

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT (11) 144973 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Ansøgning nr. 609/76

(51) Int.Cl.³ C 07 D 499/68

(22) Indleveringsdag 13. feb. 1976

(24) Løbedag 13. feb. 1976

(41) Alm. tilgængelig 15. aug. 1976

(44) Fremlagt 19. jul. 1982

(86) International ansøgning nr. -

(86) International indleveringsdag -

(85) Videreførelsesdag -

(62) Stamansøgning nr. -

(30) Prioritet 14. feb. 1975, 19040/75, JP

(71) Ansøger SUMITOMO CHEMICAL COMPANY LIMITED, Osaka-shi, JP.

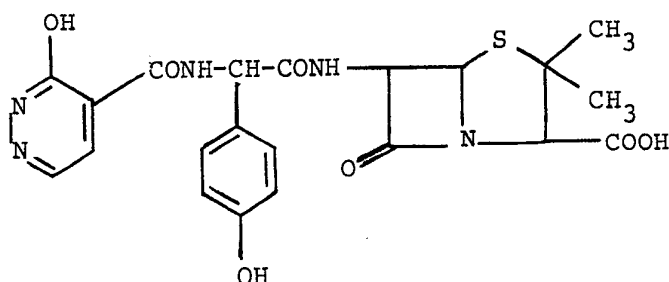
(72) Opfinder Hirotsada Yamada, JP: Hisao Tobiki, JP: Norihiko Tanno, JP: Kozo Shimago, JP: Kosaku Okamura, JP: m. fl.

(74) Fuldmægtig Plougmann & Vingtoft Patentbureau.

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af 6-(D-2-(3-hydroxypyridazin-4-carbonamido)-2-(p-hydroxyphenyl)acetamido)penicillansyre eller salte deraf.

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af den hidtil ukendte 6-[D-2-(3-hydroxypyridazin-4-carbonamido)-2-(p-hydroxyphenyl)acetamido]penicillansyre eller salte deraf.

6-[D-2-(3-Hydroxypyridazin-4-carbonamido)-2-(p-hydroxyphenyl)acetamido]penicillansyre angives ved formelen I



I

Det er velkendt, at ampicillin er meget effektivt til behandling af infektioner, der skyldes grampositive og gramnegative bakterier, men forbindelsen udviser ikke nogen væsentlig aktivitet mod *Pseudomonas*. Til behandling af infektioner med *Pseudomonas* har der i de sidste år været benyttet nogle syntetiske penicilliner såsom carbenicillin og sulfocillin, men deres aktivitet mod *Pseudomonas* er ikke tilstrækkelig stærk. I USA patentskrift nr. 3.864.329, japansk patentpublikation nr. 92391/1973 og tysk offentliggørelsesskrift nr. 2.362.279 er der beskrevet nogle penicilliner med god antibakteriel aktivitet mod grampositive og gramnegative bakterier, herunder *Pseudomonas*.

