



SUOMI—FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

[B] (11) KUULUTUSJULKAISU 56534
UTLÄGGNINGSSKRIFT

C (45) Patentti myönnetty 11.02.1980
Patent meddelat

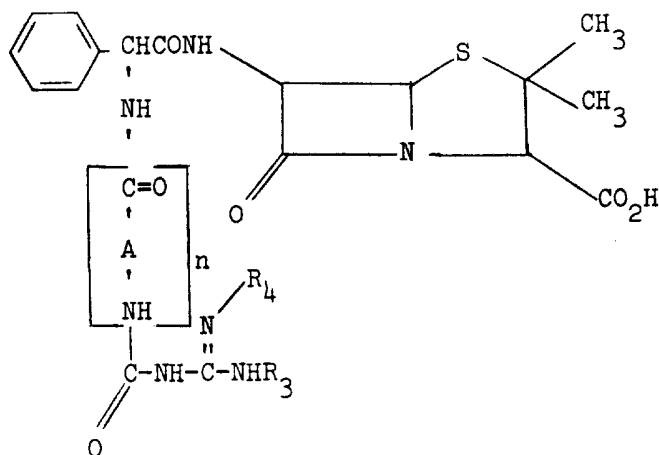
(51) Kv.lk./Int.Cl.⁸ C 07 D 499/68

(21) Patentihakemus — Patentansökning	1178/73
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	13.04.73
(23) Alkuperäisyys — Giltighetsdag	13.04.73
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	17.11.73
(44) Nähtäväksi panon ja kuul. julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utl. skriften publicerad	31.10.79
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	16.05.72
USA(US) 253856	

- (71) Pfizer Inc., 235 East 42nd Street, New York, N.Y., USA(US)
- (72) Ernest Seiichi Hamanaka, Groton, Connecticut, David Sydney Patton, North Stonington, Connecticut, USA(US)
- (74) Oy Kolster Ab
- (54) Menetelmä antibakteeristen 6-[2-fenyyli-2-(3-guanyyli-1-ureidoalkanoyyliamino)asetamido]penisillaanien valmistamiseksi - Förfarande för framställning av antibakteriska 6-[2-fenyl-2-(3-guanyl-1-ureidoalkanoylamino)acetamido]penicillansyror

Tämä keksintö koskee menetelmää uusien penisilliinien ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi, joilla on korkea antibakteerinen aktiivisuus, erityisesti gram-negatiivisia mikro-organismeja vastaan.

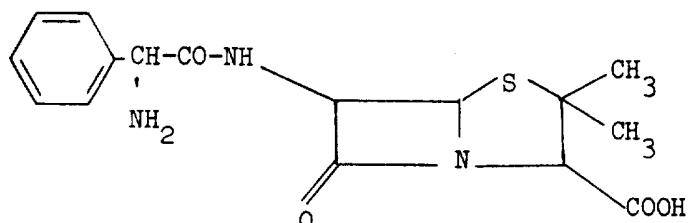
Keksinnön kohteena on menetelmä antibakteerisen 6-[2-fenyyli-2-(3-guanyyli-1-ureidoalkanoyyliamino)asetamido]penisillaanin valmistamiseksi, jolla on kaava



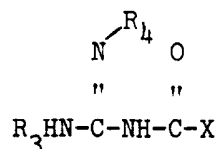
...I

jossa A on alkyleeni, jossa on 1 tai 2 hiiliatomia, n on 1-3; ryhmistä R_3 ja R_4 toinen on vety tai alkyyli, jossa on 1-4 hiiliatomia, ja toinen on vety; tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi.

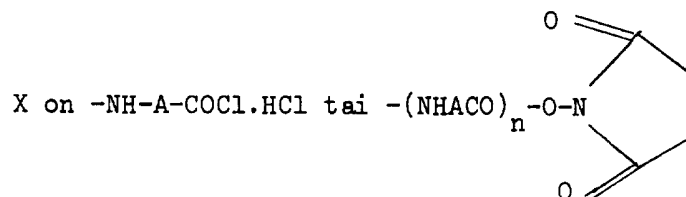
Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista, että α -aminofenyyli-metyylipenisilliini, jolla on kaava



saatetaan reagoimaan yhdisteen kanssa, jolla on kaava

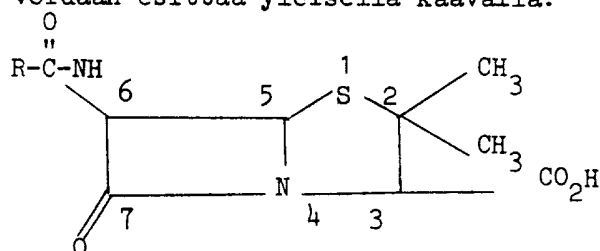


jossa R_3 ja R_4 merkitsevät samaa kuin edellä, ja



jossa A ja n merkitsevät samaa kuin edellä, ja haluttaessa valmistetaan kaavan I mukaisen yhdisteen farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja.

Penisillinejä voidaan esittää yleisellä kaavalla:



jossa 6-aminopenisillaanin hapon asyyliosuus on johdettu karboksyylihaposta tai sen funktionaalisesta johdannaisesta, esim. happohalogenidista tai -anhydridistä.

R-ryhmän luonne määrää suurelta osalta määrätyn penisilliinin farmakodynaamiset ominaisuudet ja antibioottisen profiilin. Laajimmin käytettyjä ovat sellaiset penisilliinit, joissa R on bentsyyli-, fenoksimetyyli- ja α -fenoksietyyli-

ryhmä. Näillä hyvin tunnetuilla analogeilla on vahva vaikutus gram-positiivisia mikro-organismeja vastaan, kun taas niiden vaikutus gram-negatiivisia mikro-organismeja vastaan on rajoitettu. Sen tähden ovat lääketieteessä arvokkaita sellaiset lääkkeet, jotka ovat vaikuttavia gram-negatiivisten mikro-organismien, esim. E. colin, Pseudomonaksen tai Klebsibellän aiheuttamissa infektioidissa.

