



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU**
UTLÄGGNINGSSKRIFT 62841

C (45) Patentti myönnetty 10.05.1983
Patentti julkaistiin

(51) Kv.lk.³/Int.Cl.³ C 07 D 501/36

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patenttihakemus — Patentansöknin	752434
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	29.08.75
(23) Aikupäivä — Giltighetsdag	29.08.75
(41) Tullut julkisiksi — Blivt offentlig	04.03.76
(44) Nähtävöispanon ja kuuljulkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utskriften publicerad	30.11.82
(32)(33)(31) Pyydetty suoikeus — Begärd prioritet	03.09.74
27.06.75 USA(US) 502991, 590971	

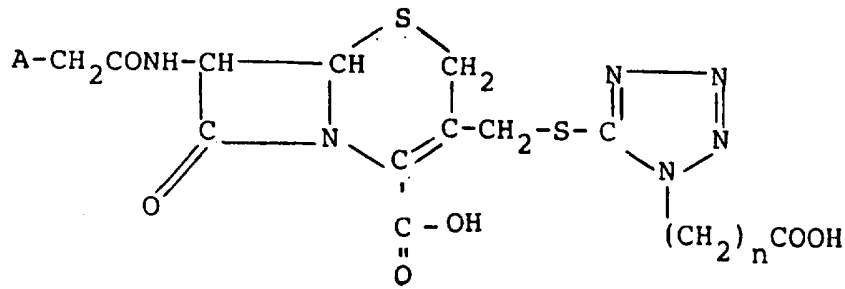
(71) Bristol-Myers Company, 345 Park Avenue, New York, New York 10022,
USA(US)

(72) William Joseph Gottstein, Fayetteville, New York, Murray Arthur Kaplan,
Syracuse, New York, Alphonse Peter Granatek, Baldwinsville, New York,
USA(US)

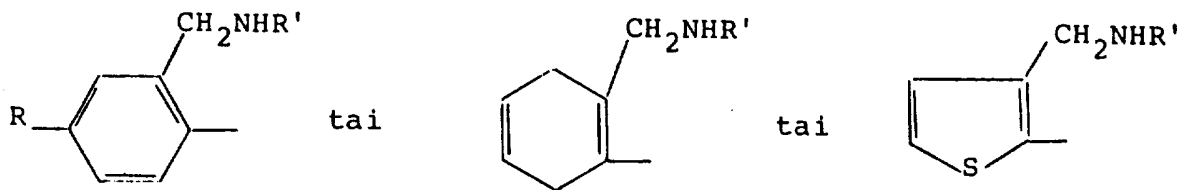
(74) Oy Kolster Ab

(54) Menetelmä terapeuttisesti käytettävien 7-(o-aminometyyli- tai metyyli-aminometyylifenyyli- tai sykloheksadienyyli- tai tienyyliasetamido)-3-/1-karboksimetyyli- (tai -etyyli- tai -propyyli-)-tetratsoli-5-yylitiometyyli/-3-kefem-4-karboksyylihappojen sekä näiden farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi - Förfarande för framställning av terapeutiskt användbara 7-(o-aminometyl- eller metylaminometylfenyl- eller cyklohexadienyl- eller tienylacetamido)-3-/1-karboximetyl- (eller -etyl- eller -propyl-)-tetrazol-5-yliometyl/-3-cefem-4-karboxylsyror samt deras farmaceutiskt gotttagbara salter

Tämän keksinnön kohteena on menetelmä terapeuttisesti käytettävien 7-(o-aminometyyli- tai metyyliaminometyylifenyyli- tai sykloheksadienyyli- tai tienyyliasetamido)-3-/1-karboksimetyyli (tai -etyyli- tai -propyyli-)-tetratsoli-5-yylitiometyyli/-3-kefem-4-karboksyylihappojen valmistamiseksi, joiden kaava on

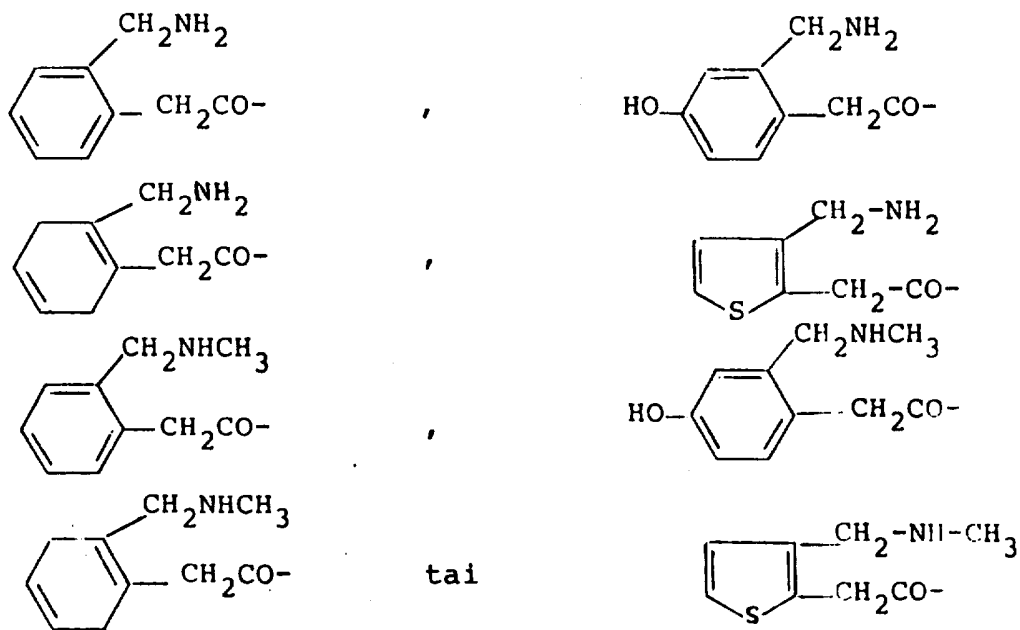


jossa n on 1, 2 tai 3 ja A on ryhmä

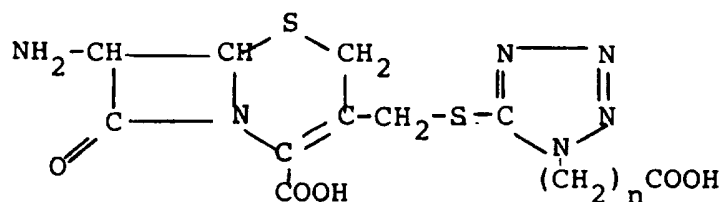


joissa kaavoissa R on vety, hydroksi tai metoksi ja R' on vety tai metyyli, sekä näiden yhdisteiden farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi.

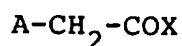
Bisyklisen ytimen stereokemia on sama kuin kefalosporiinissa C. Asyyliiryhmä A-CH₂CO on edullisesti jokin seuraavista ryhmistä:



Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista, että annetaan yhdisteen, jonka kaava on



jossa n merkitsee samaa kuin edellä, tai tämän yhdisteen suolan reagoida kaavan



mukaisen asyloimisaineen kanssa, jossa A merkitsee samaa kuin edellä, ja X on halogenidi tai sen funktionaalinen vastine, ja kun asyyliryhmä sisältää vapaata aminoa tai hydroksyyliä, suojataan mainitut ryhmät tavanomaisilla suojaryhmillä, jotka sitten poistetaan kaavan I mukaisen yhdisteen saamiseksi, ja haluttaessa muutetaan muodostunut kaavan I mukaisen yhdisteen vapaa happo farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi, ja haluttaessa muutetaan muodostunut kaavan I mukaisen yhdisteen suola kaavan I mukaiseksi vapaaksi hapoksi.

Sopivia funktionaalisia vastineita ovat vastaavat happoanhydritit, kuten seka-anhydritit ja erityisesti esim. karboksyylihapon alemman alifaattisen monoesterin tai alkyyli- ja aryyლისulfonihapon tai steerisesti estetyn hapon, kuten difenyylietikkahapon, seka-anhydritit. Erityisen käyttökelpoinen anhydridi on N-karboksianhydridi (kutsutaan myös Leuch'in anhydridiksi; US-patentit 3 080 356 ja 3 206 455). Näihin kuuluvat myös D-mantelihappokarboksianhydridi (US-patentti 3 167 549) tai vastaava substituoitu D-mantelihappokarboksianhydridi. Lisäksi voidaan käyttää happoatsidia tai aktiivista esteriä tai tioesteriä (esim. p-nitrofenyylin, 2,4-dinitrofenolin, tiofenolin tai tioetikkahapon kanssa).

Kun orgaanisessa karboksyylihappossa on funktionaalinen ryhmä, esimerkiksi amino tai hydroksyyli, on usein toivottavaa suojata amino- tai hydroksiryhmä, suorittaa sitten kytkemisreaktio ja lopuksi poistaa kemiallisesti suojaryhmä muodostuneesta yhdisteestä.

Jos yhdisteiden 7-sivuketjussa on substituoitu aminoryhmä on usein toivottavaa ensin valmistaa yhdiste, jossa on substituoi-

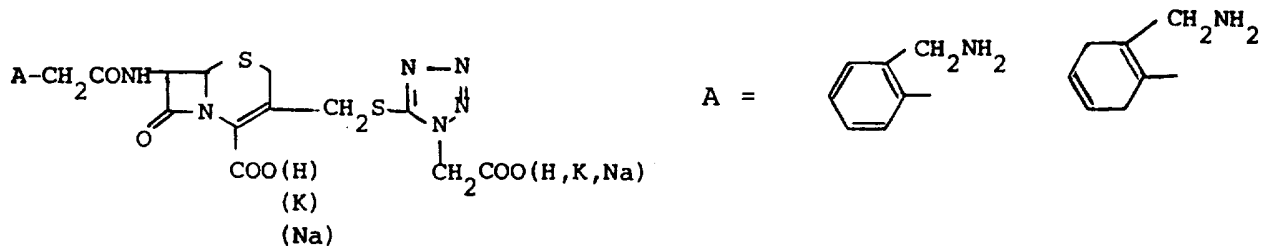
tumaton (vapaa tai primäärinen) aminoryhmä ja antaa sitten tämän yhdisteen reagoida sopivan reagenssin kanssa lopulliseksi tuotteiksi.

Käyttökelpoisia suoloja ovat myrkyttömät karboksyylihapposuolat, esim. natrium-, kalium-, kalsium-, aluminium-, ammonium- ja substituoidut ammoniumsuolat, esim. suolat, joita muodostavat tällaiset myrkyttömät amiinit, kuten trialkyyliamiinit, esimerkiksi trietyyliamiini, prokaiini, dibentsyyliamiini, N-bentsyyli- β -fenetyyliamiini, 1-efenamiini, N,N'-dibentsyylietyleeniamiini, dehydroabietyyliamiini, N,N'-bis-dehydroabietyylietyleenidiamiini, N-etyylipiperidiini ja muut amiinit, jotka muodostavat suoloja bent-syylipenisilliinin kanssa.

Farmakologiset kokeet ja niiden tulokset

Käytettiin tavanomaisia "kliinisiä" mikro-organismeja (ks. Leitner et al., Antimicrob. Agents Chemother. 7:298 - 305, (1975)) ja sovellettiin tavanomaista laimennustekniikkaa (Steers et al., Antibiot. Chemother. 9:307 - 311, (1959)). Määritettiin pienin antibioottipitoisuus, jolla vielä oli mikro-organismin kasvua ehkäisevä vaikutus. Tulokset on esitetty taulukoissa 1 - 4.

Taulukko 1. Bakteerinvastainen teho in vitro; pienin vaikuttava pitoisuus ($\mu\text{g/ml}$)
Tutkittu yhdiste



Mikro-organismi	Laimennus		
Str. pneumoniae	10^{-3}	0,13	0,06
Str. pyogenes	10^{-3}	0,13	0,13
S. aureus Smith	10^{-4}	1	0,5
S. aureus	10^{-4}	4	>0,5
S. aureus BX1633	10^{-3}	1	1,3
S. aureus BX1633	10^{-2}	2	2,5
S. aureus Meth-Res	10^{-3}	4	4
Sal. entéritidis	10^{-4}	0,06	0,16
E. coli Juhl	10^{-4}	0,5	1,3
E. coli	10^{-4}	16	16
K. pneumoniae	10^{-4}	0,13	0,3
K. pneumoniae	10^{-4}	2	2
Pr. mirabilis	10^{-4}	0,13	0,3
Pr. morgani	10^{-4}	32	8
Ps. aeruginosa	10^{-4}	>125	>125
Ent. clocae	10^{-4}	0,25	0,3
Ent. clocae	10^{-4}	32	32

Taulukko 2. Bakteerinvastainen teho in vitro gram-negatiivisia mikro-organismeja vastaan; pienin vaikuttava pitoisuus ($\mu\text{g/ml}$).

Mikro- organismi	Uusi yhdiste x)	Kefalotiini	Kefaloridiini	Kefatsoliini
Edwardsiella tarda	0,13	1	1	0,71
Arizona hinshawii	0,13	2,8	2	1
Citrobacter sp.	1	63	>125	75
Citrobacter sp.	125	>125	>125	>125
Serratia marcescens	>125	>125	>125	>125
Ervinia sp.	0,66	5,3	2	1,5
Vibrio choierae	4	1	16	4
Pasteurella multocida	0,25	0,09	0,5	0,5
Pseudomonas deruginosa	>125	>125	>125	>125
Alcaligenes sp.	2,6	1,3	6,1	4,6
Alcaligenes sp.	63	>125	>125	>125
Alcaligenes sp.	>125	>105	>125	>105
Bordetella bronchiseptica	125	8	32	125
Bacteroides fragilis	100	125	79	50

x) 7-[α -(2-aminometyylifenyyli)asetamido]-3-[(1-karboksimetyyli-tetratsoli-5-yyli)metyyli]-3-kefem-4-karboksylihappo.