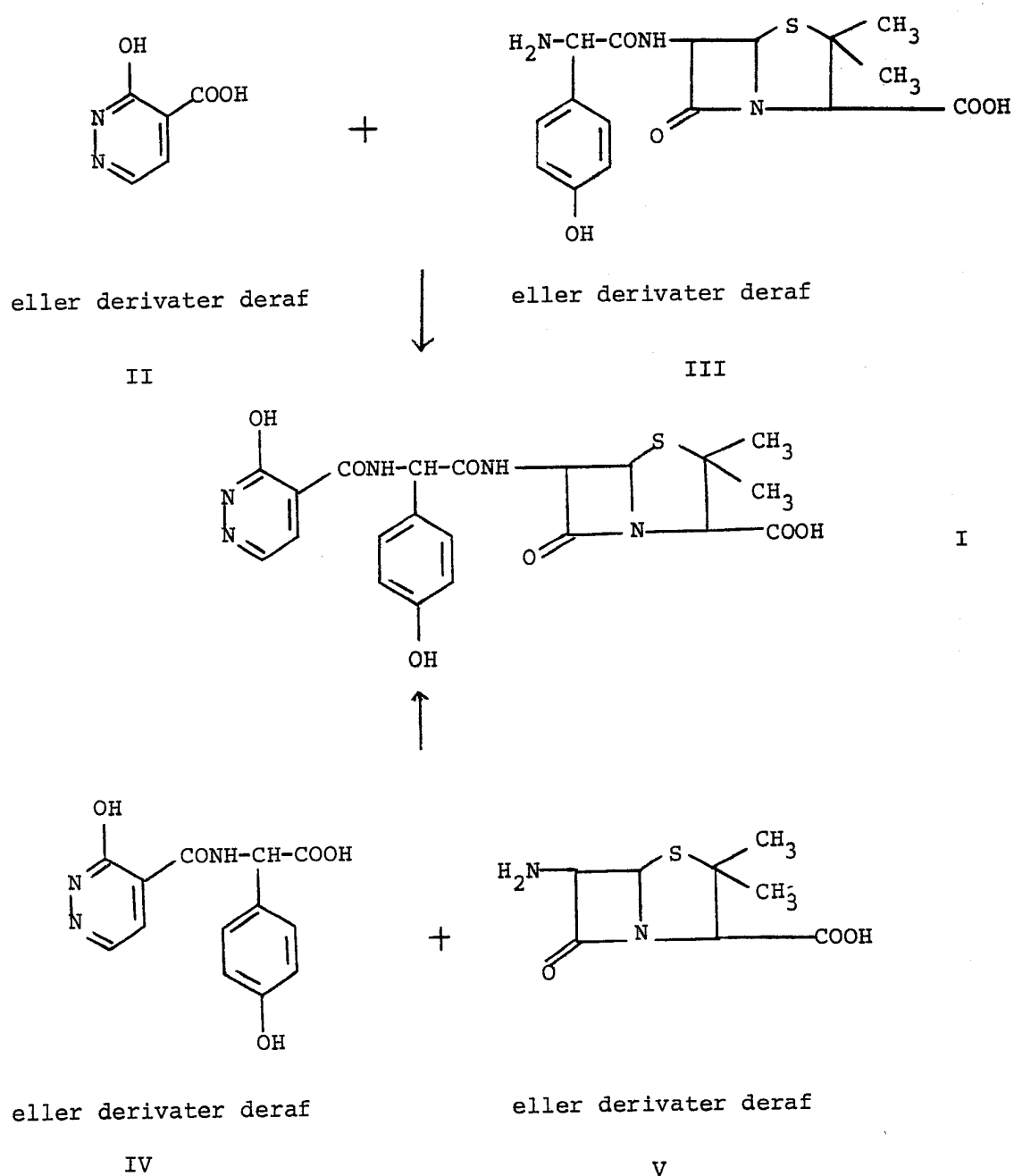
Som et resultat af omfattende forsøg har det vist sig, at 6-[D-2-(3-hydroxypyridazin-4-carbonamido)-2-(p-hydroxyphenyl)acetamido]penicillansyre udviser en stærk antibakteriel aktivitet med meget ønskelige og praktisk anvendelige farmaceutiske egenskaber, og forbindelsen er et særligt anvendeligt antibakterielt middel.

Selv om den her omhandlede forbindelse i struktur ligner penicilliner, som er angivet i de nævnte publikationer, er forbindelsens antibakterielle aktivitet in vitro og in vivo meget stærkere og dens farmakokinetiske egenskaber er mere ønskelige i forhold hertil. Den her omhandlede forbindelse udviser f.eks. in vitro og in vivo meget stærkere antibakteriel aktivitet mod adskillige patogene organismer end 6-[D-2-(4-hydroxypyridin-3-carbonamido)-2-(p-hydroxyphenyl)acetamido]penicillansyre og 6-[D-2-(3-hydroxypyridazin-4-carbonamido)-2-phenylacetamido]penicillansyre, som er angivet i den nævnte japanske patentpublikation. Den her omhandlede forbindelse udviser også lavere toxicitet, bredere antibakterielt spektrum, højere serumkoncentrationer, højere urinudskillelshastighed, lavere proteinbindingsforhold, svagere smerte ved parenteral administration og højere opløselighed i farmaceutiske fortyndingsmidler (f.eks. vand).

Den foreliggende opfindelse angår således en analogifremgangsmåde til fremstilling af 6-[D-2-(3-hydroxypyridazin-4-carbonamido)-2-(p-hydroxyphenyl)acetamido]penicillansyre eller salte deraf, fortrinsvis ikke-toxiske, farmaceutisk tolerable salte, der er værdifulde som kemoterapeutiske midler, især til behandling af infektionssygdomme, der skyldes grampositive og gramnegative bakterier.

De ikke-toxiske, farmaceutisk tolerable salte er f.eks. uorganiske salte såsom natrium-, kalium-, ammonium-, calcium- og magnesiumsalte og organiske salte såsom diethylamin-, triethylamin-, N,N'-dibenzyl-ethylendiamin-, diethanolamin-, pyrrolidin-, morpholin-, procain-, L-arginin- og L-lysinsalte.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i kravets kendetegnende del angivne. Fremgangsmåden består i i og for sig konventionelle måder, som angivet i følgende reaktionsskema:

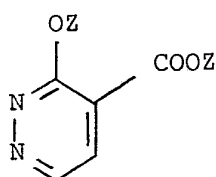


Omsætningen mellem carboxylsyren med formelen II eller et derivat deraf og aminen med formelen III eller et derivat deraf udføres sædvanligvis i et inert opløsningsmiddel såsom et polært opløsningsmiddel (f.eks. dichlormethan, chloroform, acetone, tetrahydrofuran, dioxan, acetonitril, methylisobutylketon, ethanol, dimethylformamid, dimethylacetamid, dimethylsulfoxid, sulfon, hexamethylphosphorsyretetriamid eller vand), et ikke-polært opløsningsmiddel (f.eks. benzen, toluen, petroleumsether eller n-hexan) eller blandinger deraf. Der kan i nogle tilfælde anvendes et vandigt medium. Reaktions-temperaturen er ikke begrænset og er sædvanligvis under 50°C.