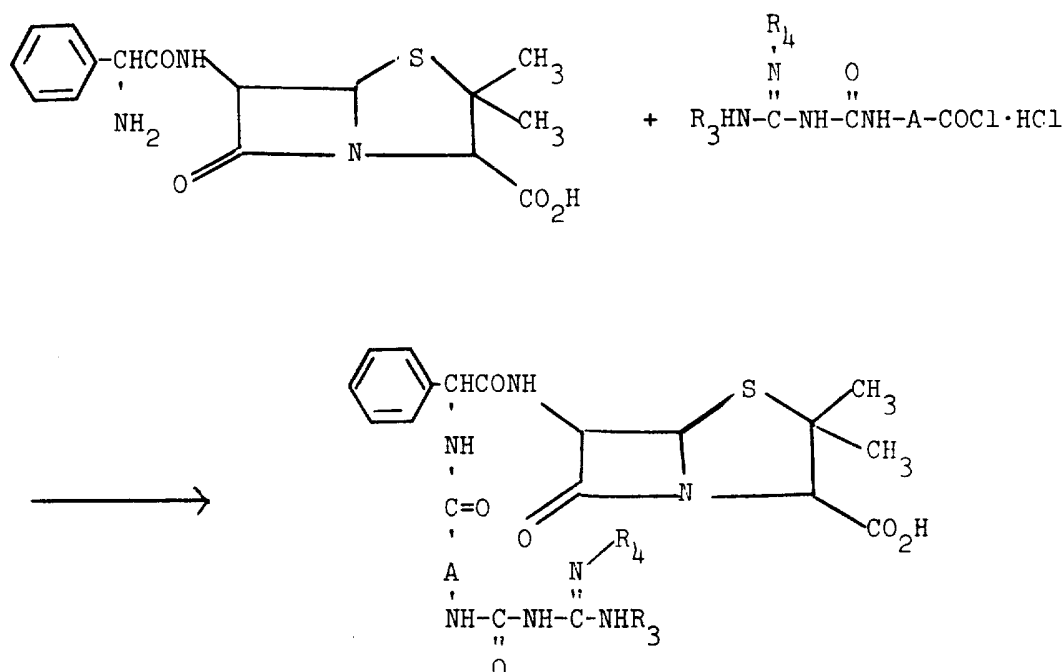
Nykyiset yritykset parantaa penisilliinien aktiivisuusprofiilia, ovat tuottaneet useiden uusien aineiden synteesejä. α -karboksibentsyylipenisilliineillä (USA.-pat. n:o 3 142 673). laaja-alaisilla antibiooteilla, on ilmoitettu olevan suurempi tehokkuus gram-negatiivisia bakteereita vastaan muuten kuin suun kautta annosteltuina, mutta niillä on vain rajoitettua käyttöä suun kautta annosteltuina. α -aminoaryylimetyylipenisilliinejä ja niiden sukulaisia tunnetaan (USA.-patentit n:o 2 985 648; 3 140 282; 3 373 156; 3 308 023 ja 3 342 677), mutta niillä on rajoitettu aktiivisuusalue tiettyjä gram-negatiivisia mikro-organismeja vastaan. 6-ureidopenisillaanihappojohdannaisille on ilmoitettu sekä gram-negatiivinen että gram-positiivinen aktiivisuus USA.-patentissa n:o 3 180 863; 3 120 512 ja 3 118 877 sekä samoin α -ureidopenisilliineille USA.-patentissa n:o 3 352 851. Aktiivisuus gram-negatiivisia, erityisesti Pseudomonas-sukua olevia bakteereita vastaan on ilmoitettu olevan α -karbamyyliureidopenisilliineillä (USA.-patentti n:o 3 483 118) ja α -alkoksikarbonyyliureidopenisilliineillä (USA.-patentti n:o 3 481 922). Myöhemmin on α -guanyyliureidopenisilliinien ilmoitettu olevan hyödyllisiä infektiosairauksia, erityisesti Pseudomonas-suvun aiheuttamia, vastaan (USA.-patentti n:o 3 579 501 ja belgialainen patenttijulkaisu n:o 742 423). Kaavan I mukaisten yhdisteiden antibakteerinen teho on kuitenkin parempi kuin näissä julkaisuissa esitettyjen tunnettujen penisilliinijohdannaisten.

Kuten asiantunteva helposti huomaa, sen penisilliinisivuketjun α -hiiliatomi, johon guanyyliureidoalkanoyyliamino-osuus on kiinnittynyt, on asymmetrinen hiiliatomi, joka sallii kahden optiivisesti aktiivisen isomeerin, D- ja L-diasteroisomeerin, kuin myös rasemaatin, DL-muodon, esiintymisen. Sopusoinnussa aiempien huomioiden, jotka koskevat sellaista penisilliinien aktiivisuutta, joilla on asymmetrisiä α -hiiliatomeja, kanssa, tämän keksinnön mukaisella menetelmällä valmistetut D-konfiguraation omaavat yhdisteet ovat aktiivisempia kuin L-konfiguraation omaavat yhdisteet, ja ovat siten edullisempia, vaikka näiden yhdisteiden L- ja DL-muotoja pidetään myös tämän keksinnön piiriin kuuluvina.

On huomattava, että 6-aminopenisillaaniytimessä, joka on perusrakennusyksikkö, josta tämän keksinnön mukaiset yhdisteet johdetaan, on useita asymmetrisiä keskuksia. Nämä potentiaaliset lisäisomeerit eivät ole tässä yhteydessä merkityksellisiä, koska lähtöaineena käytetty 6-aminopenisillaanihappo valmistetaan käymistietä ja se esiintyy tällöin vain yhdessä konfiguraatiossa.

56534

Tämän keksinnön mukaista penisilliinien valmistusmenetelmää voidaan kuvata seuraavasti:



Käytännössä tarvittava α -aminofenyylimetyylipenisilliini ja happokloridi, jossa A, R_3 ja R_4 ovat aiemmin mainitut ja n on 1, saatetaan kosketuksiin toistensa kanssa reaktio-inertissä, aproottisessa liuottimessa halogeenivetyä sitovan aineen, esim. tertiäärin amiinin läsnäollessa, jäähauteessa. Tavallisesti käytetään yhtäsuuria moolimääriä reagoivia aineita, 10-100 % ylimäärällä happokloridia. Yleensä, kun käytetään yksi mooli kumpaakin reagoivaa ainetta, käytetään kolme moolia tertiääristä amiinia, edullisesti trietyyliamiinia. Mikäli käytetään happokloridiylimäärää, lisätään vastaava moolimäärä amiinia.

Reaktio-inertin liuottimen, joka pitää reaktioseoksen nestefaasissa, pitäisi olla sellainen, ettei se havaittavasti reagoi reaktioon osallistuvien aineiden eikä tuotteen kanssa. Liuottimien tulisi edullisesti olla vedettömiä, aproottisia, polaarisia liuottimia, kuten dimetyyliformamidi tai heksametyylifosforiamidi.

Vaikka reagoivien aineiden toistensa kanssa kosketuksiin saattaminen suoritetaan jäähauteessa sivutuotteiden esiintymisen vähentämiseksi, on suotavaa muutamien minuuttien sekoittamisen jälkeen antaa reaktioseoksen lämmetä huoneenlämpötilaan, kunnes reaktio on täydellinen tai melkein täydellinen. Reaktioaika, joka vaihtelee riippuen lämpötilasta, konsentraatiosta ja ominaisreaktiivisuudesta, on tavallisesti 0,5-4 tuntia.