Taulukko 3. Pienin vaikuttava pitoisuus (MIC) ja pienimmät bakteripitoisuudet (MBC) eri Enterobacteriaceae-mikro-organismeja käytettäessä (10^4 solua).

Mikro- organismi	Uusi yhdiste x)		Kefalotiini		Kefaloridiini		Kefatsoliini	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Escherichia coli-	0,5	0,5	8	16	4	4	2	2
kantoja	0,25	0,5	4	8	2	2	2	2
	0,5	0,5	8	16	4	4	1	2
	1	1	16	16	4	4	2	2
	1	1	16	16	4	8	2	4
	16	16	32	32	16	16	8	16

Taulukko 3. jatkuu

Mikro- organismi	Uusi yhdiste x)		Kefalotiini		Kefaloridiini		Kefatsoliini	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Klebsiella	0,25	0,25	2	2	2	4	2	2
pneumoniae-	0,25	0,25	4	8	4	4	1	2
kantoja	0,25	0,25	2	4	2	2	1	2
	0,5	0,5	4	4	4	4	2	4
	0,5	0,5	8	8	8	8	2	2
	0,5	1	2	2	2	2	2	4
Enterobacter	4	8	32	63	16	16	4	8
cloacae-	8	63	250	>250	>250	>250	250	>250
kantoja	63	63	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Enterobacter	2	2	125	250	>250	>250	32	125
aerogenes-	2	2	125	>250	250	>250	63	>250
kantoja	8	16	250	>250	250	250	63	250
Proteus	0,5	1	8	32	8	16	4	8
mirabilis-	0,5	0,5	8	32	8	8	8	16
kantoja	0,5	0,5	8	8	8	8	8	8
	0,25	0,5	4	8	8	8	4	8
	0,5	0,5	8	16	4	8	8	8
Proteus	0,5	1	1	2	8	8	4	4
vulgaris-	0,5	1	8	16	8	16	8	16
kantoja	0,5	0,5	8	16	8	16	8	16
Proteus	0,063	0,13	1	2	0,5	0,5	0,25	0,5
rettgeri-								
kantoja	0,25	63	125	250	32	>250	4	>250

x) 7- α -(2-aminometyylifenylyli)asetamido-3- β -(1-karboksimetyyli-tetratsol-5-yyli)-metyyli-3-kefem-4-karboksylihappo.

Taulukko 4. Pienin vaikuttava pitoisuus ($\mu\text{g/ml}$) eri Enterobacteriaceae-mikro-organismeja käytettäessä.

Mikro-organismi	Uusi yhdiste x)	Uusi yhdiste xx)	Kefamandoli
D. pneumoniae	0,08	0,16	0,08
S. pyogenes	0,08	0,16	0,08
S. aureus Smith	3,1	3,1	0,8
S. aureus	3,1	>3,1	1,6
S. aureus BX-1633	6,3	3,1	1,6
S. enteritidis	0,2	0,2	0,4
E. coli NTHU	0,8	0,8	1,6
E. coli Juhl	0,8	0,8	0,8
E. coli-kanta	12,5	6,3	3,1
K. pneumoniae	0,2	0,2	0,8
K. pneumoniae-kanta	1,6	1,6	6,3
P. mirabilis	0,4	0,4	0,8
P. morgani	12,5	6,3	3,1
P. aeruginosa	>100	>100	>100
S. marcescens	>100	>100	>100
E. cloacae	50	50	50

x) 7-(3-N-metyyliaminometyyli-2-tienyyliasetamido)-3-(1-karboksi-metyylitetratsol-5-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappo

xx) 7-(2-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(1-karboksimetyylitetratsol-5-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappo.

Tuloksista ilmenee, että keksinnön mukaisesti valmistetut yhdisteet ovat hyvin aktiivisia, ja niillä on erikoisen laaja vaikutusalue, vaikuttaen myös gram-negatiivisiin bakteereihin. Vertailuaineilla ei ollut lainkaan tai hyvin vähäistä vaikutusta esimerkiksi Enterobacter-, Citrobacter- ja määrättyjä Proteus-mikro-organismeja vastaan.

Annettaessa uusia yhdisteitä lihakseen (koe-eläimenä infektioitu hiiri) saavutettiin korkea veren antibioottipitoisuus, ja uusien yhdisteiden biologinen puoliintumisaika oli parempi kuin tunnetuilla kefalosporiineilla ks. taulukko 5.

Taulukko 5. Vaikutus infektoituun hiireen; anto 1 tunti ja 3,5 tuntia infektoimisen jälkeen. Vaikuttava määrä ED₅₀ [mg/kg].

Mikro- organismi	Solujen lukumäärä	Uusi yh- diste x)	Kefalo- tiini	Kefalori- tiini	Kefatso- liini
Eschericia coli- kantoja	2x10 ⁵ 6x10 ⁵ -4x10 ⁶ 7x10 ³ -2x10 ⁴	0,37 1,5 2,2	42 97 180	2,6 2,2 13	1,9 4,9 5,3
Klebsiella pneumoniae	4x10 ⁴ -5x10 ⁴ 9x10 ² -1x10 ³	2 22	94 >380	8 41	16 94
Proteus mirabilis- kantoja	7x10 ⁴ -9x10 ⁴ 9x10 ⁵ -3x10 ⁴ 6x10 ⁵ -4x10 ⁴	1,4 0,62 0,59	41 11 14	19 4 5,5	16 6,2 6,5
Proteus vulgaris- kantoja	1x10 ⁴ -2x10 ⁴ 4x10 ³	1,8 2,5	11 17	6,4 10	11 8
Proteus morgani- kantoja	1x10 ³ -4x10 ³ 2x10 ⁴ -3x10 ⁴	19 39	>350 >400	180 230	62 140
Proteus rettgeri	2x10 ⁶ -3x10 ⁶	2,4	140	66	9,5
Citrobacter sp.	5x10 ⁶ -2x10 ⁷	3,5	>340	36	110
Providencia stuartii- kantoja	1x10 ⁶ -5x10 ⁶ 2x10 ⁷	5,9 8	>380 160	180 150	50 70
Enterobacter cloacae- kantoja	2x10 ³ -4x10 ³ 2x10 ⁶ -3x10 ⁶ 4x10 ⁴ -3x10 ⁵	1,9 8,6 13	>400 >400 >400	200 >400 >400	170 >400 >370

x) 7-[α -(2-aminometyylifenyyli)asetamido]-3-(1-karboksi-metyylitetrasol-5-yyllitio)-metyyli]-3-kefem-4-karboksyylis-happo.

Hoidettaessa ihmisen bakteeritulehduksia, tämän keksinnön mukaisesti valmistettuja yhdisteitä annetaan ruoansulatuskanavan ulkopuolitse tai suun kautta n. 5 - 200 mg/kg/vrk ja mieluiten n. 5 - 20 mg/kg/vrk osa-annoksina, so. 3 tai 4 kertaa vuorokaudessa. Yksittäisannokset sisältävät esim. 125, 250 tai 500 mg tehoainetta. Annosyksiköt ovat nestevalmisteina, esim. liuoksina tai suspensioina.

Lähtöaineiden valmistus on selitetty hakemuksessa 802984.

Muut reagenssit syntetisoidaan joko ko. alalla kuvatulla tavalla (ks. e.m. patentteja ja julkaisuja) tai täysin analogisin menetelmin. Esim. D(-)- α -aminohappo valmistetaan menetelmin, joita on kuvattu US-patenteissa 3 198 804, 3 342 677 ja 3 634 418, tai Friis et al., Acta Chem. Scand., 17, 2391 - 2396 (1966) tai Neims et al., Biochemistry (Wash), 5, 203 - 213 (1966) tai muissa tämän alan julkaisuissa, Seuraavassa on muutamia erityisesimerkkejä tällaisten karboksyylihapojen valmistamiseksi, jotka sisältävät tert.-butoksykarbonyylillä "suojatun" vapaan aminoryhmän.

2-(tert.-butoksykarbonyyliaminometyyli)-1,4-sykloheksadienyylieetikahappo.

Liuosta, jossa on 16,5 g (0,1 moolia) o-aminometyyli-fenyylieetikahappoa 1,5 l:ssa nestemäistä ammoniakkia (jota on käsitelty 50 mg:lla litiumia jäännöskosteuden poistamiseksi) lisätään hitaasti 500 ml kuivaa tert.-butanolia. Liuokseen lisätään pieninä annoksina 3,4 g (0,5 moolia) litiumia 4 tunnin aikana, seosta sekoitetaan 16 tuntia huoneen lämpötilassa, nestemäinen ammoniakki poistetaan vetokaapissa ja seos haihdutetaan kuiviin alle 40°C:ssa. Jäännös liuotetaan 500 ml:aan vettä, liuos kromatografoidaan hartsikolonissa IR-120 (H⁺, 700 ml) ja eluoidaan 1-% ammoniumhydroksidiliuoksella. Eluaatin ninhydriiniposiitiiviset jakeet yhdistetään ja haihdutetaan kuiviin. Jäännöstä pestään 4:llä 50 ml:n annoksella kuumaa asetonia ja kiteytetään uudelleen 50 ml:sta etanoli-vettä (1:1), jolloin saadaan 11,2 g (67 %) o-(2-aminometyyli-1,4-sykloheksadienyylieetikahappoa värittöminä neulasina, sp. 183°C.

IR: $\nu_{\text{maks.}}$ 1630, 1520, 1380, 1356 cm^{-1}

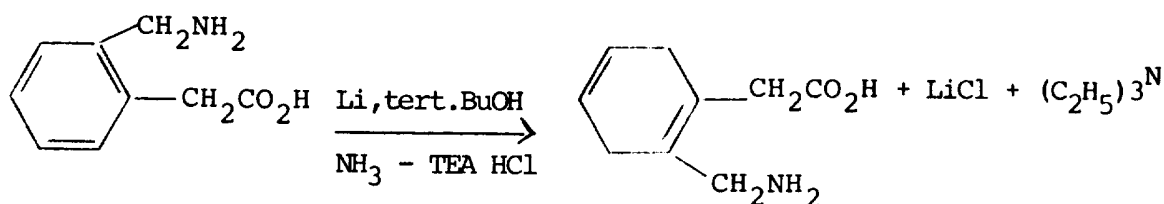
NMR: $\delta_{\text{D}_2\text{O} + \text{K}_2\text{CO}_3}$ 2,72 (4H, s, $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$), 3,01 (2H, s, CH_2CO),
3,20 (2H, s, $\text{CH}_2\text{-N}$), 5,78 (2H, s, $\text{H}-\text{C}=\text{C}$).

Analyysi $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_2$

Laskettu: C 64,65 H 7,84 N 8,38

Saatu: C 64,77 H 8,06 N 8,44

o-(2-aminometyyli-1,4-sykloheksadienyyl)-etikkahappo

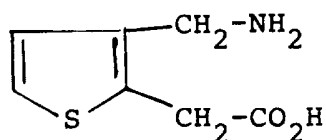


Käytetään menetelmää, jota ovat käyttäneet Welch, Dolfini ja Giarrusso yhdysvaltalaisessa patentissa 3 720 665 (esimerkki 1) D-2-amino-2-(1,4-sykloheksadienyyl)-etikkahappo valmistamiseksi. Liuosta, jossa on 830 ml tislattua nestemäistä ammoniakkia kuivataan 40 mg:lla litiumia argonsuojakaasussa. Tähän sekoitettuun liuokseen lisätään 11,0 g (0,07 moolia) 2-aminometyylifenyylietikkahappoa ja 340 ml tert.-butyylialkoholia. Voimakkaasti sekoitettuun liuokseen lisätään 2 tunnin aikana kaikkiaan 1,6 g (0,225 moolia) litiumia. Sitten vihreää liuosta käsitellään 35 g:lla (0,215 moolia) ja trietyyliamiinihydrokloridia ja sekoitetaan yli yön 18 tuntia huoneenlämpötilassa. Tert.-butyylialkoholi poistetaan 40°C :ssa (15 mm Hg) ja saadaan valkoinen jäännös, joka kuivataan yli yön vakuumissa fosforipentoksidilla. Kiintoainne liuotetaan 30 ml:aan metanoli-vettä 1:1 ja lisätään sekoittaen 5°C :ssa 3,5 litraan kloroformi-asetonia (1:1). Seosta sekoitetaan 20 minuuttia ja muodostunut (2-aminometyyli-1,4-sykloheksadienyyl)-etikkahappo eristetään ja kuivataan 16 tuntia vakuumissa fosforipentoksidilla, jolloin saadaan 6,3 g (58 %) valkoisia kiteitä, sp. 190°C (hajoaa).

Liuosta, jossa on 19,31 g (0,135 moolia) tert.-butoksikarbonyyliatsidia 152 ml:ssa tetrahydrofuraania lisätään sekoitettuun

liuokseen, jossa on 14,89 g (0,09 moolia) 2-aminometyyli-1,4-sykloheksadienylylietikkahappoa ja 7,20 g (0,18 moolia) natriumhydroksidia 281 ml:ssa vettä. Liuosta sekoitetaan 18 tuntia 25°C:ssa ja suodatetaan piimaan läpi (Supercel). Tetrahydrofuraani poistetaan 40°C:ssa (15 mm Hg), jäljelle jäävää liuosta pestään eetterillä (2 x 175 ml) ja hapotetaan 6-n kloorivetyhapolla. Seosta sekoitetaan jäähauteessa, sakka eristetään ja kuivataan 18 tuntia vakuu-
missa fosforipentoksidin päällä 25°C:ssa, jolloin saadaan 17,3 g (72,6 %) 2-(tert.-butoksikarbonyyliaminometyyli)-1,4-sykloheksadienylylietikkahappoa valkoisena jauheena.

3-aminometyyli-2-tiofeenietikkahappo



A) Tiofeeni-3-karboksaldehydidimetyyliasettaali

Seosta, jossa on 322 g (1,9 moolia) tiofeeni-3-karboksaldehydiä (S. Gronowitz, Arkev, kemi., 8, 411 (1955)), 636 g (6 moolia) trimetoksimetaania ja 6 g IR-120-hartsia (H⁺-muoto) 200 ml:ssa metanolia, kuumennetaan pystyjäähdyttären 4 tuntia. Hartsi poistetaan ja suodos haihdutetaan vakuu-
missa ja saadaan väritön öljy, joka tislataan vakuu-
missa. Saanto 423 g (94 %), kp. 90 - 95°C/13 mm Hg.

IR: $\gamma_{\text{maks.}}^{\text{neste}}$ 3150, 1045, 1025 cm⁻¹

NMR: δ puhtas 3,21 (6H, s, OCH₃), 5,43 (1H, s, OH) (7,0 - 7,4 3H, m, tiefeeni-H)

B) 2-formyylitiofeeni-3-karboksaldehydidimetyyliasettaali

Sekoitettuun liuokseen, jossa on 423 g (2,68 moolia) kohdan A mukaista yhdistettä litrassa vedetöntä eetteriä, lisätään tiputtaen tunnin aikana 27 moolia vasta valmistettua n-butyylilitiumliuosta eetterissä ja kuumennetaan lievästi pystyjäähdyttären kuivassa typpisuo-
jassa. Pystyjäähdytystä jatketaan puoli tuntia ja seokseen lisätään 3/4 tunnin aikana voimakkaasti sekoittaen ja tiputtaen liuos, jossa on 432 g (6 moolia) dimetyyliformamidia 0,9 litrassa eetteriä. Lisäyksen päätyttyä seosta sekoitetaan yli yön, kaadetaan sekoittaen 1 kg:aan jäämurskaa ja lämpötilan annetaan kohota huoneen lämpötilaan. Orgaaninen kerros eristetään, vesikerros kyllästetään natriumkloridilla ja uutetaan perusteellisesti kahdesti 200 ml:n annoksilla eetteriä. Eetteriuutteet yhdistetään, kuivataan magnesiumsulfaatilla ja konsentroidaan. Jäännös tislataan

vakuumissa ja saadaan 377 g (56 %) vaaleankeltaista öljyä 100-125°C:ssa/0,7 mm Hg.

IR: γ _{neste maks.} 3110, 1660, 1100 cm⁻¹

NMR: δ _{ppm} ^{puhdas} 3,40 (6H, s, OCH₃), 5,96 (1H, s, CH $\begin{matrix} \text{O}^- \\ \diagdown \\ \text{CH} \\ \diagup \\ \text{O}^- \end{matrix}$),
1,27 (1H, d, J = 6 Hz, tiofeeni-H₃), 1,81 (1H, d-d, J = 6 Hz, tiofeeni-H₂). 10,34 (1H, d, J = 1,5 Hz, -CHO).

C) 1-metyylisulfinyyli-1-metyylitio-2-(3-karboksaldehydi)-etyleni.

Tämä yhdiste valmistetaan menetelmän avulla, jollaista ovat kuvanneet N. Ogura et al 4., Tetrahedron Letters, 1383 (1972)). Lisätään 2 ml Triton C:tä (40-% metanoli) 5 ml:ssa tetrahydrofuuraania liuokseen, jossa on 2,5 g (20 moolia) metyyli-metyylitio-metyylisulfoksidia 2., K. Ogura et.al., Bull Chem. Soc. (Japani), 45, 2203 (1972)) ja 2-formyyli-3-tiofeenikarboksaldehydietyleeniasetaalia 3., D.W. McDowell et al., J. Org. Chem. 31, 3592 (1966)). Seosta kuumennetaan pystyjäähdyttään n. tunti ja konsentroidaan vakuumissa. Jäännös liuotetaan 150 ml:aan bentseeniä ja uutetaan kolmasti 20 ml:n annoksilla vettä. Orgaaninen kerros kuivataan magnesiumsulfaatilla ja haihdutetaan kuiviin vakuumissa. Jäännös liuotetaan 150 ml:aan bentseeniä ja uutetaan kolmasti 20 ml:n annoksilla vettä. Orgaaninen kerros kuivataan magnesiumsulfaatilla ja haihdutetaan kuiviin vakuumissa. Jäännös kolonnikromatografoidaan 80 g:lla silikageelia ja eluoidaan ensin 500 ml:lla bentseeniä ja sitten 100 ml:lla kloroformia. Kloroformieluaatista eristetään 4,9 g (85 %) otsikon tuotetta vaaleankeltaisena öljynä.

IR: γ _{neste maks.} 3110, 1600 cm⁻¹

NMR: δ _{ppm} ^{CDCl₃} 2,42 (3H, X, S-CH₃), 2,78 (3H, s, SO-CH₃), 4,15 (4H, m, CH₂CH₂-), 6,12 (1H, s, OH $\begin{matrix} \text{O}^- \\ \diagdown \\ \text{OH} \\ \diagup \\ \text{O}^- \end{matrix}$), 7,34 (1H, J = 4,5 Hz tiofeeni-H_β), 7,40 (1H, d, J = 4,5 Hz, $\begin{matrix} \text{O}^- \\ \diagdown \\ \text{tiofeeni-H} \\ \diagup \\ \text{O}^- \end{matrix}$) ja 8,28 (1H, s, -CH=).

Kohdan C mukaisen yhdisteen semikarbatsoni valmistetaan tavalliseen tapaan ja kiteytetään etanoli-dimetyyliformamidista, sp. 212-213°C.

Analyysi C₁₀H₁₃N₃O₂S₂

Laskettu: C 39,58 H 4,32 N 13,85 S 31,70

Saatu: C 39,46 H 4,24 N 14,05 S 31,63

D) 1-metyylisulfinyyli-1-metyylitio-2-(3-karboksaldehydi-metyyliasettaali-2-tienyyli)-etylenei.

Tämä yhdiste valmistetaan samalla tavoin kuin kohdan C mukainen yhdiste. Lisätään 50 ml Triton B:tä (40 % metanolissa) liuokseen, jossa on 72 g (0,58 moolia) metyylimetyylitio-metyylisulfoksidia ja 108 g (0,58 moolia) kohdan B mukaista yhdistettä 300 ml:ssa tetrahydrofuraania ja seosta pystyjäähdytetään 4 tuntia. Erotetaan kolonnikromatografoimalla 400 g:lla silikageeliä ja eluoidaan 5 litralla kloroformia, jolloin saadaan 130,5 g (78 %) otsikon yhdistettä vaaleankeltaisena öljynä.

IR: γ _{neste maks.} 3100, 1580, 1100, 1050 cm^{-1}

NMR: δ ^{CCl₄} 2,42 (3H, s, S-CH₃), 2,70 (H, s, SO-CH₃), 3,34 (6H, s, OCH₃), ^{ppm} 5,56 (1H, s, CH $\begin{matrix} \text{O}^- \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{O}^- \end{matrix}$), 7,20, (1H, d, J = 6 Hz, tiefeeni-H β), 7,40 (1H, d, J = 6 Hz, tiefeeni-H) ja 8,12 (1H, s, -OH=).

E) Etyyli-3-formyyli-2-tienyyliasettaatti

Absorboidaan 33 g kuivaa vetykloridia 500 ml:aan vedetöntä etanolia. Tähän liuokseen lisätään 130 g (0,45 moolia) kohdan D mukaista yhdistettä ja seosta kuumennetaan pystyjäähdyttären 5 minuuttia. Reaktioseosta laimennetaan vedellä ja haihdutetaan vakuumissa. Jäännöstä uutetaan kahdesti 100 ml:n annoksilla bentseeniä, bentseeniuutteet yhdistetään, pestään 50 ml:lla vettä, kuivataan magnesiumsulfaatilla ja haihdutetaan kuiviin. Öljymäinen jäännös kolonnikromatografoidaan 400 g:lla silikageeliä ja eluoidaan 5 litralla kloroformia. Haluttua tuotetta sisältävät jakeet yhdistetään ja konsentroidaan. Tislataan vakuumissa 60 g jäljelle jäävää öljyä, jolloin saadaan 23 g (23 %) otsikon yhdistettä, kp. 120-126°C/1 mm Hg.

IR: γ _{neste maks.} 3110, 1730, 1670 cm^{-1}

NMR: δ ^{CDCl₃} 1,30 (3H, t, J = 6 Hz, -CH₂CH₃), 4,25 (2H, q, J = 6 Hz, -CH₂CH₃), 4,26 (2H, s, -CH₂CO), 7,25 (1H, d, J = 5 Hz, tiefeeni-H β), 7,48 (1H, d, J = 5 Hz, tiefeeni-H α), 10,15 (1H, s, CHO).

F) Etyyli-3-formyyli-2-tienyyliasetattioksoksiimi

Lisätään sekoittaen 1,7 g 5°C:ssa (16 mmoolia) natriumkarbonaattia liuokseen, jossa on 3,14 g (16 mmoolia) aldehydiä ja 2,2 g (32 moolia) hydroksyyliamiinihydrokloridia 40 ml:ssa 50-% etanolivesiliuosta. Reaktioseosta lämmitetään huoneenlämpötilaan. 2 1/2 tunnin kuluttua reaktioseos konsentroidaan vakuuissa. Jäännöstä uutetaan kolmasti 50 ml:n annoksilla bentseeniä. Bentseeniuutteita pestään 10 ml:lla vettä, kuivataan magnesiumsulfaatilla ja haihdutetaan vakuuissa. Erotetaan kolonnikromatografoimalla 60 g:lla silikageeliä ja saadaan 2,7 g (80 %) väritöntä öljyä.

IR: γ ^{neste} maks. 3400, 1730, 1620 cm^{-1}

NMR: δ ^{asetoni-d} ppm 1,23 (3H, t, J = 7,5 Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4,01 (2H, s, $-\text{CH}_2\text{CO}$), 4,14 (2H, q, J = 7,5 Hz, OH_2CH_3), 7,31 (2H, s, tiofeeni-H), 8,26 (8,26 (1H, s, $-\text{CH-N}$), 10,15 (1H, s, NOH, häviää lisättäessä D_2O :ta).

G) 3-aminometyyli-2-tienyylietikkahapon β -laktaami

Menetelmä A. Katalyyttinen pelkistys

Seosta, jossa on 2,65 g (12,4 mmoolia) kohdan F mukaista oksoimia, 10-% palladiumpuuhiiltä ja 1,4 g (37,2 mmoolia) kuivaa kloorivetyä 69 ml:ssä vedetöntä etanolia hydrataan yli yön normaali-paineessa ja huoneenlämpötilassa. Katalyytti vaihdetaan kahdesti ja reaktion annetaan jatkua kolme vuorokautta. Katalyytti poistetaan ja suodos konsentroidaan vakuuissa. Jäännökseen lisätään 10 ml vettä ja seosta pestään kahdesti 10 ml:n annoksilla etyyliasetattia. Vesikerroksen pH säädetään arvoon 9 natriumkarbonaatilla, kyllästetään natriumkloridilla ja uutetaan kolmasti 20 ml:n annoksilla etyyliasetattia. Etyyliasetattiuutteet kuivataan magnesiumsulfaatilla, käsitellään puuhiilellä ja haihdutetaan vakuuissa. Kiteyttämällä uudelleen etyyliasetaatista saadaan 417 mg (22 %) otsikon laktaamia värittöminä neulasina, sp. 194 - 195°C.

IR: γ ^{KBr} maks. 3200, 1650, 1480 cm^{-1}

NMR: δ ^{DMSO-d} ppm 3,53 (2H, t, J = 3 Hz, $-\text{CR}_2\text{CO}-$), 4,36 (2H, d-7, J = 3, 1,5 Hz, muuttuu tripletiksi lisättäessä D_2O :ta, J = 3 Hz, CH_2N), 6,95 (1H, d, J = 4,5 Hz, tiofeeni-H β), 7,45

(1H, d, J = 4,5 Hz, tiofeeni-H α), 8,0 (1H, m, häviää lisättäessä D₂O:ta, NH).

Analyysi C₇H₇NOS

Laskettu: C 54,88 H 4,61 N 9,14 S 20,93

Saatu: C 55,04 H 4,45 N 9,13 S 20,50

Menetelmä B. Sinkkipölypelkistys

Liuokseen, jossa on 18,3 g (86 mmoolia) kohdan F mukaista oksiimia 200 ml:ssa etikkahappoa lisätään annoksittain tunnin aikana voimakkaasti sekoittaen 40-50°C:ssa 17 g (258 mmoolia) sinkkipölyä. Reaktioseosta sekoitetaan yli yön huoneenlämpötilassa ja kuumennetaan 4 tuntia 60°C:ssa. Suodatetaan ja suodos konsentroidaan vakuuissa. Jäljelle jäävään öljyyn lisätään 100 ml vettä ja seosta pestään kahdesti 50 ml:n annoksilla eetteriä. Vesikerrokselle kaadetaan 100 ml etyyliasetaattia ja pH säädetään arvoon 10 natriumkarbonaatilla. Sakka eristetään suodattamalla. Suodosta uutetaan etyyliasetaatilla. Etyyliasetaattiuutteita pestään 10 ml:lla vettä, kuivataan magnesiumsulfaatilla ja haihdutetaan vakuuissa. Kiinteää jäännöstä hierretään bentseenissä. Kiteyttämällä etyyliasetaatista saadaan 2,7 g (21 %) otsikon laktaamia, joka IR- ja NMR-spektrien mukaan oli sama kuin menetelmän A mukaan saatu tuote.

H. 3-aminometyyli-2-tienyylietikkahappo

Seosta, jossa on 2,88 g (18,8 mmoolia) kohdan G mukaista laktaamia ja 50 ml kloorivetyhappoa kuumennetaan pystyjäähdyttään 3 tuntia. Reaktioseos konsentroidaan vakuuissa. Jäännökseen lisätään 20 ml vettä, seosta käsitellään puuhilellä ja haihdutetaan vakuuissa. Hiertämällä jäännöstä tetrahydrofuraanissa saadaan 3,72 g (95 %) otsikon aminohappohydrokloridia, sp. 171-172°C.

IR: ν ^{KBr} 3450, 3000, 1700, 1200 cm⁻¹

NMR: δ ^{D₂O} 4,80 (2H, s, -CH₂CO), 4,27 (2H, s, CH₂-N), 7,26 (1H, d, J = 6 Hz, tiefeeni-H β), 7,53 (1H, d, J = 6 Hz, tiofeeni-H α).

Liuotetaan 3,71 g (17,9 mmoolia) hydrokloridia 10 ml:aan vettä, kromatografoidaan kolonnissa, jossa on 30 ml IR-120 (H⁺-muoto) ja eluoidaan ensin 100 ml:lla vettä ja sitten 2 litralla 5-n ammoniumhydroksidia. Ammoniakkieluaatti haihdutetaan kuiviin. Jäännös kiteytetään asetonivedestä ja saadaan 3,0 g (98 %) yhdistettä 8, sp. 223-225°C.

62841

IR: γ KBr maks. 3000, 1620, 1520 cm^{-1}

NMR: δ $\text{D}_2\text{O}-\text{Na}_2\text{CO}_3$ 3,20 (sH, s $-\text{CH}_2\text{OC}$), 4,13 (2H, s, CH_2N), 7,04 (1H, d, $J = 6$ Hz, tiofeeni $-\text{H}/\beta$), 7,30 (1H, d, $H = 6$ Hz, tiofeeni- $\text{H}\alpha$).

Analyysi $\text{C}_7\text{H}_9\text{NO}_2\text{S}$

Laskettu: C 49,10 H 5,30 N 8,18 S 18,73

Saatu: C 48,53 H 5,22 N 7,98 S 18,97

I. 3-tert.-butoksikarbonyyliaminometyyli-2-tioenylyietikka-happo

Seokseen, jossa on 3,1 g (18 mmoolia) o-aminometyyli-2-tienylyietikkahappoa ja 8 g (80 mmoolia) trietyyliamiinia 80 ml:ssa 50-% asetonivettä lisätään tiputtaen ja voimakkaasti sekoittaen 20 minuutin aikana 0°C :ssa 5,7 g (40 mmoolia) tert.-butoksikarbonyyliatsidia. Reaktioseosta sekoitetaan yli yön huoneenlämpötilassa ja konsentroidaan vakuuissa. Konsentraattia pestään kahdesti 20 ml:n annoksilla eetteriä, pH säädetään arvoon 2 konsentroidulla kloorivetyhapolla ja uutetaan kahdesti 50 ml:n annoksilla etyyliasettaattia. Etyyliasetattiutteita pestään kyllästetyllä natriumkloridivesiliuoksella, kuivataan magnesiumsulfaatilla ja haihdutetaan vakuuissa. Jäännöstä hierretään n-heksaanissa ja kiteytetään n-heksaanista ja bentseenistä, jolloin saadaan 4,5 g (92 %) otsikon yhdistettä värittömänä neulasina, sp. $62-63^\circ\text{C}$.

IR: γ nujoli maks. 3350, 1700 cm^{-1}

NMR: δ CDCl_3 ppm 1,43 (9H, s, BOC- H), 3,27 (2H, s, CH_2CO), 4,16 (2H, d, $J = 6$ Hz, CH_2-N , lisättäessä D_2O :ta singletti, 5,00 (1H, leveä, $-\text{NH}-$, häviää lisättäessä D_2O :ta), 6,30 (1H, leveä s, $-\text{COOH}$, häviää lisättäessä D_2O :ta), 6,86 (1H, d, $J = 6$ Hz, tiofeeni- H/β), 7,06 (1H, d, $J = 6$ Hz, tiofeeni- $\text{H}\alpha$).

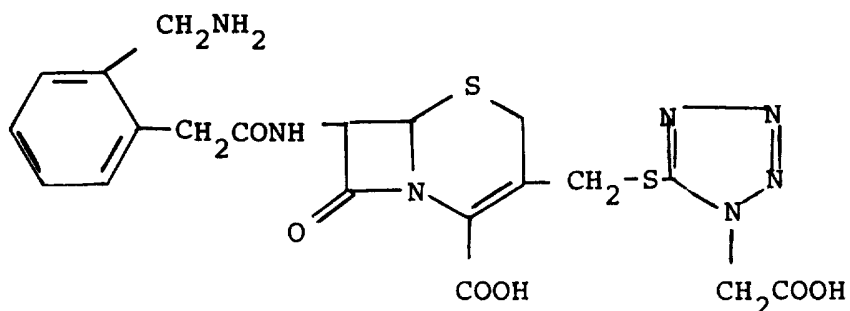
Analyysi $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_4\text{S}$

Laskettu: C 52,89 H 6,29 N 5,14 S 11,77

Saatu: C 53,30 H 6,39 N 5,13 S 11,72

Esimerkki 1

7-(2-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(1-karboksimetyyli-tetratsol-5-yyli-tiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappo



1. Kolmikaulakolviin, jossa on 100 ml ionivaihdettua vettä ja joka on varustettu sekoittimella ja lämpömittarilla lisätään 7,6 g (0,021 moolia) 7-amino-3-(1-karboksimetyyli-tetratsol-5-yyli-tiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappoa ja 3,4 g (0,034 moolia) N-metyylimorfoliinia. Jäähdytetään 0°C:seen. Sekoittaen liuos pidetään 0°C:ssa jäähauteen avulla.

2. Lisätään erilliseen, sekoittimella varustettuun kolviin 9,6 g (0,03 moolia) natrium-2-(1-metoksykarbonyyli-1-propen-2-yyliaminometyyli)-fenyyliasetaattia ja 184 ml tetrahydrofuraania. Sekoittaen suspensio jäähdytetään -30°C:seen kuiva-jää-asetoni-hauteen avulla. Sekoitusta jatkaen lämpötilassa -30°C lisätään 20 tippaa dimetyyllibentsyyliamiinia ja 4,4 g (0,03 moolia) isobutyrylikloroformaattia. Muodostunutta seosta sekoitetaan 5 minuuttia.

3. Lisätään vaiheessa 2 muodostunut seos kerralla vaiheen 1 sekoitettuun liuokseen. Muodostunutta liuosta sekoitetaan tunti 3°C:ssa.

4. Tetrahydrofuraani haihdutetaan reaktioseoksesta 30°C:ssa vakuuissa (15 mm Hg).

5. Jäljelle jäävän vesiliuoksen pH säädetään arvoon 4,0 väkevällä kloorivetyhapolla.

6. Liuokseen lisätään 2,5 g puuhiiltä (Darco G-60) ja sekoitetaan 20 minuuttia. Hiili poistetaan suodattamalla.

7. Suodokselle kaadetaan 120 ml etyyliasettaattia ja sekoittaen alennetaan pH arvoon 3,8 väkevällä kloorivetyhapolla. Muodostuu pieni määrä vaaleata sakkaa, joka poistetaan suodattamalla (säästetään jälkikäsitteilyä ja talteenottoa varten).

8. Suodos jäädytetään jäähauteessa 5°C:seen ja sekoittaen alennetaan pH arvoon 2,5-2,8 väkevällä kloorivetyhapolla. Lämpötilassa 5°C jatketaan sekoitusta tunti.

9. Tuote eristetään suodattamalla. Suodoskakkua pestään 5 ml:lla kylmää ionivaihdettua vettä ja 5 ml:lla kylmää metanolia.

10. Kiteinen 7-(2-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(1-karboksimetyylitetratsol-5-yyliometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappo ilmakeivataan vakio-painoon, 4,1 g.

11. Vaiheesta 10 saatu tuote seulotaan 200 meshin haponkestävää terästä olevan seulan läpi.

12. Suspendoidaan 10 g tätä 200 meshin tuotetta 100 ml:aan kloroformia. Lisätään 5 ml trietyyliamiinia ja seosta kuumennetaan 50°C:seen voimakkaasti sekoittaen. Seosta suspendoidaan 5 minuuttia 50°C:ssa.

13. Seos suodatetaan kuumana (7-amino-3-(1-karboksimetyylitetratsol-5-yyliometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappo, pigmentit ja muut epäpuhtaudet liukenevat kuumaan kloroformi-trietyyliamiiniliuokseen). Suodoskakkua pestään 25 ml:lla kloroformia ja ilmakeivataan 2 tuntia. Saanto 1-8 g 7-(2-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(1-karboksimetyylitetratsol-5-yyliometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappoa.

14. Vaiheesta 13 saatu tuote seulotaan 200 meshin seulan läpi.

15. Suspendoidaan 10-15 minuuttia 10 g 200 meshin tuotetta 75 ml:aan 0,1-n kloorivetyhappoa. Seos suodatetaan, suodoskakkua pestään 25 ml:lla vettä ja 50 ml:lla metanolia ja ilmakeivataan huoneen lämpötilassa 2-3 tuntia. Saanto 10 g.

16. Suspendoidaan 10 g vaiheessa 15 saatua 7-(2-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(1-karboksimetyylitetratsol-5-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappoa 65 ml:aan metanolia, ja

a) lisätään 2 ml väkevää kloorivetyhappoa; sekoitetaan 5 minuuttia,

b) lisätään nopeasti ja voimakkaasti sekoittaen 130 ml vettä, pH-arvo on 1,3-1,6, muodostuu välittömästi sakka (joka sisältää suurimman osan väriä).

c) seosta suspendoidaan minuutti ja suodatetaan nopeasti (säästetään kiintoaines jälkikäsitteilyä ja talteenottoa varten),

d) suodosta ympätään ja sekoitetaan lievästi; kiteytyminen alkaa n. 15-30 minuutin kuluttua,

e) seosta sekoitetaan ympäristölämpötilassa 2 tuntia kiteytymisen alkamisen jälkeen, ja

f) kiteet eristetään suodattamalla, pestään 25 ml:lla seosta, jossa on 65 % vettä ja 35 % metanolia (t/t) ja kuivataan vakuuissa 1 vrk 50°C:ssa. Saanto 9 g puhdistettua, valkoista 7-(2-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(1-karboksimetyylitetratsol-5-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappoa.

17. Seuraavassa on kaksi vaihtoehtoista menetelmää A) ja B) 7-(2-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(1-karboksimetyylitetratsol-5-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihapon kiteyttämiseksi;

A)

1. Suspendoidaan 10 g vaiheen 15 tuotetta 100 ml:aan metanolia.

2. Lisätään 2 ml väkevää kloorivetyhappoa.

3. Lisätään 1,5 g puuhiiltä (Darco G-60) ja seosta suspendoidaan puoli tuntia.

4. Hiili poistetaan suodattamalla ja pestään 20 ml:lla metanolia. Pesuneste lisätään suodokseen.

5. Suodokseen lisätään 120 ml vettä (muodostunut pieni määrä sakkaa poistetaan suodattamalla ja säästetään uudelleenkäsitteilyä ja talteenottoa varten).

6. Vaiheen 5 liuosta sekoitetaan voimakkaasti ja pH säädetään arvoon 2,5-3,0 10-% natriumhydroksidiliuoksella. Muodostuu sakka.

7. Seosta sekoitetaan puoli tuntia. Sakka eristetään suodattamalla, pestään 20 ml:lla 50-% metanoli-vettä (t/t), 30 ml:lla metanolia ja kuivataan vakuuissa 1 vrk 50°C:ssa. Saadaan 9 g

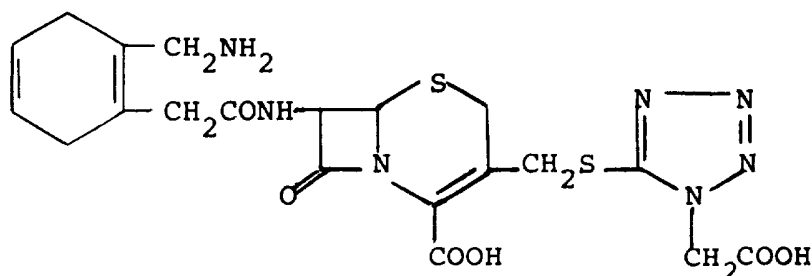
puhdasta 7-(2-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(1-karboksime-tyylitetratsol-5-yyliotiometri)-3-kefem-4-karboksyylihappoa.

B)

1. Suspendoidaan 10 g vaiheen 15 tuotetta 75 ml:aan vettä.
2. Lisätään 10-% natriumhydroksidiliuosta, kunnes pH on 6,8 - 7,2.
3. Lisätään 1,5 g puuhiiltä (Darco G-60) ja seosta sekoitetaan puoli tuntia pH-arvossa 6,8 - 7,2 (lisätään jatkuvasti 0,1 - 1-n natriumhydroksidiliuosta).
4. Hiili poistetaan suodattamalla; sakka pestään 20 ml:lla vettä, joka lisätään suodokseen.
5. Vaiheen 4 liuos, pH 6,8 - 7,2, voidaan kiteyttää pH-arvossa 1,2 - 1,5 (lisäämällä kloorivetyhappoa) ja kuten on kuvattu vaiheen 16 kohdissa d, e, ja f. Molemmissa tapauksissa saadaan 9 g kiteistä 7-(2-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(1-karboksime-tyylitetratsol-5-yyliotiometri)-3-kefem-4-karboksyylihappoa.

Esimerkki 2

7-(2-aminometyyli-1,4-sykloheksadienyliasetamido)-3-(1-karboksime-tyylitetratsol-5-yyliotiometri)-3-kefem-4-karboksyyli-happo



Liuosta, jossa on 0,80 g (0,003 moolia) 2-tert.-butoksi-karbonyyliaminometyyli-1,4-sykloheksadienylietikkahappoa ja 0,303 g (0,003 moolia) trietyyliamiinia 19,2 ml:ssa tetrahydrofuraania sekoitetaan 0°C:ssa ja lisätään 0,41 g (0,003 moolia) isobutylikloroformaattia. Seosta sekoitetaan 30 minuuttia 0°C:ssa ja lisätään liuokseen, jossa on 0,003 moolia 7-amino-3-(1-karboksime-tyylitetratsol-5-yyliotiometri)-3-kefem-4-karboksyyli-happoa ja 0,61 g (0,006 moolia) trietyyliamiinia 9,2 ml:ssa 50-% tetrahydrofuraania. Muodostunutta liuosta sekoitetaan puoli-toista tuntia 25°C:ssa. Tetrahydrofuraani haihdutetaan 30°C/15 mm

Hg:ssa, jäännöstä pestään kahdesti 30 ml:n annoksilla eetteriä ja laimennetaan puoliksi vedellä. Liuos hapotetaan pH-arvoon 3,5 laimealla kloorivetyhapolla, tuote eristetään ja kuivataan vakuu-
missa 18 tuntia fosforipentoksidilla 25°C:ssa, jolloin saadaan 1,55 g (54,0 %) valkoista jauhetta. Lisätään kaikkiaan 3,4 ml trifluorietikkahappoa yllä mainittuun 7-(2- α -tert.-butoksikarbon-
yyliaaminometyyli-1,4-sykloheksadienyyliaasetamido)-3-(1-karboksi-
metyylitetratsol-5-yyliitiometyyli)3-kefem-4-karboksyylihappoon
ja sekoitetaan tunti 0°C:ssa. Liuosta laimennetaan 150 ml:lla eette-
riä ja sakka eristetään suodattamalla. Trifluuriasetaattisuola sus-
pendoidaan 3,4 ml:aan vettä ja pH säädetään arvoon 4,5 laimealla
ammoniumhydroksidiliuoksella. Kumimaista jäännöstä hierretään
vedessä, eristetään ja pestään vedellä ja asetonilla. Tuotetta
kuivataan vakuuissa 18 tuntia fosforipentoksidilla 25°C:ssa, jol-
loin saadaan 53 mg (15,72 %) 7-(2-aminometyyli-1,4-sykloheksadi-
enyyliaasetamido)-3-(1-karboksimetyylitetratsol-5-yyliitiometyyli)-
3-kefem-4-karboksyylihappoa, sp. yli 160°C (hajoaa hitaasti).

Analyysi $C_{20}H_{23}N_7O_6S_2 \cdot 1/2 H_2O$

Laskettu: C 45,18 H 4,55 N 18,44

Saatu: C 45,46 H 4,68 N 17,09

Esimerkki 3

7-(2-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(1-karboksimetyyli-
tetratsol-5-yyliitiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihapon mono-
natriumsuolan trihydraatti

1. Suspendoidaan 10 g kiteistä 7-(2-aminometyylifenyyli-
asetamido)-3-(1-karboksimetyylitetratsol-5-yyliitiometyyli)-3-
kefem-4-karboksyylihappoa (kuvattu ja valmistettu esimerkissä 1)
50 ml:aan ioninvaihtovettä.

2. Voimakkaasti sekoittaen lisätään hitaasti natriumhydrok-
sidiliuosta pH:n pitämiseksi vakioarvossa 7,4 - 7,7.

3. Lisätään 2 g aktiivihiiltä (Darco G-60) ja seosta sekoitetaan puoli tuntia. pH pidetään arvossa 7,4 - 7,7 1-n natrium-
hydroksidiliuoksella.

4. Hiili poistetaan suodattamalla ja pestään 10 ml:lla
vettä. Pesuvesi lisätään suodokseen.

5. Vaiheen 4, pH 7,4 - 7,7, liuos steriloidaan ja tehdään
pyrogeenivapaaksi suodattamalla aseptisesti ja ko. menetelmin.

Vaiheiden 3, 4 ja 5 kokonaisaika ei saa ylittää 5 tuntia huoneen lämpötilassa.

6. Käyttäen steriilitekniikkaa vaiheen 5 voimakkaasti sekoitettuun, steriiliin liuokseen lisätään 5 minuutin aikana 65 ml (n. yhtä suuri tilavuus) steriiliä, pyrogeenivapaata asetonia.

7. Lisätään voimakkaasti sekoittaen 15 - 20 minuutin aikana 2 tilavuusosaa (120 ml) steriiliä, pyrogeenivapaata asetonia, jolloin muodostuu kiteitä.

8. Seosta suspendoidaan 10 minuuttia.

9. Lisätään 15 minuutin aikana 3 tilavuusosaa (180 ml) steriiliä asetonia. Seosta sekoitetaan puoli tuntia.

10. Sakka eristetään suodattamalla, pestään 75 ml:lla steriiliä asetonia ja vakuumikuivataan 45 - 50°C:ssa tai ilmakuivataan 50 - 56°C:ssa 24 tuntia. Saanto n. 8,8 g.

7-(2-aminometyylifenyliasetamido)-3-(1-karboksimetyylitetratsol-5-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihapon mononatrium-suolan trihydraatin ominaisuudet:

vettä = 9,2 % (teor. = 9,05 %)

natriumia (liekkifotometrisesti) = 4,0 % (teor. 3,86 %)

liukoisuus veteen = yli 500 mg/ml

stabiilisuus vedessä = stabiili vähintään 24 tuntia huoneen lämpötilassa konsentraation ollessa 250 mg/ml.

Esimerkki 4

7-(3-aminometyyli-2-tienyyliasetamido)-3-(1-karboksimetyylitetratsol-5-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappo

A) 7-(3-tert.-butoksikarbonyyliaminometyyli-2-tienyyliasetamido)-3-(1-karboksimetyylitetratsol-5-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappo

Seosta, jossa on 542 mg (2 mmoolia) 3-tert.-butoksikarbonyyliaminometyyli-2-tienyylietikkahappoa ja 412 mg (2 mmoolia) di-sykloheksyylikarbodiimidiä tetrahydrofuraanissa, sekoitetaan puoli-toista tuntia huoneen lämpötilassa. Saostunut urea poistetaan ja suodos haihdutetaan vakuumissa. Muodostunut 1,0 g aktiivista esteriä liuotetaan 10 ml:aan tetrahydrofuraania ja lisätään 0°C:ssa sekoittaen seokseen, jossa on 656 mg (2mmoolia) 7-amino-3-(1-karboksimetyylitetratsol-5-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappoa ja 816 mg (8mmoolia) trietyyliamiinia ja 5ml:ssa vettä.

Sekoitusta jatketaan 3,5 tuntia huoneen lämpötilassa. Reaktioseos lisätään 20 ml:aan vettä ja pestään neljästi 20 ml:n annoksilla eetteriä. Vesiliuokselle kaadetaan etyyliasetaattia ja pH säädetään 5^oC:ssa arvoon 2 väkevällä kloorivetyhapolla. Orgaaninen kerros erotetaan ja vesikerrosta uutetaan kahdesti 50 ml:n annoksilla etyyliasetaattia. Etyyliasetattiutteet yhdistetään, pestään kyllästetyllä natriumkloridivesiliuoksella, kuivataan magnesiumsulfaattilla ja haihdutetaan vakuumissa. Jäljelle jäänyt öljy kromatografoidaan 10 g:lla silikageeliä. Kolonna uutetaan peräkkäin 150 ml:lla kloroformia ja 100 ml:lla 3-% metanoli-kloroformia. Kloroformieluaatista saadaan talteen 50 mg 2,4-dinitrofenolia ja otsikkokefalosporiini eristetään haihduttamalla metanoli-kloroformieluaatti. Saanto 29 %, sp. 185 - 188^oC (hajoaa).

Analyysi $C_{23}H_{27}O_8S_3$

Laskettu: C 42,91 H 4,54 N 15,23 S 14,94

Saatu: C 43,02 H 4,17 N 15,07 S 15,04

B) 7-(3-aminometyyli-2-tienyyliasetamido)-3-(1-karboksi-metyylitetratsol-5-yyli tiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappo

Lisätään 0^oC:ssa 0,6 ml trifluorietikkahappoa 610 g:aan (1,05 mmoolia) vaiheen A suojattuun kefalosporaaniin ja seosta sekoitetaan 15 minuuttia huoneen lämpötilassa. Reaktioseokseen lisätään 15 ml vedetöntä eetteriä sakan muodostamiseksi, joka erotetaan suodattamalla, pestään kahdesti 10 ml:n annoksilla vedetöntä eetteriä ja liuotetaan 10 ml:aan asetonitriiliä. Liuokseen lisätään 2 tippaa väkevää ammoniumhydroksidia. Sakka erotetaan suodattamalla, pestään kahdesti 10 ml:n annoksilla asetonitriiliä ja kuivataan 7 tuntia 75^oC/1 mm Hg, jolloin saadaan otsikkotuote. Tätä käsitellään yhdellä ekvivalentilla ammoniumhydroksidia, jolloin saadaan monoammoniumsua. Saanto 83 %, sp. 174 - 178^oC (hajoaa).

Analyysi $C_{18}H_{21}N_8O_6S_3 \cdot H_2O$

Laskettu: C 38,56 H 4,32 N 19,98 S 17,16

Saatu: C 38,89 H 4,06 N 18,83 S 15,24

Esimerkki 5

7-(2-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(1-karboksietyylitetratsol-2-yyli tiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappo.

A) Kalium-o-(1-karbometoksipropen-2-yyliaminometyyli)-fenyyliasetatti (enamiini)

1. Lisätään säiliöön 1000 g o-aminometyylifenyylietikkahappoa, 340 g kaliumhydroksidia, 1412 g metyyliasetoasetattia ja

32 400 ml vedetöntä metanolia.

2. Seosta kuumennetaan pystyjäähdyttämällä ja sekoittaen 4 tuntia.

3. Reaktioliuosta konsentroidaan vakuumissa ja lämpötilassa alle 50°C n. viidennekseen lähtötilavuudesta.

4. Konsentraattiin lisätään 10 000 ml metyyli-isobutyryliketonia ja konsentroitua jatketaan vakuumissa kunnes metanoli on poistunut.

5. Lisätään 10 000 ml metyyli-isobutyryliketonia konsentraatin työstettävän suspension saamiseksi.

6. Seosta sekoitetaan ja jäähdytetään 5 - 10°C:seen 30 minuuttia.

7. Suspensio suodatetaan ja suodattama pestään 5000 ml:lla metyyli-isobutyryliketonia ja 5000 ml:lla asetonia.

8. Tuote kuivataan kiertoilmalämpökaapissa n. 40°C:ssa.

9. Saanto on 1605 - 1680 g eli 88 - 92 % valkoista, kiteistä tuotetta, sp. 140 - 142°C.

B) 7-(2-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(1-karboksietyylitetraatsol-2-yyliotiometri)-3-kefem-karboksyylihappo

A¹) Sekoitetaan 4,09 g vaiheen A enamiinia ja 90 ml tetrahydrofuraania sekoittimella ja kuivausputkella varustetussa kolmikaulakolvissa, jota jäähdytetään kuivajää-asetonihauteessa. Lisätään 8 tippaa N,N-dimetyylibentsyyliamiinia ja seos jäähdytetään -38°C:seen. Lisätään 1,95 g isobutyrylkloroformaattia ja sekoitetaan 15 minuuttia.

B¹) Liuotetaan 3,5 g 7-amino-3-(1-karboksietyylitetraatsol-2-yyliotiometri)-3-kefem-4-karboksyylihappoa 50 ml:aan vettä ja 2,29 g:aan N-metyylimorfoliinia ja jäähdytetään 2°C:seen. Liuokseen lisätään sekoittaen vaiheen A¹ anhydridiä. Seosta sekoitetaan puolitoista tuntia 2°C:ssa, Tetrahydrofuraani poistetaan vakuumissa, jäännökselle kaadetaan etyyliasettaattia ja pH säädetään arvoon 3. Sekoitetaan jäähauteessa, ja tuote erotetaan; saanto 250 mg, sp. 140°C (hajoaa).

IR- ja NMR-spektrien perusteella mukana on 20 % epäpuhtauksia, lähinnä lähtöainetta.

Esimerkki 6

Steriilin 7-[α -(2-aminometyylifenyyli)asetamido]-3-[(1-karboksietyylitetraatsol-5-yyliotiometri)metyyli]-3-kefem-4-karboksyylihapon mononatriumhydraatin valmistus

1. Suspendoidaan 10 g kiteistä vapaata happoa 100 ml:aan 50-% asetoni-deionoitua vettä huoneen lämpötilassa (20 - 23°C).

2. Lisätään hitaasti 40-% natriumhydroksidia sekoittaen hyvin nopeasti vakio-pH-arvoon 7,4 - 7,7.

3. Lisätään 1,5 g aktivoitua hiiltä (Darco G-60). Sekoite-
taan 0,5 tuntia.

4. Hiili poistetaan suodattamalla (mieluiten ylipaineen avul-
la asetonin haihtumisen estämiseksi).

5. Hiilisuoduskakku pestään 15 ml:lla 50-% asetoni-deionoitua
vettä. Pesuvesi lisätään suodokseen.

6. Yhdistetty pesuvesi ja suodos viedään sopivien steriloin-
tisuodattimien läpi (mieluiten ylipaineen avulla asetonin haihtumi-
sen estämiseksi) hiukkasten, pyrogeenien ja bakteerien poistamiseksi.
Suodos kootaan sopivaan steriiliin astiaan. Vaiheiden 2 - 6 suorituk-
seen tarvittava kokonaisaika ei saisi ylittää 5 tuntia huoneen läm-
pötilassa (20 - 23°C).

7. Edelleen nopeasti sekoittaen ja käyttäen steriiliä tekniik-
kaa lisätään 55 ml steriiliä, pyrogeenitonta asetonia 30 minuutin
aikana vaiheen 6 steriiliin liuokseen. Kiteitä alkaa muodostua,
kun suurin osa asetonista tai koko asetonimäärä on lisätty. Sekoite-
taan vielä 0,5 tuntia kiteisen massan muodostamiseksi.

8. Jatketaan nopeaa sekoitusta ja lisätään 80 - 85 ml sterii-
liä, pyrogeenitonta asetonia 1 tunnin ajan. Sekoitetaan vielä 0,5
tuntia.

9. Kiteet kootaan suodattamalla. Suodatinkakku puristetaan
halkeamien ja kanavien poistamiseksi.

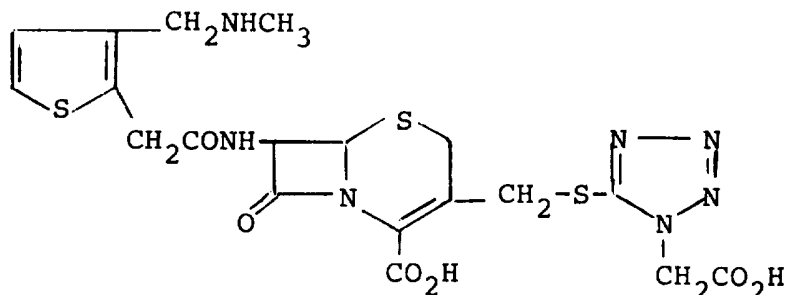
10. Suodatinkakku pestään 20 ml:lla steriiliä, pyrogeenitonta
asetoniliuosta (90 % asetonia ja 10 % deionoitua vettä) ja sen jäl-
keen 50 - 60 ml:lla steriiliä, pyrogeenitonta asetonia.

11. Steriili, kiteinen tuote tyhjökuivataan 50 - 56°C:ssa 24
tunnin ajan steriileissä olosuhteissa. Saanto 7,5 - 9,0 g (biossaanto
= 70 - 92%). Yhdisteen ominaisuudet:

Bio-teho	950 - 1000 yks./mg
% tuhkaa (Na)	3,71 (teoreettisesti 3,91)
% vettä	6,0 (teoreettisesti 6,22)
NMR	ei todettu epäpuhtauksia
liukoisuus veteen	>400 mg/ml
liuoksen pH	4,8 - 7,3 (300 mg/ml)
liuoksen stabiilisuus	ei havaittu aktiivisuuden alenemista (250 000 yks./ml, 24 h, 25°C)
Klett-väri	1 % vedessä = 30 - 35
sininen suodatin	
n:o 42	10 % vedessä = 400 - 450

Esimerkki 7

7-(3-N-metyyliaminometyyli-2-tienyyliasetamido)-3-(1-karboksi-metyyllitetratsoli-5-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappo



Trifluorietikkahappoa (0,5 ml) lisätään 7-(3-N-t-butoksi-karbonyyli-N-metyyliaminometyyli-2-tienyyliasetamido)-3-(1-karboksimetyyli-tetratsoli-5-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappoon (539 mg, 0,84 mmoolia) 0°C:ssa, ja seosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa 15 minuuttia. Reaktioseokseen lisätään vedetöntä eetteriä (10 ml) sakan eristämiseksi, joka kootaan suodattamalla, pestään vedettömällä eetterillä (2x10 ml) ja suspendoidaan asetonitriiliin (10 ml). Suspensioon lisätään 2 tippaa väkevää ammonioimhydroksidia. Erotettu kiintoaine kootaan suodattamalla, pestään asetonitriilillä (2x10 ml) ja kuivataan 60°C:ssa/1 mm Hg 7 tuntia, jolloin saadaan 327 mg (72-%) 7-(3-N-metyyliaminometyyli-2-tienyyliasetamido)-3-(1-karboksimetyyllitetratsoli-5-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappoa, joka sulii 171-175°C:ssa (hajoaa). Yhdisteen ominaisuudet:

IR: η KBr maks. 3200, 1770, 1670, 1610 cm^{-1}

UV: λ (pH⁷) 237 nm, (ϵ , 16200), 265 nm (ϵ , 10300)

Analyysi: $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_7\text{O}_6\text{S}_3 \cdot 3/2\text{H}_2\text{O}$

Laskettu: C 40,27 H 4,27 N 17,30 S 16,98

Saatu: C 39,99 H 4,14 N 17,39 S 16,12

Lähtöaineen, 7-(3-N-t-butoksikarbonyyli-N-metyyliaminometyyli-2-tienyyli-asetamido)-3-(1-karboksimetyyllitetratsoli-5-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihapon valmistus

Seosta, joka sisältää 3-(N-tert.-butoksikarbonyyli-N-metyyliaminometyyli)-2-tienyylietikkahappoa (855 mg, 3 mmoolia), 2,4-di-

nitrofenolia (552 mg, 3 mmoolia) ja disykloheksyyli-karbodi-imidiä (618 mg, 3 mmoolia) tetrahydrofuraanissa (10 ml), sekoitetaan huoneen lämpötilassa 1,5 tuntia. Saostunut karbamidi poistetaan ja suodos lisätään sekoittaen 0°C:ssa seokseen, joka sisältää 7-amino-3-(1-karboximetyylitetratsoli-5-yyliitiometyyli)-3-kefem-4-karboxyylihappoa (1,1 g, 3 mmoolia) ja trietyyliamiinia (909 g, 9 mmoolia) vedessä (10 ml). Sekoitusta jatketaan 3,5 tuntia huoneen lämpötilassa, ja reaktioseos lisätään veteen (20 ml) ja pestään eetterillä (20 ml). Vesiliuokselle kaadetaan etyyliasetaattia (20 l) ja pH säädetään arvoon 2 väkevällä kloorivetyhapolla 5°C:ssa. Orgaaninen kerros erotetaan, ja vesikerros uutetaan etyyliasetaatilla (3x50 ml). Etyyliasetaattiuutteet yhdistetään, pestään kyllästetyllä NaCl-vesiliuoksella, kuivataan MgSO₄:lla ja konsentroidaan alennetussa paineessa. Öljymäinen jäännös (1,1 g) kromatografoidaan silikageelikolonnissa (11 g). Kolonnia eluoidaan peräkkäin kloroformilla (400 ml) ja 3-% metanoli-kloroformilla (400 ml). Kloroformieluauasta otetaan talteen 2,4-dinitrofenoli (150 mg). 3-% metanoli-kloroformieluauatti leikataan kahdeksi jakeeksi kromatografisesti käyttäen silikageelilevyä (50-% metanoli-kloroformi; detektointi jodilla. Ensimmäinen jae on BOC-suojatun aminohapon ja tuotteen seos (100 mg). Toinen jae sisältää haluttua tuotetta (610 mg, 32 %); R_f = 0,24, sp. 175-180°C (hajoaa).

Esimerkki 8

7-(3-N-metyyliaminometyyli-2-tienyyliasetamido)-3-(1-karboximetyylitetratsoli-5-yyliitiometyyli)-3-kefem-4-karboxyylihapon natriumsuola

Suspensioon, joka sisältää vapaata happoa (37 mg, 0,16 mmoolia) vedessä (10 ml), lisätään 2,6 ml 47,5 x 10⁻³M natriumhydroksidia pH:n säätämiseksi arvoon 7,2, ja seosta käsitellään puuhiilellä ja lyofilisoidaan, jolloin saadaan 87 mg vaaleanruskeaa jauhetta, jonka sulamispiste on 167-171°C. Yhdisteen ominaisuudet:

IR: $\tilde{\nu}$ KBr maks. 3200, 1770, 1640, 1600 cm⁻¹
 UV: λ (pH⁷) maks. 237 nm (ϵ , 15900), 265 nm (ϵ , 10000)

Analyysi: C₁₉H₂₉N₇O₆S₃Na₃H₂O

Laskettu: C 37,07 H 4,26 N 15,93 S 15,93 S 15,62

Saatu: C 37,27 H 4,22 N 16,33 S 14,95

Esimerkki 9

62841

7-(2-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(1-karboksi-propyyli-tetratsoli-5-yyli-tiometyyli)-3-kefem-4-karboksylihappo

Seokseen, joka sisältää 1,57 g (0,0052 moolia) kalium-2-N-(1-karbetoksi-propeeni-2-yyli)aminometyylifenyyliasetaatia ja 5 tippaa N,N-dimetyylibentsyyliamiinia 50 ml:ssa tetrahydrofuraania -40°C:ssa, sekoitetaan voimakkaasti 720 mg (0,0053 moolia) isobutylikloroformiaattia. Seosta sekoitetaan vielä 25 minuuttia ja lisätään liuokseen, joka sisältää 1,38 g (0,0034 moolia) 7-amino-3-(1-karboksi-propyyli-tetratsoli-5-tiometyyli)-3-kefem-4-karboksylihappoa ja 0,975 ml (0,0089 moolia) N-metyyli-morfoliinia 28 ml:ssa vettä 5°C:ssa. Liuosta sekoitetaan 1 tunnin ajan, tetrahydrofuraani poistetaan 30°C:ssa (15 mm) ja liuokselle kaadetaan 50 ml etyyliasetaatia. Seoksen pH säädetään arvoon 4,5 väkevällä kloorivetyhapolla ja seos suodatetaan, jolloin siitä poistetaan jonkin verran tummanruskeaa ainetta. Suodoksen pH säädetään arvoon 3,5 tiputtamalla siihen väkevää kloorivetyhappoa, ja tuote kootaan ja pestään kylmällä vedellä sekä kylmällä metanolilla. Kun tuotetta on kuivattu tyhjöissä 64 tuntia fosforipentoksidilla, saadaan 420 mg 7-(2-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(1-karboksi-propyyli-tetratsoli-5-yyli-tiometyyli)-3-kefem-4-karboksylihappoa, sp. 130°C (hidas hajoaminen).

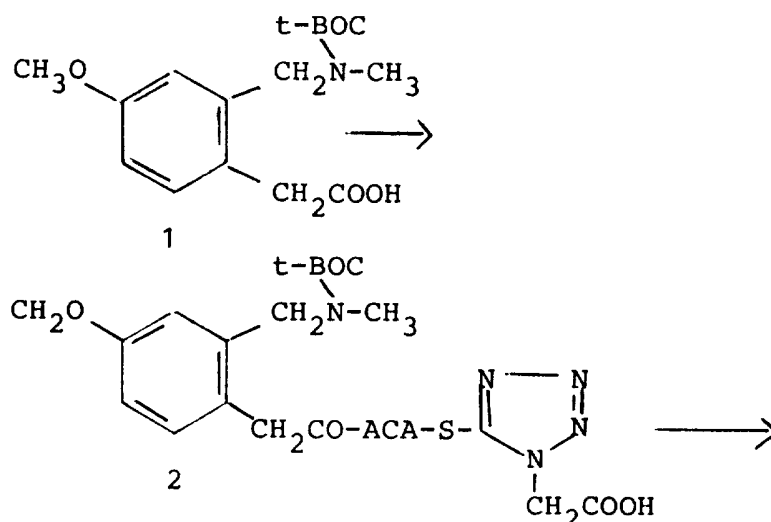
Analyysi $C_{22}H_{25}N_7O_6S_2H_2O$

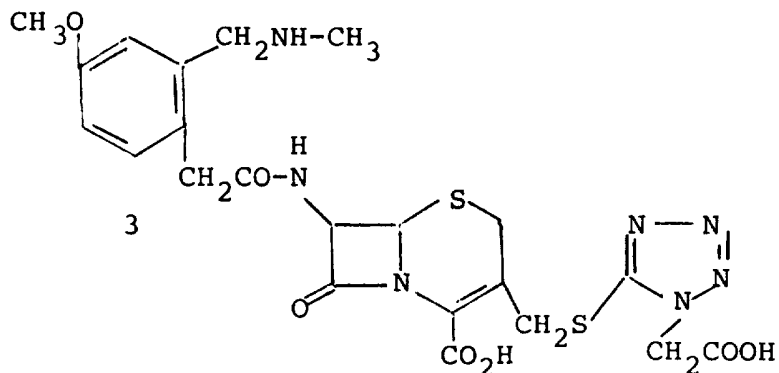
Laskettu: C 46,71 H 4,80 N 17,34

Saatu: C 46,55 H 4,94 N 16,25

Esimerkki 10

7-(2-N-metyyliaminometyyli-4-metoksifenyyli)asetamido-7-3-(1-karboksimetyylitetratsoli-5-yyli-tiometyyli)-3-kefem-4-karboksylihappo





Seosta, joka sisältää N-BOC-kefalosporiinia 2 (500 mg, 0,75 mmoolia) ja trifluorietikkahappoa (1 ml), sekoitetaan 15 minuuttia 10°C:ssa. Eetteriä (50 ml) lisätään seokseen muodostuneen trifluori-asetaatin saostamiseksi, joka kootaan suodattamalla ja liuotetaan asetonitriiliin (20 ml) ja veden (5 ml) seokseen. Liuosta käsitellään aktiivihieillä. Suodos säädetään pH-arvoon 6 väkevällä ammoniakilla ja laimennetaan asetonitriilillä (100 ml). Erotettu kiintoaine kootaan suodattamalla, pestään asetonitriilillä (2x 5 ml) ja kuivataan tyhjässä forforipentoksidilla, jolloin saadaan 330 mg (79 %) otsikkotuotetta, sp. 180-190°C (hajoaa).