Som derivat af carboxylsyren med formelen II på carboxylgruppen kan angives halogenider, syreanhydrider, blandede syreanhydrider, syreazolider, syreazider og aktive estere. Som eksempler på syreazolider kan angives sådanne, der fremstilles ud fra imidazol, substituerede imidazoler, dimethylpyrazol, triazol eller tetrazol. Aktive estere kan være cyanomethylester, p-nitrophenylester, 2,4-dinitrophenylester, trichlorphenylester, pentachlorphenylester, methansulfonylester, 1-hydroxy-2(1H)-pyridon, N-hydroxysuccinimid eller N-hydroxydiphthalimid.

Når carboxylsyren med formelen II anvendes som fri syre kan amideringen med aminen med formelen III eller et derivat deraf fortrinsvis udføres i nærværelse af et koblingsmiddel såsom N,N'-dicyclohexylcarbodiimid, N-cyclohexyl-N'-morpholinoethylcarbodiimid, triphenylphosphin, 2-ethyl-5-(m-sulfonyl)isoxazoliumhydroxid-indre salt eller carbonyldiimidazol.

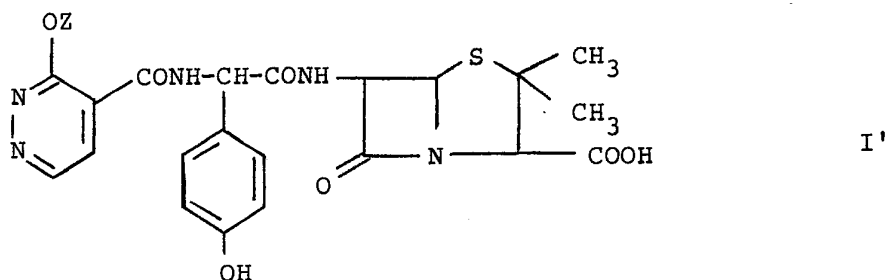
Når der til aktivering af carboxylsyren med formelen II fremstilles et blandet syreanhydrid, kan følgende fremgangsmåde anbefales. 1 mol carboxylsyre med formelen II omsættes med ca. 2 mol af et lavere alkylcarbonylhalogenid (f.eks. chlormyresyreethylester eller chlormyresyreisobutylester) eller et lavere alkanoylhalogenid (f.eks. pivaloylchlorid) i nærværelse af ca. 2 mol base, hvorved fås et blandet syreanhydrid med den almene formel II'



II'

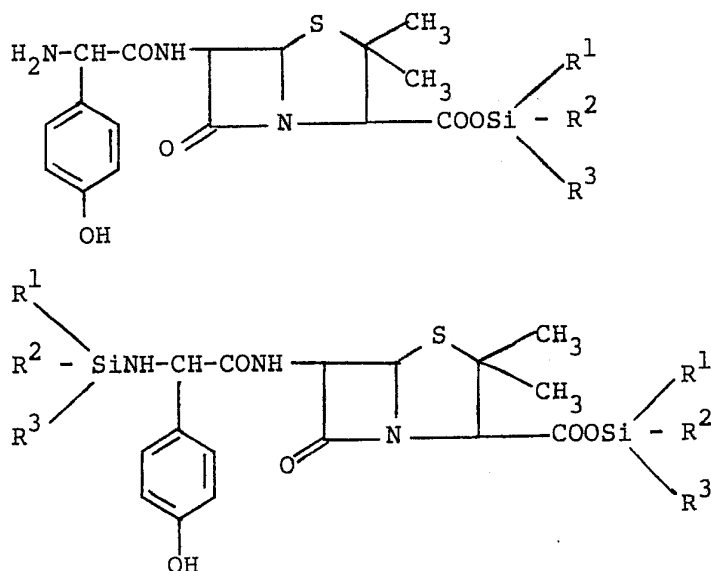
hvor Z betegner acyl eller lavere alkoxy-carbonyl.