56534

Reaktion jälkeen suodatetaan liukenemattomat aineet pois ja tuote saostetaan lisäämällä suodokseen suuri määrä dietyylieetteriä. Raaka tuote eristetään imusuodatuksella ja kuivataan. Raa'an tuotteen suspensio metyleenikloridissa vapautetaan vähäisistä määristä lähtöaineena käytettyä α -aminofenyyli-metyyli-penisilliiniä, lisäämällä pieni määrä trietyyliamiinia, joka muuttaa lähtöaineen metyleenikloridiin liukenevaksi trietyyliamiinisulaksi. Puhdas tuote suodatetaan ja kuivataan.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettäviä lähtötuotteita valmistetaan helposti menetelmillä, jotka ovat tuttuja asiantunteville. α -aminoaryylimetyyli-penisilliinit ovat tunnettuja ja niitä kuvaillaan USA.-patenteissa 2 985 648 ja 3 342 677, niitä on myös kuvaillut Long, et al., J.Chem.Soc., 1920(1971), kun taas 3-guanyyli-1-ureidoalkaanikarboksyylihappoja valmistetaan menetelmällä, jonka on kehittänyt Frankel, et al., J.Chem. Soc., 2698 (1967) tai menetelmällä, jonka on kehittänyt Shapiro, et al., J.Am.Chem.Soc., 81,2220 (1959).

Vaihtoehtoista valmistusmenetelmää voidaan esittää seuraavalla kaaviolla, jossa A, R₃ ja R₄ merkitsevät samaa kuin edellä:

Edellä esitetyn reaktiokaavion mukaan saatetaan toistensa kanssa kosketuksiin yhtä monta moolia tarvittavaa 3-guanyyli-1-ureido-alkaanikarboksyylihappoa, N-hydroksisukkiini-imidiä ja disykloheksyyli-karbodi-imidiä (DCC), kahta viimeksi mainittua aina 50 % ylimäärään saakka, reaktioinertissä liuottimessa, jona käytetään jotain aiemmin mainittua liuotinta, normaalissa lämpötilassa. 1-3 tunnin kuluessa käsitellään välituotteena in situ kehittynyt N-sukkiini-imidoesteri yhtä suurella moolimäärällä, aina 50 % ylimäärään asti, α -aminofenyylimetyylipenisilliiniä, jota edullisimmin käytetään emäksisenä suolana. Reaktioaika voi vaihdella 1-6 tuntiin, riippuen lämpötilasta, pitoisuudesta ja reagoivien aineiden reaktiivisuudesta.

Reaktioseoksen suodattamisen jälkeen, eristetään tuote lisäämällä suodokseen suuri määrä dietyylieetteriä. Tuote voidaan haluttaessa puhdistaa käyttäen trietyyliamiinia, kuten on aiemmin mainittu.

Tässä toisessa menetelmävaihtoehdossa voidaan lähtöaineina käyttää kaupallisia tuotteita, tai ne voidaan valmistaa tunnetuilla menetelmillä.

Kuten asiantunteva voi huomata, voi kaavan I mukaisten yhdisteiden guanidiini-osuus esiintyä useissa erilaisissa tautomeerisissä muodoissa, joita kaikkia pidetään tämän keksinnön piiriin kuuluvina.

Kuten aiemmin on mainittu, kaavan I mukaisten happamien yhdisteiden luonteenomainen piirre on niiden kyky muodostaa emäksisiä suoloja. Kaavan I mukaiset happoyhdisteet muutetaan emäksisiksi suoloiksi käsittelemällä happoa sopivalla emäksellä vesi- tai vedettömässä liuoksessa. Suolojen valmistuksessa sopivasti käytettävät emäksiset aineet voivat vaihdella luonteeltaan, ja niihin kuuluvat orgaaniset amiinit, ammoniakki, alkalimetallihydroksidit, -karbonaatit, -bikarbonaatit, -hydridit ja -alkoksidit, sekä maa-alkalimetallihydroksidit, -hydridit, -alkoksidit ja -karbonaatit. Esimerkkeinä mainittakoon ammoniakki, primääriset amiinit, kuten n-propyyliamiini, n-butyliamiini, aniliini, sykloheksyyliamiini, bentsyyliamiini, p-toluidiini, etyyliamiini, oktyyliamiini, sekundääriset amiinit, kuten disykloheksyyliamiini ja tertiääriset amiinit, kuten dietylianiliini, N-metyylipyrrolidiini, N-metyylimorfoliini ja 1,5-diatsabisyklo-(4,3,0)-5-noneeni; natriumhydroksidi, kaliumhydroksidi, ammoniumhydroksidi, natriummetoksidi, kaliummetoksidi, magnesiumhydroksidi, kalsiumhydridi ja bariumhydroksidi.

Kuten asiantunteva helposti huomaa, ovat kaavan I mukaiset yhdisteet riittävän emäksisiä, guanyyli-osuuden ansiosta, jotta ne voivat muodostaa happojen kanssa additiosuoloja, nämä suolat kuuluvat myös keksinnön piiriin.

Hyväksikäytettäessä niiden kaavan I mukaisten yhdisteiden, jotka muodostavat emäksisiä suoloja, kemoterapeuttista aktiivisuutta, on tietenkin suotavaa käyttää farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja. Vaikka veteen liukenemattomuus, suuri myrkyllisyys tai kiteisen rakenteen puute voi tehdä jotkut suolat sopimattomiksi tai vähemmän haluttaviksi farmaseuttiseen käyttöön, veteen liukenemattomat tai myrkylliset suolat voidaan muuttaa vastaaviksi hapoiksi hajottamalla suolat, kuten yllä on esitetty tai vaihtoehtoisesti muuttamalla ne miksi hyvänsä farmaseuttisesti hyväksyttäviksi emäksisiksi suoloiksi. Mainittuihin farmaseuttisesti hyväksyttäviin suoloihin kuuluvat natrium-, kalium-, kalsium-, magnesium- ja ammonium-suolat sekä substituoitujen ammoniumsuolat, esim. prokaiinin, dibentsyyliamiinin, N,N-bis(dehydroabietyyli)etyleenidiamiinin, 1-efenamiinin, N-etyylipiperidiinin, N-bentsyyli- β -fenetyyliamiinin, N,N'-dibentsyylietyleenidiamiinin, trietyyliamiinin suolat, sekä suolat muiden amiinien kanssa, joita on käytetty muodostamaan suoloja bentsyylipenisilliinin kanssa.

Tässä kuvatut uudet penisilliinit osoittavat in vitro aktiivisuutta suurta määrää erilaisia mikro-organismeja vastaan, näihin kuuluvat sekä gram-positiiviset että gram-negatiiviset bakteerit.

