

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

51708

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 06.VII.1964 (P 105 093)

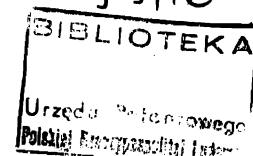
Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 24. VIII. 1966

Kl. 12 p, 4/01

MKP C 07 d

UKD



Współtwórcy wynalazku: doc. dr Jerzy Cieślak, mgr inż. Błagina Wasiliewa

Właściciel patentu: Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa”,
Warszawa (Polska)

Sposób otrzymywania półsyntetycznych penicylin

1

Przedmiotem wynalazku jest otrzymywanie półsyntetycznych penicylin o wzorze ogólnym 1, w którym X oznacza α -amino podstawioną grupę acylową o wzorze ogólnym 2, w którym $n = 0 - 6$, a R oznacza atom wodoru, podstawiony lub niepodstawiony rodnik alkiłowy, cykloalkilowy, aryłowy, arylo-alkilowy albo podstawioną lub wolną grupę heterocykliczną.

Związki tego typu znajdują zastosowanie jako środki terapeutyczne dla zwierząt i ludzi, oraz mogą być użyte jako dodatek do pasz.

Penicyliny o wzorze ogólnym 1 charakteryzują się większą trwałością w środowisku kwaśnym aniżeli penicylina G i penicylina V oraz szerszym spektrum przeciwbakteryjnym, działając między innymi na szereg drobnoustrojów Gram-ujemnych.

Znane sposoby wytwarzania półsyntetycznych penicylin o wzorze 1 polegają na kondensacji kwasu 6-aminopenicylanowego (6-AP) z mieszanymi bezwodnikami kwasów o wzorze X O H, w którym X ma znaczenie wyżej podane, w których grupa α -aminowa chroniona jest grupą o ogólnym wzorze $R' - O - CO -$, w którym R' oznacza rodnik alkiłowy albo podstawiony lub niepodstawiony rodnik benzylowy lub fenylowy. Na etapie katalitycznej wodorolizy z przejściowo powstających N-podstawionych penicylin oddziela się następnie grupę ochronną otrzymując odpowiednie N-(α -amino-acylo)-pochodne kwasu 6-aminopenicylanowego o wzorze 1. Sposoby te podane są w brytyjskim opisie patento-

2

wym nr 873049, w opisie patentowym NRF nr 945637, w opisie patentowym St. Zjedn. Am. nr 2985648 oraz publikacjach F. P. Doyle i inni — J. Chem. Soc. 1440/1962/, Manufacturing Chemist 34,296/1963/.

5 Znany z wymienionych opisów patentowych i publikacji sposób obejmuje kilka stadiów pośrednich syntezy i konieczność stosowania drogich katalizatorów, np. palladu. Ze względu na obecność atomu siarki w półprodukcie, katalizatory te muszą być stosowane w dużym nadmiarze, a szybkie ich zatrucie pociąga za sobą konieczność ciągłej regeneracji. W konsekwencji metoda jest nieekonomiczna.

15 Znane są ponadto sposoby wytwarzania związków o wzorze 1 omijające etap katalitycznej wodorolizy. Jeden z tych sposobów polega na kondensacji kwasu 6-AP z mieszanymi bezwodnikami utworzonymi z chloromrówczanów alkiłowych lub chlorków kwasowych i soli N-podstawionych α -aminokwasów otrzymanych w wyniku reakcji soli α -aminokwasów z odpowiednimi β -dwuketonami lub β -ketoestrami.

20 Z powstających N-podstawionych kwasów 6-(α -aminoacylamido)-penicylanowych można na drodze hydrolizy kwaśnej, prowadzonej w łagodnych warunkach, uzyskać związki o wzorze 1.

25 Metoda powyższa oparta jest na sposobie syntezy peptydów, opisanym w Angew. Chem. 74,873(1962) i w opisie patentowym NRF 1143516 oraz w odniesieniu do związków o wzorze 1, w Angew. Chem. 76,342(1964).