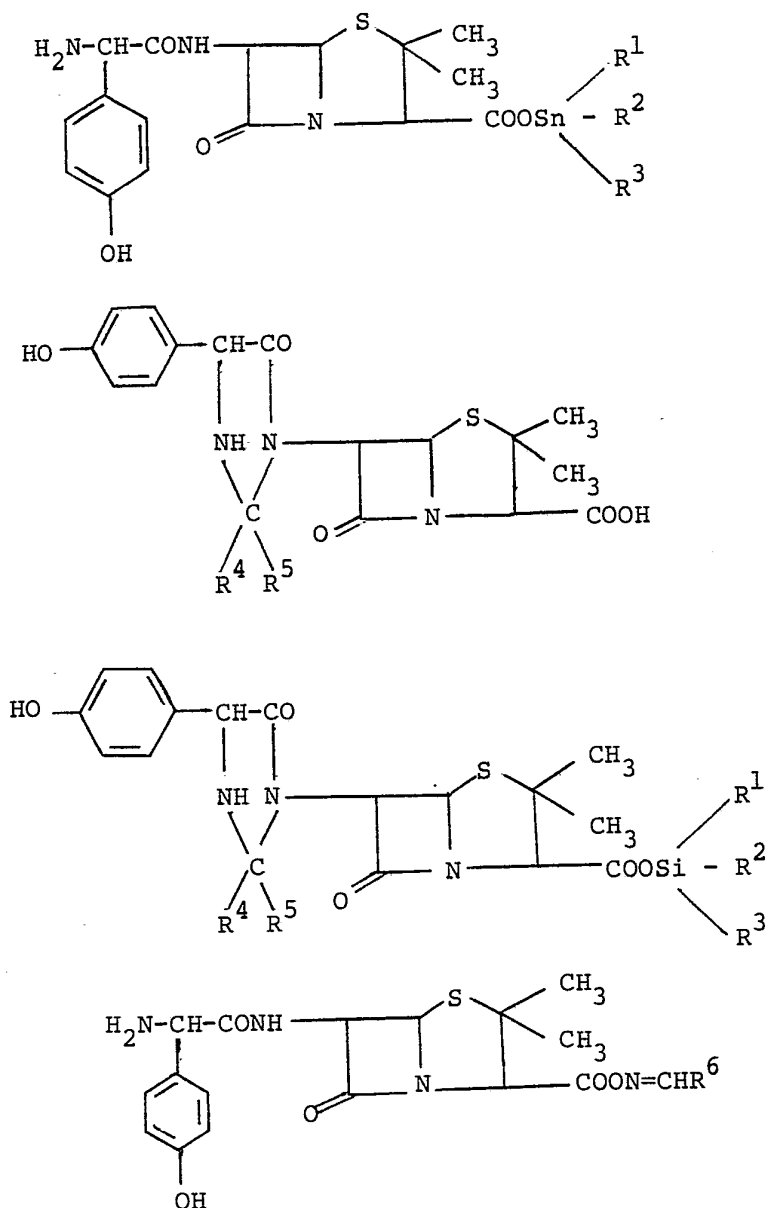
Produktet ved amideringen under anvendelse af et sådant blandet anhydrid har den almene formel I'



hvor Z har den ovenfor angivne betydning, hvilket produkt ved behandling med en organisk eller uorganisk base (f.eks. natriumcarbonat, kaliumcarbonat, natriumhydroxid, ammoniakvand, triethylamin, dimethylamin eller kalium-2-ethylhexanoat) kan omdannes til penicillinen med formel I. Omdannelsen kan også udføres under sure betingelser, selv om der sædvanligvis foretrækkes basiske betingelser.

Derivater af aminen med formel III kan f.eks. være salte, estere eller N-substituerede forbindelser deraf. Som eksempler på salte kan angives salte af alkalimetaller (f.eks. natrium eller kalium), jordalkalimetaller (f.eks. calcium eller barium), organiske baser (f.eks. trimethylamin eller triethylamin) eller organiske sulfonsyrer (f.eks. toluensulfonsyre, naphthalensulfonsyre eller tetrahydronaphthalensulfonsyre). Eksempler på estere og N-substituerede forbindelser er følgende:





hvor R¹, R² og R³ hver betegner lavere alkyl eller lavere alkoxy, R⁴ og R⁵ hver betegner lavere alkyl, og R⁶ betegner lavere alkyl, aryl eller en heteroring.

Yderligere eksempler på esterenheden i estere af aminen med formlen III er følgende: toluensulfonylethylester, p-nitrobenzylester, benzylester, phenacyl-ester, diphenylmethylester, substituerede diphenylmethylestere, tritylester, benzoyloxymethylester, lavere alkanoyl-

oxymethylestere, dimethylmethylenaminoester, p-nitrophenylester, methylsulfonylphenylester, methylthiophenylester, tert.butylester, 3,5-di-tert.butyl-4-hydroxybenzylester og trichlorethylester. Disse esterenheder anvendes alle konventionelt som en gruppe, der beskytter et carboxylsyreradikal inden for bestemte områder. Disse estere kan anvendes i saltform såsom dem, der fås ved anvendelsen af organiske sulfonsyrer (f.eks. toluensulfonsyre eller tetrahydronaphthalensulfonsyre).

