również i w przypadku innych antybiotyków β -laktamowych, na przykład różnych penicylin i cefalosporyn. Przykładem może tu być cefalotyna, której minimalne stężenie hamujące w stosunku do niektórych kultur *Staphylococcus aureus* odpornych na metycylinę wzrasta z 2 do 64. W odróżnieniu od tego, takie różnice wartości stężenia hamującego nie występują w przypadku antybiotyków wytwarzanych sposobem według wynalazku. Świadczy to o braku odporności różnych kultur na te antybiotyki, co świadczy o tym, że kultury *S. aureus* odporne na działanie metycyliny ulegają działaniu antybiotyków wytwarzanych sposobem według wynalazku.

Wyniki prób podano w tablicy III.

Stosowane w próbach szczepionki zawierają w 1 ml 10^5 bakterii.

Przykład VIII. Antybiotyczne działanie rozpuszczalnego w wodzie kwasu 7-[2'-3"-chloro-4"-fluorofenylotio/-acetamido]-cefalosporanowego opisanego w przykładzie V na różne kultury *Staphylococcus aureus* bada się metodą tarczową A. W. Bauer, W. M. M. Kirby, J. C. Sherris i Turck, opisaną w Amer. J. Clin. Pathol 45, str. 493-496 (1966). Kultury hoduje się w temperaturze 37°C lub 30°C, przy czym zgodnie z artykułem D. I. Annear zamieszczonym w The Medical Journal of Australia, 16 marca 1968 r. różnorodność *S. aureus* w zakresie odporności na metycylinę występuje przy prowadzeniu hodowli tych bakterii w temperaturze 30°C. Badaniom poddaje się szczepy opisane w przykładzie VI. Szczepy o numerach 3125-3140 są odporne na działanie metycyliny, a ich odporność na cefalotynę jest różna, szczep 3055 jest wrażliwy na penicylinę, a szczepy 3074 i H232 są wrażliwe na działanie metycyliny.

Wyniki prób podano w tablicy IV.

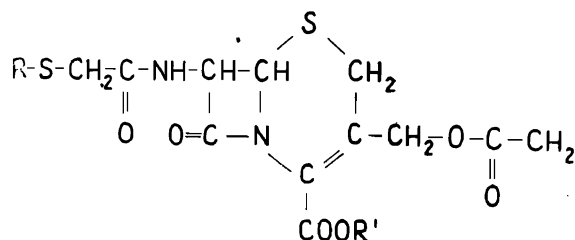
Przykład IX. Bada się antybiotyczne właściwości kwasu 7-[2'-3"-chloro-4"-fluorofenylotio/-acetamido]-cefalosporanowego w stosunku do *Streptococcus pyogenes*, szczep C203, u myszy, porównując w takich samych warunkach z właściwościami cefalorydyny. Próby przeprowadzone wykazały, że antybiotyki skuteczne według tej metody przeciwko *Streptococcus pyogenes*, szczep C203, są przy stosowaniu klinicznym skuteczne przeciwko szczepom *Staphylococcus aureus*. Przykład ten wykazuje, że antybiotyki wytwarzane

Próby prowadzi się in vivo, metodą W. E. Wick, F. Streightoff i D. H. Holmes, J. Bacteriol. **81**, str. 233—235 (1961). Średnią skuteczną dawkę ED₅₀ niezbędną w celu wyleczenia 50% myszy oblicza się metodą L. J. Reed i H. Muench, Am. J. Hyg. **27** str. 493—497 (1938).

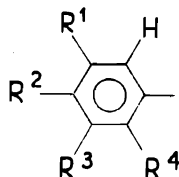
Tablica V

Badany środek	Stosowanie	ED ₅₀ mg/kg × 2	Wskaźnik zarażenia XID ₅₀
Związek z przykładu V	doustnie	7	27,9
	podskórnie	>0,21	27,9
cefalory-	doustnie	0,323	27,9
dyna	podskórnie	0,10	27,9

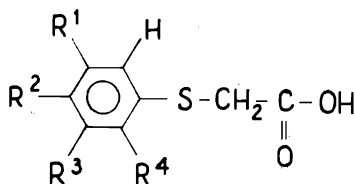
Sposób wytwarzania kwasów chlorowcenylo-
tioacetamidocefalosporanowych o ogólnym wzorze
1, w którym R^1 oznacza atom wodoru, grupę dwu-
cykloheksyloaminową lub farmakologicznie dopusz-
czalny kation, a R oznacza grupę o ogólnym wzorze
2, w którym, gdy R^1 oznacza atom fluoru, wów-
czas R^2 i R^4 oznaczają atomy wodoru lub chloru,
a R^3 oznacza atom wodoru, a gdy R^1 oznacza atom
chloru, wówczas R^2 oznacza atom wodoru i jeden
z podstawników R^3 i R^4 oznacza atom chloru, a
drugi oznacza atom wodoru, albo R^2 oznacza atom
chloru, a R^3 i R^4 oznaczają atomy wodoru lub
chloru, zaś gdy R^2 oznacza atom fluoru, wówczas
 R^3 oznacza atom chloru, a R^1 i R^4 oznaczają ato-
my wodoru, **znamienny tym**, że kwas 7-aminoce-
falosporanowy acyluje się za pomocą kwasu o ogólnym
wzorze 3, w którym R^1 , R^2 , R^3 i R^4 mają wy-
żej podane znaczenie, albo za pomocą bezwodnika,
mieszanego bezwodnika lub halogenku tego kwasu.



Wzrost 1



Wzrost 2.



Wzór 3