

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

64894

Patent dodatkowy
do patentu

Kl. 12p,4/01

Zgłoszono: 28.XI.1968 (P 130 293)

Pierwszeństwo: 28.XI.1967 Stany
Zjednoczone
Ameryki

MKP C07d 99/24

Opublikowano: 15.X.1972

UKD

Współtwórcy wynalazku: Takayuki Naito, Susumu Nakagawa

Właściciel patentu: Bristol Laboratories International S.A., Panama (Re-
publika Panama)

Sposób wytwarzania kwasu 7-(sydnono-3-acetamido)- -cefalosporanowego i jego soli

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania kwasu 7-(sydnono-3-acetamido)-cefalosporanowego o wzorze 1 lub nietoksycznych, dopuszczalnych w lecznictwie soli tego kwasu. Związki te, będące nowymi pochodnymi kwasu cefalosporanowego, mają właściwości bakteriobójcze i nadają się jako dodatki do pokarmów zwierzęcych i do leczenia stanów zapalnych gruczołu sutkowego u bydła, jak również chorób zakaźnych, wywołanych przez bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne u ludzi, zwierząt i ptactwa domowego.

Znane są pochodne kwasu cefalosporanowego, stosowane jako środki przeciwbakteryjne, ale kwas 7-(sydnono-3-acetamido)-cefalosporanowy w którym grupa aminowa kwasu 7-aminocefalosporanowego jest podstawiona grupą sydnono-3-acetylową, nie był dotychczas znany. Kwas o wzorze 1 i jego sole mają w porównaniu ze znanymi pochodnymi kwasu cefalosporanowego szereg zalet, mianowicie są nietoksyczne i wykazują wysoką aktywność bakteriobójczą w stosunku do bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, a poza tym są bardzo odporne na rozkładowe działanie enzymu cefalosporynazy.

Sposobem według wynalazku, związek o wzorze 1 oraz nietoksyczne sole tego związku wytwarza się przez acylowanie kwasu 7-aminocefalosporanowego za pomocą czynnika acylującego o ogólnym wzorze 2, w którym X oznacza atom chloru, bromu lub jodu, albo za pomocą opisanych niżej funkcjo-

2

nalnych odpowiedników związku o wzorze 2. Reakcję acylowania prowadzi się w środowisku wodnym lub w środowisku złożonym z wody i niemieszkającego się z wodą, obojętnego w warunkach reakcji rozpuszczalnika organicznego, w obecności zasady i w temperaturze od około -10°C do 45°C .

Grupa nietoksycznych soli kwasu 7-(sydnono-3-acetamido)-cefalosporanowego, wykazujących korzystne działanie farmakologiczne, obejmuje m. innymi sole sodowe, potasowe, wapniowe, glinowe i amonowe grupy karboksylowej tego kwasu oraz sole amonowe podstawione takimi aminami jak niższe trójalkiloaminy, prokaina, dwubenzylamina, N-benzyl- β -fenetyloamina, 1-efenoamina, N,N'-dwubenzylodetylenodwuamina dehydroabietiloamina, N,N'-bis-dehydroabietiloetylenodwuamina i niższe N-alkilopiperidyny, na przykład N-etylopiperidyna lub aminami stosowanymi przy otrzymywaniu soli penicyliny benzylowej. W grupie tej znajdują się również estry i amidy kwasów łatwo ulegających hydrolizie, z wytworzeniem wolnego kwasu, pod wpływem czynników chemicznych lub enzymów.

Odpowiednikami funkcjonalnymi związku II, które mogą być stosowane jako środki acylujące w procesie będącym przedmiotem niniejszego wynalazku, są znane odpowiednie bezwodniki kwasów, w tym również bezwodniki mieszane. Szczególnie przydatne są mieszane bezwodniki mocnych kwasów, otrzymane z niższych alifatycznych monoest-

rów kwasów karboksylowych, kwasów alkilo- lub arylosulfonowych lub kwasów takich jak kwas dwufenylooctowy. Ponadto do reakcji acylowania może być stosowany azydek kwasu sydnono-3-octowego lub aktywny ester, ewentualnie tioester tego kwasu, na przykład z p-nitrofenolem, 2,4-dwunitrofenolem, tiofenolem, kwasem tiooctowym. Acylowanie można prowadzić również na drodze bezpośredniej reakcji między kwasem 7-aminokefalosporanowym i wolnym kwasem sydnono-3-octowym, po uprzednim poddaniu tego kwasu reakcji z chlorkiem N,N'-dwumetylochloroformiminiowym (brytyjski opis patentowy nr 1.008.170, *Experientia* XXI/6,360/1965), albo za pomocą enzymów lub jednego z następujących reagentów: N,N'-karbonyldwuimidazol, N,N'-karbonyldwutriazolu (zgłoszenie Unii Południowo Afrykańskiej nr 63/2684), karbodwuimidu zwłaszcza N,N'-dwucykloheksylokarbodwuimidu, N,N'-dwuizopropylkarbodwuimidu lub N-cykloheksylo-N'-(2-morfolinoetylo) karbodwuimidu (Sheehan i Hess, *J. Amer. Chem. Soc.* 77, 1067, (1955), alkinyloaminy (R. Buijle i H. G. Viehe, *Angew. Chem. International Edition* 3, 582 /1964/), ketenoininy (C. L. Stevens i M. E. Mond, *J. Amer. Chem. Soc.* 80, 4065 /1958/), soli izooksazolowej (R. B. Woodward, R. A. Olofson i H. Mayer, *J. Amer. Chem. Soc.* 83, 1010 /1961/). Do acylowania można stosować również, zamiast bezwodnika kwasowego, odpowiedni azolid, to jest amid kwasu, w którym atom azotu z grupy amidowej należy do quasiaromatycznego, pięciocząłowego pierścienia, zawierającego co najmniej dwa atomy azotu, mianowicie takich związków jak na przykład imidazol, pirazol, triazole, benzoimidazol, benzotriazol oraz ich pochodne.

Przykładem ogólnym metody otrzymywania azolidów jest reakcja N,N'-karbonyldwuimidazolu z kwasem karboksylowym, wziętych w stosunku równomolowym. Reakcje tą prowadzi się w temperaturze pokojowej w tetrahydrofuranie, chloroformie, dwumetyloformamidzie lub w innym obojętnym chemicznie rozpuszczalniku organicznym. Jej produktami są: imidazolid kwasu karboksylowego, otrzymywany z dużą wydajnością, dwutlenek węgla i jeden mol imidazolu. W przypadku zastosowania podobnych reakcji kwasów dwukarboksylowych, otrzymuje się dwuimidazole. Imidazol, będący ubocznym produktem reakcji, wytrąca się w postaci osadu i może być oddzielony od imidazolidu, co nie jest jednak konieczne. Metody te w zastosowaniu do otrzymywania cefalosporyny oraz sposób wyodrębniania tego związku są znane (opisy patentowe Stanów Zjednoczonych Ameryki nr nr 3.079.314, 3.117.126 i 3.129.224 oraz brytyjskie opisy patentowe nr nr 932.644, 957.570 i 959.054).

Również znane są obojętne chemicznie, niemieszające się z wodą rozpuszczalniki organiczne, stosowane w reakcjach acylowania. Są to na przykład: benzen, eter dwuetylowy, chloroform, metyloizobutyloketon, octan etylu, chlorek metylenu, czterochlorek węgla, toluen i chlorobenzen.

Reakcja acylowania, stanowiąca przedmiot wynalazku podobnie jak wiele reakcji chemicznych, może być prowadzona w pewnym zakresie temperatur, przekraczającym nieco zakres podany po-

wyżej, to jest -10° do 45°C . Nadmierne przekroczenie tego zakresu, zarówno w kierunku temperatury wyższej jak i niższej, wpływa jednak ujemnie na wydajność reakcji.

5 Przy prowadzeniu reakcji w wyższej temperaturze, powodem zmniejszenia wydajności jest wzrost ilości produktów ubocznych, natomiast w temperaturze niższej od podanej, prędkość reakcji jest mała, co powoduje konieczność znacznego przedłużenia czasu procesu. Najwyższą wydajność uzyskuje się przy przeprowadzaniu reakcji w temperaturze zbliżonej do 0°C .

Substancje alkalizujące dobiera się z grupy związków, obejmującej węglany i kwaśne węglany 15 metali alkalicznych, na przykład sodu lub potasu, pirydynę i wodorotlenki, na przykład wodorotlenek sodowy, potasowy, wapniowy lub glinowy. Najkorzystniejsze jest stosowanie kwaśnego węglanu sodowego lub pirydyny. Zastosowanie nadmiaru substancji alkalizującej jest korzystne dla uzyskania 20 wysokiej wydajności reakcji acylowania, przy czym najwyższą wydajność uzyskuje się stosując co najmniej dwukrotny nadmiar tej substancji.

Proporcje molowe czynnika acylującego i kwasu 25 7-aminocefalosporanowego mogą być zmieniane w szerokim zakresie. Możliwe jest również stosowanie nadmiaru jednego z reagentów. Użycie 1 do 2 moli czynnika acylującego na 1 mol kwasu 7-aminocefalosporanowego jest korzystne dla uzyskania 30 wysokiej wydajności reakcji acylowania. Maksimum wydajności uzyskuje się przy użyciu 1—1,2 mola czynnika acylującego na 1 mol kwasu 7-aminocefalosporanowego.

Synteza związków chemicznych znanych pod 35 nazwą sydnony przeprowadzona została po raz pierwszy przez Earl'a i Mackney'a (*J. Chem. Soc.* 7, (1935) str. 899-900). Kilku badaczy przeprowadziło od tego czasu badania dotyczące syntezy i budowy tych związków (Baker i Ollis, *Quarterly Reviews* (London), styczeń 1957, str. 15—29; Stewart, *Chem. Reviews* 64 (2), kwiecień 1964, str. 129—147). W wyniku tych badań ustalono, że 40 strukturę cząsteczki sydnonu najlepiej przedstawia następujący wzór 3, w którym R oznacza niższą grupę alkilową. W związku z tym, grupę sydnono-3-acetylową można przedstawić wzorem 4.

45 Kwas sydnono-3-octowy, stosowany jako produkt wyjściowy w reakcji acylowania według wynalazku, otrzymuje się w sposób podany przez F. H. Stewarta (*Chem. Ind. (London)*, 2 września 1961, str. 1411).

50 Sól sodowa kwasu 7-(sydnono-3-acetamido)-cefalosporanowego, otrzymana sposobem według wynalazku, została porównana pod względem działania przeciwbakteryjnego ze związkiem znanym w handlu pod nazwą kefalotyna, o wzorze strukturalnym 5. W tablicy I podano porównanie wielkości dawek progowych obydwu substancji w stosunku do różnych gatunków bakterii.

Tablica I

Bakterie Gram dodatnie		Dawki progowe w $\mu\text{g/ml}$	
		Kefalotyna	związku 6
B. anthracis	A-9504	0.3	0.3
D. pneumoniae	A-9585	0.03	0.03

Bakterie Gram dodatnie		Dawki progowe w µg/ml	
		Kefalo- tyny	związku o wzorze 6
D. pneumoniae	A-15046	0.03	0.06
D. pneumoniae	A-15059	0.03	0.06
D. pneumoniae	A-15069	0.1	0.3
List. monocytogenes	A-15121	2.0	4.0
List. monocytogenes	A-20025	2.0	4.0
Staph. aureus	A-9537	0.1	0.5
Staph. aureus	A-9497	0.06	0.1
Staph. aureus	A-15034	0.3	1.0
Staph. aureus	A-15092	3.3	1.0
Staph. aureus	A-15094	0.1	1.0
St. faecalis	A-9536	32.0	250.0
St. faecalis	A-9575	32.0	63.0
St. faecalis	A-9854	32.0	250.0
St. faecalis	A-20020	32.0	63.0
St. pyogenes	A-9604	0.03	0.1
St. pyogenes	A-15040	0.1	0.3
St. pyogenes	A-20065	0.03	0.06
St. pyogenes	A-20066	0.06	0.1
Bakterie			
Gram-ujemne			
A. aerogenes	A-9432	2.0	4.0
A. aerogenes	A-9532	2.0	2.0
A. Cloacae	A-9656	500.0	250.0
Alc. faecalis	A-9423	2.0	16.0
Br. bronchiseptica	A-9901	8.0	32.0
E. coli	A-15010	8.0	4.0
E. coli	A-15119	8.0	4.0
E. coli	A-9660	4.0	4.0
E. coli	A-15169	32.0	4.0
E. coli	A-9435	125.0	8.0
Herellea sp.	A-15125	500.0	250.0
K. pneumoniae	A-9977	4.0	4.0
K. pneumoniae	A-9867	2.0	4.0
K. pneumoniae	A-9678	16.0	4.0
K. pneumoniae	A-15130	32.0	4.0
K. aerobacter	A-15154	> 500.0	32.0
Mima polymorpha	A-15120	32.0	63.0
Pr. mirabilis	A-9900	32.0	4.0
Pr. mirabilis	A-9554	> 500.0	63.0
Pr. morgani	A-15153	> 500.0	63.0
Pr. morgani	A-15166	63.0	8.0
Pr. morgani	A-20031	< 1.0	2.0
Pr. morgani	A-9553	> 500.0	250.0
Pr. rettgeri	A-15167	63.0	4.0
Pr. vulgaris	A-9436	0.5	4.0
Pr. vulgaris	A-9699	63.0	32.0
Pr. vulgaris	A-9526	250.0	63.0
Ps. aeruginosa	A-9843	> 500.0	> 250.0
Ps. aeruginosa	A-9923	> 500.0	> 250.0
Ps. aeruginosa	A-9930	> 500.0	> 250.0
Ps. aeruginosa	A-15150	> 500.0	> 250.0
Ps. aeruginosa	A-15194	> 500.0	> 250.0
Sal. typhosa	A-9498	4.0	2.0
Ser. marcescens	A-20019	> 500.0	> 250.0
Sh. flexneri	A-9684	250.0	16.0
Sh. sonnei	A-9516	2.0	4.0
V. comma	A-9548	0.3	4.0

Tablica I ilustruje wysoką aktywność in vitro związku o wzorze 6 w stosunku do bakterii z gatunków *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*. Ponadto wynika z niej, że niektóre gatunki *Proteus* są bardziej wrażliwe na działanie tego związku niż kefalotyny.

Badania przeprowadzone na organizmach żywych wykazały również większą aktywność związku otrzymywanego sposobem według wynalazku niż kefalotyny w stosunku do różnych odmian bakterii Gram-ujemnych. Dawka lecznicza (LD_{50}) związku o wzorze 6, wstrzyknięta domięśniowo myszom przeciw bakteriom *E. coli* BX — 1373 wynosi 5,6 mg/kg, zaś dawka lecznicza kefalotyny wynosi 11 mg/kg. Dawka lecznicza (LD_{50}) związku o wzorze 6 przeciwko *E. coli* Juhl wynosi 14 mg/kg, zaś odpowiednia dawka kefalotyny 260 mg/kg. W tablicy II podano porównanie względnej prędkości rozkładu kefalotyny (0,001 M) w stosunku do prędkości rozpadu soli sodowej związku o wzorze 1 (0,001 M) w obecności β -laktamazy (cefalosporynazy) z bakterii Gram-ujemnych, w temperaturze 37°C.

Tablica II

Zródło enzymu	Ilość enzymu w mg	Procentowy sto- sunek prędkości hydrolizy związ- ku o wzorze 6 do prędkości roz- kładu kefalotyny
<i>Shigella flexneri</i> A15152	178	23
<i>Proteus morgani</i> A15149	720	20
<i>Escherichia coli</i> A15147	460	< 1,5
<i>Aerobacter-Kleb- siella</i> sp. A15156	900	< 2,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A15150	810	< 3,8

Z tablicy II wynika, że rozkład związku otrzy-
mywanego sposobem według wynalazku zachodzi
znacznie wolniej niż rozkład kefalotyny pod wpły-
wem wszystkich rodzajów enzymów użytych do
badania. Dalsze badania, z zastosowaniem mia-
reczkowania jodometrycznego, wskazują, że wy-
mienione enzymy hydrolizują β -laktamowy pier-
ścień kefalotyny. Można z tego wysnuć wniosek, że
związek o wzorze 6 jest znacznie odporniejszy od
kefalotyny na działanie laktamazy różnych rodza-
jów bakterii Gram-ujemnych.

Przy leczeniu ludzi zarażonych bakteryjnie,
związek wytwarzany sposobem według wynalazku
podaje się doustnie lub pozajelitowo, zgodnie z
procedurą stosowaną przy leczeniu antybiotykami.
Dawki leku określone są przez lekarzy i zależą one
od takich czynników, jak stopień nasilenia choroby
i ciężar ciała pacjenta. Zwykle stosuje się dawki
2–50 mg/kg, przy czym zalecane jest stosowanie
dawki 15 mg/kg/dzień, w oddzielnych porcjach 3
lub 4 razy dziennie. Lekarstwo podawane jest w
dawkach 125–250 lub 500 mg aktywnego składni-

ka, zmieszanego z odpowiednimi nośnikami i dodatkami uzupełniającymi. Może ono być stosowane zarówno w postaci ciekłej, takiej jak roztwory, dyspersje lub emulsje, jak i w postaci stałej, takiej jak tabletki, kapsułki i temu podobne. Poniżej podano przykłady otrzymywania pochodnych kwasu 7-(sydnono-3-acetamido) cefalosporanowego. Przykłady te mają służyć dla zilustrowania istoty wynalazku, nie zaś jej ograniczaniu.

Przykład I. Sól sodowa kwasu 7-(sydnono-3-acetamido/cefalosporanowego o wzorze 6.

Mieszaninę 1 g (0,007 mola) kwasu sydnono-3-octowego i 2 g (0,0095 mola) pięciochlorku fosforu w 50 ml bezwodnego chlorku metylenu wytrząsa się w ciągu 1/2 godz. w temperaturze pokojowej. Otrzymany roztwór chlorku sydnono-3-acetylu dodaje się powoli, w temperaturze 0°C, do mieszaniny zawierającej 1,9 g (0,007 mola) kwasu 7-aminocefalosporanowego i 6 g (0,07 mola) kwaśnego węgla sodowego w 20 ml wody i 30 ml octanu etylu. Połączone reagenty miesza się w ciągu około 20 minut w temperaturze 10°C. Po zakończeniu reakcji oddziela się warstwę organiczną, a warstwę wodną zalewa 50 ml octanu etylu i doprowadza do wartości pH = 2 przez dodanie 20%-wego roztworu kwasu solnego, w temperaturze 5°C, stosując mieszanie. Warstwę octanu etylu, zawierającą kwas 7-(sydnono-3-acetamido)-cefalosporanowy, oddziela się następnie od warstwy wodnej, którą ekstrahuje się dwukrotnie 20 ml octanu etylu. Połączone roztwory octanu etylu przemycia się wodą, suszy bezwodnym siarczanem sodu i sączy z 3,3 ml 35% roztworu 2-etyloheksanolanu sodowego w metyloizobutyloketonie. Wytrącony produkt osącza się, przemycia 5 ml octanu etylu i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem nad pięciotlenkiem fosforu. Wydajność reakcji wynosi 0,6 g (20% wydajności teoretycznej). Temperatura topnienia produktu wynosi 180–220°C (z rozkładem). $\gamma_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 1780–1740 (szeroki),

1640, 1610, 1405 cm^{-1} . $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 269 m μ (ϵ 10.000). Analiza: obliczono dla związku o wzorze $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_8\text{SNa} \cdot \text{H}_2\text{O}$: 38,36% i 3,45% H, podczas gdy stwierdzono skład: 38,65% C, 39,12% C i 4,31 oraz 4,30% H.

Przykład II. Sól potasowa kwasu 7-sydnono-3-acetamido/cefalosporanowego.

Mieszaninę 1 g (0,007 mola) kwasu sydnono-3-octowego i 2 g (0,0095 mola) pięciobromku fosforu

w 50 ml bezwodnego chlorku metylenu wytrząsa się w temperaturze pokojowej w ciągu 1/2 godziny. Otrzymany roztwór bromku sydnono-3-acetylu dodaje się powoli mieszając, do mieszaniny zawierającej 1,6 g (0,006 mola) kwasu 7-aminocefalosporanowego i 2,8 g (0,05 mola) KOH w 20 ml CH_2Cl_2 . Połączone reagenty miesza się w ciągu 45 minut w temperaturze 15°C, po czym oddziela się warstwę organiczną i odrzuca. Warstwę wodną miesza się nadal, po dodaniu do niej 40 ml CH_2Cl_2 i zakwaszeniu jej 40% roztworem kwasu fosforowego do wartości pH = 2. Warstwę CH_2Cl_2 oddziela się i łączy z drugim (40 ml) ekstraktem, a następnie przemycia 40 ml wody. Połączone warstwy CH_2Cl_2 przesącza się przez warstwę bezwodnego Na_2SO_4 , którą następnie przemycia się 3 porcjami po 25 ml CH_2Cl_2 . Połączone przesącze i roztwór z przemycia natęża się pod zmniejszonym ciśnieniem aż do otrzymania powoli krystalizującego oleju. Otrzymany produkt jest solą potasową kwasu 7-(sydnono-3-acetamido)-cefalosporanowego.

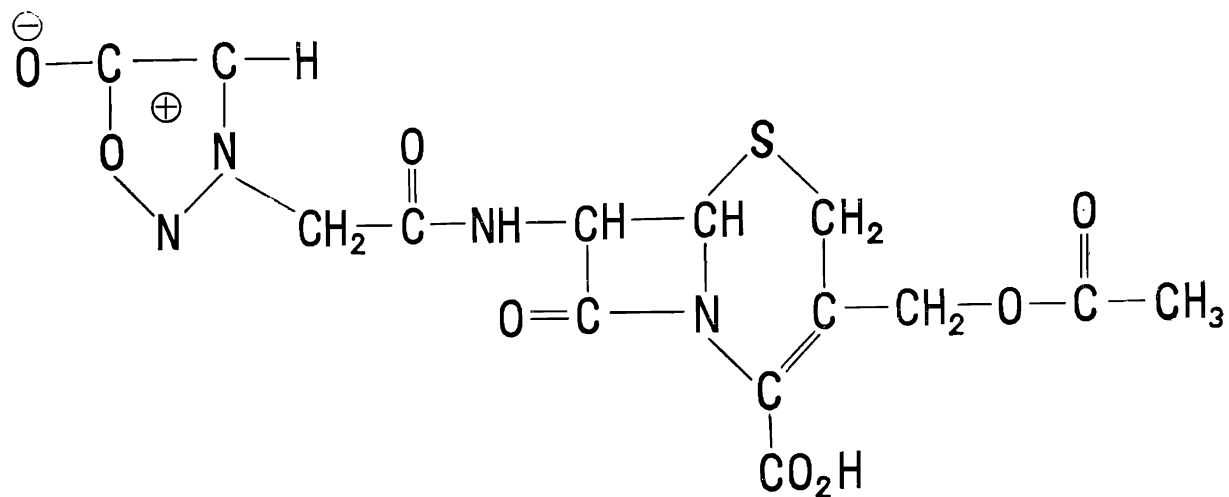
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania kwasu 7-(sydnono-3-acetamido)-cefalosporanowego o wzorze 1 lub jego soli, **znamienny tym**, że kwas 7-aminocefalosporanowy acyluje się za pomocą czynnika acylującego o wzorze 2, w którym X oznacza atom chloru, bromu lub jodu, albo za pomocą funkcjonalnego odpowiednika związku o wzorze 2, prowadząc proces acylowania w środowisku rozpuszczalnika w postaci wody lub mieszaniny wody z niemieszanym się z wodą, obojętnym rozpuszczalnikiem organicznym, w obecności zasady, w temperaturze od około -10°C do 45°C , po czym otrzymaną sól ewentualnie przeprowadza się w wolny kwas.

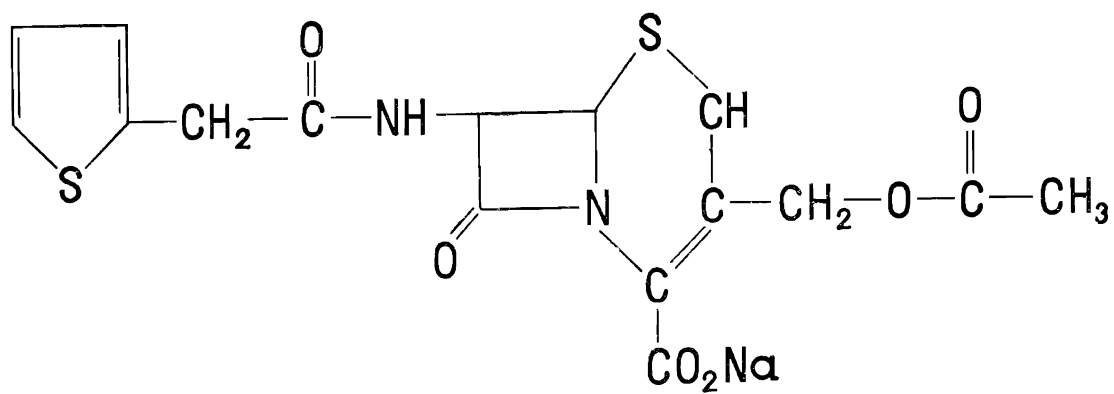
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako zasadę stosuje się węglan metalu alkalicznego, kwaśny węglan metalu alkalicznego, pirydynę lub wodorotlenki metali.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że czynnik acylujący i kwas 7-aminocefalosporanowy poddaje się reakcji w stosunku molowym około 1,0–2,0 moli czynnika acylującego na 1 mol kwasu 7-aminocefalosporanowego.

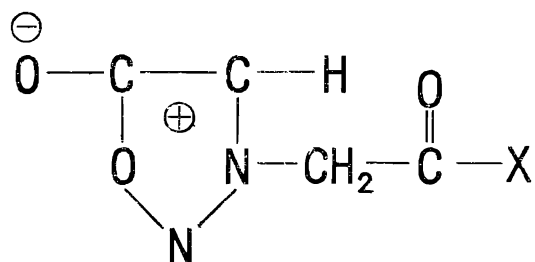
4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że jako czynnik acylujący stosuje się chlorek sydnono-3-acetylu.



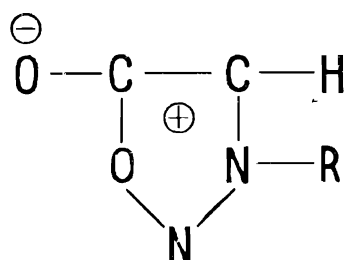
Wzór 1



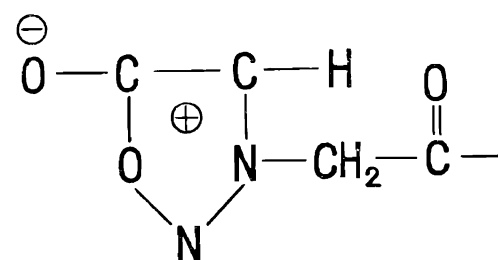
Wzór 5



Wzór 2



Wzór 3



Wzór 4