Efter amideringen med carboxylsyren med formlen II eller et derivat deraf kan disse esterdele elimineres på i og for sig kendt måde såsom reduktion eller hydrolyse under så milde betingelser, at der ikke sker indvirkning på β -lactamringen i penicillinkernen.

Omsætningen mellem carboxylsyren med formlen IV eller et derivat deraf og aminen med formlen V eller et derivat deraf kan udføres analogt med den ovenfor beskrevne omsætning af carboxylsyren med formlen II eller et derivat deraf med aminen med formlen III eller et derivat deraf.

Til behandling af infektioner hos pattedyr kan den her omhandlede forbindelse administreres via forskellige ruter såsom intramuskulær eller intravenøs injektion eller instillation med en daglig dosis på 300 mg - 20 g i mindre doser, f.eks. 3 eller 4 gange pr. døgn.

Der kan med den her omhandlede forbindelse på i og for sig kendt måde fremstilles konventionelle enhedsdoseringsformer (f.eks. opløsninger, dispersioner, emulsioner, pulvere, tabletter eller kapsler).

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen belyses nærmere ved de følgende eksempler:

Eksempel 1.

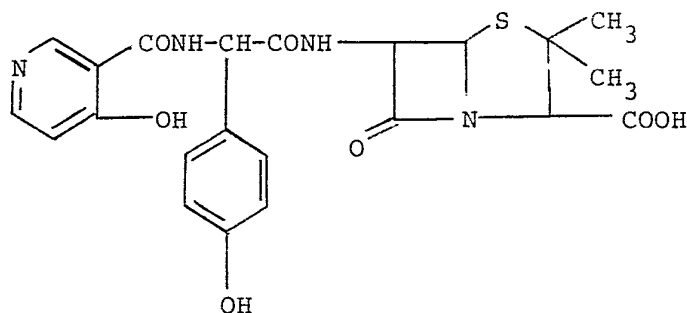
Til en opløsning af 8,0 g 6-(D- α -amino- α -p-hydroxyphenylacetamido)-penicillansyre-trihydrat og 2,02 g triethylamin i 40 ml dimethylformamid sættes under omrøring ved stuetemperatur 5,48 g 3-hydroxypyri-

dazin-4-carboxylsyre-p-nitrophenylester, og omrøringen fortsættes ved den samme temperatur i 40 minutter. Efter tilsætning af 3,16 g natrium-2-ethylhexanoat til reaktionsblandingen fortsættes omrøringen i yderligere 15 minutter. Ved filtrering fjernes en ringe mængde af uopløste produkter, og filtratet blandes med 200 ml dichlormethan og 200 ml acetone. De udfældede krystaller opsamles ved filtrering, vaskes successivt med dichlormethan, acetone og ether og tørres over phosphorpentoxid under reduceret tryk, hvorved fås 9,0 g natrium-salt af 6-[D-2-(3-hydroxypyridazin-4-carbonamido)-2-(p-hydroxyphenyl)acetamido]penicillansyre. Smeltepunkt 218 - 220°C (sønderdeling).

Eksempel 2.

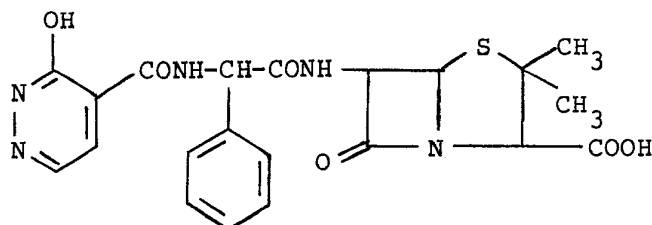
Til en blanding af 1,52 g D-2-(3-hydroxypyridazin-4-carboxamido)-2-(p-hydroxyphenyl)eddikesyre, 0,506 g N-methylmorpholin og 10 ml dimethylformamid afkølet til -50°C sættes dråbevis 0,683 g isobutylchlorformiat, og den resulterende blanding omrøres i 10 minutter. Separat sættes 2,4 g N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid til en suspension af 1,08 g 6-aminopenicillansyre i 10 ml dimethylformamid, og den resulterende blanding omrøres ved 30 - 35°C i 60 minutter, hvorefter der afkøles til -30°C. De ovenfor vundne blandinger forenes og omrøres ved -50 - -40°C i 5 timer, hvorefter temperaturen gradvist hæves til 5°C natten over. 200 ml vand sættes til reaktionsblandingen. De udfældede krystaller isoleres ved filtrering, vaskes med vand og tørres over phosphorpentoxid under reduceret tryk, hvorved fås 2,4 g D-2-(3-hydroxypyridazin-4-carboxamido)-2-(p-hydroxyphenyl)acetamidopenicillansyre.

