



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

MKP C07d 99/24

Zgłoszono: 27.01.73 (P. 160439)

Pierwszeństwo: 11.09.72 Stany
Zjednoczone
Ameryki

Int. Cl.² C07D 501/06

Zgłoszenie ogłoszono: 15.11.73

Opis patentowy opublikowano: 30.07.1977

Twórca wynalazku: _____

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

Sposób wytwarzania nowych pochodnych chlorowcofenylotioacetamidocefalosporyny

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych pochodnych chlorowcofenylotioacetamidocefalosporyny, które skutecznie hamują rozwój mikroorganizmów *Staphylococcus*, odpornych na działanie metycyliny.

W licznych publikacjach opisano skutki, jakie powoduje brak skuteczności działania różnych antybiotyków na różne szczepy *Staphylococcus aureus*, odporne na działanie metycyliny. Szczepy te 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 nowotwory, 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 Zjednoczonych Ameryki nr 3 335 136 znane są pewne kwasy chlorowcofenylomerkaptometylocefalosporynowe odporne na działanie penicyliny i na działanie kwasów oraz skuteczne przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i niektórym bakteriom Gram-ujemnym. W opisie tym nie ma jednak mowy o identyfikowaniu

2

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

Nieoczekiwanie stwierdzono, że nowe pochodne chlorowcofenylotioacetamidocefalosporyny o ogólnym wzorze 1, w którym X i Y oznaczają atomy wodoru lub chloru, przy czym są one tak rozmieszczone, że jeżeli tylko jeden z tych podstawników oznacza atom chloru, wówczas znajduje się on w pozycji 3 pierścienia benzenowego, a jeżeli oba oznaczają atomy chloru, wówczas znajdują się one w pozycjach 3 i 4 lub 3 i 5 albo 2 i 5 tego pierścienia, Z oznacza atom wodoru lub fluoru i w przypadku gdy oznacza atom fluoru, wówczas znajduje się w pozycji 3 lub 4 pierścienia benzenowego i stanowi albo jedyny podstawnik tego pierścienia, albo równocześnie pierścień ten zawiera również jako podstawniki jeden lub dwa atomy chloru, z których jeden znajduje się w pozycji 3 lub 4 pierścienia, R oznacza atom wodoru, grupę 5-metylo-1, 3, 4-tiazol-2-ylotio, 1-metylo-5-tetrazolilotio lub grupę metylokarbamoiłoksyłową a R' oznacza atom wodoru, grupę dwucykloheksyloaminową lub farmakologicznie dopuszczalny kation, są nie tylko odporne na działanie penicyliny i trwałe w środowiskach kwaśnych, jak również skutecznie działają przeciwko mikroorganizmom Gram-dodatnim i wielu mikroorganizmom Gram-ujemnym, ale

także są wysoce skuteczne przeciwko różnym mikroorganizmom *Staphylococcus aureus* odpornym na działanie metycyliny.

Sposobem według wynalazku związku o wzorze 1, w którym wszystkie symbole mają wyżej podane znaczenie, wytwarza się przez acylowanie związku o ogólnym wzorze 2, w którym R i R' mają wyżej podane znaczenie, kwasem o ogólnym wzorze 3, w którym X, Y i Z mają wyżej podane znaczenie, albo halogenkiem, bezwodnikiem lub mieszanym bezwodnikiem 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-aminocefalosporanowy, który acyluje się w znany sposób, wprowadzając do grupy aminowej w pozycji 7 żądany łańcuch boczny. Jako środki acylujące stosuje się korzystne 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.

Związki mające boczny łańcuch 3-tiometylowy otrzymuje się przez reakcję cefalosporyny C lub kwasu 7-aminocefalosporanowego albo jego estrów lub pochodnych z chronioną grupą aminową z odpowiednim tiolem. Reakcję tę prowadzi się sposobami analogicznymi do znanych, na przykład podanych w opisach patentowych Stanów Zjedn. Am. nr 3 516 996 i 3 530 123. Grupę aminoadypoilową można odszczepiać z cefalosporyny C i grupę 7-aminową tiolowanego kwasu lub estru acylować w wyżej podany sposób.

Grupy estrowe usuwa się przez redukcję, hydrogenolizę lub rozszczepianie za pomocą kwasu, w zależności od rodzaju występującej grupy estrowej i ewentualnie wytwarza się sole kwasów, które są łatwiej rozpuszczalne. W celu zwiększenia zdolności produktów do ulegania procesowi absorpcji w organizmach można stosować estrы acetoksymetylowe kwasów chlorowcofenyltioacetamidocefalosporanowych.

Związki wytwarzane sposobem według wynalazku 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-dwumetyloaminiowe lub dwubenzylaoetylenodwuaminiowe. 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 izotonicznych roztworach soli albo dekstrozy jako preparaty do wstrzykiwania śródmięśniowego. Dawka dla dorosłych wynosi 0,25–0,5 g co 4–6 godzin. Związki te można również stosować doustnie, w nieco większych daw-

kach, wynoszących przeważnie 0,5–1,0 g co 4–6 godzin. Preparaty do podawania doustnego mają postać tabletek, kapsulek żelatynowych lub zawieszin, które wytwarza się 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 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, maj 1969, str. 547–554.

W badaniach stosuje się typowe płytki Petriego, kwadratowe, 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 uzyskanymi przy stosowaniu obu typów płytek, toteż surowicę z reguły dodaje się tylko do warstwy dolnej.

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 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 zawiesiny wytrząsa się dokładnie i do prób odmierza pipetą 1 ml zawiesiny zawierającej podwielokrotność końcowego stężenia agaru wynoszącego 0,05%.

Próbka powinna być naniesiona na płytkę równomiernie i za jednym ruchem, bardzo szybko, co osiąga się po nabyciu odpowiedniej wprawy. 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 płycie.

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 stężenie hamujące (MIC) są średnimi z dwóch pasm na płycie i 2–3 płytek.

Na jednej płytce można łatwo umieścić 8 pasm. Jeżeli pasmo nie ma wyraźnie zarysowanego 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 pokazano w tablicy I.

Tablica I

Numer 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 na gronkowce uodpornione stosuje się płytki kontrolne, zawierające penicylinę i stafecylinę 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 uchwycenie niewielkich różnic w działaniu antybiotyków, a przy tym wyniki uzyskane tą metodą można przechowywać w postaci fotografii.

Poza tym można stosować łatwo modyfikację tej metody do specjalnych celów, na przykład gradienty krzyżowe.

Sposób według wynalazku zilustrowano w niżej podanych przykładach.

Przykład I. 571 mg kwasu 2,5-dwuchlorofenylotiooctowego rozpuszcza się w 75 ml i do roztworu dodaje 0,31 ml chlorku oksalilu i 2 krople dwumetyloformamidu, utrzymując roztwór w temperaturze 0°—5°C w ciągu 1 godziny. Roztwór odparowuje się w wyparce obrotowej i pozostałość rozpuszcza w 15 ml acetonu. 546 mg kwasu 7-amino-3-/N-metylokarbamoiloksymetylo/- Δ^3 -cefaloporanowego rozpuszcza się w 20 ml wody zawierającej 605 mg wodorowęglanu sodowego, dodaje 5 ml acetonu i chłodzi do temperatury -5°C, po czym do roztworu wkrapla się przygotowany w sposób wyżej opisany chlorek kwasowy i miesza w ciągu 30 minut w temperaturze 0°C. Następnie odparowuje się w wyparce obrotowej aceton i pozostałość rozpuszcza w 50 ml wody z 100 ml mieszaniny octanu etylu z acetonem.

Roztwór zakrapla się kwasem solnym do wartości pH 2,5, oddziela warstwę organiczną, suszy nad siarczanem sodowym i odparowuje, a następnie pozostawia do krystalizacji.

Otrzymuje się kwas 7-/2,5-dwuchlorofenylomerkaptoacetamido/-3-/N-metylokarbamoiloksymetylo/-3-cefemokarboksylowy-4, z wydajnością wynoszącą 20% wydajności teoretycznej. Produkt w widmie absorpcyjnym w świetle nadfioletowym wykazuje

maksimum przy długości fali 256 milimikronów ($\Sigma=13800$), a w świetle podczerwonym pasmo przy 1760 cm^{-1} .

Przykład II. 2,20 g 10 milimoli kwasu 3-chloro-4-fluorofenylotiooctowego rozpuszcza się w 50 ml bezwodnego benzenu i dodaje 10 ml chlorku oksalilu oraz 1 kroplę dwumetyloformamidu i miesza w ciągu 1 godziny w temperaturze 25°C. Następnie odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem benzen i usuwa nadmiar chlorku oksalilu, otrzymując chlorek kwasu w postaci syropu o żółtawej barwie.

Produkt ten rozpuszcza się w benzenie i ponownie odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem w celu usunięcia śladów chlorku oksalilu i chlorowodoru, po czym pozostałość rozpuszcza się w 20 ml bezwodnego acetonu i mieszając wkrapla w temperaturze -10°C do roztworu 3,44 g (10 milimoli) kwasu 7-amino-3-/5-metylo-1, 3, 4-tiadiazol-2-ylo-tiometylo-3-cefemokarboksylowego-4 i 3,44 g wodorowęglanu sodowego w 50 ml wody i 50 ml acetonu, po czym miesza się w kąpeli lodowej w ciągu 1 godziny. Następnie odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem aceton i pozostały roztwór wodny miesza z 50 ml octanu etylu i zakwasza kwasem solnym do wartości Ph2. Warstwę wodną ekstrahuje się powtórnie 30 ml octanu etylu, łączy organiczne wyciągi, suszy nad siarczanem magnezu, przesącza i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem.

Pozostałość o konsystencji syropu i barwie żółtej rozpuszcza się w etanolu i dodaje 3,4 milimola 2-etyloheksanolanu sodowego, przy czym szybko powstają kryształy. Otrzymany produkt odsącza się, przemycza etanolem i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując sól sodową kwasu 7-{2-[(3-chloro-4-fluorofenylotio)-acetamido-3-]}[(5-metylo-1, 3, 4-tiadiazol-2-ylo)-tio]-metylo-3-cefemokarboksylowego-4. Widmo produktu w podczerwieni wykazuje pasmo przy długości fali 1760 cm^{-1} (β laktam), a widmo w ultrafiolecie ma maksimum przy długości fali 270 milimikronów ($\Sigma=14200$).

Wszystkie inne dane fizyczne zgadzają się z danymi odpowiadającymi budowie tego związku. Związek ten jest rozpuszczalny w wodzie w temperaturze pokojowej w ilościach większych niż 100 mg/ml, a po ogrzaniu rozpuszczalność wzrasta.

Otrzymany produkt wykazuje in vitro minimalne stężenie hamujące w mikrogramach/ml agaru w stosunku do różnych mikroorganizmów podane w tablicy II.

Tablica II

Badany mikroorganizm	MIC antybiotyku $\mu\text{g/ml}$
S. aureus 3055 (wrażliwy na penicylinę G)	0,031
S. aureus 3074 (odporny na penicylinę G)	0,062
S. facalis X 66	400
P. morganii	>128
S. typhosa SA 12	32
H. pneumoniae KL 14	64
E. aerogenes EB 17	128
E. coli EC 14	64

Badany mikroorganizm	MIC antybiotyku μg/ml
C. freundii CF 17	>128
P. aeruginosa X 239	>128
S. marcescens SE 3	>128
S. typhimurium	128
B. bronchiseptica	>128
P. solanaecarum X 185	>128
E. amylovora	64
C. tropicalis A 17	>128
T. mentagrophytes	>128
A. flavus	>128
C. ulmi	>128

Minimalne stężenie hamujące związku wytworzonego w sposób opisany w przykładzie II w stosunku do *Streptococcus pyogenes* 0203 w brzeczce wynosi 0,008 mikrograma/ml. Średnia dawka skuteczna tego związku (ED_{50}) przy stosowaniu podskórnym przeciwko *S. pyogenes* wynosi 0,281 mikrograma/ml, podczas gdy wartość LD_{50} wynosi 1260.

Sól otrzymaną w sposób opisany w przykładzie II badano w celu określenia jej minimalnego stężenia hamującego w porównaniu z odpowiednimi stężeniami znanych antybiotyków, takich jak metycylina, cefalotyna i cefalorydyna, w stosunku do niektórych bakterii. Wyniki podano w tablicy III. Numery kultur bakterii i sposób prowadzenia badań oparto na artykule W. E. Wick i D. A. Preston pt. Heterogeneous Methicillin 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 10^8 bakterii w jednej płamie.

Jako próby porównawcze stosowano kultury 3055 (wrażliwe na działanie benzylopenicyliny i H232) odporne na działanie benzylopenicyliny. Pozostałe kultury wymienione w tablicy są odporne na działanie metycyliny i za wyjątkiem kultury 3136 są otrzymane klinicznie. Kultura 3136 stanowi mutant po czterokrotnym przeniesieniu laboratoryjnym. W tablicy III podano minimalne stężenie hamujące w mikrogramach/ml.

Przykład III. W sposób analogiczny do opisanego w przykładzie I i II, z kwasu 3, 4-dwuchlorofenylooctowego i kwasu 7-amino-3-/1-metylotetrazol-5-yliotiometylo/-3-cefemokarboksylowego-4 otrzymuje się kwas 7-[2-(3,4-dwuchlorofenylo)-acetamido]-3-(1-metylotetrazol-5-yliotiometylo)-3-cefemokarboksylowy-4, którego widmo w świetle nadfioletowym wykazuje maksimum przy długości fali 260 milimikronów ($\Sigma=11600$) a widmo w podczerwieni wykazuje pasmo przy 1760 cm^{-1} .

Przykład IV. W sposób analogiczny do opisanego w przykładach I i II, z kwasu 2,5-dwuchlorofenylooctowego i kwasu 7-amino-(5-metylo-1,3,4-tiadiazol-2-yliotiometylo)-3-cefemokarboksylowego-4 otrzymuje się kwas 7-[2-(2,5-dwuchlorofenylo)-acetamido]-3-(5-metylo-1,3,4-tiadiazol-2-yliotiometylo)-3-cefemokarboksylowy-4, którego widmo w świetle nadfioletowym wykazuje maksimum przy długości fali 254 milimikrony ($\Sigma=15200$), a widmo w podczerwieni wykazuje pasmo przy 1700 cm^{-1} .

Tablica III

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

Pożywka	Antybiotyk	Próby kontrolne		Badane bakterie												
		3055	H232	3130	3131	3132	3133	3134	3135	3136	3137	3138	3139	966 Seat- tle	113850 Havar- mak	S 61
Agar-soja, z trypticase 0,5% NaCl	metycylina	1	2	4	4	4	2	8	4	4	8	8	2	4	8	4
	cefalotyna	0,13	2,5	0,5	0,5	0,5	0,5	2	1	0,5	2	1	0,5	0,5	1	1
	cefalorydyna	0,03	0,06	0,5	0,5	0,25	0,13	1	0,5	0,13	4	1	0,5	0,5	1	1
	z przykł. II	0,03	0,06	0,5	0,25	0,13	0,13	1	0,5	0,25	1	1	0,25	0,25	0,5	0,5
Agar, soja, trypticase z 4,5% NaCl (dodano 5% NaCl)	metycylina	1	1	16	32	8	2	32	32	64	64	32	1	16	64	32
	cefalotyna	0,25	0,25	1	1	0,5	0,5	1	1	1	1	2	0,25	0,25	1	1
	cefalorydyna	0,13	0,13	1	1	0,5	0,25	1	4	4	4	4	0,13	0,13	8	1
	z przykł. II	0,03	0,06	0,25	0,25	0,13	0,13	0,25	0,2	0,5	1	0,5	0,03	0,06	1	0,5

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania nowych pochodnych chlorowcofenylioacetamidocefalosporyny o ogólnym wzorze 1, w którym X i Y oznaczają atomy wodoru lub chloru, przy czym są one tak rozmieszczone, że jeżeli tylko jeden z tych podstawników oznacza atom chloru, wówczas znajduje się on w pozycji 3 pierścienia benzenowego, a jeżeli oba oznaczają atomy chloru, wówczas znajdują się w pozycjach 3 i 4 lub 3 i 5 albo 2 i 5 tego pierścienia, Z oznacza atom wodoru lub fluoru i w przypadku, gdy oznacza atom fluoru, wówczas znajduje się w pozycji 3 lub 4 pierścienia benzenowego i stanowi albo jedyny podstawnik tego pierścienia,

albo równocześnie pierścień ten zawiera również jako podstawniki jeden lub dwa atomy chloru, z których jeden znajduje się w pozycji 3 lub 4 pierścienia, R oznacza atom wodoru, grupę 5-metylo-1,3,4-tiazol-2-ylotio, 1-metylo-5-tetrazolilotio lub grupę metylokarbamoiloksylową, a R' oznacza atom wodoru, grupę dwucykloheksyloaminową lub farmakologicznie dopuszczalny kation, **znamienny tym**, że związek o ogólnym wzorze 2, w którym R i R' mają wyżej podane znaczenie, acyluje się kwasem o ogólnym wzorze 3, w którym X, Y i Z mają wyżej podane znaczenie, albo halogenkiem, bezwodnikiem lub mieszanym bezwodnikiem tego kwasu.