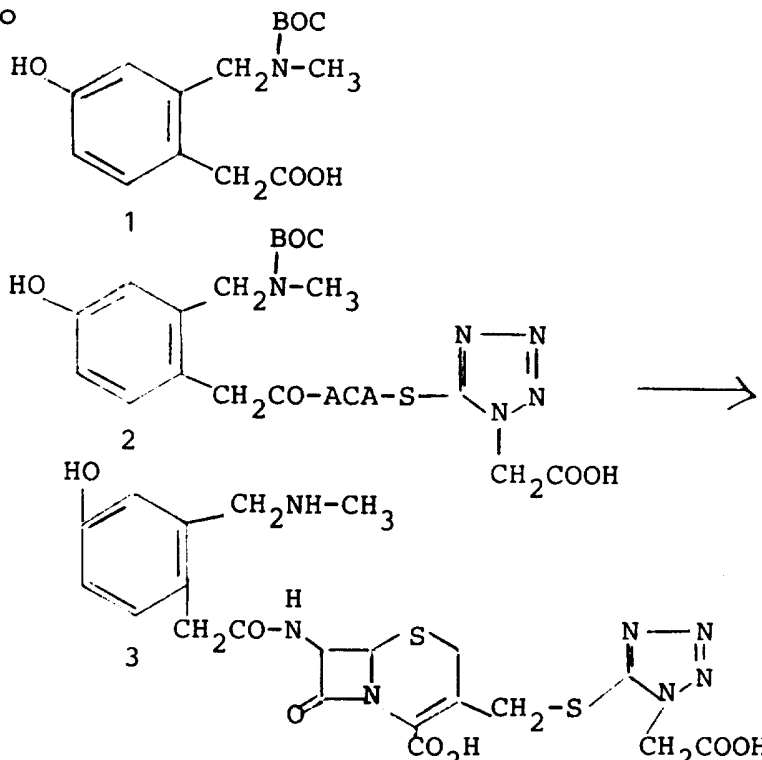
Lähtöaineen, 7-[(2-N-tert-butoksykarbonyyli-N-metyyliaminometyyli-4-metoksyfenyyli)-asetamido]-3-(1-karboksimetyylitetratsoli-5-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihapon valmistus.

Seosta, joka sisältää (2-(N-tert.-butoksykarbonyyli-4-metyyliaminometyyli)-4-metoksyfenyylietikkahappoa (1) (680 mg, 2,2 mmoolia), 2,4-dinitrofenolia (405 mg, 2,2 mmoolia) ja disykloheksyylikarbodi-imidia (453 mg 2,2 mmoolia) kuivassa tetrahydrofuraanissa (20 ml), sekoitetaan 2 tuntia huoneen lämpötilassa. Erotettu karbamidi poistetaan suodattamalla. Suodos lisätään jäällä jäädytettyyn liuokseen, joka sisältää 7-amino-3-(1-karboksimetyylitetratsoli-5-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappoa (744 mg, 2 mmoolia) ja trietyyliamiinia (0,84 ml, 6 mmoolia) vedessä (10 ml), ja seosta sekoitetaan 3 tuntia huoneen lämpötilassa. Reaktioseos konsentroidaan 10 ml:aan alennetussa paineessa, pestään eetterillä (3x10 ml), hapotetaan 6-n kloorivetyhapolla ja uutetaan etyyliasetaatilla (5x10 ml). Yhdistetyt uutteen pestään kyllästetyllä suola-

vedellä ja kuivataan vedettömällä natriumsulfaatilla. Liuot-
timen haihduttua saadaan öljymäinen tuote, joka kromatografoidaan
silikageelikolonissa (Wako-geeli, C-100, 25 g) eluoidaan kloro-
formi-metanolilla (0-3 %). Halutun tuotteen sisältävät jakeet koo-
taan, konsentroidaan ja trituroidaan eetteri-n-heksaanilla, jol-
loin saadaan N-BOC-kefalosporiini amorfisena kiintoaineena. Saan-
to 560 mg (42 %), sp. 160-170°C (hajoaa).

Esimerkki 11

7-[(2-N-metyyliaminometyyli-4-hydroksifenyyl)asetamido]-3-
(1-karboksimetyylitetratsoli-5-yyli)tiometyyli)-3-kefem-karboksyli-
happo



N-BOC-kefalosporiinia (400 mg, 0,62 mmoolia) käsitellään tri-
fluorietikkahapolla (1 ml) 30 minuuttia. Eetteriä (50 ml) lisäämällä
eristetty trifluoriasetaatti liuotetaan asetonitriiliin (10 ml) ja
veden (5 ml) seokseen. Suodosta käsitellään pienellä aktiivihiili-
määrällä, ja säädetään pH arvoon 6 väkevällä ammoniumhydroksidilla.
Muodostunut sakka kootaan, pestään asetonitriilillä (10 ml) ja
kuivataan. Saanto 220 mg (59 %), sp. 190-200°C (hajoaa). Analyysi-
tulokset:

IR: $\tilde{\nu}$	KBr maks.	1770, 1660, 1610, 1380 cm^{-1}
UV: λ	(pH ⁷) maks.	225 nm (ϵ , 14000), 270 nm (ϵ , 9700)

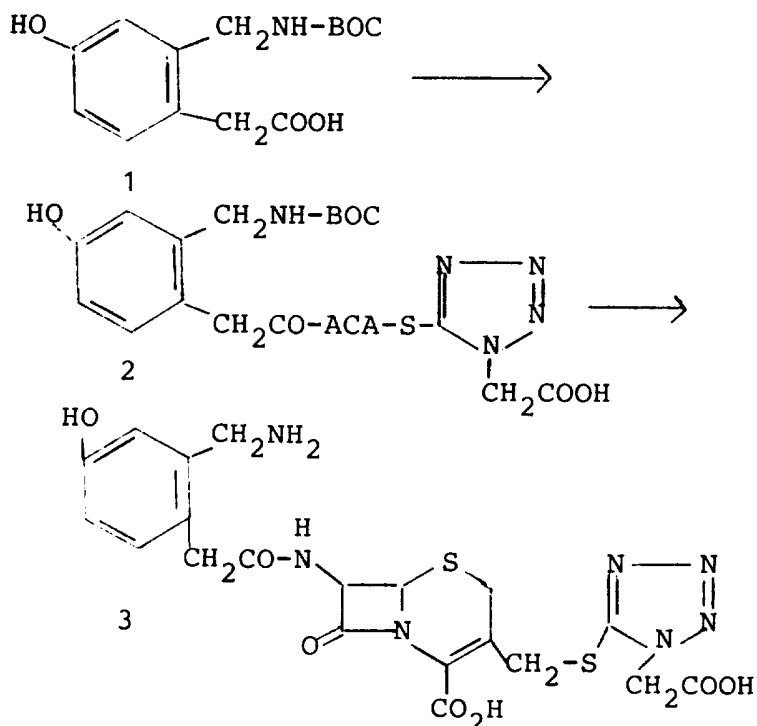
NMR: δ	$D_2O+K_2CO_3$	2,37 (3H, s, N-CH ₃), 3,3-3,75 (4H, m, 2-H, CH ₂ CO), 3,9-4,4 (4H, m, CH ₂ N & 3-CH ₂) 4,93 (2H, s, N-CH ₂ COOH), 4,85 (1H, d, 4,5 Hz, 6-H), 5,49 (1H, d, 4,5 Hz, 7-H), 6,6-7,3 (3H, m, fenyyli-H)
Analyysi:		C ₂₁ H ₂₃ N ₇ O ₇ S ₂ H ₂ O
Laskettu:		C 44,44 H 4,44 N 17,27 S 11,30
Saatu:		C 44,82 H 4,59 N 16,90 S 10,24

Lähtöaineen, 7-[2-N-tert.-butoksikarbonyyli-N-metyyliaminometyyli-4-hydroksifenyyli)-asetamido]-3-(1-karboksimetyyli-tetratsoli-5-yyliotiometri-3-kefem-4-karboksyylihapon, valmistus

Seokseen, joka sisältää 2-N-tert.-butoksikarbonyyli-N-metyyliaminometyyli-4-hydroksifenyylietikkahappoa (708 mg, 2,4 mmoolia) ja 2,4-dinitrofenolia (478 mg, 2,6 mmoolia) kuivassa tetrahydrofuraanissa (30 ml), lisätään DCC (526 mg, 2,6 mmoolia) yhtenä anoksenä, ja seosta sekoitetaan 2 tuntia huoneen lämpötilassa. Sakka poistetaan suodattamalla, ja suodos lisätään liuokseen, joka sisältää 7-amino-(1-karboksimetyylitetratsoli-5-yyliotiometri-3-kefem-4-karboksyylihappoa (744 mg, 2 mmoolia) ja trietyyliamiinia (0,84 ml, 6 mmoolia) vedessä (20 ml). Seosta sekoitetaan 17 tuntia huoneen lämpötilassa. Reaktioseos konsentroidaan alennetussa paineessa 20 ml:aan, pestään eetterillä (3x10 ml), hapotetaan 6-n kloorivetyhapolla ja uutetaan etyyliasetaatilla (3x20 ml). Yhdistetyt utteet pestään kyllästetyllä suolavedellä ja kuivataan vedetömällä Na₂SO₄:llä. Liuottimen haihduttua alennetussa paineessa saadaan öljymäinen tuote, joka kromatografoidaan silikageelillä (Waco-geeli, C-200, 25 g) eluoidaan kloroformi-metanolilla (0-3 %). Halutun tuotteen sisältävät jakeet kootaan, ja liuotin poistetaan tyhjöissä. Öljymäinen jäännös trituroidaan eetteri-n-heksaanilla, jolloin saadaan 474 mg (36,5 %) amorfista kiintoainetta, sp. 170-180°C (hajoaa).

Esimerkki 12

7-[2-(2-aminometyyli-4-hydroksifenyyli)asetamido]-3-(1-karboksimetyylitetratsoli-5-yyliotiometri-3-kefem-4-karboksyylihappo



Trifluorietikkahappoa (2 ml) lisätään N-BOC-kefalosporiiniin (470 mg, 0,74 mmoolia) 0°C:ssa, ja seosta sekoitetaan 30 minuuttia 10°C-15°C:ssa. Lisätään vedetöntä eetteriä (50 ml) ja muodostunut trifluoriasetaatti kootaan suodattamalla ja liuotetaan seokseen, joka sisältää asetonitriiliä (10 ml) ja vettä (10 ml). Liuokseen lisätään väkevää ammoniumhydroksidia pH:n säätämiseksi arvoon 6, ja seos laimennetaan asetonitriilillä (100 ml), jolloin otsikkoyhdiste saostuu; se kootaan suodattamalla, pestään asetonitriilillä (10 ml) ja kuivataan tyhjiössä. Saanto 270 mg (68 %), sp. 150-160°C (hajoaa). Analyysitulokset:

IR: η KBr maks. 1770, 1660, 1610, 1380 cm^{-1}

UV: λ (pH⁷) maks. 270 nm (ϵ , 10000)

Analyysi: $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_7\text{O}_7\text{S}_2 \cdot 1/2 \text{CH}_3\text{CN}$

Laskettu: C 45,36 H 4,08 N 18,89 S 11,53

Saatu: C 45,53 H 4,64 N 18,44 S 10,59

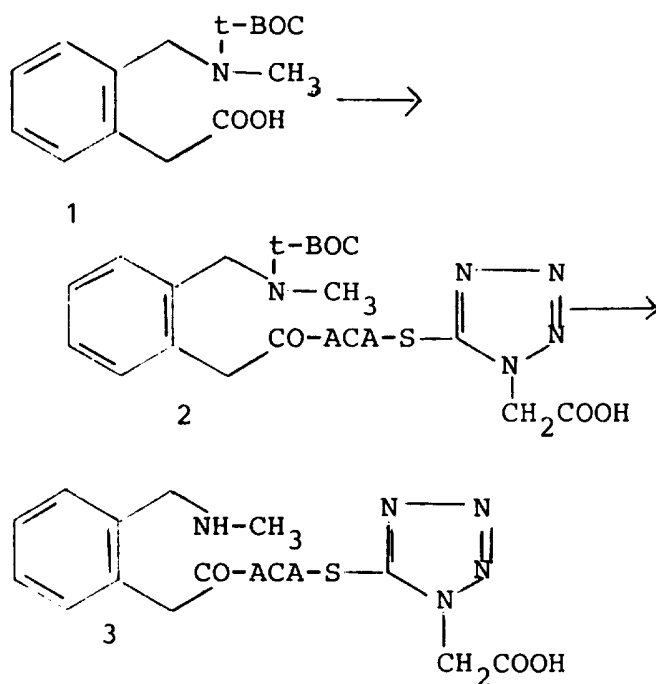
Lähtöaineen, 7-[2-(2-N-tert.-butoksykarbonyyliaminometyyli-4-hydroksifenyyl)asetamido]-3-(1-karboksimetyylitetratsoli-5-yyli-tiometyyli)-3-kefem-4-karboksylihapon valmistus

Disykloheksyylikarbodi-imidiä (513 mg, 2,5 mmoolia) lisätään

seokseen, joka sisältää 2-N-tert.-butoksykarbonyyliamiinometyyli-4-hydroksifenyylitikkahappoa (1) ja 2,4-dinitrofenyyliä (460 mg, 2,5 mmoolia) kuivassa tetrahydrofuraanissa (20 ml, ja seosta sekoitetaan 1 tunnin ajan huoneen lämpötilassa. Saostunut karbamidi poistetaan suodattamalla, ja suodos lisätään seokseen, joka sisältää 7-amino-3-(1-karboksimetyylitetratsoli-5-yyliitiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappoa (744 mg, 2 mmoolia) ja trietyyliamiinia (0,56 ml, 4 mmoolia) 10 ml:ssa vettä. Seosta sekoitetaan 16 tuntia huoneen lämpötilassa ja konsetroidaan 10 ml:aan alennetussa paineessa. Konsentraatti pestään eetterillä (2x20 ml), hapotetaan 6-n kloorivetyhapolla ja uutetaan etyyliasetaatilla (4x50 ml). Yhdistetyt uutteen pestään vedellä (2x50 ml), ja kuivataan vedettömällä natriumsulfaatilla. Liuottimen haihduttua saatiin öljymäinen jäännös, joka kromatografoidaan silikageelikolonissa (Wako-geeli, C-200, 25 g) eluoidaan kloroformi-metanolilla (0-3 %). Halutun tuotteen sisältävät jakeet kootaan (TLC-monitorin avulla), ja liuottimen haihduttua saadaan öljymäinen jäännös, joka trituroidaan n-heksaanieetterillä, jolloin saadaan 530 mg (42 %) mainittua lähtöaineyhdistettä amorfisena jauheena, sp. 100°C (hajoaa).

Esimerkki 13

7- α -(o-N-metyyliamiinometyylifenyyli)asetamido-3-(1-karboksimetyylitetratsoli-5-yyliitiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappo



N-BOC-kefalosporiini (0,54 g, 0,85 mmoolia) sekoitetaan jäällä jäädytettyyn trifluorietikkahappoon (1,5 ml), ja seosta sekoitetaan 10 minuuttia huoneen lämpötilassa. Eetteriä (20 ml) lisätään seokseen muodostuneen trifluoriasetaatin saostamiseksi, joka kootaan suodattamalla ja liuotetaan asetonitriiliin (50 ml). Liuosta käsitellään pienellä hiilimäärällä. Suodokseen lisätään tipoittain väkevää ammoniakkaa sekoittaen, kunnes sakkaa ei enää muodostu. Otsikkoyhdiste kootaan suodattamalla, pestään asetonitriilillä (20 ml) ja kuivataan. Saanto 0,34 g (75 %) sp. 177-182°C (hajoaa). Analyysitulokset:

IR:	$\tilde{\nu}$	KBr maks. 3600-2600, 1775, 1660(sh), 1620, 1385, 1205, 1180 cm^{-1}
UV:	λ	vesi maks. 267 nm (ϵ , 9200)
NMR:	δ	$\text{D}_2\text{O} + \text{NaHCO}_3$ ppm 2,80 (3H, s, N-CH ₃), 3,4-3,6 (2H, 65 m, 2-H), 3,84 (2H, s, CH ₂ CON), 4,1-4,3 (2H, m, 3-H), 4,28 (2H, s, CH ₂ N), 4,93 (1H, d, 4Hz, 6-H), 4,98 (2H, s, NCH ₂ COOH), 5,56 (1H, d, 4Hz, 7-H), 7,48 (4H, s, fe- nyyli-H)
Analyysi:		$\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}_6\text{S}_2, 2,5\text{H}_2\text{O}$
Laskettu:		C 43,59 H 4,88 N 16,94 S 11,08
Saatu:		C 44,06 43,96, H 4,27, 4,55 N 16,20, 16,50 S 10,26, 10,30

Lähtöaineen, 7-~~α~~-o-(N-metyyli-N-tert.-butoksykarbonyyli-aminometyyli)-fenyyli-asetamido]-3-(1-karboksimetyylitetratsoli-5-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihapon valmistus

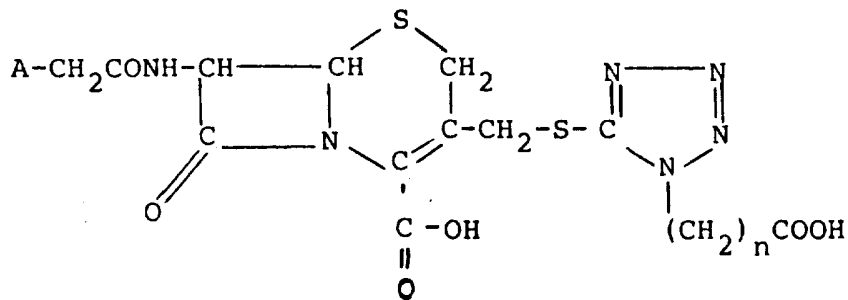
Seosta, joka sisältää o-N-butoksykarbonyyli-N-metyyliamino-metyylifenyylietikkahappoa (1) (538 mg, 2 mmoolia), 2,4-dinitro-fenolia (368 mg, 2 mmoolia) ja disykloheksyylikarbodi-imidiä (412 mg, 2 mmoolia) tetrahydrofuraanissa (10 ml), sekoitetaan 1 tunnin ajan huoneen lämpötilassa. Saostunut karbamidi poistetaan suodattamalla ja pestään tetrahydrofuraanilla (5 ml). Suodos ja pesunesteet yhdistetään ja lisätään sekoittaen jäällä jäädytettyyn liuokseen, joka sisältää 7-amino-3-(1-karboksimetyylitetratsoli-5-yyliotiome-tyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappoa (744 mg, 2 mmoolia) ja trietyyli-

62841

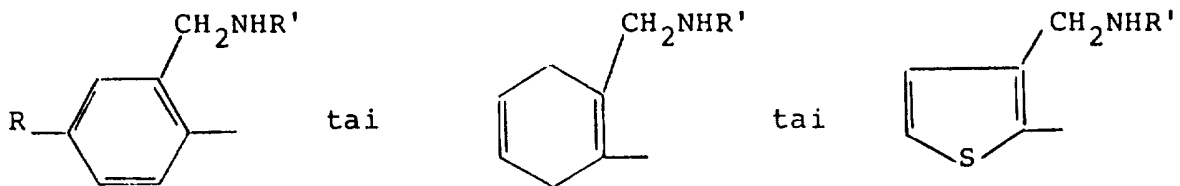
amiinia (0,61 g, 6 mmoolia) 50-% tetrahydrofuraani-liuoksessa (20 ml). Sekoitusta jatketaan yön yli. Seos laimennetaan vedellä (20 ml) ja pestään eetterillä (3x50 ml). Vesipitoinen kerros hapotetaan pH-arvoon 1 laimealla kloorivetyhapolla ja uutetaan etyyliasetaatilla (4x50 ml). Yhdistetyt utteet pestään vedellä, käsitellään pienellä hiilimäärällä ja kuivataan. Liuottimen poisto alennetussa paineessa antaa tulokseksi öljymäisen jäännöksen, joka jähmettyy trituroitaessa eetteri-n-heksaanilla (1;1; 50 ml). Tuote 2 kootaan suodattamalla, pestään eetteri-n-heksaanilla (1:1; 20 ml) ja kuivataan. Saanto 0,58 g (46 %), sp. 120-130°C (hajoaa).

Patenttivaatimukset

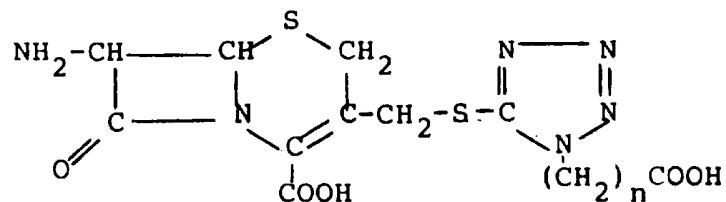
1. Menetelmä terapeuttisesti käytettävien 7-(o-aminometyyli- tai metyyliaminometyylifenyyli- tai sykloheksadienyli- tai tienyyliasetamido)-3-[1-karboksimetyyli - (tai -etyyli- tai -propyyli)-tetratsoli-5-ylitiometyyli]-3-kefem-4-karboksyylihappojen valmistamiseksi, joiden kaava on



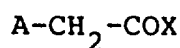
jossa n on 1, 2 tai 3 ja A on ryhmä



joissa kaavoissa R on vety, hydroksi tai metoksi ja R' on vety tai metyyli, sekä näiden yhdisteiden farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että annetaan yhdisteen, jonka kaava on



jossa n merkitsee samaa kuin edellä, tai tämän yhdisteen suolan reagoida kaavan



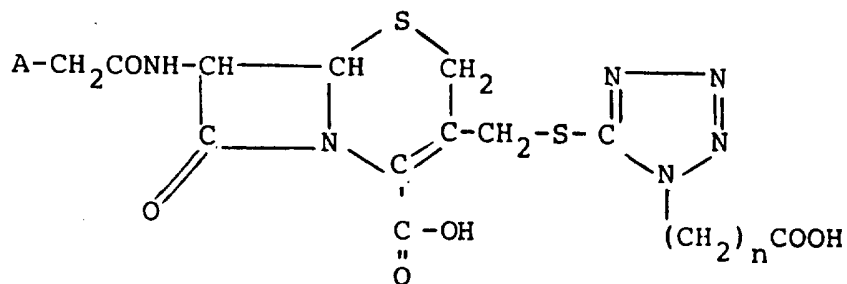
mukaisen asyloimisaineen kanssa, jossa A merkitsee samaa kuin edellä, ja X on halogenidi tai sen funktionaalinen vastine, ja kun asyyli-ryhmä sisältää vapaata aminoa tai hydroksyyliä, suojataan mainitut ryhmät tavanomaisilla suojaryhmillä, jotka sitten poistetaan kaavan I mukaisen yhdisteen saamiseksi, ja haluttaessa muutetaan muodostunut kaavan I mukaisen yhdisteen vapaa happo farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi, ja haluttaessa muutetaan muodostunut kaavan I mukaisen yhdisteen suola kaavan I mukaiseksi vapaaksi hapoksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä kaavan I mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, jossa kaavassa n on 1.

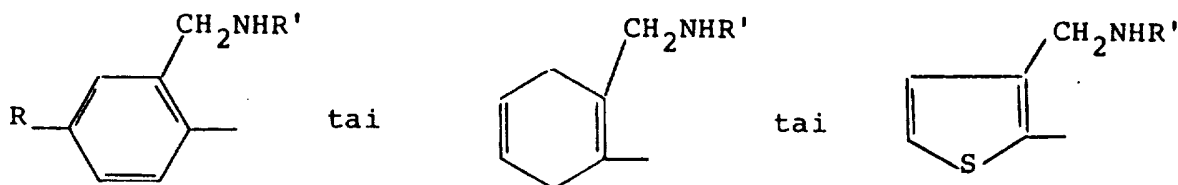
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä 7-(2-amino-metyylifenyyliasetamido)-3-(1-karboksimetyylitetratsoli-5-yyliometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihapon valmistamiseksi.

Patentkrav

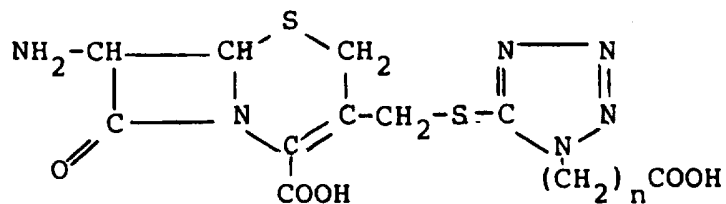
1. Förfarande för framställning av terapeutiskt användbara 7-(o-aminometyl- eller metylaminometylfenyl- eller cyklohexadienyl- eller tienylacetamido)-3-[1-karboximetyl- eller -etyl- eller -propyl-)tetrazol-5-yltiometyl]-3-cefem-4-karboxylsyror med formeln



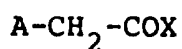
där n är 1, 2 eller 3 och A är gruppen



där R är väte, hydroxi eller metoxi och R' är väte eller metyl, samt dessa föreningars farmaceutiskt godtagbara salter, k ä n n e t e c k n a t därav, att en förening med formeln



där n betecknar detsamma som tidigare, eller ett salt, omsätts med ett acyleringsmedel med formeln



där A betecknar detsamma som tidigare, och X är halogen eller dess

funktionella motsvarighet, och när acylgruppen innehåller en fri amino eller hydroxyl, skyddas nämnda grupper med sedvanliga skyddsgrupper, vilka sedan avlägsnas för erhållande av en förening med formeln I, och om så önskas omvandlas en bildad fri syra av föreningen med formeln I till ett farmaceutiskt godtagbart salt och om så önskas omvandlas ett bildat salt av föreningen med formeln I till motsvarande fria syra med formeln I.

2. Förfarande enligt patentkravet 1 för framställning av en förening med formeln I, i vilken formel n är 1.

3. Förfarande enligt patentkravet 1 för framställning av 7-(2-aminometylfenylacetamido)-3-(1-karboximetyltetrazol-5-yltiometyl)-3-cefem-4-karboxylsyra.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia:-Offentliga finska patentansökningar: 1791/74, 2264/74, 2449/74.

Hakemusjulkaisuja:-Ansökningspublikationer: Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE) 1 953 861 (C 07 d 99/24), 2 262 262 (C 07 d 99/24), 2 362 816 (C 07 d 99/24), 2 222 954 (C 07 d 99/24), 2 316 867 (C 07 d 99/24).

Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: Suomi-Finland(FI) 51 201 (C 07 D 501/36), 60 019 (C 07 D 501/36). Japani-Japan(JP) 7 205 550.