Den antibakterielle aktivitet in vitro og in vivo af 6-[D-2-(3-hydroxypyridazin-4-carbonamido)-2-(p-hydroxyphenyl)acetamido]penicillansyre (i det følgende betegnet forbindelse I) mod adskillige organismer sammenlignes med to typiske og repræsentative penicilliner, der er angivet i japansk patentpublikation nr. 92391/1973, nemlig 6-[D-2-(4-hydroxypyridin-3-carbonamido)-2-(p-hydroxyphenyl)acetamido]penicillansyre (i det følgende betegnet forbindelse A):



A

og 6-[D-2-(3-hydroxypyridazin-4-carbonamido)-2-phenylacetamido]penicillansyre (i det følgende betegnet forbindelse B):



B

De gennemsnitlige minimalt inhiberende koncentrationer, som fås med forbindelse I og forbindelse A mod 170 bakterieisolater fra hospitalspatienter, og som repræsenterer 8 slægter, er angivet i tabel I, hvoraf det fremgår, at den antibakterielle aktivitet af forbindelse I er overlegen sammenlignet med forbindelse A, især mod organismer såsom *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Proteus morganii*, *Enterobacter aerogenes* og *Serratia*.

Tabel I

Organisme	Antal af kliniske isolater	Gennemsnitlig minimalt inhiberende koncentration (μ g/ml)	
		Forbindelse I	Forbindelse A
<i>Staphylococcus aureus</i>	37	13	21
<i>Escherichia coli</i>	23	12	14
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26	21	73
<i>Proteus vulgaris</i>	7	8,8	115
<i>Proteus morganii</i>	14	4,4	50
<i>Enterobacter aerogenes</i>	8	25	100
<i>Serratia</i>	6	31	>200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49	10	5

Bemærkning: Forbindelse I og forbindelse A blev testet i form af natriumsaltet. Den minimalt inhiberende koncentration (MIC) blev bestemt under anvendelse af agarpladefortyndingsmetoden, som anbefales af Japan Society of Chemotherapy.

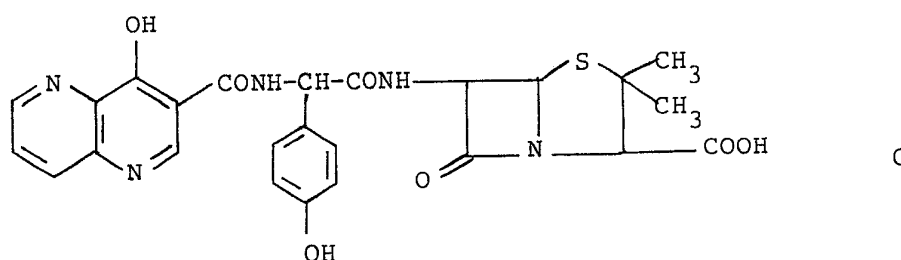
De relative aktiviteter af forbindelse I, forbindelse A og forbindelse B mod forskellige intraperitoneale infektioner hos mus bestemmes ved de minimalt inhiberende koncentrationer, og de gennemsnitlige beskyttende doser (subcutan administration) er angivet i tabel II, hvoraf det fremgår, at PD₅₀-værdierne af forbindelse I er betydelig overlegne i forhold til dem for forbindelse A og forbindelse B, især mod organismer såsom *Klebsiella pneumoniae* og *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabel II

Organisme	Stamme nr.	MIC (µg/ml)			PD ₅₀ (mg/kg)		
		Forbindelse I	Forbindelse A	Forbindelse B	Forbindelse I	Forbindelse A	Forbindelse B
<i>Escherichia coli</i>	37	12,5	12,5	12,5	31	-	57
<i>Escherichia coli</i>	NIHJ	6,25	12,5	12,5	3,2	3,0	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	12,5	100	12,5	31	>150	71
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	25	100	25	36	120	50
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	6,25	3,13	12,5	25	100	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	T	25	12,5	12,5	35	51	160
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NC-5	12,5	6,25	12,5	22	60	180

Bemærkning: Forbindelse I, forbindelse A og forbindelse B var underkastet forsøget i form af natriumsaltet. Til hver test blev der ved hvert dosisniveau anvendt 8 hanmus af ICR-SCL-stammen. MIC-Værdien bestemtes ved næringsvæskefortyndingsmetoden. Til bestemmelse af PD_{50} -værdien udførtes to subcutane behandlinger, dvs. 1 og 4 timer efter infektionen.