Niiden hyödyllinen aktiivisuus voidaan helposti osoittaa in vitro kokeilla erilaisia organismeja vastaan aivokudosisfuusioaineessa tavallisella kaksinkertaisella sarjalaimennustekniikalla. Tässä kuvattujen yhdisteiden in vitro aktiivisuus tekee niistä hyödyllisiä paikalliseen käyttöön erilaisten voiteiden muodossa tai sterilointitarkoituksiin, esim. sairaalavälineiden sterilointiin.

Nämä uudet penisilliinit ovat myös tehokkaita antibakteerisia aineita in vivo eläimille, myös ihmiselle, ei ainoastaan ulkoisesti vaan myös suun kautta annosteltuina.

Todennäköisesti lääkäri päättää, mikä annos on sopivin kullekin yksilölle, ja se voi vaihdella potilaan iästä, painosta ja vastustuskyvystä sekä oireiden laadusta ja määrästä sekä annettavan aineen farmakodynaamisista ominaisuuksista riippuen. Usein huomataan, että mikäli yhdistettä annetaan suun kautta, tarvitaan suurempia määriä aktiivista yhdistettä saman tason saavuttamiseen, kuin parenteraalissa lääkeannossa.

Tehokkaana kaavan I mukaisen yhdisteen päivittäisenä annoksena pidetään ihmisellä suun kautta, 10-100 mg/kg, edullisimmin 50-75 mg/kg, yhtenä tai useampana annoksena, ja parenteraalasti annettuna 25-100 mg/kg, edullisimmin 20-75 mg/kg. Nämä arvot ovat esimerkkejä, ja tietenkin voi olla tapauksia, joissa suuremmat tai pienemmät annokset ovat paikallaan.

56534

Kaavan I mukaiset penisilliinit ovat laajaspektrisiä antibiootteja, jotka vaikuttavat toisin kuin monet penisilliinianalogit, vahvasti gram-negatiivisia mikro-organismeja, esim. *E. coli*, *Pseudomonasta* ja *Klebsibellaa* vastaan. Edelleen ne näyttävät olevan vastustuskykyisempiä kuin monet penisilliinit, penisillinaasin aiheuttamaa hajoamista vastaan; penisillinaasi on erään bakteerin tuottama entsyymi, joka hajottaa penisilliinin inaktiiviseksi penisillaanihakoksi.

Kaavan I mukaisia edullisia yhdisteitä ovat:

6-[2-fenyyli-2-(3-guanyyli-1-ureidoasetamido)asetamido]-penisillaanihappo,
 6-[2-fenyyli-2-(β -3-guanyyli-1-ureidopropionamido)asetamido]-penisillaanihappo,
 6-[2-fenyyli-2-(3-guanyyli-1-ureidoasetyyli- α -glytsinamido)asetamido]-penisillaanihap-
 po ja
 6-[2-fenyyli-2-(3-guanyyli-1-ureidoasetyyli- γ -glytsinamido)asetamido]-peni-
 sillaanihappo.

Näistä yhdisteistä ovat edullisia ne diastereoisomeerit, joilla on D-konfiguraatio.

Joidenkin kaavan I mukaisten yhdisteiden bakteerien vastainen vaikutusalue on esitetty seuraavissa taulukoissa. Taulukossa I on verrattu 6-[2-fenyyli-2-(3-guanyyli-1-ureidoasetamido)asetamido]-penisillaanihapon (PGU) in vitro profiilia ampisilliinin (AMP) ja karbenisilliinin (CAR) kanssa. Kokeet suoritettiin standardi-olosuhteissa, joissa ravintoliuokseen, joka sisälsi koemateriaaleja eri pitoisuuksissa, ympätettiin määrättyä organismia, ja minimipitoisuus (MIC), jossa kunkin organismin kasvua ei havaittu, merkittiin muistiin.

Taulukko I

In vitro vertailuja PGU:lle, AMP:lle ja CAR:lle (MIC; 10^{-3} mg/ml)

Organismi	MIC		
	PGU	AMP	CAR
<i>E. coli</i> 51A266	0,39	3,12	3,12
<i>E. coli</i> 51A002	200	200	200
<i>Ps. aeruginosa</i> 52A490	0,39	0,78	0,6
<i>Ps. aeruginosa</i> 52A104	3,12	200	50
<i>Ps. aeruginosa</i> 52A173	3,12	38	75
<i>Kleb. pneumoniae</i> 53A009	25	100	200
<i>Kleb. pneumoniae</i> 53A015	25	250	>200
<i>A. aerogenes</i> 55A002	0,78	100	25
<i>A. aerogenes</i> 55A004	0,78	5	50
<i>Ser. marcescens</i> 63A001	1,56	200	25
<i>P. mirabilis</i> 57C015	0,78	1,56	1,25
<i>P. vulgaris</i> 57A059	0,78	6	12,5
<i>S. aureus</i> 01A005	0,19	0,09	1,56

56534

Taulukossa II on esitetty in vivo vertailuja taulukossa I esitetyille yhdisteille useita kokeellisia infektiota vastaan hiirissä.

Arvot saatiin (% eloonjääneitä) standardiolosuhteissa, jotka ovat tunnettuja asiantunteville. *E. coli* ollessa kyseessä, koeyhdiste annettiin infektoituille hiirille useina annoksina, jolloin ensimmäinen annos annettiin puoli tuntia tartunnan jälkeen ja toistettiin 4 ja 24 tuntia myöhemmin. *Ps. aeruginosa* vastaan, koeyhdiste annettiin 1, 3, 5, 7 ja 24 tuntia tartunnan jälkeen.

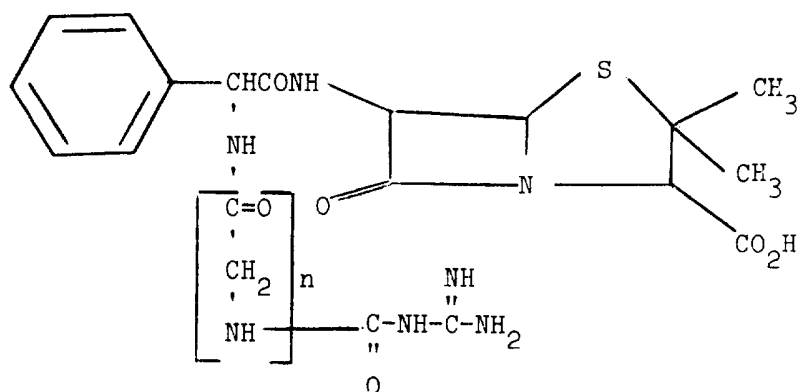
Taulukko II

Organismi	Annostustapa x	Annos (mg/kg)	% Suoja ¹		
			PGU	AMP	CAR
<i>E. coli</i> 51A266	PO	200	50	90	70
		50	30	80	10
		25	10	--	--
<i>E. coli</i> 51A266	SC	200	90	90	90
		50	70	80	90
		25	80	--	--
<i>Ps. aeruginosa</i> 52A104	SC	400	90	--	80

x PO = suunkautta; SC = ihonalainen injektio; ¹% eloonjääneitä.

Taulukossa III on esitetty lisää in vitro vertailukokeiden tuloksia.

Taulukko III



Organismi	MIC ($\mu\text{m/ml}$)		
	n = 1	n = 2	n = 3
<i>S. aureus</i> 01A005	0,19	0,73	3,12
<i>S. aureus</i> 01A006	0,78	0,78	1,56
<i>S. aureus</i> 01A212	25	50	50
<i>Strep. pyogenes</i> 020203	<0,01	0,098	0,012
<i>Ps. aeruginosa</i> 52A104	3,12	6,25	25
<i>Ps. aeruginosa</i> 52A490	0,39	0,78	3,12
<i>Kleh. pneumoniae</i> 53A009	25	100	200
<i>H. influenzae</i> 54A001	0,09	0,39	0,39

56534

A. aerogenes 55A002	0,78	25	50
P. mirabilis 57C015	0,78	12,5	50
Sal. cholerae-suis 58B242	1,5	12,5	25
Ser. marcescens 63A001	1,56	50	>200

Taulukossa IV on esitetty in vivo vertailukokeiden tulokset taulukossa III esitetyille kolmelle yhdisteelle E. colin aiheuttamia infektioita vastaan hiirissä.

Arvot saatiin (% eloonjääneitä) standardiolosuhteissa, jotka ovat tunnettuja asiantunteville. Koeyhdistettä annettiin infektoituneille hiirille useina annoksina, joista ensimmäinen annos annettiin puoli tuntia tartunnan jälkeen ja toistettiin 4 ja 24 tuntia myöhemmin.

Taulukko IV

Organismi	Annostustapa	Annos (mg/kg)	% Suoja		
			n = 1	n = 2	n = 3
E. coli 51A266	PO	200	50	70	50
		50	10	20	20
		25	30	10	10
E. coli 51A266	SC	200	90	100	60
		50	70	50	40
		25	80	40	30

Taulukoissa V - VII on esitetty in vitro vertailukokeiden tuloksia. Niissä on verrattu esimerkissä 1 valmistettua 6- $\overline{D}$ -2-fenyyli-2-(3-guanyyli-1-ureidoasetamido)asetamido]penisillaanihappoa (yhdiste A) ja US-patenttijulkaisusta 3 579 501 tunnettua, aktiivisinta yhdistettä 6- $\overline{G}$ -(3-guanyyli-1-ureido)fenyyliasetamido]penisillaanihappoa (yhdiste B).

Taulukko V

26 erilaisen Enterobacter-lajin 50-, 70- ja 80-%:iseen inhibiitioon tarvittava pitoisuus ($\mu\text{m/ml}$)

	50 %	70 %	80 %
Yhdiste A	4,3	15	32
Yhdiste B	17,5	40	140

Taulukko VI

14 erilaisen Klebsiella-lajin 50-, 70- ja 80-%:iseen inhibiitioon tarvittava pitoisuus ($\mu\text{m/ml}$)

56534

	50 %	70 %	80 %
Yhdiste A	22,5	47	120
Yhdiste B	75	120	160

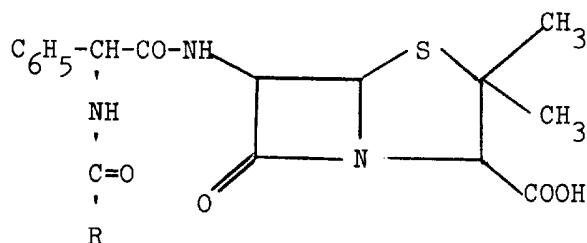
Taulukko VII

23 erilaisen E. colin 40-, 50-, 60- ja 70-%:iseen inhibiitioon tarvittava pitoisuus ($\mu\text{m/ml}$)

	40 %	50 %	60 %	70 %
Yhdiste A	4,0	9,9	80	130
Yhdiste B	5,9	16,3	180	230

Seuraavissa taulukoissa VIII ja IX on verrattu rakenteellisesti 1-läheisten yhdisteiden A (esimerkissä 1 valmistettu yhdiste) ja C aktiivisuutta in vitro ja in vivo eri mikro-organismeja vastaan.

Yhdisteiden kaava on seuraava:



Yhdiste A: R on $\text{CH}_2\text{-NH-CO-NH-C(=NH)-NH}_2$

Yhdiste C: R on $\text{CH}_2\text{-NH}_2$

In vitro-aktiviteetit

Mikro-organismi	MIC ($\mu\text{m/ml}$)	
	Yhdiste A	Yhdiste C
Staphylococcus aureus 01A005	0,39	3,12
Staphylococcus aureus 01A006	0,78	3,12
Staphylococcus aureus 01A212	25	50
Streptococcus pyogenes	<0,1	0,005
Klebsiella pneumoniae	25	< 200
Hemophilus influenzae	0,09	0,39
Aerobacter aerogenes	12,5	100
Proteus mirabilis	6,25	6,25
Cammonella choleraesuis	1,5	6,25
Serratia marcescens	3,12	25

56534

In vivo-aktiviteetit - (E. colia vastaan)

Yhdiste	Annos (mg/kg)	Prosentuaalinen suoja	
		suun kautta	ihonalaisesti
Yhdiste A	200	50	90
Yhdiste A	50	10	90
Yhdiste A	25	10	60
Yhdiste C	200	50	60
Yhdiste C	50	20	20
Yhdiste C	25	0	0

Tämän keksinnön mukaisesti valmistetut uudet tuotteet ovat arvokkaita antibakteerisia aineita ja ne ovat huomattavan tehokkaita käsiteltäessä infektioita, joita aiheuttavat herkäät gram-negatiiviset ja gram-positiiviset bakteerit siipikarjassa ja eläimissä, ihminen mukaanlukien. Sellaisiin tarkoituksiin voidaan käyttää puhtaita tuotteita tai niiden seoksia muiden antibioottien kanssa. Niitä voidaan annostella yksinään tai yhdessä farmaseuttisen kantaja-aineen kanssa, riippuen annostustavasta ja tavanomaisesta farmaseuttisesta käytännöstä. Esimerkiksi, niitä voidaan annostella suun kautta tablettien muodossa, sisältäen sellaisia lisäaineita kuin tärkkelystä, maitosokeria, tietäntyyppisiä savilaatuja, jne., tai kapseleissa yksinään tai seoksina, käyttäen edellämainittuja tai niiden tyyppisiä lisäaineita. Niitä voidaan annostella suun kautta myös eliksiirien tai suspensioiden muodossa, jotka sisältävät makeutus- tai väriaineita, tai niitä voidaan antaa ruiskeina lihaksiin tai ihon alle. Tällöin niitä parhaiten käytetään steriilin vesiliuoksen muodossa, joka liuos voi sisältää vettä, isotonista suolaliuosta, isotonista dekstroosia, Ringer'in liuosta, tai ei-vesiliuoksen muodossa, käyttäen kasviöljyä (pellavasiemenöljy, maapähkinäöljy, maissiöljy, seesamöljy) ja muita vettä sisältämättömiä kantaja-aineita, jotka eivät vaikuta valmisteen terapeuttiseen tehokkuuteen ja ovat myrkyttömiä niissä tilavuuksissa ja suhteissa, joissa niitä käytetään (glyseroli, propyleeniglykoli, sorbitoli). Lisäksi voidaan valmistaa seoksia, joista voidaan tehdä liuoksia juuri ennen käyttöä. Tällaisiin seoksiin voi sisältyä nestemäisiä laimentimia, esim. propyleeniglykolia, dietyyli-karbonaattia, glyserolia, sorbitolia, jne.; puskuroivia aineita, paikallispuuduttavia aineita ja haluttavia farmakologisia ominaisuuksia antavia epäorgaanisia suoloja.

Seuraavat esimerkit kuvaavat keksintöä.

Esimerkki 1

6- $\overline{D}$ -2-fenyyli-2-(3-guanyyli-1-ureidoasetamido)asetamido]penisillaanihappo
 $= CH_2$, $n = 1$ ja R_3 ja $R_4 = H$)

A. Suspensioon, joka sisältää 12,7 g (0,0325 moolia) D- α -aminobentsyylipeni-

56534

silliinitrihydraattia suspendoituna 200 ml:aan dimetyyliformamidia huoneen lämpötilassa ja tyypikehässä lisätään 9,15 ml trietyyliamiinia, ja näin saatu seos jäädytetään 0°C:een jäähauteessa. Reaktioseokseen lisätään kahden minuutin aikana kaksi kertaa 3,5 g (0,0325 moolia) guanyyliureidoasetyylikloridi-hydrokloridia voimakkaasti sekoittaen, seosta sekoitetaan viiden minuutin ajan 0°C:ssa ja huoneen lämpötilassa 50 min. ajan. Seos jäädytetään uudelleen jäähauteessa, siihen lisätään 4,55 ml trietyyliamiinia sekä uudelleen kaksi kertaa 3,5 g happokloridia kahden minuutin aikana. Sekoitetaan 10 min. ajan 0°C:ssa ja tunnin ajan huoneen lämpötilassa, seos suodatetaan ja suodokseen lisätään kolme litraa dietyylieetteriä. Raaka tuote, 19,5 g, suspendoidaan 200 ml:aan metyleenikloridia, joka sisältää 5 ml trietyyliamiinia, seoksen annetaan seistä kahden tunnin ajan. Tuote, valkoinen pulveri, suodatetaan ja kuivataan, 14,0 g (88 % saanto).

Infrapunaspektrihuiput: (μm , KBr) 3,0; 3,3; 5,6; 5,75-6,3(b), 6,3-6,75(b), 7,2; 7,6 ja 8,1.

Ydinmagneettiset resonanssispektrihuiput: (PPM; DMS O-D₆) 1,5(d), 6H; 3,9(c), 2H; 4,0(s), 1H; 5,4(c), 2H; 5,8(c) 1H; 7,4(c), 7H ja 8,4-9,2(c) 5H.

B. Liuokseen, joka sisältää 345 mg (mmoolia) N-hydroksisukkiini-imidiä ja 620 mg (3 mmoolia) disykloheksyylikarbodi-imidiä 15 ml:ssa kuivaa dimetyyliformamidia, lisätään 587 mg (3 mmoolia) 3-guanyyli-1-ureidoetikkahappo-hydrokloridia, ja seosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa kahden tunnin ajan. Lisätään D- α -aminobentsyylipensilliini-trietyyliamiinisuolaa (1,35 mg, 3 mmoolia) ja sekoittamista jatketaan kolmen tunnin ajan. Lisätään reaktioseokseen dimetyyliformamidia (20 ml), suodatetaan, ja kirkkaaseen suodokseen lisätään 1,2 l dietyylieetteriä. Kuivattu valkoinen sakka, 947 mg, eristetään imusuodatuksella, suspendoidaan 50 ml:aan metyleenikloridia ja käsitellään yhdellä millilitralla trietyyliamiinia. Tunnin sekoittamisen jälkeen kootaan puhdas tuote ja kuivataan vakuuissa, 537 mg (36,5 % saanto).

Saatu tuote on joka suhteessa identtinen esimerkin 1-A mukaisella happokloridivalmistusmenetelmällä saadun tuotteen kanssa.

Esimerkki 2

6-[D-2-fenyyli-2-(β -3-guanyyli-1-ureidopropionamido)asetamido]-penisillaanihappo (A = $-(\text{CH}_2)_2-$ n = 1 ja R₃ ja R₄ = H) β -(3-guanyyli-1-ureido)propionihappo-hydrokloridia (840 mg, 4 mmoolia) lisätään liuokseen, joka sisältää 785 mg (3,8 mmoolia) disykloheksyylikarbodi-imidiä ja 440 mg (3,8 mmoolia) N-hydroksisukkiini-imidiä 15 ml:ssa kuivaa dimetyyliformamidia huoneen lämpötilassa ja tyypikehässä, ja seosta sekoitetaan kahden tunnin ajan. Lisätään D- α -aminobentsyylipenisilliinitrietyyliamiinisuolaa (1,71 g, 3,8 mmoolia), ja reaktioseosta sekoitetaan 1,5 tunnin ajan. Seos suodatetaan, ja suodokseen lisätään 400 ml dietyylieetteriä. Puhdistamisessa käytetään samaa tekniikkaa kuin esimerkissä 1, jon-

56534

ka jälkeen haluttu tuote, valkoinen jauhe, suodatetaan ja kuivataan, 1,4 g (73 % saanto).

Infrapunaspektrihuiput: (μm ; KBr) 3,0; 3,35; 5,6; 5,75-6,3(b), 6,3-6,8(b), 7,15; 7,85 ja 8,0.

Ydinmagneettiset resonanssihuiput: (PPM; DMS O-D_6) 1,5(d), 6H; 2,5(c), 2H; 3,3(c), 2H; 4,0(s), 1H; 5,4(c), 2H; 5,75(c), 1H; 7,1-7,8(c), 7H; ja 8,3-9,3(c), 5H.

Esimerkki 3

6-($\overline{\text{D}}$ -2-fenyyli-2-(3-guanyyli-1-ureidoasetyyli-glysinamido)asetamido]-penisillaanihappo ($\text{A} = \text{CH}_2$ $n = 2$ ja R_3 ja $\text{R}_4 = \text{H}$) 175 ml:aan dimetyyli-formamidia, joka pidetään typpi-ilmakehässä, lisätään ensin 4,3 g (17 mmoolia) 3-guanyyli-1-ureidoasetyyli-glysiinihydrokloridia ja sitten 2,42 g (21 mmoolia) N-hydroksisukkiini-imidiä ja 4,35 g (21 mmoolia) N,N'-disykloheksyylikarbodi-imidiä. Saatua suspensiota sekoitetaan 2,5 tunnin ajan ja suodatetaan. D- α -aminobentsyyli-penisilliini-trietyyliamiinisuolaa (9,45 g, 21 mmoolia) lisätään suodokseen ja seosta sekoitetaan huoneen lämmössä kahden tunnin ajan. Seos suodatetaan ja suodos lisätään tipoitain 20 min. aikana 2,5 l:aan dietyylieetteriä. Saatua sakkaa sekoitetaan 20 min. ajan, suodatetaan ja sekoitetaan liejuksi metyleenikloridin kanssa, johon on lisätty 4,5 ml trietyyliamiinia. 25 min. kuluttua tuote, keltaisenruskea kiinteä aine, suodatetaan ja kuivataan vakuumissa, 8,9 g.

Infrapunaspektrihuiput: (mikroneja; KBr) 3,05; 5,65; 6,04; 6,58; 7,20 ja 8,10.

Ydinmagnetiset resonanssispektrihuiput: (PPM; D_2O) 1,32, 6H; 3,85; 6,35, (2H) ja 7,32, (5H).

Esimerkki 4

6-(D-2-fenyyli-2-(3-guanyyli-1-ureidoasetyyli-glysyli-glysinamido)-asetamido) penisillaanihappo ($\text{A} = \text{CH}_2$; $n = 3$; R_3 ja $\text{R}_4 = \text{H}$)

Liuokseen, jossa on 310 mg (1 mmooli) 3-guanyyliureidoasetyyli-glysyli-glysiinihydrokloridia 8 ml:ssa kuivaa dimetyyli-formamidia typpi-ilmakehässä, lisätään peräkkäin 115 mg (1 mmooli) N-hydroksisukkiini-imidiä ja 206 mg (1 mmooli) N,N'-disykloheksyylikarbodi-imidiä, ja saatua liuosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa kahden tunnin ajan. Lisätään D- α -aminobentsyyli-penisilliini-trietyyliamiinisuolaa (450 mg, 1 mmooli) kerralla ja seosta sekoitetaan kolmen tunnin ajan. Kiinteät aineet suodatetaan, pestään pienellä määrällä dimetyyli-formamidia, ja suodos ja pesuneste yhdistetään ja lisätään tipoitain 400 ml:aan dietyylieetteriä. Saostuma suodatetaan ja sekoitetaan liejuksi metyleenikloridin kanssa, johon lisätään kuusi tippaa trietyyliamiinia. Sekoitetaan puolen tunnin ajan, suodatetaan ja kuivataan vakuumissa, 310 mg.

Infrapunaspektrihuiput: (mikroneja); KBr) 3,05; 5,65; 6,05; 6,55; 7,20 ja 810.

Ydinmagneettiset spektrihuiput: (PPM; DMSO-D₂O) 1,40, (6H); 3,20-4,1(b); 3,38, (1H); 5,7, (1H) ja 7,34 (5H).

Esimerkki 5

6-(D-2-fenyyli-2-(3-N-metyyliguanyyli-1-ureidoasetamido)asetamido)penisillaanihappo
(A = CH₂, n = 1, R₃ = CH₃, R₄ = H)

Suspensioon, jossa on 2,25 g (5 mmoolia) D-α-aminobentsyylipenisilliini-tretyyliamiinisuolaa 25 ml:ssa vedetöntä dimetyyliformamidia, lisätään typpi-kehässä 0,7 ml (5 mmoolia) trietyyliamiinia, ja reaktioseos jäädytetään -30°C:seen. Siihen lisätään 3 minuutin kuluessa annoksittain voimakkaasti sekoittaen 3-(N-metyyliguanyyli)-1-ureidoasetyylikloridi-hydrokloridia (2,28 g, 0,01 moolia) samalla jäädyttäen reaktioseosta jäähauteessa. 2 tunnin sekoittamisen jälkeen jäähauteessa seos imusuodatetaan, suodos kaadetaan kloroformin (500 ml) ja asetonin (500 ml) seokseen, ja seosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa yön yli. Saatu sakka kootaan ja kuivataan tyhjöissä. Saadaan 1,5 g otsikon yhdistettä, sp. 195°C (hajoaa).

Esimerkki 6

6-(D-2-fenyyli-2-(3-guanyyli-1-ureidoasetamido)asetamido)penisillaanihapon natriumsuola

"Liejuun", jossa on 30 g (0,061 moolia) 6-(D-2-fenyyli-2-(3-guanyyli-1-ureidoasetamido)asetamido)penisillaanihappoa 100 ml:ssa dioksaania ja 50 ml:ssa kylmää vettä, lisätään 5,2 g (0,061 moolia) natriumbikarbonaattia liuotettuna 75 ml:aan vettä. Liuoksen (osaksi suspension) annetaan sekoittua 15 min. ajan, liukenemattomat aineet suodatetaan pois ja suodos jäädytys-kuivataan. Näin saatu kiinteä aine lietetään 2 l:aan kloroformia, suodatetaan ja kuivataan vakuuissa, 29,2 g (93 %).

Samalla tavalla valmistetaan 6-(D-2-fenyyli-2-(3-guanyyli-1-ureido-asetamido)asetamido)penisillaanihapon sekä muiden tässä esitettyjen penisilliinien kalium-, kalsium-, magnesium- ja muita farmaseuttisesti hyväksyttäviä metallisuoloja.

Esimerkki 7

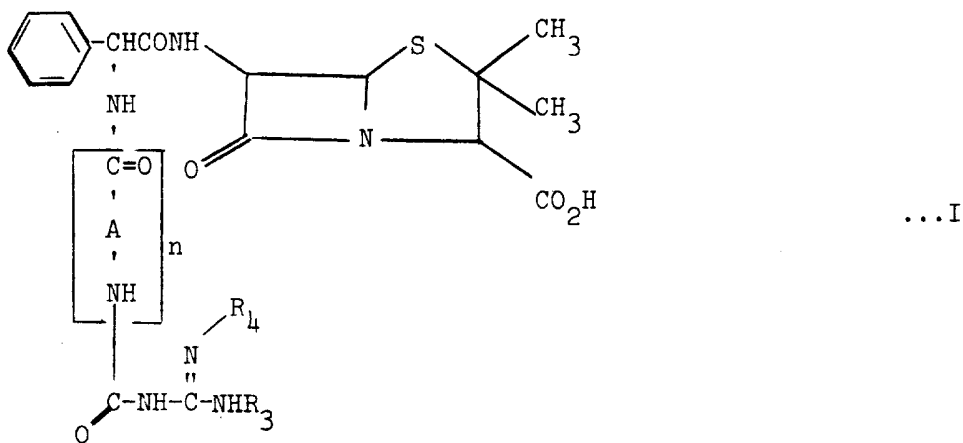
6-(D-2-fenyyli-2-(3-guanyyli-1-ureidoasetamido)asetamido)penisillaanihapon trietyyliamiinisuola

"Liejua", jossa on 2,0 g (3,8 mmoolia) 6-(D-2-fenyyli-2-(3-guanyyli-1-ureido-asetamido)asetamido)penisillaanihappoa 20 ml:ssa vettä, käsitellään 0,5 ml:lla (3,8 mmoolia) trietyyliamiinia. Sekoitetaan 5 min. ajan, pieni määrä liukenemattomia aineita suodatetaan pois, ja suodos jäädytys-kuivataan 2,1 g (93 % saanto).

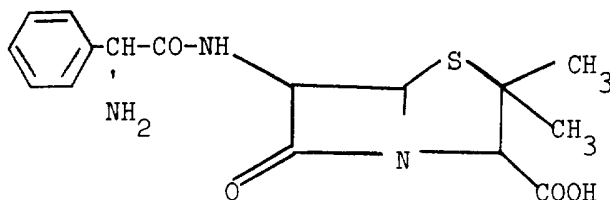
Samalla tavalla valmistetaan yllämainitun sekä muiden tässä kuvattujen penisilliinien ammonium- ja farmaseuttisesti hyväksyttäviä, orgaanisista amiineista johdettuja suoloja.

Patenttivaatimukset:

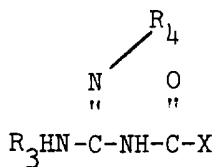
1. Menetelmä antibakteerisen 6-[2-fenyyli-2-(3-guanyyli-1-ureidoalkanoyyli-amino)asetamido]penisillaanihapon valmistamiseksi jolla on kaava:



jossa A on alkyleeni, jossa on 1 tai 2 hiiliatomia, n on 1-3; ryhmistä R_3 ja R_4 toinen on vety tai alkyyli, jossa on 1-4 hiiliatomia, ja toinen on vety; tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että α -aminofenyylimetyylipenisilliini, jolla on kaava:



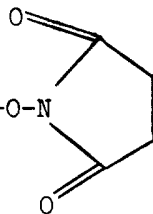
saatetaan reagoimaan yhdisteen kanssa, jolla on kaava:



jossa R_3 ja R_4 merkitsevät samaa kuin edellä, ja

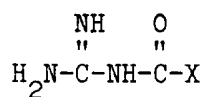
56534

X on $-\text{NH}-\text{A}-\text{COCl} \cdot \text{HCl}$ tai $-(\text{NHACO})_n-\text{O}-\text{N}$



jossa A ja n merkitsevät samaa kuin edellä, ja haluttaessa valmistetaan kaavan I mukaisen yhdisteen farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja.

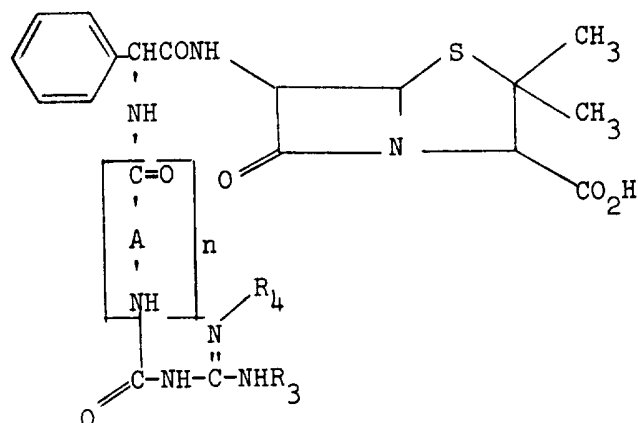
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä 6-~~D~~-2-fenyyli-2-(3-guanyyli-ureidoasetamido)asetamido~~7~~penisillaanin hapon valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että D-~~α~~aminobentsyylipenisilliini tai sen suola saatetaan reagoimaan yhdisteen kanssa, jolla on kaava



jossa X merkitsee samaa kuin patenttivaatimuksessa 1, jolloin n on kuitenkin 1, ja haluttaessa valmistetaan saadun yhdisteen farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja.

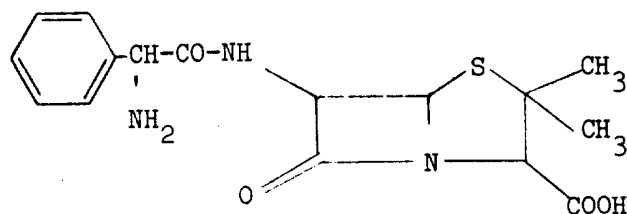
Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av en antibakterisk 6-[2-fenyl-2-(3-guanyl-1-ureidoalkanoylamino)acetamido]penicillansyra med formeln

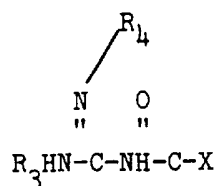


...I

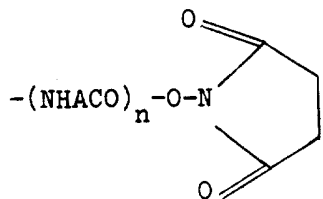
vari A är alkylen med 1 eller 2 kolatomer, n är 1-3, en av grupperna R_3 och R_4 är väte eller alkyl med 1-4 kolatomer, och den andra är väte, eller dess farmaceutiskt godtagbara salter, k ä n n e t e c k n a t därav, att man omsätter α -aminofenylmetylpenicillinet med formeln



med föreningen med formeln

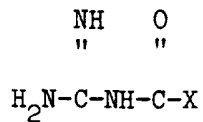


vari R_3 och R_4 har ovan nämnda betydelse, och X är -NH-A-COCl-HCl eller



vari A och n har ovan nämnda betydelse, och, om man så önskar, framställer farmaceutiskt godtagbara salter av föreningen med formeln I.

2. Förfarande enligt patentkravet 1 för framställande av 6-[D-2-fenyl-(3-guanyljureidoacetamido)acetamido]penicillansyran, k ä n n e t e c k n a t därav, att man omsätter D- α -aminobensylpenicillinet eller dess salt med föreningen med formeln



vari X har samma betydelse som i patentkravet 1, varvid dock n är 1, och, om man så önskar, framställer farmaceutiskt godtagbara salter av den erhållna föreningen.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: USA(US) 3 579 501 (C 07 d 99/16).