Drugi sposób wytwarzania związków o wzorze 1 polega na kondensacji kwasu 6-AP z 4-podstawionymi oksazolidyno-dionami —2,5.

W brytyjskim opisie patentowym nr 903785 opisany jest sposób kondensacji soli wapniowych kwasu 6-AP w bezwodnych rozpuszczalnikach organicznych z 4-podstawionymi oksazolidynodionami-2,5 prowadzący do otrzymywania związków o wzorze 1 lub ich soli. W brytyjskich opisach patentowych nr 958824 oraz nr 960896 opisano sposób kondensacji soli metali alkalicznych kwasu 6-AP z wyżej wymienionymi związkami w wodno-organicznym środowisku o pH 7, prowadzący do otrzymania związków o wzorze 1. W opisanych warunkach (pH około 7 oraz obecność wody) zachodzi polimeryzacja 4-podstawionych oksazolidyno-dionów-2,5 prowadząca do peptydów złożonych z cząsteczek wyjściowych α -aminokwasów. Reakcja ta znacznie obniża wydajność oraz komplikuje proces izolacji dwupeptydów o wzorze 1.

Z francuskiego opisu patentowego nr 1349621 znany jest sposób otrzymywania związków o wzorze 1 w wodnym roztworze o pH około 3,8—6,2. Ponieważ substraty reakcji nie rozpuszczają się dobrze w wodzie w przytoczonych zakresach pH, reakcję kondensacji prowadzi się w roztworach buforowych o odpowiednio dobranej aktywności jonowej, mieszczących się w granicach 0,1—0,3. Bardzo niekorzystną cechą omawianej metody jest konieczność pracy w dużych rozcieńczeniach przy stężeniu rzędu 1—2%, co z kolei znacznie komplikuje i podraża proces izolacji i oczyszczanie produktów.

Według wynalazku, udaje się uniknąć omówionych wyżej wad przez zmianę zasadniczych parametrów reakcji kondensacji.

Sposób według wynalazku polega na bezpośredniej kondensacji kwasu 6-aminopenicylanowego z 4-podstawionymi oksazolidyno-dionami-2,5 o wzorze 3, w którym R oznacza atom wodoru, wolny lub podstawiony rodnikiem alkilowym, cykloalkilowym, arylo-alkilowym albo grupę heterocykliczną wolną lub podstawioną.

Roztwór oksazolidyno-dionu-2,5 w obojętnym rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą, jak np. aceton, dioksan itp., wprowadza się do intensywnie mieszanego wodno-organicznego roztworu kwasu 6-aminopenicylanowego o pH = 1—3,8.

Zaletą sposobu według wynalazku jest ponadto to, że reakcji nie trzeba prowadzić w roztworach tak silnie rozcieńczonych jak dotychczas. Według wynalazku kondensację 4-podstawionych oksazolidyno-dionów-2,5 z kwasem 6-AP prowadzi się przy stężeniach poszczególnych substratów rzędu 7—15%, jak w przytoczonych przykładach.

Przebieg reakcji oraz jej zakończenie można określić ilością wydzielonego dwutlenku węgla. W zależności od użytego rodzaju 4-podstawionego oksazolidyno-dionu-2,5, reakcja trwa praktycznie 2—5 godzin i w znacznej mierze zależy od temperatury, w jakiej prowadzi się proces kondensacji.

Według wynalazku reakcję prowadzi się w zakresie temperatur —10 — +40°, korzystnie +15° — +25°C. Po jej zakończeniu roztwór odsącza się od wydzielonego osadu, przesącz przemywa eterem, po czym pH roztworu doprowadza się do wartości

określonej punktem izoelektrycznym danej penicyliny. Z otrzymanego roztworu wodno-organicznego, bezpośrednio po zagęszczeniu lub liofilizacji izoluje się znanymi metodami daną penicylinę w postaci wolnego kwasu. Wydajność procesu kondensacji w zależności od użytego 4-podstawionego oksazolidyno-dionu-2,5 oraz stosunków molarnych półproduktów, określonych metodą mikrobiologiczną oraz chemiczną, w przeliczeniu na wyjściowy kwas 6-aminopenicylanowy, wynosi od 30—80%.

Przykład I. 2,16 g (0,01 M) kwasu 6-aminopenicylanowego rozpuszczone w 10 ml 1 n kwasu solnego i dodano 10 ml acetonu. Do powstałego roztworu, w temperaturze 20°C, przy intensywnym mieszaniu, dodano jednorazowo roztwór 1,77 g (0,01 M) DL-4-fenyl-oksazolidyno-dionu — 2,5 w 5 ml acetonu. Po 2 godzinach odsączono mieszaninę reakcyjną, klarowny przesącz przemyto dwukrotnie eterem i warstwę wodną doprowadzono przy pomocy 1 n ługu sodowego do pH = 4,65. Otrzymany w ten sposób roztwór zatężono do sucha na obrotowej wyparce próżniowej w temperaturze 2—5°C. Produkt następnie wysuszono w eksykatorze próżniowym nad pięciotlenkiem fosforu do stałej wagi.

Otrzymano 3,7 g surowego kwasu 6-[(DL- α -amino- α -fenyloacetylo)-amino]-penicylanowego w postaci żółto-kremowego proszku. Analiza mikrobiologiczna metodą płytkowo-cylinderkową, na szczepie testowym *Bacillus subtilis* ATCC 6633 wobec wzorca roboczego, to jest 98 procentowego kwasu 6-[(DL- α -amino- α -fenyloacetylo)-amino] - penicylanowego wykazała 45% czystości otrzymanego produktu. Przy oznaczaniu metodą jodometryczną czystość otrzymanego produktu, w stosunku do wzorca roboczego wynosiła 53%. Widmo IR w zawiesinie w nujolu wykazało charakterystyczne maksimum absorpcji przy 1760 cm^{-1} (grupa C=O wiązania β -laktamowego), 1690 cm^{-1} (C=O w wiązaniu amidowym) i 1600 cm^{-1} (grupa C=O w grupie karboksylowej).

Przykład II. 6,48 g (0,03 M) kwasu 6-aminopenicylanowego rozpuszczono w 39 ml 1,029 n kwasu solnego, dodano 30 ml acetonu i mieszano 10 minut aż do całkowitego rozpuszczenia się osadu. Do klarownego intensywnie mieszanego roztworu w ciągu 40 minut wdroplono roztwór 6,01 g (0,034 M) DL-4-fenyl-oksazolidyno-dionu — 2,5 w 30 ml acetonu. Po 2,5 godzinach mieszania w temperaturze 25°C odsączono wydzielony osad, a klarowny przesącz przemyto eterem. Warstwę wodną zobojętniono przy pomocy 1 n wodorotlenku sodowego do pH 4,65 i poddano liofilizacji. Uzyskano 10,37 g surowego produktu w formie białego bezpostaciowego proszku. Analiza mikrobiologiczna jak w przykładzie I wykazała 55% czystości otrzymanego produktu; według analizy chemicznej otrzymano 61% czystości produktu. Widmo IR w nujolu — maksima absorpcji 1763 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} oraz zgodność charakteru widma z widmem wzorca roboczego w zakresie 650 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} i 1800 cm^{-1} —5000 cm^{-1} .

Poniżej zestawiono spektrum przeciwbakteryjne oznaczone metodą rozcieńczeniową liofilizatu i wzorca roboczego dla kilku wybranych szczepów.

Najmniejsze stężenie antybiotyku hamujące
wzrost bakterii w mg/ml

Szczep testowy	Wzorzec roboczy	Liofilizat B
Salmonella typhi 155	0,000195	0,00038
Shigella sonnei 520	0,00098	0,00192
Escherichia coli ATCC 9637	0,0098	0,0194

Przykład III. 1,08 g (0,005 M) kwasu 6-amino-penicylanowego rozpuszczono w 5 ml 1 n kwasu solnego, dodano 5 ml acetonu. Do otrzymanego roztworu wkroplono przy intensywnym mieszaniu roztwór 0,715 g (0,005 M) DL-4-izopropyl-oksazolidyno-dionu — 2,5 w 5 ml acetonu. Po 3 godzinach mieszaninę reakcyjną, utrzymywaną w temperaturze 25°C odsączono, przesącz przemyto eterem, warstwę wodną zobojętniono przy pomocy 5 ml 1 n wodorotlenku sodowego, powtórnie odsączono i klarowny przesącz poddano liofilizacji. Otrzymano 1,65 g surowego kwasu 6-[(DL- α -amino-2-metylobutyrylo)-amino]-penicylanowego w postaci białego proszku. Analiza chemiczna metodą jodometryczną wykazała 72% czystości produktu. Widmo IR w zawiesinie w nujolu dawało charakterystyczne maksima absorpcji przy 1758 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} . Liofilizat hamował wzrost następujących szczepów testowych w stężeniu w mg/ml.

Micrococcus pyogenes v. aureus 209-P	— 0,00195
Shigella sonnei 520	— 0,0078
Salmonella typhi 155	— 0,0039
Escherichia coli 308	— 0,0156

Przykład IV. 1,08 g (0,005 M) kwasu 6-amino-penicylanowego rozpuszczono w 5 ml 1 n kwasu solnego i dodano 5 ml acetonu. Do otrzymanego roztworu wkroplono przy intensywnym mieszaniu roztwór 0,955 g (0,005 M) DL-4-benzyl-oksazolidyno-dionu — 2,5 w 5 ml acetonu. Po trzech i pół godzinach mieszaninę reakcyjną utrzymywaną stale w temperaturze 20°C, odsączono, przesącz przemyto eterem, warstwę wodną zobojętniono przy pomocy 5 ml 1 n wodorotlenku sodowego, odsączono i przesącz poddano liofilizacji. W ten sposób otrzymano 1,786 g surowego kwasu 6-[(DL- α -amino- α -benzyl-ocetylo)-amino]-penicylanowego w postaci białego proszku. Analiza chemiczna metodą jodometryczną wykazała 50% czystości produktu. Widmo IR w zawiesinie w nujolu wykazywało charakterystyczne maksima absorpcji przy 1760 cm^{-1} , 1680 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} .

Liofilizat hamował wzrost następujących szczepów testowych w stężeniu w mg/ml.

Micrococcus pyogenes v. aureus	— 0,00195
Shigella sonnei 520	— 0,0313
Salmonella typhi 155	— 0,0078
Escherichia coli 308	— 0,0313

Przykład V. 1,08 g (0,005 M) kwasu 6-amino-penicylanowego rozpuszczono w 5,5 ml 1 n kwasu solnego po czym dodano 5 ml acetonu. Do klarownego intensywnie mieszanego roztworu dodano jednorazowo roztwór 0,955 g (0,005 M) D(-)-4-feny-

looksazolidyno-dionu-2,5 w 5 ml acetonu. Reakcję prowadzono 2 godziny w temperaturze 20°C, po czym roztwór odsączono, przesącz doprowadzono do pH 4,65 i przerobiono jak w przykładzie III i IV. Otrzymano 1,809 g liofilizatu w postaci białego, sypkiego proszku.

Analiza mikrobiologiczna płytkowo-cylindrowa na szczepie testowym Bacillus subtilis ATCC 6633 wobec wzorca roboczego — kwasu 6-[(D- α -amino- α -fenyloacetylo)-amino] — penicylanowego wykazała 43% czystości otrzymanego produktu. Wynik analizy jodometrycznej w stosunku do wzorca roboczego wynosił 58% czystości.

Widmo IR w nujolu wykazywało charakterystyczne maksimum absorpcji przy 1758 cm^{-1} , 1680 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} oraz zgodność charakteru widma w zakresie 650 cm^{-1} — 1400 cm^{-1} i 1800 cm^{-1} — 5000 cm^{-1} z widmem wzorca roboczego.

Przykład VI. 26,8 g (0,128 M) kwasu 6-amino-penicylanowego rozpuszczono w mieszaninie 143,8 ml 1 n kwasu solnego i 111,5 ml acetonu, po czym dodano jednorazowo roztwór 25 g (0,141 M) D(-)-4-fenyllooksazolidyno-dionu-2,5 i mieszano 3 godziny 15 minut w temperaturze 20°C. Mieszaninę reakcyjną zalkalizowano do pH 3 dodatkiem 5 n wodorotlenku sodowego, po czym po 5 minutach przesączono. Osad (5,6 g) zidentyfikowano jako czysty kwas D(-)- α -amino-fenyl-ocetowy — $[\alpha]_D^{20} = 158^\circ$ (C — 7,19 w około 0,7 n kwasie solnym).

Analizę mikrobiologiczną na szczepie testowym Bacillus subtilis ATCC 6633 w przesączu, stwierdzono 80% konwersji kwasu 6-AP na kwas 6-[(D- α -amino- α -fenyloacetylo)-amino]-penicylanowy. Przesącz zagęszczano pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 5°C, do objętości 150 ml, przemyto 3 razy porcjami po 50 ml eteru, odbarwiono dodatkiem węgla aktywnego, zalkalizowano do pH 6,1 przy pomocy 5 n wodorotlenku sodowego i odstawiono do krystalizacji. Wydzielony, biały, drobnokrystaliczny produkt odsączono, osad przemyto zimną wodą i wysuszono nad pięciotlenkiem fosforu do stałej wagi. Uzyskano 22 g produktu, który po rekrystalizacji wykazywał czystość 92% (analiza mikrobiologiczna) i 97% (analiza jodometryczna). Temperatura topnienia 202°C, $[\alpha]_D^{20} = -270^\circ$ (C—0,5 w wodzie).

Poniżej zestawiono spektrum antybiotyczne dla kilku szczepów testowych preparatu wobec wzorca roboczego (firmy Bayer-Binotal).

Szczep testowy	Najmniejsze stężenie antybiotyku hamujące wzrost bakterii w mg/ml	
	Wzorzec roboczy	produkt
Micrococcus pyogenes v. aureus 209-P PW	0,000195	0,000195
Shigella sonnei 520	0,00078	0,00156
Salmonella typhi 155	0,00039	0,00039
Escherichia coli 308	0,00312	0,00312

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania półsyntetycznych penicylin o wzorze 1, w którym X oznacza α -amino podstawioną grupę acylową o wzorze ogólnym 2, w którym n równa się 0—8, a R oznacza atom wodoru, podstawiony lub niepodstawiony rodnik alkilowy, cykloalkilowy, aryłowy, aryloalkilowy albo podstawioną lub wolną grupę heterocykliczną, przez kondensację kwasu 6-aminopenicylanowego z 4-podstawionymi oksazolidynodionami-2,5 o wzorze 3, w którym R oznacza atom wodoru, wolny lub podstawiony rodnik alkilowy, cykloalkilowy, aryłowy, aryloalkilowy albo grupę heterocykliczną wolną lub podsta-

wioną w kwaśnym wodno-organicznym roztworze **znamienny tym**, że kondensację prowadzi się w jednej fazie w roztworze o pH = 1—3,8.

2. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że kondensację kwasu 6-aminopenicylanowego z 4-podstawionymi oksazolidynodionami-2,5 prowadzi się w roztworze, w którym stężenie poszczególnych substratów wynosi 7—15% wagowych.
3. Sposób według zastrz. 1, 2 **znamienny tym**, że do reakcji kondensacji stosuje się racemiczne 4 podstawione oksazolidyno-diony-2,5 jak i ich odmiany optycznie czynne.
4. Sposób według zastrz. 1—3 **znamienny tym**, że reakcję kondensacji prowadzi się w zakresie temperatur $-10^{\circ} - +40^{\circ}\text{C}$, korzystnie $+15^{\circ} - +25^{\circ}\text{C}$.