Den antibakterielle aktivitet in vitro og in vivo af forbindelse I mod forskellige organismer og de farmakokinetiske profiler af forbindelse I blev sammenlignet med dem af typiske og repræsentative forbindelser, som er angivet i tysk offentliggørelsesskrift nr. 2.362.279, dvs. 6-[D-2-(4-hydroxy-1,5-naphthyridin-3-carbonamido)-2-(p-hydroxyphenyl)acetamid]penicillansyre (i det følgende betegnet forbindelse C) med formlen



De minimalt inhiberende koncentrationer, som fås med forbindelse I og forbindelse C mod de følgende organismer, der repræsenterer 6 slægter, fremgår af tabel III.

Tabel III

Organisme	Stamme nr.	MIC (μ g/ml)	
		Forbindelse I	Forbindelse C
Staphylococcus aureus	209P	0,39	0,78
Escherichia coli	NIHJ	6,25	1,56
Proteus mirabilis	GN2425	6,25	1,56
Proteus vulgaris	HX19	0,025	0,025
Klebsiella pneumoniae	PCI602	12,5	12,5
Pseudomonas aeruginosa	104	1,56	1,56

Bemærkning: Forbindelse I og forbindelse C underkastes forsøget i form af natriumsalt.

Det fremgår af tabel III, at den antibakterielle aktivitet af forbindelse I er overlegen i forhold til den af forbindelse C mod organismer såsom *Staphylococcus aureus*, men lavere mod organismer såsom *Escherichia coli* og *Proteus mirabilis*.

De gennemsnitlige minimalt inhiberende koncentrationer, som opnås med forbindelse I og forbindelse C mod 60 bakterieisolater fra hospitalspatienter, hvilke isolater repræsenterer to slægter, er angivet i tabel IV, hvoraf det fremgår, at den antibakterielle aktivitet af forbindelse I er overlegen i forhold til den af forbindelse C mod organismer såsom *Staphylococcus aureus* og *Streptococcus faecalis*.

Tabel IV

Organisme	Antal stammer	Gennemsnitlig minimalt inhiberende koncentration (μ g/ml)	
		Forbindelse I	Forbindelse C
<i>Staphylococcus aureus</i>	37	15	60
<i>Streptococcus faecalis</i>	23	2,0	3,8

Bemærkning: Forbindelse I og forbindelse C underkastes forsøget i form af natriumsalt. MIC-Værdien bestemmes under anvendelse af agarpladefortyndingsmetoden.

De relative aktiviteter af forbindelse I og forbindelse C mod adskillige intraperitoneale infektioner hos mus bestemmes ved de minimalt inhiberende koncentrationer, og de gennemsnitlige beskyttende doser (subcutan administration) er angivet i tabel V.

Tabel V

Organisme	Stamme nr.	MIC (μ g/ml)		PD ₅₀ (mg/kg)	
		Forbindelse I	Forbindelse C	Forbindelse I	Forbindelse C
Staphylococcus aureus	A24	0,39	1,56	2,0	32
Streptococcus faecalis	F10	1,56	1,56	1,1	6
Klebsiella pneumoniae	1	6,25	6,25	16	18
Pseudomonas aeruginosa	TS	6,25	3,13	22	15

Bemærkning: Forbindelse I og forbindelse C blev anvendt i form af natriumsalt. Til hvert forsøg blev på hvert dosisniveau anvendt 5 hanmus af ICR-SLC-stammen. MIC-Værdien blev bestemt ved næringsvæskefortyndingsmetoden. Til bestemmelse af PD₅₀-værdien udførtes subcutane behandlinger tre gange, nemlig 1, 3 og 5 timer efter infektionen.

Det fremgår af tabel V, at PD₅₀-værdierne af forbindelse I er væsentligt overlegne sammenlignet med dem af forbindelse C mod organismer såsom Staphylococcus aureus og Streptococcus faecalis og omtrentligt ens mod Klebsiella pneumoniae, men mod Pseudomonas aeruginosa er PD₅₀-værdien af forbindelse I mindre end den af forbindelse C.

De følgende data refererer til de farmakokinetiske profiler af forbindelse I sammenlignet med forbindelse C. De proteinbindende hastigheder i humant serum af forbindelse I og forbindelse C er angivet i tabel VI, hvoraf det fremgår, at forbindelse I har en lavere proteinbindingshastighed end forbindelse C, og den førstnævnte inaktiveres mindre i serum ved administration.

Tabel VI

Forbindelse	Bindings hastighed med humant serum (%)	
	Ultrafiltreringsmetode	Ultracentrifugeringsmetode
I	58	60
C	90	92

Bemærkning: Forbindelse I og forbindelse C blev testet i form af natriumsaltet.

