

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 606/89

(51) Int.Cl.⁵ : C07D 501/36
//A61K 31/545

(22) Anmeldetag: 15. 7.1986

(42) Beginn der Patentdauer: 15.10.1989

(45) Ausgabetag: 10. 5.1990

(62) Ausscheidung aus Anmeldung Nr.: 1926/86

(30) Priorität:

16. 7.1985 HU 2725/85 beansprucht.

(73) Patentinhaber:

BIOGAL GYOGYSZERGYAR
H-4042 DEBRECEN (HU).

(72) Erfinder:

MIHOK MIKLOS DIPL.ING.
DEBRECEN (HU).
MAROSSY KATALIN DR.
DEBRECEN (HU).
JANCSO SANDOR DR.
DEBRECEN (HU).
KONYA MARIA
DEBRECEN (HU).
KOVACS ISTVAN DR.
DEBRECEN (HU).

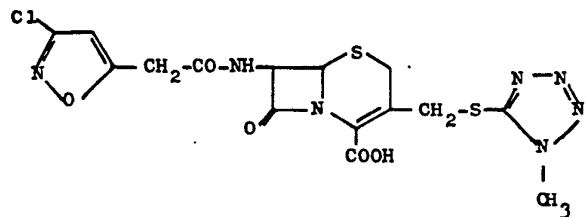
(72) Erfinder:

ELEK SANDOR DIPL.ING. DR.
DEBRECEN (HU).
MIHOK ILDIKO DIPL.ING. DR.
DEBRECEN (HU).
KISS ILONA
DEBRECEN (HU).
LEMBERT KAROLY DIPL.ING. DR.
BUDAPEST (HU).
DOLESCHALL GABOR DIPL.ING. DR.
BUDAPEST (HU).
FETTER JOZSEF DIPL.ING. DR.
BUDAPEST (HU).
HORNYAK GYULA DIPL.ING. DR.
BUDAPEST (HU).
NYITRAI JOZSEF DIPL.ING. DR.
BUDAPEST (HU).
SIMIG GYULA DIPL.ING. DR.
BUDAPEST (HU).
GOMBOS ZSUZSANNA DIPL.ING. DR.
BUDAPEST (HU).
ZAUER KAROLY DIPL.ING. DR.
SZENTENDRE (HU).

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG DER NEUEN 7-(3CHLOR-ISOXAZOL-5-YL)-ACETAMIDO-3-(1-METHYL-1H-1,2,3,4-TETRAZOL-5-YL)-THIOMETHYL-CEPH3-EM-4-CARBONSÄURE

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung der neuen 7-(3-Chlorisoxazol-5-yl)-acetamido-3-(1-methyl-1H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)thiomethyl-ceph-3-em-4-carbonsäure der Formel (I) und ihrer pharmakologisch geeigneten Salze, bei dem man 7-(3-Chlorisoxazol-5-yl)acetamido-cephalosporan-Säure mit 1-Methyl-1H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl-thiol umsetzt und erwünschtemfalls die so erhaltene Verbindung der Formel (I) in ein pharmakologisch geeignetes Salz überführt.

Die Verbindung der Formel (I) zeigt eine hohe Aktivität gegenüber einem breiten Spektrum von Mikroorganismen und ist als Wirkstoff für oral verabreichbare pharmazeutische Präparate geeignet.



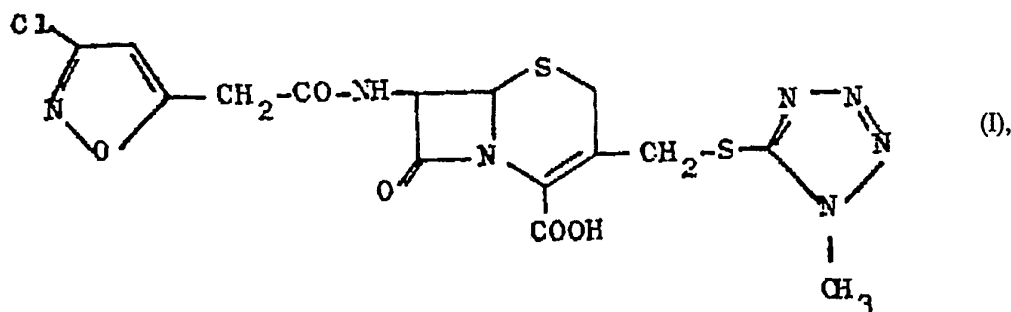
Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung der neuen 7-(3-Chlor-isoxazol-5-yl)-acetamido-3-(1-methyl-1H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)-thiomethyl-ceph-3-em-4-carbonsäure der Formel (I)

5

10

15

20



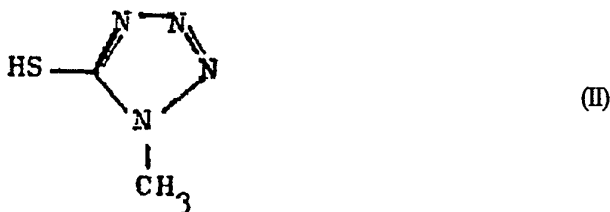
sowie ihrer pharmakologisch geeigneten Salze.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist vor allem dadurch gekennzeichnet, daß man das 1-Methyl-1H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl-thiol der Formel (II)

25

30

35



40

mit 7-(3-Chlor-isoxazol-5-yl)-acetamido-cephalosporansäure umsetzt, die gebildete 7-(3-Chlorisoxazol-5-yl)-acetamido-3-(1-methyl-1H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)-thiomethyl-ceph-3-em-4-carbonsäure der Formel (I) aus dem Reaktionsgemisch in an sich bekannter Weise isoliert, erwünschtenfalls auf bekannte Weise in ein Salz überführt und das Salz aus dem Reaktionsgemisch in an sich bekannter Weise isoliert.

45

Die Reaktion wird in einem Lösungsmittel - zweckmäßig in einer Mischung von Wasser und Aceton - bei einer Temperatur zwischen 30 °C und 90 °C - vorzugsweise bei 60 - 65 °C - und einem pH-Wert im Bereich von 4,5 - 6,0 durchgeführt. Die Reaktion läuft innerhalb von etwa 2 - 10 Stunden ab.

50

Auf dem Gebiet der halbsynthetischen β -Lactam-Derivate wurden sehr viele Versuche zur Herstellung von Verbindungen mit einem breiten oder speziellen antimikrobiellen Wirkungsspektrum durchgeführt. In einer großen Anzahl der hergestellten Moleküle wird an das Kohlenstoffatom 6 der 6-Aminopenicillansäure oder an das Kohlenstoffatom 7 der 7-Amino-cephalosporansäure - durch eine Acetaminogruppe - eine substituierte oder unsubstituierte Isoxazolgruppe gebunden. Mehrere Vertreter der so hergestellten Derivate zeigen eine bedeutende antimikrobielle Wirkung.

55

Bekannte, wertvolle und zum Arzneimittel weiterentwickelte Moleküle enthalten in Stellung 6 des Penicillingerüsts eine substituierte Isoxazol-4-yl-acetamino-Gruppe. Derartige Verbindungen werden in den US-Patentschriften Nr. 2 996 501 und 3 239 507 und in der französischen Patentschrift BSM Nr. 6432 beschrieben.

60

In der US-Patentschrift Nr. 4 394 504 werden Penicillin- und Cephalosporin-Derivate beschrieben, welche neben der 3-Amino-isoxazol-5-yl-acetamino-Gruppe in Alpha-Stellung zum Isoxazolring auch eine Alkoxyiminogruppe enthalten. Die in der zitierten US-Patentschrift beschriebenen Verbindungen zeigen eine bedeutende Wirkung gegen Staphylococcus-Stämme.

In der DOS Nr. 2 155 081 werden Penicillin- und Cephalosporin-Derivate beschrieben, welche eine 3-(substituiertes Phenyl)-isoxazol-5-yl-acetamino-Gruppe enthalten. Keines der genannten und getesteten Phenyl-

isoxazol-Derivate ist jedoch wirksam gegen die verwendeten Mikroorganismen.

In der DOS Nr. 2 409 949 werden weitere Isoxazol-5-yl-acetamido-Derivate beschrieben. In diesen Verbindungen ist der Isoxazolring anstatt durch die Phenylgruppe durch andere Substituenten substituiert.

Die allgemeine chemotherapeutische und pharmakologische Wirkung von einigen in dieser DOS beschriebenen Derivaten wurde bestimmt. Es wurde jedoch gefunden, daß keines der getesteten Derivate gegen die Testmikroorganismen eine hervorragende antibakterielle Wirkung zeigt.

Die für einige Derivate angegebenen MIC-Werte bleiben unter der Grenze, welche für die zu entwickelnden und einzuführenden Arzneimittel unbedingt erwünscht ist.

Das Ziel der Erfindung ist die Herstellung von wirksamen neuen Isoxazol-5-yl-cephalosporin-Derivaten, welche die Aktivität der bekannten Verbindungen ähnlicher Struktur übertreffen.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß die 7-(3-Chlor-isoxazol-5-yl)-acetamido-3-(1-methyl-1H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)-thiomethyl-ceph-3-em-4-carbonsäure der Formel (I) eine hervorragende antibakterielle Wirksamkeit aufweist. Dies wird durch chemotherapeutisches Screen und pharmakologische Versuche nachgewiesen.

Die erfindungsgemäß hergestellte Verbindung der Formel (I) fällt zwar unter die allgemeine Formel der DOS Nr. 2 409 949, das Herstellungsverfahren und die physikalisch-chemischen charakteristischen Merkmale dieser Verbindung wurden jedoch in der genannten DOS nicht beschrieben, und auch ihre MIC-Werte wurden nicht angegeben.

Die antibakterielle Wirksamkeit der Verbindung der Formel (I) wird durch die MIC-Werte derselben gekennzeichnet. Die gegen verschiedene Mikroorganismen gezeigten MIC-Werte und die entsprechenden Angaben zu den als Referenzverbindung verwendeten Handelsprodukten werden in Tabelle I zusammengefaßt.

Tabelle I

Testmikroorganismus	Verbindung der Formel (I)	Cefalexin	Cefuroxim	Cefoxitin
Bordetella bronchiseptica	12,5	500	500	100
Escherichia coli K 12	0,5	6,2	2	1,6
Escherichia coli 6 R	25	15,6	4	1,6
E. coli poliresistens	100	500	250	100
Staphylococcus aureus SMITH	0,06	0,8	0,8	1,2
Staphylococcus epidermidis ATCC I-12228	0,03	0,8	0,8	0,6
E. coli R-222	0,5	6,2	4	3,1
E. coli R-15	1,6	6,2	4	3,1
Klebsiella ATCC 10.031	0,16	6,2	0,08	12,5
Proteus vulgaris XL	100	500	62,5	3,1
Pseudomonas pyocyanea NTCT 10.490	100	500	500	100
Salmonella typhimurium	0,5	6,2	4	3,1
Bacillus subtilis ATCC 6633	0,015	0,3	0,1	0,1
Staphylococcus aureus 1110	1,25	62,5	125	25
Staphylococcus aureus 53	0,25	2,5	1,6	12,5
Streptococcus faectalis	50	250	500	100
Streptococcus haemoliticus Pneumo	0,03	0,31	0,008	0,6
Streptococcus haemoliticus A118	0,06	0,31	-	0,3
Streptococcus haemoliticus Robb	0,03	1,25	0,003	1,2

Mit Hilfe der Absorptionsversuche wurde überraschenderweise gefunden, daß die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (I) - welche auf Grund der MIC-Werte als Cephalosporinderivat der II. Generation betrachtet werden kann - im Gegensatz zu den dieser Gruppe angehörenden Antibiotika einen Absorptionsindex zeigt, der die Anwendung dieser Verbindung als oral zu verabreichendes Arzneimittel ermöglicht. Diese Ergebnisse werden in der Tabelle II angegeben.

Der Absorptionsindex wird durch die folgende Gleichung ausgedrückt:

$$\text{Absorptionsindex} = \frac{\text{p.o. ED}_{50} \text{ mg/kg}}{\text{s.c. ED}_{50} \text{ mg/kg}}$$

(an Mäusen, p.o.)

Tabelle II

Wirkstoff	Absorptionsindex		
	S. aur. Smith	Salm. typhi	Proteus XL
Verbindung der Formel (I)	20	1 - 2	1 - 2
Cefuroxim	30	0,001	4
Cefoxitin	7 - 8	0,001	/
Cefamandol	5	20	/
Cefalexin	1	1	/
Cefotaxim	0,001	0,001	0,001

Aus der Bestimmung der akuten Toxizität geht hervor, daß die Verbindung der Formel (I) in einer für die β -Lactame charakteristischen, einzigen Dosis verabreicht, nicht toxisch ist.

Eine i.p. oder p.o. Dosis von 2500 mg/kg Körpergewicht hat keine Sterblichkeit der Mäuse zur Folge.

LD₅₀ = 2500 mg/kg Körpergewicht.

Die pharmakokinetischen Eigenschaften der Verbindung der Formel (I) werden an Mäusen des CFLP-Stammes bei i.p. und p.o. Verabreichung bestimmt. Gleichzeitig werden 20 Mäuse mit der entsprechend konzentrierten, wäßrigen Lösung der Verbindung der Formel (I) behandelt. Angewendete Dosen: bei i.p. Verabreichung: im Falle von 20 mg/kg Körpergewicht 0,1 ml einer Lösung mit einer Konzentration von 4 mg/ml; bei p.o. Verabreichung: im Falle von 80 mg/kg Körpergewicht 0,4 ml einer Lösung mit einer Konzentration von 4 mg/ml. Das durchschnittliche Körpergewicht der Mäuse beträgt 20 g. Zu den angegebenen Zeitpunkten läßt man die Mäuse nach Decapitieren verbluten (die Blutgerinnung wird durch Zugabe von Heparin gehemmt). Der Wirkstoffgehalt des Blutspiegels wird auf mikrobiologischem Wege bestimmt (Versuchsstamm: Bacillus subtilis ATCC 6633). Die Ergebnisse sind der Tabelle III zu entnehmen.

Tabelle III

a) Bei i.p. Verabreichung (20 mg/kg Körpergewicht)

Zeit (Stunden)	Blutspiegel (mg/l)
0,15	1,23
0,30	2,6
0,45	1,23
1	0

b) Bei oraler Verabreichung (80 mg/kg Körpergewicht)

Zeit (Stunden)	Blutspiegel (mg/l)
0,15	0,35
0,30	0,70
0,45	0,58
1	0,46
1,5	0,22
2	0

Die Absorption der Verbindung der Formel (I) wird an Beagle-Hunden ebenfalls bestimmt. Die Testverbindung wird i.m. und p.o. verabreicht. Die Dosis beträgt bei i.m. Verabreichung 20 mg/kg Körpergewicht, bei p.o. Verabreichung 80 mg/kg Körpergewicht. Als Testmikroorganismus wird der Bacillus subtilis ATCC 6633 Stamm verwendet. Das Blut wird durch intravenöse Punktion gewonnen. Die Ergebnisse werden in der Tabelle IV zusammengefaßt.

Tabelle IV

a) Bei i.m. Verabreichung (20 mg/kg Körpergewicht)

Zeit (Stunden)	Blutspiegel (mg/l)
0,5	54,6 - 55,6
1	29,7 - 31,1
1,5	10,6
2	5,0 - 5,1
3	1,82 - 1,88
5	0,34

b) Bei p.o. Verabreichung (80 mg/kg Körpergewicht)

Zeit (Stunden)	Blutspiegel (mg/l)
0,5	0,63 - 0,645
1	0,645 - 0,67
1,5	3,1
2	5,7 - 5,8
3	7,5
5	2,78

Die nach p.o. Verabreichung im Blut gebildete Konzentrationskurve zeigt, daß die Verbindung der Formel (I) als Wirkstoff bei der Herstellung von oral verabreichbaren pharmazeutischen Präparaten anwendbar ist.

Außerdem wird die Bindung der Verbindung der Formel (I) an das Serumeiweiß bestimmt. Beim Versuch werden zwei Testmethoden verwendet; eine Methode beruht auf der Gleichgewichtsdialyse (Scholtan: Antibiot. Chemother. No. 12, Seite 103, [1964]), und die andere ist die sog. "Large plate" Methode (E. Kawanagh: Analytical Mikrobiol. Acad. Press. N.Y. [1963]). Die Bindung der Verbindung der Formel (I) and das Serumeiweiß liegt zwischen 50 % und 70 %.

Dieser Wert weist ebenfalls auf die Möglichkeit der oralen Verabreichung hin.

Die Verbindung der Formel (I) wird weiterhin in-vivo Testen unterworfen. Der ED₅₀-Wert wird an Mäusen des CFLP-Stammes bestimmt. Die Mäuse werden mit 6 - 8 Stunden alten Kulturen des Testmikroorganismus i.p. infiziert; die angewendete Mikroorganismendosis ist die zehnfache des LD₁₀₀-Wertes. Die Tiere werden 60 Minuten nach der Infektion mit der wäßrigen Lösung der Testverbindung behandelt. Als Referenzverbindung werden bekannte Handelsprodukte verwendet. Die Ergebnisse werden mit Hilfe der Litchfield-Wilcoxon-Methode berechnet. Es wurde in Einklang mit den in der Literatur für die β-Lactame beschriebenen Angaben gefunden, daß unter Einwirkung der Verbindung der Formel (I) im Falle einer Staphylococcus- und Proteus-Infektion die Zahl der lebenden Tiere praktisch keine Änderung zeigt.

In dem folgenden Testversuch wird bewiesen, daß die Verbindung der Formel (I) wirksamer ist als die Verbindungen der DOS Nr. 2 409 949. Der Versuch wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Tabelle V

Vergleich der ED₅₀-Werte in mg/kg

Versuchstier: Mäuse des CFLP-Stammes, beiden Geschlechts mit durchschnittlich 20 g Gewicht

Wirkstoff	Weg der Eingabe	Staphylococcus aureus SMITH ED ₅₀ in mg/kg
Verbindung der Formel (I)		0,23
	s.c.	(0,06 - 0,8)
	p.o.	4,3 (0,6 - 28,0)
Verbindung H*	s.c.	24,6 (15,9 - 38,2)
Verbindung F**	p.o.	75,7 (40,2 - 142,7)

* 7-([3-Chlorisoxazol-5-yl]-acetamido)-cephalosporansäures Natriumsalz

** 7-([3-Chlorisoxazol-5-yl]-acetamido)-3-([5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl]-thiomethyl)-ceph-3-em-4-carbonsäures Natriumsalz

Es können pharmazeutische Präparate hergestellt werden, welche als Wirkstoff 7-(3-Chlor-isoxazol-5-yl)-acetamido-3-(1-methyl-1H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)-thiomethyl-ceph-3-em-4-carbonsäure der Formel (I) oder ein pharmakologisch geeignetes Salz davon und geeignete, inerte, feste oder flüssige pharmazeutische Träger enthalten.

5 Die pharmazeutischen Präparate werden nach an sich bekannten Methoden der pharmazeutischen Industrie hergestellt.

Die Erfindung wird im folgenden anhand eines nicht einschränkenden Beispiels näher erläutert.

Beispiel

10 Herstellung der 7-(Chlorisoxazol-5-yl)-acetamido-3-(1-methyl-1H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)-thiomethyl-ceph-3-em-4-carbonsäure und ihres Natriumsalzes

0,084 g (1 mMol) Natriumbicarbonat und 0,415 g (1 mMol) 7-(3-Chlorisoxazol-5-yl)-acetaminocephalosporansäure werden in einer Mischung von 17 ml Wasser und 8 ml Aceton gelöst. Nach Zugabe von 0,14 g (1,2 mMol) 1-Methyl-1H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl-thiol wird das Reaktionsgemisch 8 Stunden lang bei 15 60 - 65 °C gehalten, wobei der pH-Wert durch Zugabe einer Natriumbicarbonatlösung auf 5,0 - 5,5 eingestellt wird.

Nach Ablauf der Reaktion wird der pH-Wert des Gemisches mit 3 N Salzsäure auf 2 eingestellt und danach mit Äthylacetat extrahiert. Die organische Phase wird lösungsmittelfrei eingedampft und der Rückstand mit Äther verrieben. Man erhält 0,35 g der freien Säure. Ausbeute: 74,5 %.

20 Die so erhaltene freie Säure wird in wasserfreiem Aceton gelöst, und zu der gebildeten Lösung wird eine Lösung einer äquivalenten Menge wasserfreien Natriumacetats in Methanol (10 %) gegeben. Die erhaltene Lösung wird eine Stunde lang bei 20 °C gerührt und mit einer gleichen Menge (Vol.teile) Diäthyläther verdünnt. Die charakteristischen Konstanten des erhaltenen Natriumsalzes sind die folgenden:

25 ¹H NMR: (DMSO-d₆)

3,52 (ABq, 2H, H-2), 3,90 (s, 3H, N-CH₃), 3,97 (s, 2H, CH₂CO), 4,35 (ABq, 2H, H-10),

4,97 (d, 1H, H-6), 5,52 (q, 1H, H-7), 6,67 (s, 1H, H-Ar), 9,25 (d, 1H, C⁷-NH).

Fp.: 150 - 155 °C (Zersetzung).

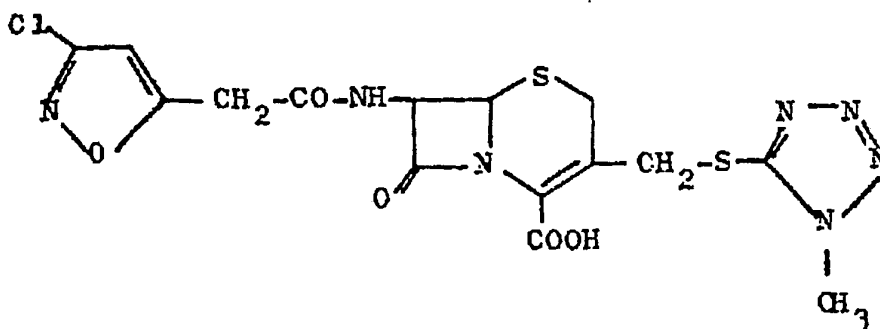
30

35 PATENTANSPRUCH

40

1. Verfahren zur Herstellung der neuen 7-(3-chlor-isoxazol-5-yl)-acetamido-3-(1-methyl-1H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)-thiomethyl-ceph-3-em-4-carbonsäure der Formel (I)

45

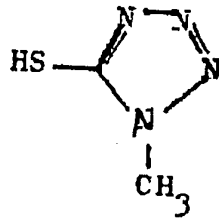


(I)

und ihrer pharmakologisch geeigneten Salze, dadurch gekennzeichnet, daß man das 1-Methyl-1H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl-thiol der Formel (II)

5

10



(II)

15

20 mit 7-(3-Chlorisoxazol-5-yl)-acetamido-cephalosporansäure umgesetzt, die gebildete 7-(3-Chlorisoxazol-5-yl)-acetamido-3-(1-methyl-1H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)-thiomethyl-ceph-3-em-4-carbonsäure der Formel (I) aus dem Reaktionsgemisch in an sich bekannter Weise isoliert, erwünschtenfalls auf bekannte Weise in ein Salz überführt und das Salz aus dem Reaktionsgemisch in an sich bekannter Weise isoliert.

25