Topserumkoncentrationer af forbindelse I og forbindelse C i mus af ICR-stammen efter subcutan administration af 50 mg/kg er angivet i tabel VII.

Tabel VII

Forbindelse	Serumniveau ($\mu\text{g/ml}$)			
	0,25 time	0,5 time	1 time	2 timer
I	69	35	14	3
C	44	32	8	5

Bemærkning: Forbindelse I og forbindelse C blev testet i form af natriumsaltet. Der blev til testen anvendt tre hanmus af ICR-SLC-stammen. Biostyrkebestemmelsen blev udført i overensstemmelse med "skivemetoden" under anvendelse af *Bacillus subtilis*.

Urinudskillelseshastigheder af forbindelse I og forbindelse C efter intramuskulær administration af 20 mg/kg til hanrotter af Wistar-HLA-stammen er angivet i tabel VIII.

Tabel VIII

Forbindelse	Urinudskillelseshastighed (%)		
	0 - 6 timer	6 - 24 timer	0 - 24 timer
I	54	1,0	55
C	19,5	0,5	20

Bemærkning: Forbindelse I og forbindelse C blev testet i form af natriumsaltet.

Den akutte toxicitet af forbindelse I og forbindelse C i mus af ICR-stammen ved intraperitoneal administration fremgår af tabel IX.

Tabel IX

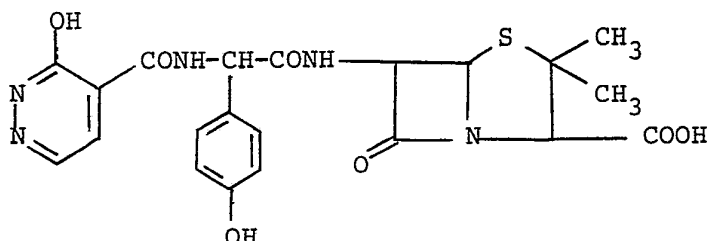
Forbindelse	LD ₅₀ -værdi (mg/kg)
I	7100
C	3100

Bemærkning: Forbindelse I og forbindelse C blev testet i form af natriumsaltet.

Det fremgår af ovenstående resultater, at forbindelse I som chemo-terapeutisk middel har udmærkede egenskaber. Højere serumniveauer og højere urinudskillelseshastighed for forbindelse I giver højere beskyttelse ved behandlingen af mange infektionssygdomme herunder urinvejsinfektioner, som skyldes grampositive og gramnegative bakterier.

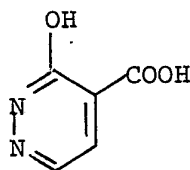
Patentkrav.

Analogifremgangsmåde til fremstilling af 6-[D-2-(3-hydroxypyridazin-4-carbonamido)-2-(p-hydroxyphenyl)acetamido]penicillansyre med form-
len I



eller salte deraf, fortrinsvis ikke-toxiske, farmaceutisk tolerable
salte deraf,
k e n d e t e g n e t ved, at

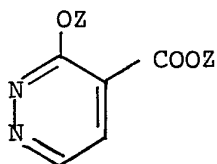
a) forbindelsen med formlen II



II

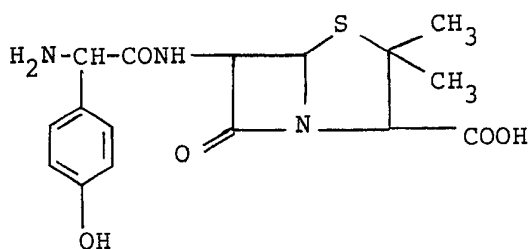
eller et derivat deraf ved carboxygruppen

eller en forbindelse med den almene formel II'



II'

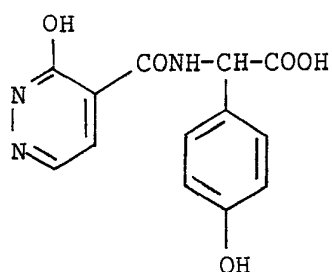
hvor Z betegner acyl eller lavere alkoxy-carbonyl, omsættes med
forbindelsen med formlen III



III

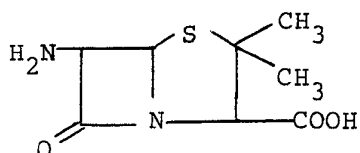
eller et derivat deraf, eller

b) forbindelsen med formlen IV



IV

eller et derivat deraf omsættes med forbindelsen med formlen V



V

eller et derivat deraf, hvorefter en eventuel beskyttelsesgruppe i den dannede forbindelse fraspaltes, og forbindelsen om ønsket omdannes til et salt.

Fremdragne publikationer:
