



**SUOMI-FINLAND**  
**(FI)**

**Patentti- ja rekisterihallitus**  
**Patent- och registerstyrelsen**

[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU**  
**UTLÄGGNINGSSKRIFT** 57111  
C Patentti myönnetty 10.06.1980  
(45) Patent meddelat

(51) Kv.lk./Int.Cl.<sup>8</sup> C 07 D 501/36

(21) Patentihakemus — Patentansöknng 2670/73  
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag 27.08.73  
(23) Alkuperäpäivä — Giltighetsdag 27.08.73  
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig 01.03.74  
(44) Nähtävöksiannon ja kuul.julkaisun pvm. —  
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 29.02.80  
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet 30.08.72  
06.09.72 USA(US) 284792, 286793

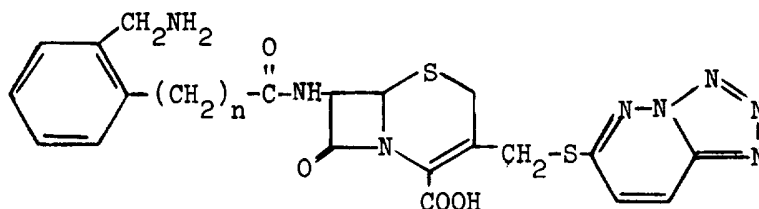
(71) Bristol-Myers Company, 345 Park Avenue, New York, N.Y., USA(US)

(72) Takayuki Naito, Tokyo, Jun Okumura, Yokohama, Hajime Kamachi,  
Yokohama, Japani-Japan(JP)

(74) Oy Kolster Ab

(54) Menetelmä bakteerinvastaisten 7-(o-aminometyylifenyyli-asetamido- ja  
-propionamido)-3-(tetratsolo[4,5-b]pyridatsin-6-yyliotiometyyli)-3-kefem-  
4-karboksyylihappojen valmistamiseksi - Förfarande för framställning av  
antibakteriella 7-(o-aminometyylifenyl-acetamido- och -propionamido)-3-  
(tetratsolo[4,5-b]pyridazin-6-yltiometyl)-3-cefem-4-karboksylysyror

Tämä keksintö koskee menetelmää 7-(o-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(tet-  
ratsolo[4,5-b]pyridatsin-6-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihapon ja 7-(o-  
aminometyylifenyylipropioniamido)-3-(tetratsolo[4,5-b]pyridatsin-6-yyliotiometyyli)-  
3-kefem-4-karboksyylihapon valmistamiseksi, joilla on kaava



I

jossa n on 1 tai 2 ja näiden happojen dimetaanisulfonaattijohdannaisten ja niiden  
myrkyttömien farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi.

Keksinnön mukaisesti valmistettujen uusien yhdisteiden on havaittu olevan  
arvokkaita bakteereja tappavia aineita, ravintolisäaineita eläinrehuihin, utaretu-  
lehduksen hoitoaineita nautakarjalla ja terapeuttisia aineita siipikarjalla ja muilla  
eläimillä, ihminen mukaanluettuna, hoidettaessa monien gram-positiivisten ja gram-  
negatiivisten bakteerien aiheuttamia tarttuvia tauteja.

On olemassa runsaasti kirjallisuutta, joka käsittelee kefalosporiiniantibiootteja. Tärkeimmät tämän alan aikaisemmat tiedot esitetään alla: 7-fenyyliaasetamidokefalosporaanihappo, josta käytetään myös nimityksiä 7-ACA:n N-fenyyliaesityylijohtannainen, kefaloram, PACA ja ilmeisesti myös fenasporiini tunnetaan hyvin tieteellisestä kirjallisuudesta. Valmistusta ja/tai ominaisuuksia koskevia julkaisuja tästä yhdisteestä benseenirenkaassa olevine substituenteineen tai ilman niitä ja vastaavista yhdisteistä, joissa 3-asetoksimetyyliryhmä on korvattu metyyli-, hydroksimetyyli- ja/tai pyridiniummetyyli-ryhmällä, ovat seuraavat:

Chauvette, R.R., et al. "Chemistry of Cephalosporin Antibiotics II.

Preparation of a New Class of Antibiotics and the Relation of Structure To Activity", Journal of the American Chemical Society, 84 3401-4302 (1962).

Chauvette, R.R., et al. "Structure-Activity of Relationships Among 7-Acylamidocephalosporanic Acids", Antimicrobial Agents and Chemotherapy -1962, 687-694.

Cocker, J.D. et al., "Cephalosporanic Acids, Part II. Displacement of the Acetoxy-group by Nucleophiles", Journal of the Chemical Society, 5015-5031 (1965).

Cocker, J.D., et al., "Cephalosporanic Acids, Part IV. 7-acylamidoceph-2-em-4-carboxylic Acids", Journal of the Chemical Society, 1142-1151 (1966).

Culp, H.W., et al., "Metabolism and Absorption of the 7-(Phenylacetamido-1-C<sup>14</sup>)-cephalosporanic Acid", Antimicrobial Agents and Chemotherapy - 1963, 243-246.

Jago, M., "Antibacterial Activity of Some Derivatives of 7-Aminocephalosporanic acid Against Staphylococcus Auereus and Synergism Between these and Other Antibiotics", Britt. J. Pharmacol., 22, 22-23 (1964).

Loder, B., et al., "The Cephalosporin C Nucleus (7-aminocephalosporanic Acid) and some of its Derivates", Biochemical Journal, 79, 408-416 (1961).

Nishida, M., et al., "Studies on Microbial Degradation of Cephalosporin C Derivatives II", The Journal of Antibiotics, 21, 375-478 (1968).

Nishida, M., et al., "Studies of Microbial Degradation of Cephalosporin C Derivatives I.", The Journal of Antibiotics, 21, 165-169 (1968).

Spencer, J.L., et al., "Chemistry of Cephalosporin Antibiotics VIII. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Cephaloridine Analogues", Antimicrobial Agents and Chemotherapy - 1966, 573-580.

Stedman, R.J., et al., "7-aminodesacetoccephalosporanic Acid and its Derivates", J. Med. Chem., 7 (1), 117-119 (1964).

Sullivan, H.R., et al., "Metabolism of Oral Cephalothin and Related Cephalosporins in the Rat", Biochemical Journal, 102, 976-982 (1967).

Vymola, F., et al., "The Classification and Characteristics of Cephalosporin Antibiotics I. Systematic Study of the Quantitative Sensitivity of Some Pathogenic Microorganisms to Cephaloridine", Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology, 10, 180-189 (1966).

Monista muista 7-aminokefalosporaanihapon 7-asyylijohtannaisista on ilmoitettu patenttikirjallisuudessa mukaanluettuna 7-(4-( $\alpha$ -aminoalkyyli)fenyyliasetamido)kefalosporaanihapot (amerikkalainen patentti n:o 3,382,241). 7-(p-aminofenyyli)asetamido)kefalosporaanihappo (amerikkalainen patentti n:o 3,422,100), 7-(halofenyyli)asetamido)kefalosporaanihapot (amerikkalainen patentti n:o 3,335,136) ja sellaisten yhdisteiden lähes rajoittamaton lukumäärä muunnelmia, jotka sisältyvät yleiseen kaavaan (ja jota ei usein muulla tavoin kuvatakaan), joka on esitetty sellaisissa patenteissa kuin hollantilainen patentti 69/02013 (Farmdoc 39,172). 7-(p-aminofenyyli)asetamido)kefalosporaanihappo paljastetaan amerikkalaisessa patentissa n:o 3,422,103 samoin kuin vastaava N-trityylijohtannainen (katso myös japanilainen patentti n:o 2712/67) (Farmdoc 25,406).

Amerikkalainen patentti n:o 3,219,662 sisältää patenttivaatimukset yhdisteistä, joilla on rakenne  $R-CH_2-CO-ACA$ , jossa R on fenyyli-, nitrofenyyli- (erityisesti para-nitro), kloorifenyyli-, alkyyli- ja alkoksifenyyli-ryhmä, ja vastaavista fenoksi- ja substituoiduista yhdisteistä ja kaikkia näitä vastaavista yhdisteistä, joissa 3-asetoksimetyyli-ryhmä on korvattu 3-pyridiniummetyyli-ryhmällä. Tällaisten yhdisteiden laajempaa ryhmää, johon kuuluu sarja, jossa R on fenyyli-ryhmä, ja myös yhdisteet, joissa R on bentsyyli-ryhmä (so. 7-( $\beta$ -fenyylipropionamido)kefalosporaanihappo), alkoksibentsyyli-, alkanoyylioksibentsyyli-, aminobentsyyli-ryhmä jne. esitetään käytettäväksi ainakin yleisluontoisesti lähtöaineina englantilaisissa patenteissa n:o 1,012,943; ja 1,153,421 (Farmdoc 23,984), katso myös englantilainen patentti n:o 1,001,478 ja amerikkalainen patentti n:o 3,280,118. Muita 7-fenyyliasetamidokefalosporaanihappoja, joiden bentseenirenkaassa on substituenteja, kuten hydroksi- ja aminoryhmiä, paljastetaan lähtöaineina englantilaisissa patenteissa n:o 1,082,943 ja 1,082,962.

Amerikkalainen patentti n:o 3,341,531 kuvaa 7-(o-, m- ja p-karboksiamidometyyli)fenyyliasetamido)kefalosporaanihappoja ja niiden betaineja. Joukko 7-(halo-, dihalo-, nitro- ja halonitrofenyyli)asetamido)kefalosporaanihappoja mainitaan lähtöaineina reaktioon tiettyjen nukleofiilien kanssa

amerikkalaisessa patentissa n:o 3,431,259 (Farmdoc 27,715). Muita 7-(fenyyliaasetamido)kefalosporaanihappoja, joiden bentseenirenkaassa on erilaisia substituentteja, paljastetaan japanilaisessa patentissa n:o 2712/67 (Farmdoc 25,406), japanilaisessa patentissa n:o 26105/69 (Farmdoc 40,860), englantilaisessa patentissa n:o 1,178,471 (Farmdoc 27,715, katso hollantilainen patentti 67/00906) ja japanilaisessa patentissa n:o 25785/69 (Farmdoc 40,847).

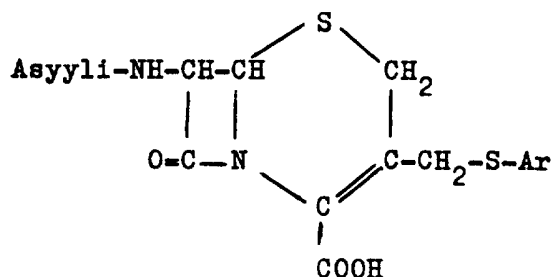
Kefalosporiinin 3-asetoksiryhmän korvaamista erilaisilla heterosyklisillä tioleilla on kuvattu

a) eteläafrikkalaisessa patentissa 70/2290 (katso myös hollantilainen patentti 70/05519 (Farmdoc 80,188 R)), jossa sivuketjut olivat esim. 7- $\alpha$ -aminofenyyliaasetamidoryhmiä ja tyypillisiä heterosyklisiä tioleja olivat 2-metyyli-1,3,4-tiadiatsoli-5-tioli- ja 1-metyyli-1,2,3,4-tetratsoli-5-tioli; ja

b) amerikkalaisessa patentissa 3,516,997, jossa 7-asemassa olevilla sivuketjuilla oli rakenne, kuten  $R^3$ -(alk)<sub>m</sub>-CO-NH- ja  $R^3$ -S-(alk)<sub>m</sub>-CO-NH-, joissa  $R^3$  oli yksi monista aromaattisista heterosyklisistä ryhmistä, ja 3-asemassa olevia lukuisia heterosyklisiä tioleja olivat esim., 1-metyylitetratsoli-5-tioli ja 2-metyyli-1,3,4-tiadiatsoli-5-tioli ja

c) amerikkalaisessa patentissa 3,563,983.

Eri kefalosporiinien, kefalosporiini C sattumalta mukaanluettuna, on annettu reagoida nukleofiilisten, aromaattisten merkaptaanien kanssa yhdisteiden valmistamiseksi, joilla on rakenne

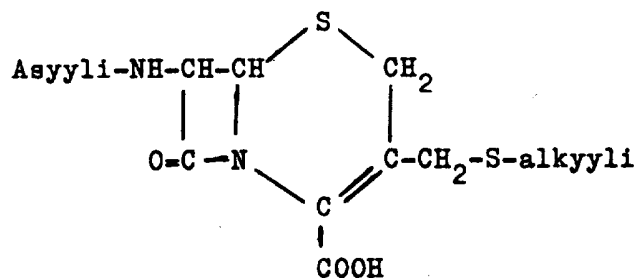


Amerikkalaisessa patentissa n:o 3,278,531 Ar on fenyyliryhmä tai tietty substituoitu fenyyliryhmä tai tietty aromaattinen, heterosyklinen rengas, joita on nimitetty esim. palstalla 5. Samantapaisia nukleofiilejä, esim. 2-merkaptopyrinidiinejä, on esitetty amerikkalaisissa patenteissa n:o 3,261,832; 3,479,350 ja 3,502,665 ja englantilaisessa patentissa 1,101,422, kaikki julkaistu Glaxo'n nimissä. Samankaltainen esitys on löydettävissä Ciba'n nimissä julkaistusta englantilaisesta patentista 1,109,525 esim.

ryhmää  $R_3$  tarkoittavasta kohdasta "h". Lisää tämän tyyppisiä nukleofiilejä esitti Fujisawa belgialaisessa patentissa 714,518 (Farmdoc 35,307; hollantilainen patentti 68/06129 ja eteläafrikkalainen patentti 2695/68), kanadalaisessa patentissa 818,501 (Farmdoc 38,845), englantilaisessa patentissa 1,187,323 (Farmdoc 31,936; hollantilainen patentti 67/14888) ja erityisesti amerikkalaisessa patentissa 3,516,997 (Farmdoc 34,328; hollantilainen patentti 68/05179), joka käsittää yhdisteen nimeltä kefatsoliini, jonka 7-aminoryhmässä on tetratsolyyliasetyyylisivuketju ja 3-asemassa 5-metyylitiadiatsolyylitiometyyliryhmä, ja jota kuvataan jossain määrin tieteellisessä kirjallisuudessa, esim. julkaisussa Antimicrobial Agents and Chemotherapy-1969, American Society for Microbiology, Bethesda, Maryland, sivuilla 236-243 ja julkaisussa J. Antibiotics (Japani) 23 (3), 131-148 (1970).

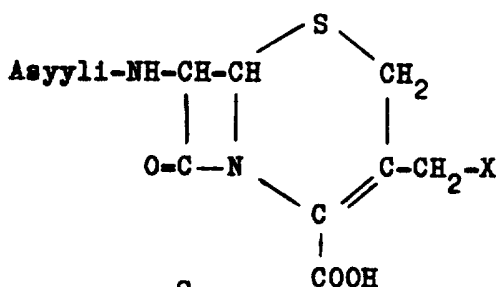
Aivan viime aikoina on kefalosporiinin 3-asetoksiryhmän korvaamista erilaisilla heterosyklisillä tioleilla esitetty amerikkalaisessa patentissa 3,563,983 ja hollantilaisessa patentissa 70/05519 (Farmdoc 80,188 R) joissa sivuketjut olivat esim. 7- $\alpha$ -aminofenyliasetamidoryhmiä ja tyypillisiä heterosyklisiä tioleja olivat 2-metyyli-1,3,4-tiadiatsoli-5-tioli ja 1-metyyli-1,2,3,4-tetratsoli-5-tioli; viimemainittu vastaa amerikkalaista patenttia 3,641,021 julkaistu 8. helmikuuta 1972 hakemuksen perusteella, joka on jätetty 18. huhtikuuta 1969. Muita samantapaisia esityksiä on löydettävissä amerikkalaisesta patentista n:o 3,563,983, belgialaisesta patentista n:o 771,189 (Farmdoc 12,817 T), japanilaisesta patentista 72/05550 (Farmdoc 12,921 T) ja japanilaisesta patentista 72/0551 (Farmdoc 12,922 T).

Erilaisia kefalosporiineja, joilla on rakenne



jossa asyyli edustaa erilaisia sivuketjuja  $\alpha$ -aminofenyliasetyyyliryhmä mukaanluettuna, on kuvattu joissakin ylläolevissa patenteissa ja Glaxo'n belgialaisessa patentissa 734,532 (Farmdoc 41,619) ja belgialaisessa patentissa 734,533 (Farmdoc 41,620) ja amerikkalaisessa patentissa 3,668,203.

Kefalosporiineja, joilla on rakenne



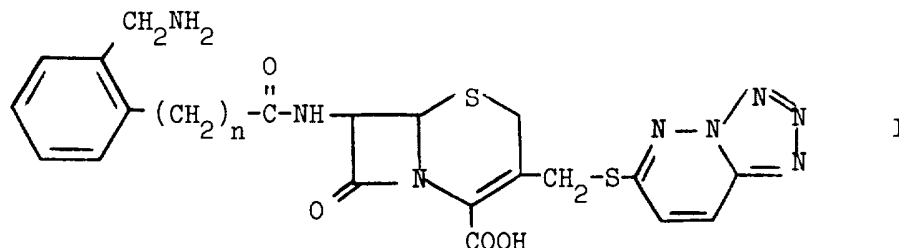
jossa X käsittää ryhmät  $-\overset{\text{S}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-$  ja  $-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-$  on esitetty joissakin yllä olevissa patentissa ja amerikkalaisissa patentissa 3,239,515; 3,239,516; 3,243,435; 3,258,461; 3,431,259 ja 3,431,259 ja 3,446,803.

Asiaan liittyviä julkaisuja tieteellisessä kirjallisuudessa ovat J. Med. Chem. 8, 174-181 (1965) ja J. Chem. Soc. (Lontoo) 1595-1605 (1965), 5015-5031 (1965) ja 1959-1963 (1967).

6-merkaptotetratsolo (4,5-b)pyridatsiinia kuvasivat B. Stanovnik et al., J. Org. Chem. 35(4), 1138-1141 (1970) yhdisteenä 8 (R=H) nimellä 6-merkaptotetratsolo(1,5-b)pyridatsiini.

Kirjallisuudessa on erilaisia esityksiä antibioottien metaanisulfo-naateista. Niinpä belgialaisessa patentissa 742,728 (Farmdoc 41466 R) kuvataan ampisilliinin monometaanisulfonaattia. Amerikkalaiset patentit 3,268,508 ja 3,295,246 kuvaavat yhden tai useamman kanamysiinin neljästä vapaasta aminohaposta muuttamista metaanisulfonaattijohdannaiseksi. Natriumbasitrasiin metaanisulfonaatti paljastetaan amerikkalaisessa patentissa 3,205,137 ja neomysiinin suhteen katso J. Antibiotics (Japani) 12, 114-115 (1959). Ruiskeena annettava antibiootti kolistimetaani (Warner-Chilcott markkinoi nimellä "Coly-Mycin") on kolistiinin metaanisulfonaatin natriumsuola; Merck Index mainitsee esimerkkinä Koyama et al., Japan 4898 (1957). Kolistimetaanista esitetään yksityiskohtainen katsaus sivuilla 315-320 julkaisussa U.S. Dispensatory 26th Edition, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, Penns. Sitä kuvataan Colistin A-valmisteen penta(metaanisulfonihappo)johdannaisen pentanatriumsuolana sivuilla 621-622 julkaisussa U.S.P. XVII. Amerikkalainen patentti 2,599, 950 paljastaa esimerkissä VIII "polymyksiini-formaldehydinaatriumbisulfiittiyhdisteen". Katso myös englantilaiset patentit 874,028; 902,992 ja 896,774 ja japanilainen patentti 15948/61.

Keksinnön kohteena on menetelmä bakteerinvastaisten 7(o-aminometyylifenyyli-asetamido- ja -propionamido)-3-(tetratsolo [4,5-b] pyridatsin-6-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappojen valmistamiseksi, joilla on kaava



jossa n on 1 tai 2 ja niiden myrkyttömien, farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi.

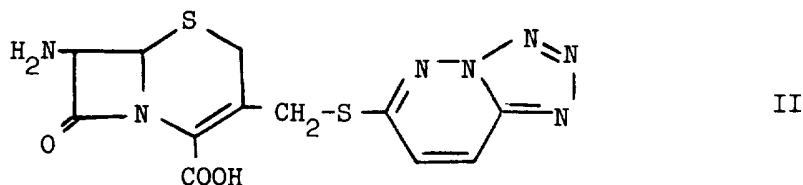
Myrkyttömiä farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja, joihin yllä viitattiin, ovat myrkyttömät karboksyylihapposuolat, esim. myrkyttömät metallisuolat, kuten natrium-, kalium-, kalsium- ja alumiinisuolat, ammoniumsuola ja substituoidut ammoniumsuolat, esim. sellaisten amiinien kuin trialkyyliamiinien suolat trietyyliamiini mukaanluettuna, prokaiinin, dibentsyyliamiinin, N-bentsyylibeta-fenetyyliamiinin, 1-efenamiinin, N,N'-dibentsyylietyleenidiamiinin, dehydroabietyyliamiinin, N,N'-bis-dehydroabietylietyleenidiamiinin, N-(alempi)-alkyyli-piperidiinin, kuten N-etyyli-piperidiinin ja muiden sellaisten amiinien suolat, joita on käytetty muodostamaan suoloja bentsyyli-penisilliinin kanssa; ja niiden (so. amiinisuolojen) myrkyttömät happolisäyssi-suolat mukaanlukien mineraalihappolisäyssi-suolat, kuten hydrokloridi, hydrobromidi, hydrojodidi, sulfaatti, sulfamaatti ja fosfaatti ja orgaaniset happolisäyssi-suolat, kuten maleaatti, aseaatti, sitraatti, oksalaatti, sukkiniaatti, bensoaatti, tartraatti, fumaraatti, malaatti, mandelaatti, askorbaatti jne.

E erityisen suositeltavia kaavan I mukaisten yhdisteiden suoloja ovat dimeetaanisulfonaatin natriumsuolat. Nämä suolat ovat vesiliukoisina erityisen hyödyllisiä ruiskeena käytettävien valmisteiden valmistuksessa.

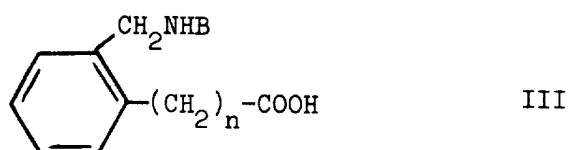
Kaavan I mukaisten yhdisteiden välituotteita tai aineenvaihdunnallisia edeltäjäyhdisteitä ovat yhdisteet, joissa aminoryhmä on "suojattu" sellaisilla substituenteilla kuin t-butoksikarbonyyli-, karbobentsyylioksi-, formyyli-, o-nitrofenyyli-sulfenyyli-,  $\alpha, \beta, \beta$ -trikloorietoksikarbonyyli-, 4-okso-2-pentenyyli-2-, 1-karboetoksi-1-propenyyli-2-ryhmällä jne. Tällaisiin suojaaviin ryhmiin kuuluvat erityisesti ketonit (erityisesti asetoni) ja aldehydit (erityisesti formaldehydi ja asetaldehydi), jotka on esitetty esim. US-patenteissa 3 198 804 ja 3 347 851 ja

$\beta$ -ketoesterit ja  $\beta$ -diketonit, jotka on esitetty esim. US-patentissa 3 325 479 ja  $\beta$ -ketoamidit (JA-patentti 71/24714).

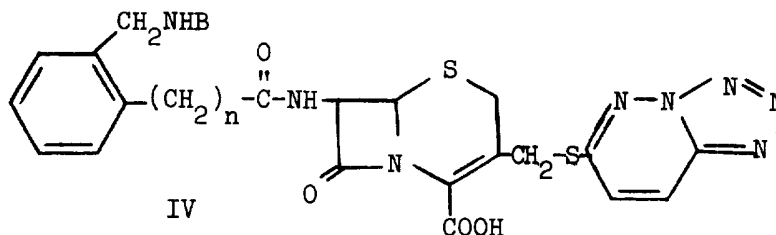
Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista, että yhdiste, jolla on kaava



tai sen suola saatetaan reagoimaan reaktiivisen happojohdannaisen kanssa, jolla hapolla on kaava



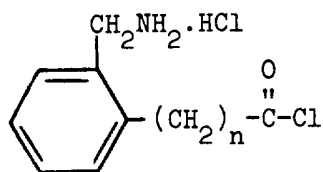
jossa B on aminoryhmää suojaava ryhmä ja n on sama kuin yllä, yhdisteen valmistamiseksi, jolla on kaava



jossa B ja n ovat samoja kuin yllä tai sen suolan valmistamiseksi, ja sen jälkeen poistetaan aminoryhmää suojaava ryhmä B halutun kaavan I mukaisen yhdisteen tai sen myrkyttömän, farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan valmistamiseksi.

Tämän keksinnön amfoteeriset yhdisteet valmistetaan liittämällä kaavalla II määriteltäyn 7-amino-3-(tetratsolo [4,5-b] pyridatsin-6-yyliotiometryyli)-3-kefem-4-karboksyylihappoon kaavan III mukainen happo tai reaktiokyvyltään sitä vastaava yhdiste primaarista aminoryhmää asyloivana aineena. Liittämisen jälkeen aminoryhmää suojaava ryhmä B poistetaan halutun tuotteen aikaansaamiseksi. Kaavassa III B esittää sen tyyppistä suojaavaa ryhmää, jota käytetään joko peptidisynteesissä tai jossakin lukuisista ampisilliinin tai kefaloglysiinin tai kefaleksiinin synteesistä, joissa lähdetään 2-fenyyliiglysiinistä. Erityisen arvokkaita suojaavia ryhmiä ovat protoni, kuten yhdisteessä, jolla on kaava





tai  $\beta$ -diketoni tai  $\beta$ -ketoesteri kuten englantilaisessa patentissa 1 123 333 ja amerikkalaisissa patenteissa 3 325 479 ja 3 316 247, esim. metyyliasetoasetaatti tai  $\beta$ -ketoamidi kuten japanilaisessa patentissa 71/24714 (Farmdoc 47 321 S), jossa tapauksessa suojatun aminoryhmän sisältävä happo konvertoidaan mieluummin anhydridiseokseksi esim. etyyliklooriformiaatin kanssa ennenkuin sen annetaan reagoida yhdisteen II tai sen suolan kanssa halutun tuotteen I muodostamiseksi sen jälkeen, kun suojaava ryhmä on poistettu.

Jatkona yllä olevalle niistä suojaavia ryhmiä koskevalle esitykselle, joita käytetään sivuketjuhapon vapaassa aminoryhmässä sen yhdisteeseen II liittämisen aikana, suojaava ryhmä poistetaan sitten tämän keksinnön tuotteiden muodostamiseksi, esim. t-butoksikarbonyyliryhmä voidaan poistaa käsittelemällä sitä muurahaishapolla tai trifluorietikkahapolla, karbobentsyylioksi-ryhmä voidaan poistaa katalyyttisellä hydruksella, 2-hydroksi-1-naftkarbonyyliryhmä voidaan poistaa happohydrolyyysillä, trikloorietoksikarbonyyliryhmä voidaan poistaa käsittelemällä sitä sinkkipölyllä jäätikassa ja 1-karboetoksi-1-propenyyl-2-ryhmä poistetaan mieluummin käsittelemällä sitä muurahaishapolla. On selvää, että muitakin reaktiokyvyltään vastaavia aminoryhmää suojaavia ryhmiä voidaan käyttää ja tällaisten ryhmien katsotaan kuuluvan tämän keksinnön suojapiiriin.

Niinpä mitä tulee kaavan III happoon, jota on tarkoitus käyttää liittämiseen yhdisteeseen II, reaktiokyvyltään vastaavia yhdisteitä ovat vastaavat happoanhydritit, mukaanluettuna seosanhydritit ja erityisesti ne seosanhydritit, jotka on valmistettu vahvemmista hapoista, kuten karboksyylihapon tai alkyyl- ja

aryylisulfonihappojen ja steerisesti estetympien happojen, kuten difenyylietikka-hapon alemmat alifaattiset monoesterit. Lisäksi voidaan käyttää happoatsidia tai aktiivista esteriä tai tioesteriä (esim. p-nitrofenyylin, 2,4-dinitrofenolin, tiofenolin tai tioetikkahapon kanssa) tai itse vapaa happo voidaan liittää yhdisteeseen II, kun sanotun vapaan hapon on ensin annettu reagoida N,N'-dimetyyli-klooriforminiumkloridin kanssa (vrt. englantilainen patentti 1 008 170 ja Novak ja Weichet, *Experientia* XXI, 6, 360 (1965)) tai käyttäen entsyymejä tai N,N'-karbonyylidi-imidatsolia tai N,N'-karbonyyliditriatsolia (vrt. eteläafrikkalainen patentti 63/2684) tai karbodi-imidireagenssia (erityisesti N,N'-disykloheksyyli-karbodi-imidiä, N,N'-di-isopropyylikarbodi-imidiä tai N-sykloheksyyli-N'-(2-morfolinoetyyli)-karbodi-imidiä; vrt. Sheehan ja Hess. *J. Amer. Chem. Soc.*, 77, 1067 (1955)) tai alkylyyliamiinireagenssia (vrt. R. Buijle ja H.G. Viehe, *Angew. Chem. International Edition* 3, 582, (1964)) tai isoksatsoliumsuolareagenssia (vrt. R.B. Woodward, R.A. Olofson ja H. Mayer, *J. Amer. Chem. Soc.*, 83, 1010 (1961)) tai keteeni-imiinireagenssia (vrt. C.L. Stevens ja M.E. Mond, *J. Amer. Chem. Soc.*, 80 (4065)).

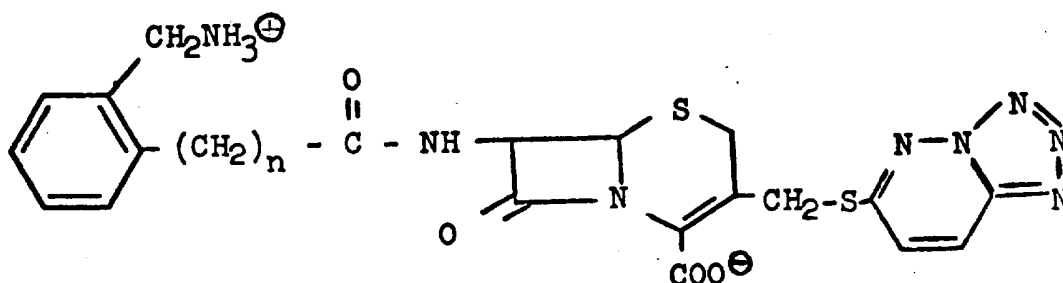
Toinen happokloridia vastaava yhdiste on vastaava atsolidi, so. vastaavan hapon amidi, jonka amidityppi on jäsen puoliaromaattisessa, viisijäsenisessä renkaassa, joka sisältää vähintään kaksi typpiatomia, so. imidatsoli, pyratsoli, triatsolit, bensimidatsoli, bensotriatsoli ja niiden substituoidut johdannaiset. Esimerkkinä atsolidin yleisestä valmistusmenetelmästä N,N'-karbonyylidi-imidatsolin annetaan reagoida karboksyylihapon kanssa ekvimolaarisissa suhteissa huoneenlämpötilassa tetrahydrofuraanissa, kloroformissa dimetyyliformamidissa tai vastavassa inertissä liuottimessa karboksyylihappoimidatsolidin muodostamiseksi käytännöllisesti katsoen kvantitatiivisella saannolla, jolloin vapautuu hiilidioksidia ja yksi mooli imidatsolia. Dikarboksyylihapoista saadaan di-imidatsolidia. Sivuu-

turte imidatsoli saostuu ja voidaan erottaa ja imidatsolidi eristää, mutta tämä ei ole välttämätöntä.

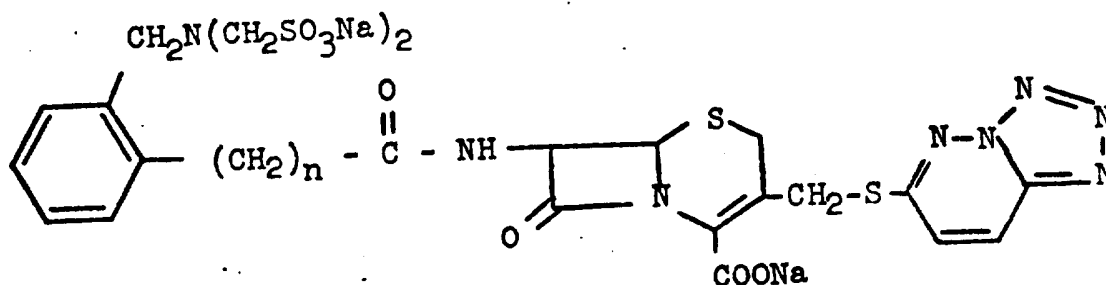
Menetelmät näiden reaktioiden suorittamiseksi kefalosporiinin valmistamiseksi ja näin saadun kefalosporiinin eristämisessä käytetyt menetelmät ovat alalla hyvin tunnettuja.

Yllä mainittiin entsyymien käytöstä vapaan hapon liittämiseksi suojattuine aminoryhmineen yhdisteeseen II. Tällaisten menetelmien piiriin kuuluu tämän vapaan hapon esterin, esim. metyyliesterin käyttö eri mikro-organismien tuottamien entsyymien kanssa, kuten niiden, joita ovat kuvanneet T. Takahashi et al., J. Amer. Chem. Soc., 94(11), 4035-4037 (1972) ja T. Nara et al., J. Antibiotics (Japani) 24(5), 321-323 (1971).

Kun yllä kuvatut liittämisen- ja suojauksen poistoreaktiot on saatu päätökseen, voidaan kahtaisionituotteet, joilla on kaava



haluttaessa konvertoida dimetaanisulfonaattinatriumsuoloiseen, joilla on kaava

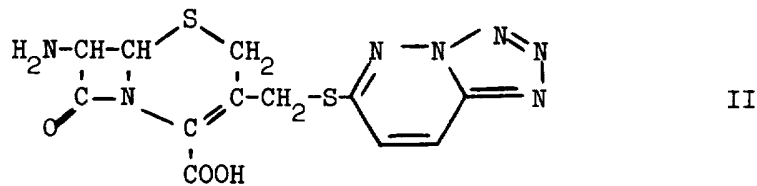


Kahtaisionisen kefalosporaanihapon konversio dimetaanisulfonaattijohdannaisiksi voidaan suorittaa alalla tunnetuilla menetelmillä. Suositeltavassa menetelmässä annetaan kahtaisionin reagoida natriumformaldehydibisulfiitin (tai sen lähteen, kuten esim. natriumbisulfiitin ja formaliinin) ja veden kanssa vahvan natriumemäksen, esim. natrium-2-etyyliheksanoatin läsnäollessa. Yllä oleva seos lämmitetään huoneenlämpötilan yläpuolelle, esim. yli n. 40°C:n ja mieluummin välille 40-45°C lyhyeksi ajaksi, kunnes muodostuu halutun tuotteen liuos. Tuote otetaan talteen kiinteänä aineena saostamalla esim. lisäämällä vesiliukoista, olennaisesti vedetöntä liuotinta, joka on mieluummin alkoholi, kuten etanoli tai isopropanoli. Vaihtoehtoisesti voidaan kah-

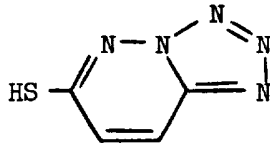
taisioniset tuotteet konvertoida vanhastaan tunnetuilla menetelmillä myrkyttömiksi, farmaseuttisesti hyväksyttäviksi suoloiksi.

Alaan perehtyneille on ilmeistä, että kaavan I mukaiset yhdisteet voidaan vaihtoehtoisesti valmistaa ensin asyloimalla 7-aminokefalosporaanihappoa tai sen suolaa halutulla 7-sivuketjuhapolla tai reaktiokyvyltään sitä vastaavalla aineella ja korvaamalla sen jälkeen 3-asetoksiryhmä 6-merkaptotetratsolo[4,5-b]pyridatsiiniryhmällä halutun tuotteen saamiseksi.

Lähtöaineena käytetty 7-amino-3-(tetratsolo[4,5-b]pyridatsin-6-yyliitiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappo, jolla on kaava II



tai sen suola voidaan valmistaa saattamalla 7-aminokefalosporaanihappo tai sen suola reagoimaan tiolin kanssa, jolla on kaava



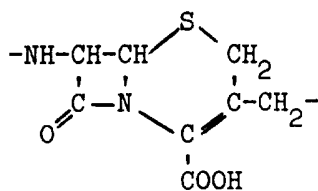
tai sen suolan, edullisesti natrium- tai kaliumsuolan kanssa,

7-aminokefalosporaanihapon esteriryhmän, esim. 3-asetoksiryhmän korvaaminen tioliryhmällä on hyvin tunnettu reaktio ja se voidaan toteuttaa vesiliuoksessa laimean emäksen kuten natriumbikarbonaatin läsnäollessa. Reaktio suoritetaan mieluummin edullisesti noin 50-100°C:ssa.

7-amino-3-(tetratsolo[4,5-b]pyridatsin-6-yyliitiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappo on hyödyllinen välituote valmistettaessa kaavan I mukaisia yhdisteitä.

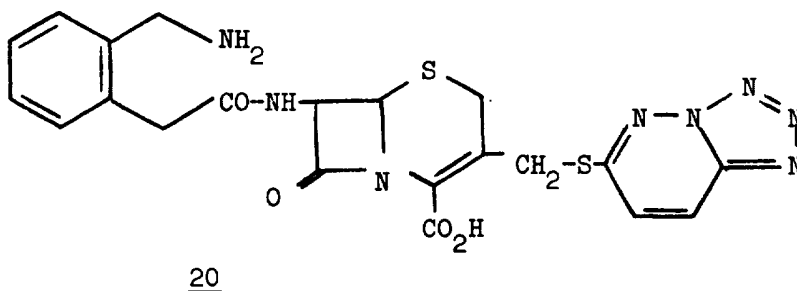
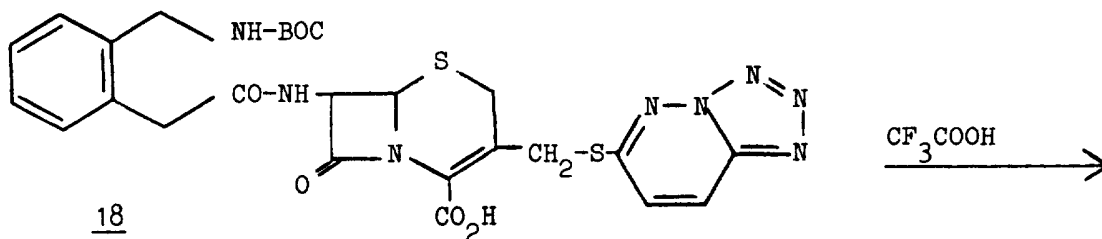
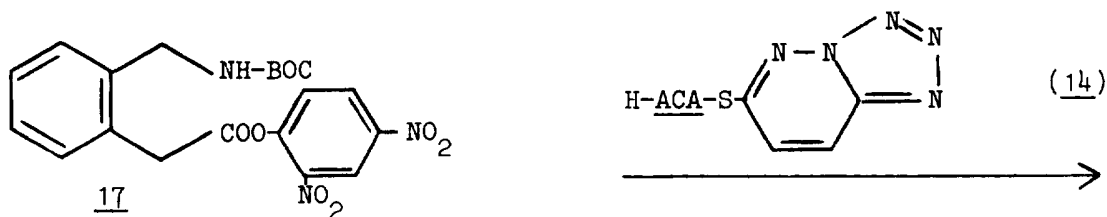
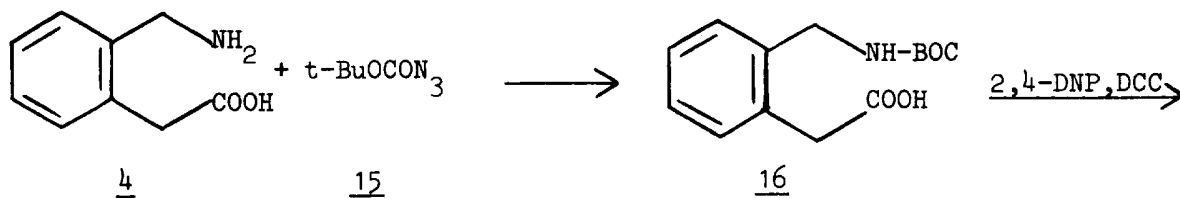
Hoidettaessa bakteeritartuntoja ihmisillä keksinnön mukaisesti valmistettuja yhdisteitä annetaan parenteraalisti noin 5-200 mg/kg/päivä, edullisesti noin 5-20 mg/kg/päivä jaettuina annoksina, esim. kolme tai neljä kertaa päivässä. Niitä annetaan annostusyksikköinä, jotka sisältävät esim. 125, 250 tai 500 mg aktiivista aineosaa sopivien fysiologisesti hyväksyttävien kantoaineiden tai laimentimien kanssa. Annostusyksiköt ovat nestemäisten valmisteiden kuten liuosten tai suspensioiden muodossa.

Seuraavat esimerkit valaisevat keksinnön mukaista menetelmää. Kaikki lämpötilat ovat Celsius-asteina. 7-amino-kefalosporaanihappo lyhennetään merkinnällä 7-ACA; -ACA-esittää radikaalia, jolla on rakenne

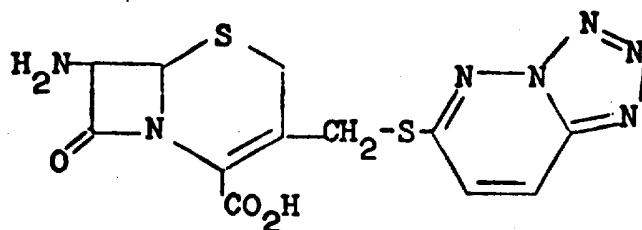
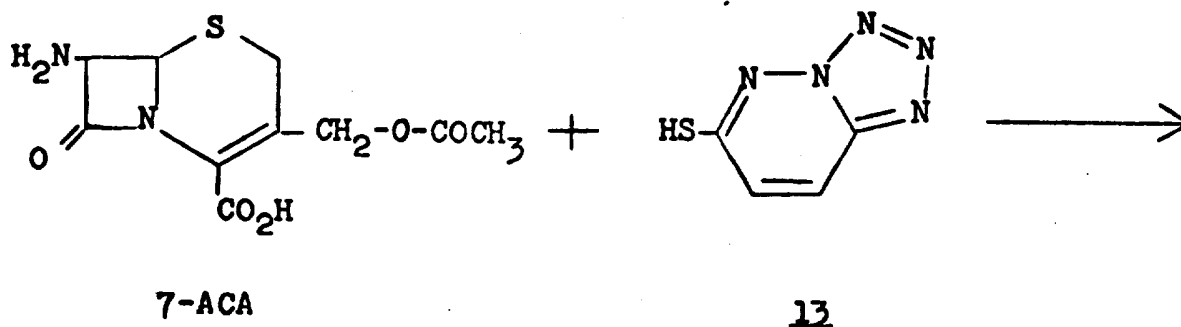


ja näin ollen 7-ACA-yhdistettä voidaan esittää kaavalla  $\text{H-ACA-O-C(=O)-CH}_3$ .

Esimerkki 1



7-amino-3-(tetratsolo-(4,5-b)pyridatsin-6-yyliotiometryli)-3-kefem-4-karboksylihappo



14

7-amino-3-(tetratsolo-(4,5-b)pyridatsin-6-yyliotiometryli)-3-kefem-4-karboksylihappo (14)

i) Kuumaan liuokseen (50-60°C), jossa oli 9,56 g (0,062 moolia) tuotetta 13 ja 10,42 g (0,124 moolia) natriumbikarbonaattia 300 ml:ssa vettä, lisättiin varovaisesti 16,86 g (0,062 moolia) 7-ACA:a ja seosta pidettiin 80-85°C:ssa 30 min. Reaktioseokseen lisättiin noin 7 g natriumbikarbonaattia liukeneettoman aineen liuottamiseksi. Liuosta käsiteltiin aktiivihieillä, suodatettiin ja suodos hapotettiin pH-arvoon 5 laimealla kloorivetyhapolla. Sakka otettiin talteen suodattamalla, pestiin vedellä, kuivattiin ilmalla ja lopuksi tyhjössä P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:n avulla, jolloin saatiin 14,47 g (64 %) tuotetta 14. Sp. 248-250°C (hajoaa).

ii) Sekoitettua liuosta, jossa oli 16,8 g (0,11 moolia) tuotetta 13 ja 18,48 g (0,22 moolia) NaHCO<sub>3</sub>:a 1 l:ssa 0,1-M fosfaattipuskuria (pH 6,4), pidettiin 50°C:ssa ja liuokseen lisättiin annoksittain 30 g (0,11 moolia) 7-ACA:a. Seosta pidettiin 80°C:ssa 2,5 tuntia, jona aikana liukeneeton aine

säilyi tallella. Reaktioseos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja saostettu tuote 14 otettiin talteen suodattamalla, pestiin perusteellisesti 200 ml:lla vettä ja kuivattiin ilmalla.

Lisää tuotetta 14 saatiin suodoksesta ja pesuliukoista hapottamalla ne pH-arvoon 5 laimealla HCl:lla. Kokonaissaalis 32,9 g (83 %). Sp. 245-250°C (hajoaa).

IR:  $\gamma_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  1800, 1615, 1538, 1360  $\text{cm}^{-1}$ .

UV:  $\gamma_{\text{max}}^1$  %  $\text{NaHCO}_3$  237 nm ( $\epsilon$  19500), 275 nm ( $\epsilon$  12000), 310 nm(sh) ( $\epsilon$  5700).

NMR:  $\delta$   $\text{D}_2\text{O} + \text{K}_2\text{CO}_3$  3,35 (1H, d, 18 Hz, 2-H), 3,76, (1H, d, 18 Hz, 2-H),  
ppm  
4,00 (1H, d, 10 Hz, 3- $\text{CH}_2$ ), 4,48 (1H, d, 10 Hz, 3- $\text{CH}_2$ ), 4,93 (1H, d, 4 Hz, 6-H), 5,32 (1H, d, 4 Hz, 7-H), 7,46 (1H, d, 10 Hz, pyridatsiini-H), 8,18 (1H, d, 10 Hz, pyridatsiini-H).

Laskemalla kaavasta:  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_7\text{O}_3\text{S}_2$ : C, 39,44; H, 3,03; N, 26,83; S, 17,55  
Kokeellisesti: C, 39,19; H, 2,71; N, 26,84; S, 17,35.

#### t-butoksikarbonyyliatsidi (15)

Jäähdytettyyn liuokseen, jossa oli 100 g (0,76 moolia) t-butyyliekarbatsaattia 87 g:ssa jäätikkää ja 120 ml:ssa vettä, lisättiin tipoitain liuos, jossa oli 60 g (0,85 moolia) natriumnitriittiä 50 ml:ssa vettä 40 min. aikana samalla, kun lämpötila pidettiin 10-15°C:ssa. Lisäyksen päätyttyä sekoitusta jatkettiin vielä 30 min. samassa lämpötilassa. Seokseen lisättiin 100 ml vettä ja erottunut öljy uutettiin viidellä 100 ml:n erällä metyleenikloridia. Yhdistetyt orgaaniset uutteen pestiin 100 ml:lla 10 %:sta natriumbikarbonaattiliuosta ja 100 ml vettä peräkkäin ja kuivattiin vedettömällä natriumsulfaatilla. Metyleenikloridi poistettiin alennetussa paineessa vesihauteella, jota pidettiin 40-45°C:ssa. Jäljelle jäänyt atsidi tislattiin ja otettiin talteen 45°C:ssa ja 20 mm Hg:n paineessa. Se painoi 92,7 (84 %).

#### o-(t-butoksikarbonyyliaminometyyli)fenyylietikkahappo (16)

Liuokseen, jossa oli 70 g (0,35 moolia) o-aminometyylifenyylietikkahapon hydrokloridia (4) ja 116 g (1,15 moolia) trietyyliamiinia (TEA) 400 ml:ssa vettä, lisättiin tipoitain liuos, jossa oli 64 g (0,45 moolia) t-butoksikarbonyyliatsidia (15) 300 ml:ssa tetrahydrofuraania (THF) sekoittaen 0°C:ssa. Lisäyksen päätyttyä lämpötilan annettiin nousta huoneenlämpötilaan ja sekoitusta jatkettiin 20 tuntia. Tetrahydrofuraani tislattiin pois alle 40°C:ssa ja vesiliuos pestiin 200 ml:lla eetteriä, sen päälle kerrostettiin 200 ml

etyyliasettaattia ja hapotettiin laimealla kloorivetyhapolla pH-arvoon 3 jäähdyttämällä 0°C:een. Orgaaninen kerros erotettiin ja vesikerros uutettiin neljällä 200 ml:n erällä etyyliasettaattia. Yhdistetty etyyliasettaattiliuos pestiin 200 ml:lla vettä, kuivattiin vedettömällä natriumsulfaattilla ja väkevöitiin tyhjässä. Konsentraattia käsiteltiin 500 ml:lla n-heksaanilla, jolloin saatiin 87,9 g (95 %) tuotetta 16 värittömänä neulasina, jotka sulivat 114-116°C:ssa.

2,4-dinitrofenyyli-p-t-butoksykarbonyyliaminometyylifenyyliasettaatti  
(17)

Disykloheksyylikarbodi-imidiä (17,72 g, 0,086 moolia) (DCC) lisättiin yhtenä eränä seokseen, jossa oli o-(t-butoksykarbonyyliaminometyyli)fenyylietikkahappoa (16) (22,73 g, 0,086 moolia) ja 2,4-dinitrofenolia (15,82 g, 0,086 moolia) (2,4-DNP) 250 ml:ssa THF:a. Reaktioseosta sekoitettiin 2 tuntia huoneenlämpötilassa. Saostunut disykloheksyyliurea suodatettiin pois ja pestiin 100 ml:lla THF:a. Suodos ja pesuliuokset yhdistettiin ja väkevöitiin alipaineessa alle 50°C:ssa, jolloin saatiin viskoosi keltainen öljy, jota hierrettiin n-heksaanissa (150 ml) ja saatiin tuotetta 17 keltaisina neulasina. Saalis 34,9 (94 %). Sp. 76-77°C.

IR:  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3340, 1785, 1685, 1610, 1540, 1530, 1500, 1340  $\text{cm}^{-1}$ .

Laskemalla kaavasta  $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_8$ : C, 55,68; H, 4,91; N, 9,74

Kokeellisesti: C, 55,70; H, 5,05; N, 9,93.

7-(o-t-butoksykarbonyyliaminometyylifenyyliasetamido)-3-(tetratsolo-  
(4,5-b)-pyridatsin-6-yyliotiometri)-3-kefem-4-karboksylihappo (18)

Liukseen, jossa oli 20,26 g (0,047 moolia) tuotetta 17 150 ml:ssa tetrahydrofuraania, lisättiin yhdellä kertaa liuos, jossa oli 14,40 g (0,039 moolia) tuotetta 14 ja 19,19 g (0,19 moolia) TEA:a 150 ml:ssa tetrahydrofuraanin 50 %:sta vesiliuosta 0-5°C:ssa. Reaktioseosta sekoitettiin 18 tuntia ja väkevöitiin alipaineessa tetrahydrofuraanin poistamiseksi alle 30°C:ssa. Vesipitoinen konsentraatti pestiin kahdella 200 ml:n erällä eetteriä, hapotettiin pH-arvoon 2 laimealla kloorivetyhapolla ja uutettiin viidellä 200 ml:n erällä eetteriä, hapotettiin pH-arvoon 2 laimealla kloorivetyhapolla ja uutettiin viidellä 200 ml:n erällä etyyliasettaattia. Yhdistetyt uutteen pestiin kahdella 100 ml:n erällä vettä, kuivattiin vedettömällä natriumsulfaattilla, käsiteltiin aktiivihielellä ja suodatettiin. Haihuttamalla liuotin pois saatiin vaaleankeltainen öljy, jota hierrettiin eetterissä ja saatiin 13,89 g (58 %) tuotetta 18. Sp. 166-173°C (hajoaa).



IR:  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  1770, 1710, 1690, 1535, 1370, 1255, 1170  $\text{cm}^{-1}$ .

Analyysi laskemalla kaavasta  $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : C, 49,51; H, 4,79; N, 17,77;  
S, 10,17.

Kokeellisesti: C, 49,58; 49,65; H, 4,15; 4,59; N, 17,41; 17,66; S, 10,14.

7-(o-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)-pyridatsin-6-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappo (20)

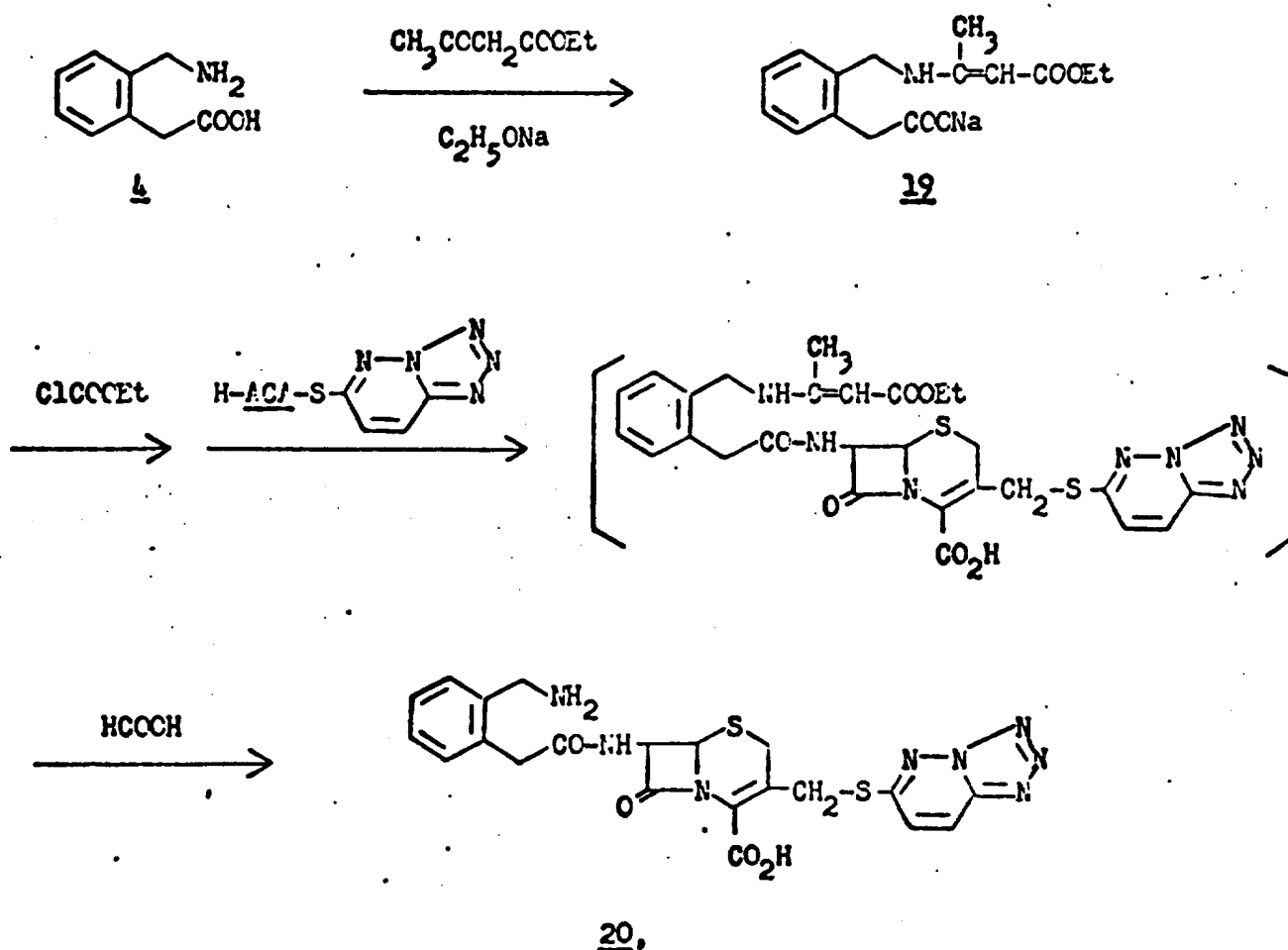
20 ml:aan trifluorietikkahappoa lisättiin yhdellä kertaa 13,80 g (0,022 moolia) tuotetta 18 ja seosta sekoitettiin 45 min.  $0,10^\circ\text{C}$ :ssa. Reaktioseokseen lisättiin 300 ml eetteriä, jolloin saatiin tuote 20 trifluoriasetaattinaan, joka otettiin talteen suodattamalla ja pestiin eetterillä. Trifluoriasetaatti liuotettiin 20 ml:aan vettä ja pH säädettiin arvoon 5 ammoniumhydroksidilla, jolloin saatiin kahtaisioni kumimaisena öljynä, joka erotettiin dekantoimalla ja hierrettiin vedellä. Kiinteä tuote otettiin talteen suodattamalla, pestiin 20 ml:lla vettä ja 200 ml:lla asetonitriiliä peräkkäin ja kuivattiin tyhjässä fosforipentoksidilla, jolloin saatiin 5,10 g (45 %) tuotetta 20, joka oli melko puhdasta, mutta amorfista.

Tuotteen 20 uudelleenkiteytys - amorfinen jauhe (3,50 g) liuotettiin 400 ml:aan tetrahydrofuraanin 50 %:sta vesiliuosta kuumentaan  $60-70^\circ\text{C}$ :een voimakkaasti sekoittaen. Liuosta käsiteltiin pienellä määrällä aktiivihiliä. Suodos jäähdytettiin, astian seinämiä raaputettiin lasisauvalla ja liuoksen annettiin seistä yli yön jääkaapissa, jolloin saaviin 2,27 g tuotetta 20 hienoina neulasina, jotka sulivat  $190-193^\circ\text{C}$ :ssa (hajoaa).

Analyysi: Laskemalla kaavasta  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_8\text{O}_4\text{S}_2 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ : C, 46,76; H, 4,30; N, 20,77; S, 11,89.

Kokeellisesti: C, 47,18; 47,37; H, 4,08; 3,88; N, 20,93; 20,23; S, 12,03.

## Esimerkki 2



Natrium-o-(1-etoksykarbonyyli-1-propen-2-yyliaminometyyli)fenyyliasettaatti (19)

Natriumetoksidin alkoholiliuokseen (metallista natriumia 5,75 g (0,25 g-atomia) ja absoluuttista etanolia 500 ml) lisättiin 41,26 g (0,25 moolia) o-aminometyylifenyylietikkahappoa (saatu neutraloimalla hydrokloridia 4 ammoniakkin vesiliuoksella) ja 32,5 g (0,25 moolia) etyyliasetoasettaattia peräkkäin. Seosta refluksoitii 6 tuntia ja käsiteltiin aktiivihiilellä ja suodatettiin piimaan ("Dicalite") läpi. Suodatinkerros pestiin 200 ml:lla kuumaa etanolia. Yhdistetyt suodos- ja pesuliuokset haihdutettiin lähes kuiviin ja jäädytettiin 0°C:een, jolloin saatiin tuotetta 19 värittöminä neulasina, jotka otettiin talteen suodattamalla, pestiin 200 ml:lla etanolia ja kuivattiin tyhjässä P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:n avulla. Kiinteä tuote 19 painoi 44,51 g. Lisää tuotetta 19 saatiin väkevöimällä emäliuos. Kokonaissaalis 56,51 g (79 %). Sp. 231-232°C (hajooa).

7-(o-aminometyylifenyyliaasetamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliotiometriyli)-3-kefem-4-karboksyylihappo (20)

Etyyliformaattia (6,87 g, 0,0063 moolia) lisättiin yhdellä kertaa sekoitettuun suspensioon, jossa oli 17,44 g (0,057 moolia) natrium-0-(1-etoksikarbonyyli-1-propen-2-yyliaminometriyli)fenyyliasettaattia (19) 200 ml:ssa kuivaa THF:a, joka sisälsi 1 ml N,N-dimetyyllibentsyyliamiinia -15°C:ssa. Sekoitus lopetettiin ja jäädytetty liuos, jossa oli 20,80 g (0,057 moolia) tuotetta 14 ja 9,60 g (0,095 moolia) trietyyliamiinia 200 ml:ssa THF:n 50 %:sta vesiliuosta, lisättiin hitaasti seinämää pitkin. Seosta sekoitettiin voimakkaasti 30 min. 0-15°C:ssa, käsiteltiin aktiivihiehillä ja suodatettiin "Dicalite"-piimaan läpi. Kerros pestiin 50 ml:lla THF:n 50 %:sta vesiliuosta, joka sisälsi 8 ml trietyyliamiinia. Muurahaishappoa (3 ml) lisättiin suodoksen ja pesuliuosten yhdistettyyn liuokseen reagoimattoman 7-ACA:n (2,5 g) saostamiseksi, joka suodatettiin pois. Suodokseen sekoitettiin 200 ml eetteriä ja sen jälkeen 15 ml muurahaishappoa. Seosta sekoitettiin 10-15 min. huoneenlämpötilassa ja saatu sakka otettiin talteen suodattamalla, pestiin 100 ml:lla eetteriä ja 500 ml:lla vettä peräkkäin ja kuivattiin tyhjässä P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:n avulla, jolloin saatiin 23,05 g (79 %) tuotetta 20, sp. 180-186°C (hajoo).

Tuotteen 20 uudelleenkiteytys - yllä kuvattua amorfista tuotetta (12,93 g) liuotettiin 1,2 l:an THF:n 50-60°C:ssa voimakkaasti sekoittaen, käsiteltiin 5 g:lla aktiivihieiltä ja suodatettiin. Suodos ympätettiin ja sitä säilytettiin jääkaapissa yli yön, jolloin saatiin 7,80 g tuotetta 20 hienoina neulasina. Sp. 186-189°C (hajoo).

#### Esimerkki 3

7-(o-aminometyylifenyyliaasetamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliotiometriyli)-3-kefem-4-karboksyylihapon kahtaisionimuodon (0,361 g) suspensiota 3 ml:ssa metanolia jäädytetään jäällä ja käsitellään muutamalla tipalla väkevää kloorivetyhappoa, kunnes saadaan kirkas liuos. 7-(o-aminometyylifenyyliaasetamido)-3-(tetratsolo(4,5)pyridatsin-6-yyliotiometriyli)-3-kefem-4-karboksyylihapon hydrokloridi saostuu vaaleanruskean värisenä kiinteänä aineena lisättäessä eetteriä ja se otetaan talteen suodattamalla ja kuivataan tyhjässä P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:n avulla.

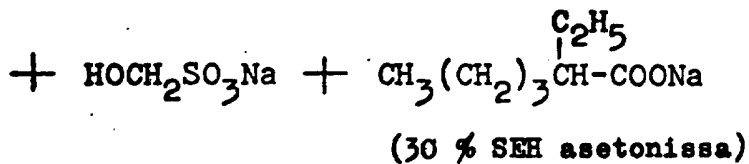
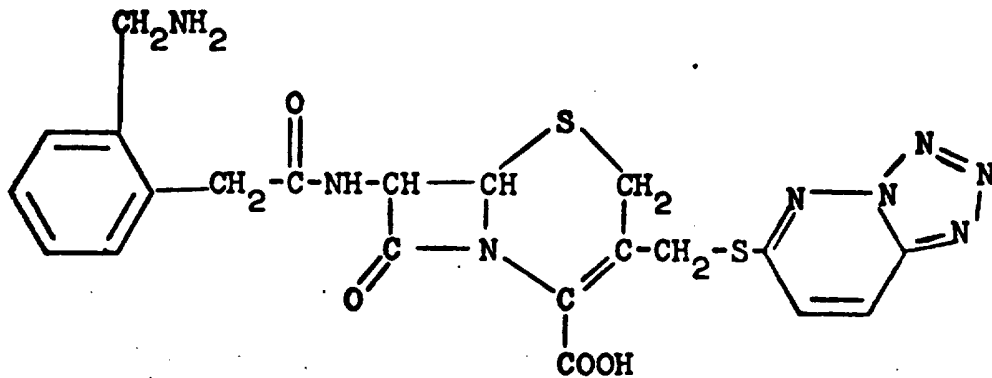
#### Esimerkki 4

7-(o-aminometyylifenyyliaasetamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliotiometriyli)-3-kefem-4-karboksyylihapon kahtaisionimuodon (0,361 g) sekoitettuun suspensioon lisätään 1-N natriumhydroksidin vesiliuosta huoneen lämpötilassa, kunnes saadaan kirkas liuos (pH 10,8). Tämä liuos pakastekuiva-

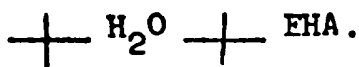
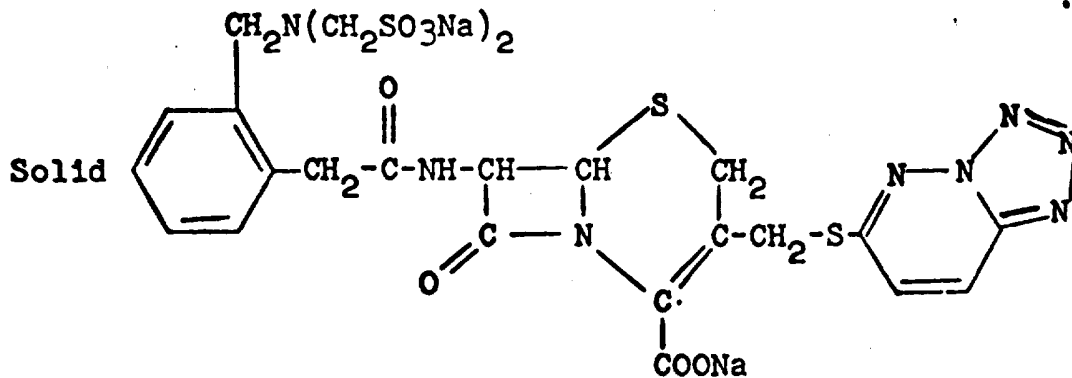
taan välittömästi, jolloin saadaan epäpuhdasta, kiinteää natrium-7-(o-aminometyylifenyyliaasetamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyli-tiometyyli)-3-kefem-4-karboksylaattia.

Dimetaanisulfaatin valmistusmenetelmä

Esimerkki 5



1. Kuumenna vedessä
2. Käsittele hiilellä ja suodata
3. Lisää suodos vedettömään alkoholiin.



**Menettely:**

Aseta 2,0 moolia (noin 1025 g vedettömänä laskettuna) 7-(o-aminometyylifenyliasetamido)-3-(tetratsolo-(4,5-b)-pyridatsin-6-yyilitiometyyli)-3-kefem-4-karboksylihappoa, 540 g natriumformaldehydin bisulfiittia (4,03 moolia), 3000 ml vettä ja 2700 ml (4,87 moolia) 30 %:sta SEH:a (natrium-2-etyyliheksanoaattia) asetoniin liuotettuna sopivaan säiliöön ja kuumenna seos sekoittaen 40-45°C:een. Seos liukenee noin 10 minuutissa keltaiseksi liuokseksi.

15 minuutin kuumennuksen jälkeen lisää 50 g väriä poistavaa hiiltä ("Darko KB") liuokseen ja sekoita vielä 15 min. 40-45°C:ssa.

Suodata piimaan ("Dicalite") läpi, kun reaktioseosta on pidetty 40-45°C:ssa yhteensä 30 min.

Pese hiilikakku 2000 ml:lla 50 %:sta etanolin vesiliuosta. Yhdistä uutteen, säädä lämpötila 25°C:een ja lisää liuos 25°C:ssa 112 litraan nopeasti sekoitettua 100 %:sta etyylialkoholia. Muodostuu hieno, valkoinen, amorfinen sakka, joka on natrium-7-(o-aminometyylifenyliasetamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyilitiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylaatin di(natriummetaanisulfonaattia).

Sekoita suspensiota noin 10 min. ja suodata sitten ja pese kakku 15 l:lla 100 %:sta etyylialkoholia.

Kuivaa kakkua 50-55°C:ssa uunissa, jossa on ilmankierto noin 2 tuntia ja sitten tyhjässä 4-6 mm:n paineessa 24 tuntia.

Saalis on noin 1200-1400 g amorfista, valkoista, kiinteää natrium-7-(o-aminometyylifenyliasetamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyilitiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylaatin di(natriummetaanisulfonaattia). Tuote sisältää tavallisesti muutamia prosentteja vettä ja mahdollisesti pienen määrän etanolia.

Tästä tuotteesta voidaan myös käyttää nimeä natrium-7-(o-N,N-bis(natriumsulfometyyli)aminometyylifenyliasetamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyilitiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylaatti.

**Esimerkki 6**

Valmistetaan seuraava liete:

- 2,19 g natriumformaldehydin bisulfiittia (2 ekvivalenttia)
- 3,5 g 7-(o-aminometyylifenyliasetamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyilitiometyyli)-3-kefem-4-karboksylihappo kahtaisionia (100-200 mesh).
- 25 ml vettä (tilavuutta voidaan vaihdella).
- 14 ml 30 %:sta SEH:n isopropanoliliuosta

Saadaan lähes valmis liuos noin 0,5 tunnin nopean sekoituksen jälkeen 24°C:ssa. Seoksen lämpötila nostetaan nopeasti 40-43°C:en. Tätä ylläpidetään noin 2 minuuttia ja jäädytetään sitten nopeasti 20-23°C:en.

Liuos suodatetaan vähäisten liukenemattomien aineiden poistamiseksi (liuotuksen kokonaisaika ei saa ylittää 2 tuntia).

Liuos, jonka pH on 7,3, lisätään 5 min. aikana 600 ml:aan erittäin nopeasti sekoitettua absoluuttista etanolia (muita alkoholeja kuten vedetöntä isopropanolia voidaan käyttää). Muodostuu natrium-7-(o-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliometyyli)-3-kefem-4-karboksylaatin di(natriummetaanisulfonaatin) amorfinen sakka. Seosta sekoitetaan 5 min. Sakka otetaan talteen suodattamalla, pestään 60 ml:lla etanolia (tai isopropanolia) ja kuivataan tyhjässä 50°C:ssa 24 tuntia. Saalis on noin 4,3 g.

Tuotetta liukenee veteen pH-arvolla noin 7 vähintään 200 mg/ml:n määrä. Tällainen liuos on stabiili vähintään 2 tuntia huoneenlämpötilassa; laimeammat liuokset ovat stabiileja kauemminkin. Tuote osoittaa samoja bakteereja tappavia ominaisuuksia kuin sitä edeltävä kahtaisionikin ja on biologisesti täysin aktiivinen onpa se sitten hydrolysoitu takaisin kahtaisioniksi tai ei.

#### Esimerkki 7

Natrium-7-(o-N,N-bis-(natriumsulfometyyli)aminometyylifenyyliasetamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliometyyli)-3-kefem-4-karboksylaatti

#### A. Valmistus käyttäen hydroksimetaanisulfonaattia

Seosta, jossa oli 1 g (1,95 mmoolia) 7-(o-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappoa, 1,52 g (10 mmoolia) natriumhydroksimetaanisulfonaatin monohydraattia, 6 ml (6 mmoolia) 1-M SEH-liuosta etyyliasetaatissa, 10 ml isopropanolia ja 10 ml vettä, sekoitettiin huoneenlämpötilassa 3,5 tuntia. Saatua liuosta käsiteltiin 1 g:lla aktiivihiltä ja se kaadettiin sekoittaen 300 ml:aan absoluuttista etanolia ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 30 min. jolloin saatiin kiteinen tuote, joka otettiin talteen suodattamalla, pestiin kolmella 50 ml:n erällä absoluuttista etanolia ja kuivattiin P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:n avulla 45-52°C:ssa 1 mm:n paineessa 20 tuntia, jolloin saatiin 1,51 g natrium-7-(o-N,N-bis(natriumsulfometyyli)aminometyylifenyyliasetamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliometyyli)-3-kefem-4-karboksylaattia, joka liukeni helposti veteen (>1 g/ml). Sp. > 270°C.

IR:  $\gamma_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  1760, 1660-1620, 1605, 1540, 1400, 1200, 1040  $\text{cm}^{-1}$ .

UV:  $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$  242 nm ( $\epsilon$  18,000), 271 nm ( $\epsilon$  11,600 sh), 312 nm ( $\epsilon$  5,100, sh).

NMR:  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{D}_2\text{O}}$  3,34 (1H, d, 18 Hz, S-CH<sub>2</sub>), 3,76 (1H, d, 18 Hz, S-CH<sub>2</sub>), 3,85 (2H, s, CO-CH<sub>2</sub>- $\phi$ ), 4,04 (4H, N-CH<sub>2</sub>- $\phi$  & 3-CH<sub>2</sub>-S), 4,30 (4H, s, N-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub>Na), 4,92 (1H, d, 4,5, Hz, 6-H), 5,42 (1H, d, 4,5, Hz, 7-H), 7,05-7,30 (4H, fenyyli-H), 7,40, (1H, d, 10 Hz, pyridatsiini-H), 8,11 (1H, d, 10 Hz, pyridatsiini-H).

#### B. Valmistus käyttäen formaliinia ja natriumbisulfiittia

a) Liuokseen, jossa oli 1 ml (10 mmoolia) 30 %:sta formaliinia ja 1 g natriumbisulfiittia 10 ml:ssa vettä, lisättiin peräkkäin 1,026 g (2 mmoolia) 7-(o-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksylihappoa, 6 ml 1-M SEH-liuosta ja 10 ml isopropanolia. Seosta sekoitettiin 2,5 tuntia huoneenlämpötilassa ja se kaadettiin 300 ml:aan etanolia. Saatua natrium-7-(o-N,N-bis(natriumsulfometyyli)-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsiini-6-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksylaatti otettiin talteen suodattamalla, pestiin kolmella 50 ml:n erällä etanolia ja kuivattiin tyhjässä. Saalis 1,61 g.

b) Seokseen, jossa oli 1,026 g (2 mmoolia) 7-(o-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksylihappoa, 6 ml 1-M SEH-liuosta etyyliasetaatissa 10 ml isopropanolia ja 10 ml vettä, lisättiin 1 ml (10 mmoolia) 30 % formaliinia. Seosta sekoitettiin 2 tuntia huoneenlämpötilassa, jolloin saatiin kirkas liuos, jossa oli pieni määrä öljymäistä sakkaa. Kun liuokseen oli lisätty 1 g natriumbisulfiittia, sitä sekoitettiin vielä 2 tuntia, jona aikana öljymäinen sakka liukeni liuokseen. Reaktioseos kaadettiin 300 ml:aan etanolia voimakkaasti sekoittaen, jolloin saatiin 1,61 g natrium-7-(o-N,N-bis(natriumsulfometyyli)-aminometyylifenyyliasetamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksylaattia, joka otettiin talteen suodattamalla, pestiin kolmella 50 ml:n erällä etanolia ja kuivattiin tyhjässä.

#### Esimerkki 8

A. 7-( $\beta$ -(o-t-butoksykarbonyyliaminometyylifenyyli)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksylihappo

N,N'-disykloheksyylikarbodi-imidiä (0,41 g, 2 mmoolia) lisättiin seokseen, jossa oli  $\beta$ -(o-t-butoksykarbonyyliaminometyylifenyyli)propionihappoa (0,56 g, 2 mmoolia) ja 2,4-dinitrofenyyliä (0,37 g, 2 mmoolia) 5 ml:ssa THF:a ja seosta sekoitettiin tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Saostunut urea suodatettiin pois. Suodokseen lisättiin liuos, jossa oli 7-amino-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliitiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappoa (0,73 g, 2 mmoolia) ja trietyyliamiinia (0,81 g, 8 mmoolia) 10 ml:ssa 50 %:sta THF:n vesiliuosta ja seosta sekoitettiin 18 tuntia huoneenlämpötilassa. Reaktioseos pestiin eetterillä (2 x 20 ml) ja vesikerros hapotettiin pH-arvoon 2 laimealla HCl:lla ja uutettiin etyyliasetaatilla (3 x 50 ml). Yhdistetyt uutteen pestiin vedellä (30 ml), käsiteltiin aktiivihielellä, kuivatettiin vedettömällä  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ :lla ja haihdutettiin alipaineessa öljyksi. Öljyä hierrettiin 50 ml:ssa eetteriä, jolloin saatiin 7-( $\beta$ -(o-t-butoksykarbonyyliaminometyylifenyyli)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliitiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappoa värittömänä kiinteänä aineena, joka otettiin talteen suodattamalla ja kuivatettiin tyhjässä  $\text{P}_2\text{O}_5$ :n avulla. Saalis 0,33 (26 %). Sp. 110-120°C (hajoaa).

IR:  $\gamma_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  1780, 1710, 1690, 1530, 1370, 1250  $\text{cm}^{-1}$ .

UV:  $\lambda_{\text{max}}^1 \%$   $\text{NaHCO}_3$  240 nm ( $\epsilon$  19,400), 270 nm (sh) ( $\epsilon$  12,500), 310 nm (sh) ( $\epsilon$  5000).

NMR:  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{DMSO-d}_6}$  1,37 (9H, s, t-Bu-H), 4,96 (1H, d, 4 Hz, 6-H), 5,55 (1H, d-d,

4 & 8 Hz, 7-H), 6,99 (4H, s, fenyyli-H), 7,57 (1H, d, 10 Hz, pyridatsiini-H), 8,38 (1H, d, 10 Hz, pyridatsiini-H), 8,69 (1H, d, 8 Hz, CONH).

Analyysi laskemalla kaavasta:  $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_2 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$ : C, 51,02; H, 4,91; N, 17,63. Kokeellisesti: C, 51,74; H, 4,83; N, 17,88.

B. 7-( $\beta$ -(o-aminometyylifenyyli)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliitiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappo

Trifluorietikkahappoa (0,5 ml) ja 7-( $\beta$ -(o-tert.-butoksykarbonyyliaminometyylifenyyli)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliitiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappoa (0,28 g, 0,46 mmoolia) sekoitettiin jäähdyttäen 0°C:een ja sekoitettiin 30 min. Eetteriä (50 ml) lisättiin seokseen, jolloin saatiin 7-( $\beta$ -(o-aminometyylifenyyli)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)-pyridatsin-6-yyliitiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihapon trifluori-asetaatia, joka erotettiin dekantoimalla, pestiin eetterillä, liuotettiin veteen (1 ml) ja pH säädettiin arvoon 6 laimealla  $\text{NH}_4\text{OH}$ :lla. Tuote 7-( $\beta$ -(o-aminometyylifenyyli)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliitiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappo otettiin talteen suodattamalla ja kui-



vattiin tyhjössä  $P_2O_5$ :n avulla. Saalis 0,10 g (42 %), sp. 190-197°C (hajoaa).

IR:  $\gamma_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  1760, 1665, 1600, 1535,  $\text{cm}^{-1}$ .

Analyysi laskemalla kaavasta  $C_{22}H_{22}N_8O_4S_2 \cdot 1/2 H_2O$ : C, 49,33; H, 4,33;  
N, 20,92; S, 12,18.

Kokeellisesti: C, 49,04; H, 4,26; N, 20,17; S, 11,96.

#### Esimerkki 9

##### A. Natrium- $\beta$ -(o-(1-etoksikarbonyyli-1-propen-2-yyliaminometyyli)-fenyyl)propionaatti

Natriumetoksidin alkoholiliuokseen (metallista natriumia 5,75 g (0,25 g-atomia) ja absoluuttista etanolia 500 ml) lisätään 0,25 moolia  $\beta$ -(o-aminometyylifenyyl)propionihappoa (saatu neutraloimalla sen hydrokloridia ammoniakkin vesiliuoksella) ja 32,5 g (0,25 moolia) etyyliasetoosetaattia peräkkäin. Seosta refluksoidaan 6 tuntia ja käsitellään aktiivihielellä ja suodatetaan piimaan ("Dicalite") läpi. Suodatinkerros pestään 200 ml:lla kuumaa etanolia. Yhdistetyt suodos- ja pesuliuokset haihdutetaan lähes kuiviin ja jäädytetään 0°C:een, jolloin saadaan natrium- $\beta$ -(o-(1-etoksikarbonyyli-1-propen-2-yyliaminometyyli)fenyyl)-propionaattia värittöminä neulasina, jotka otetaan talteen suodattamalla, pestään 200 ml:lla etanolia ja kuivataan tyhjössä  $P_2O_5$ :n avulla. Lisää tuotetta saadaan väkevöimällä emäliuos. Kokonaissaalis noin 50 g.

##### B. 7-( $\beta$ -(o-aminometyylifenyyl)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)-pyridatsin-6-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappo

Etyyliklooriformaattia (6,87 g, 0,0063 moolia) lisätään yhdellä kertaa sekoitettuun suspensioon, jossa on 0,057 moolia natrium- $\beta$ -(o-(1-etoksikarbonyyli-1-propen-2-yyliaminometyyli)fenyyl)propionaattia 200 ml:ssa kuivaa THF:a, joka sisältää 1 ml N,N-dimetyylibentsyyliamiinia -15°C:ssa. Sekoitus lopetetaan ja jäädytetty liuos, jossa on 20,80 g (0,057 moolia) 7-amino-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliotiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappoa ja 9,60 g (0,095 moolia) trietyyliamiinia 200 ml:ssa 50 %:sta THF:n vesiliuosta lisätään hitaasti seinämää pitkin. Seosta sekoitetaan voimakkaasti 30 min. 0-15°C:ssa, käsitellään aktiivihielellä ja suodatetaan "Dicalite"-piimaan läpi. Kerros pestään 50 ml:lla THF:n 50 %:sta vesiliuosta, joka sisältää 8 ml trietyyliamiinia. Muurahaishappoa (3 ml) lisätään suodoksen ja pesuliuosten yhdistettyyn liuokseen reagoimattoman 7-ACA:n (2,5 g) saostamiseksi, joka suodatetaan pois. Suodokseen sekoitetaan 200 ml eetteriä

ja sitten 15 ml muurahaishappoa. Seosta sekoitetaan 10-15 min. huoneenlämpötilassa ja saatu sakka kerätään talteen suodattamalla, pestään 100 ml:lla eetteriä ja 500 ml:lla vettä peräkkäin ja kuivataan tyhjöissä  $P_2O_5$ :n avulla, jolloin saadaan 7-( $\beta$ -(o-aminometyylifenyyli)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)-pyridatsin-6-yyli-tiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappoa noin 20 g.

7-( $\beta$ -(o-aminometyylifenyyli)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyli-tiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihapon uudelleenkiteytys - yllä kuvattua amorfista tuotetta (13 g) liuotetaan 1,2 l:aan THF:n 50 %:sta vesiliuosta 50-60°C:ssa voimakkaasti sekoittaen, käsitellään 5 g:lla aktiivihiiltä ja suodatetaan. Suodos ympätään ja sitä säilytetään jääkaapissa yli yön, jolloin saadaan noin 8 g tuotetta hienoina neulasina.

#### Esimerkki 10

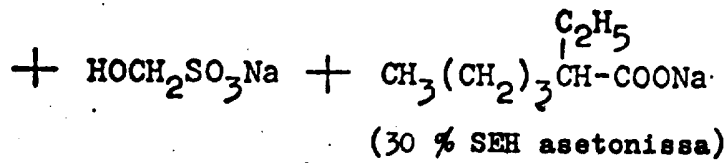
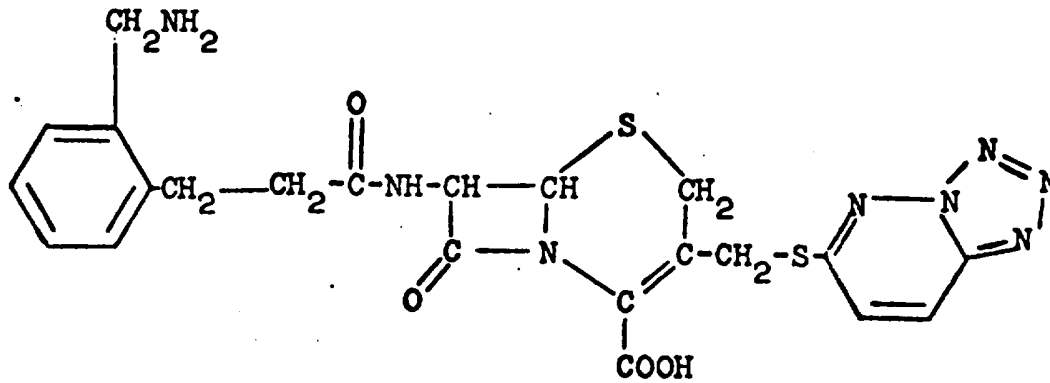
7-( $\beta$ -(o-aminometyylifenyyli)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyli-tiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihapon kahtaisionimuodon (0,361 g) suspensiota 3 ml:ssa metanolia jäähdytetään jäällä ja käsitellään muutamilla tipoilla väkevää kloorivetyhappoa, kunnes saadaan kirkas liuos. 7-( $\beta$ -(o-aminometyylifenyyli)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyli-tiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihapon hydrokloridi saostuu vaaleanruskeana värisenä kiinteänä aineena, kun lisätään eetteriä ja se otetaan talteen ja kuivataan tyhjöissä  $P_2O_5$ :n avulla.

#### Esimerkki 11

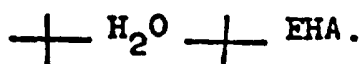
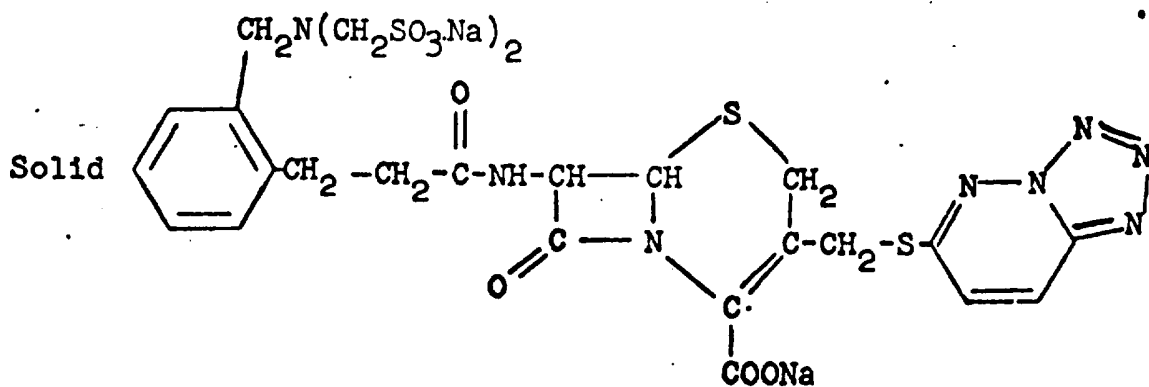
7-( $\beta$ -(o-aminometyylifenyyli)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyli-tiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihapon kahtaisionimuodon (0,361 g) sekoitettuun suspensioon lisätään 1-N natriumhydroksidin vesiliuosta huoneenlämpötilassa, kunnes saadaan kirkas liuos (pH 10,8). Tämä liuos pakaste-kuivataan välittömästi, jolloin saadaan epäpuhdasta, kiinteää natrium-7-( $\beta$ -(o-aminometyylifenyyli)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyli-tiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylaattia.

## Dimetaanisulfonaatin valmistusmenetelmät

## Esimerkki 12



1. Kuumenna vedessä
2. Käsittele hiilellä ja suodata
3. Lisää suodos vedettömään alkoholiin



**Menettely:**

Aseta 2,0 moolia (noin 1053 g vedettömänä laskettuna) 7-( $\beta$ -(o-aminometyylifenyyli)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yylitiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappoa, 540 g natriumformaldehydin bisulfiittia (4,03 moolia), 3000 ml vettä ja 2700 ml (4,87 moolia) 30 %:sta SEH-liuosta (natrium-2-etyyliheksanoaatti) asetonissa sopivaan säiliöön ja kuumenna seos sekoittaen 40-45°C:een. Seos liukenee noin 10 minuutissa keltaiseksi liuokseksi.

15 minuutin kuumennuksen jälkeen lisää 50 g väriä poistavaa hiiltä ("Darco KB") liuokseen ja sekoita vielä 15 min. 40-45°C:ssa. Suodata piimaan ("Dicalite") läpi sen jälkeen kun reaktioseosta on pidetty 40-45°C:ssa yhteensä 30 min.

Pese hiilikakku 2000 ml:lla 50 %:sta etanolin vesiliuosta. Yhdistä suodokset, säädä lämpötila 25°C:een ja lisää liuos 25°C:ssa 112 l:aan nopeasti sekoitettua 100 %:sta etyylialkoholia. Muodostuu hieno, valkoinen, amorfinen sakka, joka on natrium-7-( $\beta$ -(o-aminometyylifenyyli)-propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yylitiometyyli)-3-kefem-4-karboksylaatin di(natriummetaanisulfonaattia).

Sekoita suspensiota noin 10 min. ja suodata sitten ja pese kakku 15 l:lla 100 %:sta etyylialkoholia.

Kuivaa kakkua 50-55°C:ssa kiertoilmaunissa noin 2 tuntia ja sitten tyhjössä 4-6 mm:n paineessa 24 tuntia.

Saalis on noin 1200-1400 g amorfista, valkoista, kiinteää natrium-7-( $\beta$ -(o-aminometyylifenyyli)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yylitiometyyli)-3-kefem-4-karboksylaatin di(natriummetaanisulfonaattia). Tuote sisältää tavallisesti joitakin prosentteja vettä ja mahdollisesti pienen määrän etanolia.

Tästä tuotteesta käytetään myös nimitystä natrium-7-( $\beta$ -(o-N,N-bis(natriumsulfometyyli)aminometyylifenyyli)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yylitiometyyli)-3-kefem-4-karboksylaatti.

**Esimerkki 13**

Valmistetaan seuraava liete:

2,19 g natriumformaldehydin bisulfiittia (2 ekvivalenttia)

3,5 g 7-( $\beta$ -(o-aminometyylifenyyli)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yylitiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihapon kahtaisionia (100-200 mesh)

25 ml vettä (tilavuutta voidaan vaihdella)

14 ml 30 %:sta SEH:n isopropanoliliuosta.

Saadaan lähes valmis liuos noin 0,5 tunnin nopealla sekoituksella

24°C:ssa. Seoksen lämpötila nostetaan nopeasti 40-43°C:een. Tätä ylläpidetään noin 2 minuuttia ja jäädytetään sitten nopeasti 20-23°C:een.

Liuos suodatetaan vähäisten liukenemattomien aineiden poistamiseksi (liuotuksen kokonaisaika ei saa ylittää kahta tuntia).

Liuos, jonka pH on 7,3, lisätään 5 min. aikana 600 ml:aan erittäin nopeasti sekoitettua absoluuttista etanolia (muita alkoholeja kuten vedetöntä iopropanolia voidaan käyttää). Muodostuu amorfinen natrium-7-(β-(o-aminometyylifenyyl)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliotiometryyli)-3-kefem-4-karboksyylaatin di(natriummetaanisulfonaatin) sakka. Seosta sekoitetaan 5 min. Sakka otetaan talteen suodattamalla, pestään 60 ml:lla etanolia (tai isopropanolia) ja kuivataan tyhjässä 50°C:ssa 24 tuntia. Saalis on noin 4 g.

Tuotetta liukenee veteen pH-arvolla noin 7 vähintään 200 mg/ml:n määrä. Tällainen liuos on stabiili vähintään 2 tuntia huoneenlämpötilassa; laimeammat liuokset ovat stabiileja kauemminkin. Tuote osoittaa samoja bakteereja tappavia ominaisuuksia kuin sitä edeltävä kahtaisioni ja se on biologisesti täysin aktiivinen onpa se sitten hydrolysoitu takaisin kahtaisioniksi tai ei.

#### Esimerkki 14

Natrium-7-(β-(o-N,N-bis(natriumsulfometyyli)aminometyylifenyyl)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliotiometryyli)-3-kefem-4-karboksyylaatti

#### A. Valmistus käyttäen hydroksimetaanisulfonaattia

Seosta, jossa on 1,95 mmoolia 7-(β-(o-aminometyylifenyyl)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliotiometryyli)-3-kefem-4-karboksyylihappoa, 1,52 g (10 mmoolia) natriumhydroksimetaanisulfonaatin monohydraattia, 6 ml (6 mmoolia) 1-M SEH-liuosta etyyliasetaatissa, 10 ml isopropanolia ja 10 ml vettä, sekoitetaan huoneenlämpötilassa 3,5 tuntia. Saatua liuosta käsitellään 1 g:lla aktiivihiltä ja se kaadetaan sekoittaen 300 ml:aan absoluuttista etanolia ja seosta sekoitetaan huoneenlämpötilassa 30 min. jolloin saadaan kiteinen tuote, joka otetaan talteen suodattamalla, pestään kolmella 50 ml:n erällä absoluuttista etanolia ja kuivataan P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:lla 45-52°C:ssa 1 mm:n paineessa 20 tuntia, jolloin saadaan noin 1,5 g natrium-7-(β-(o-N,N-bis(natriumsulfometyyli)aminometyylifenyyl)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliotiometryyli)-3-kefem-4-karboksyylaattia, joka liukenee helposti veteen (>1 g/ml).

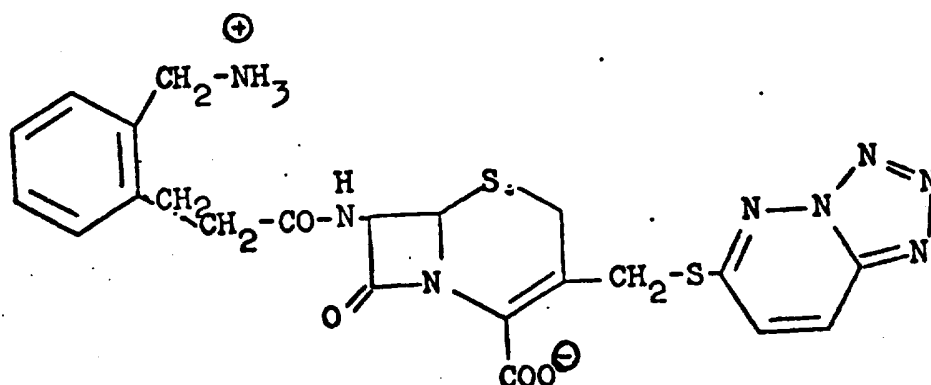
B. Valmistus käyttäen formaliinia ja natriumbisulfiittia

a) Liuokseen, jossa on 1 ml (10 mmoolia) 30 %:sta formaliinia ja 1 g natriumbisulfiittia 10 ml:ssa vettä, lisätään peräkkäin 2 mmoolia 7-(o-aminometyylifenyylipropionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliitiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappoa, 6 ml 1-M SEH-liuosta ja 10 ml isopropanolia. Seosta sekoitetaan 2,5 tuntia huoneenlämpötilassa ja se kaadetaan 300 ml:aan etanolia. Saatu natrium-7-(β-(o-N,N-bis(natriumsulfometyyli)aminometyylifenyylipropionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliitiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylaatti otetaan talteen suodattamalla, pestään kolmella 50 ml:n erällä etanolia ja kuivataan tyhjässä. Saalis noin 1,5 g.

b) Seokseen, jossa on 2 mmoolia 7-(β-(o-aminometyylifenyylipropionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliitiometyyli)-3-kefen-4-karboksyylihappoa, 6 ml 1-M SEH-liuosta etyyliasetaatissa, 10 ml isopropanolia ja 10 ml vettä, lisätään 1 ml (10 mmoolia) 30 %:sta formaliinia. Seosta sekoitetaan 2 tuntia huoneenlämpötilassa, jolloin saadaan kirkas liuos, jossa on pieni määrä öljymäistä sakkaa. Kun liuokseen on lisätty 1 g natriumbisulfiittia, sitä sekoitetaan vielä 2 tuntia, jona aikana öljymäinen sakka liukenee liuokseen. Reaktioseos kaadetaan 300 ml:aan etanolia voimakkaasti sekoittaen, jolloin saadaan noin 1,5 g natrium-7-(β-(o-N,N-bis(natriumsulfometyyli)aminometyylifenyylipropionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliitiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylaattia, joka otetaan talteen suodattamalla, pestään kolmella 50 ml:aan erällä etanolia ja kuivataan tyhjässä.

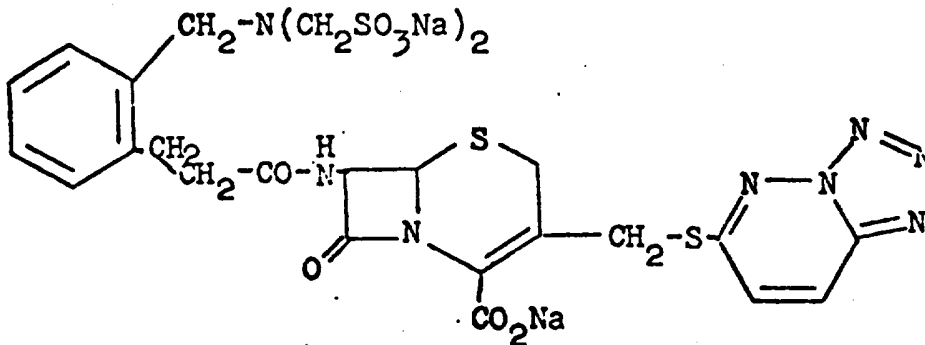
In vitro - ja In vivo-tutkimukset

7-((o-aminometyyli)fenyyli)propionamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliitiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappo on uusi, laajavaikutteinen puolisynteettinen kefalosporiini, jolla on alla esitetty rakenne



Sillä on osoitettu olevan erinomaiset in vitro- ja in vivo-aktiivisuudet useita erilaisia gram-positiivisia ja gram-negatiivisia bakteereja vastaan,

joihin kuuluvat ne, jotka vastustavat kefalotinia ja kefaloridinia. Sen dimetaanisulfonaatti-addukti, jolla on rakenne

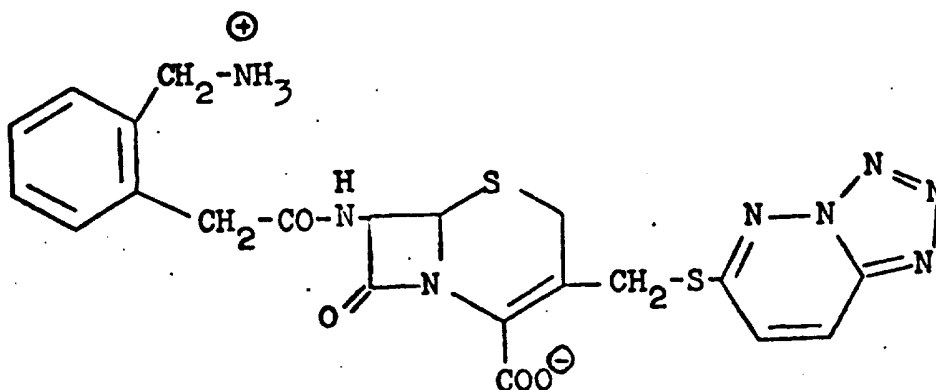


valmistetaan vesiliukoisena valmisteena, joka on käyttökelpoinen ruiskeena ja tutkittaessa absorptiota ja erittymistä, akuuttista myrkyllisyyttä ja kiputaipumusta ruisketta annettaessa.

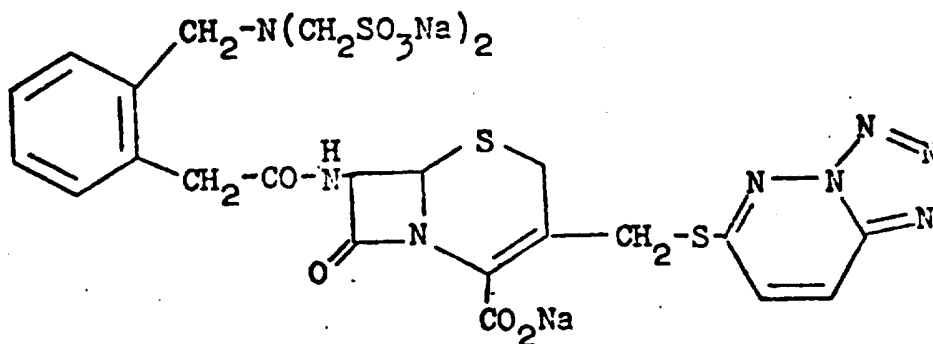
Bakteereja vastustavan in vitro-aktiivisuuden ensimmäiset tutkimukset putkilaimennusmenetelmällä tai agarlaimennusmenetelmällä käyttäen tätä uutta kefalosporiinia osoittivat pienimpien ehkäisevien väkevyyksien (M.I.C) olevan alle 1,0  $\mu\text{g/ml}$  kaikilla tai lähes kaikilla tutkituilla lajeilla, joita olivat *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* ja *Diplococcus pneumoniae* ja M.I.C-arvot olivat tavallisesti alle 4  $\mu\text{g/ml}$  ja usein alle 1,0  $\mu\text{g/ml}$  erilaisia *Salmonella enteritidis*- ja *Enterobacter cloacae*-lajeja vastaan.

Tämän yhdisteen in vivo-tehokkuutta ihonalaisella ruiskeella tutkittiin hiirillä, joilla oli koetartunta, joka oli saatu aikaan tautiasynnytävällä, penisillinaasi-positiivisella *S.aureus*-lajilla. Keskimääräinen parantava annos ( $\text{CD}_{50}$ ) oli noin 1,6 mg/kg.

7-((o-aminometyyli)fenyyliasetamido)-3-(tetratsolo(4,5-b)pyridatsin-6-yyliotiometryyli)-3-kefem-4-karboksyylihappo on uusi, laajavaikutteinen puolisynteettinen kefalosporiini, jolla on alla esitetty rakenne.



Sillä on osoitettu olevan erinomaiset in vitro- ja in vivo-aktiivisuudet useita eri gram-positiivisia ja gram-negatiivisia bakteereja vastaan, joihin kuuluvat ne, jotka vastustavat kefalotiinia ja kefaloridiinia. Sen dimetaanisulfonaattiadutki, jolla on rakenne



valmistettiin vesiliukoisena valmisteena, joka on käyttökelpoinen ruiskeena ja tutkittaessa absorptiota ja erittymistä, akuuttista myrkyllisyyttä ja kiputaipumusta ruisketta annettaessa.

Bakteereja vastustavan in vitro-aktiivisuuden ensimmäiset tutkimukset putkilaimennusmenetelmällä tai agarlaimennusmenetelmällä käyttäen tätä uutta kefalosporiinia osoittivat pienimpien ehkäisevien väkevyyksien (MIC.) olevan alle 1,0  $\mu\text{g/ml}$  kaikilla tai lähes kaikilla tutkituilla lajeilla, joita olivat *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Diplococcus pneumoniae*, eri *Bacillus*-lajit kuten *Bacillus anthracis*, *mycoides* ja *cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus rettgeri*, *Shigella* ja erityisesti *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis* ja *Salmonella typhosa* ja MIC.-arvot olivat tavallisesti alle 4  $\mu\text{g/ml}$  ja usein alle 1,0  $\mu\text{g/ml}$  erilaisia *Escherichia coli*-, *Klebsiella* määrittämätön, *Proteus vulgaris*-, *Proteus morgani*, *Proteus mirabilis*- ja *Enterobacter Cloacae*-lajeja vastaan.

Tämä gram-negatiivisen koeorganismien sarja sisälsi 14 kefalotinia vastustavaa *Enterobacteriaceae*-lajia (3 *E. coli*, 6 *Proteus*, 1 *Enterobacter*, 1 *Shigella* ja 3 *Serratia*) jota 100  $\mu\text{g/ml}$  kefalotinia ei ehkäissyt ja monessa tapauksessa 100  $\mu\text{g/ml}$  kefaloridiinia ja kefapiriniä ei myöskään ehkäissyt. Tämän keksinnön yhdiste oli huomattavan aktiivinen näitä organismeja vastaan ehkäisten 12 näistä 14:sta lajista väkevyydellä 6,3  $\mu\text{g/ml}$  tai sen alle.

Tämän yhdisteen MIC.-arvot eivät huonontuneen oleellisesti kun läsnä oli kohtalaisia ihmisen veriharjan pitoisuuksia, esim. aina 50 %:in asti. Yhdiste oli erittäin stabiili liuoksessa 37°C:ssa pH-alueella joka vaihteli välillä 4,6-8,4 puoliintumisaikojen ylittäessä 24 tuntia.

Tämän yhdisteen in vivo-tehokkuutta ihonalaisella ruiskeella tutkit-



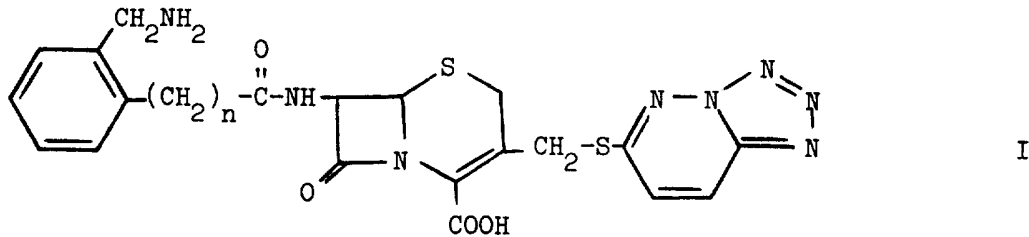
tiin hiirillä, joilla oli koetartunnat, jotka oli saatu aikaan kymmenellä tautiasynnyttävällä bakteerilla, joihin kuuluivat penisillinaasi-positiivinen *S.aureus* ja kefalosporinaasi-positiivinen *E.coli*. Käytetyt bakteerit olivat lajela *S.aureus*, *S. pyogenes*, *Dpneumoniae*, *E.coli*, *K.pneumoninae*, *P.vulgaris* ja *S.marcescens*. Keskimääräinen parantava annos ( $CD_{50}$ ) ei koskaan ylittänyt arvoa 20 mg/kg, vain kahdesti se ylitti 10 mg/kg ja seitsemässä tapauksessa se oli 3,2 mg/kg tai sen alle minimiarvon ollessa 0,2 mg/kg.

Pitoisuudet hiiren veressä tämän yhdisteen ihonalaisen ruiskeen jälkeen niinkin pienillä annoksilla kuin 5 mg/kg määrättiin ja ne osoittivat erinomaista absorptiota; saanto virtsasta oli hyvä (noin 60 %) ja virtsan paperikromatografinen tutkimus osoitti tämän yhdisteen olevan ainoa läsnäoleva bioaktiivinen aine, mikä osoittaa aineenvaihdunnallista stabilisuutta.

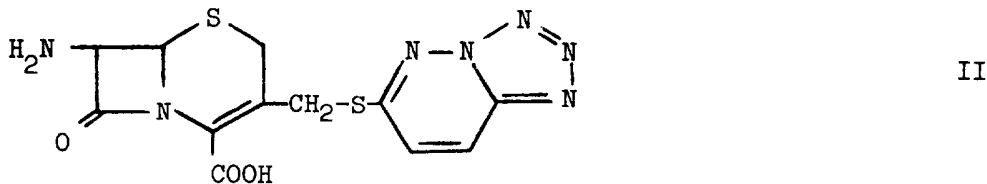
Akuuttiset myrkyllisyyskokeet hiirillä annettaessa ihonalaisesti niinkin suuria annoksia kuin 1000 mg/kg eivät osoittaneet menehtymisiä. Kaksi koetta, jotka oli laadittu paikallisen kudosaärsytyksen mittaamiseksi ruisituksen jälkeen, eivät osoittaneet ärsytystä 12,5 %:n tai sitä pienemmillä väkevyyksillä.

## Patenttivaatimus:

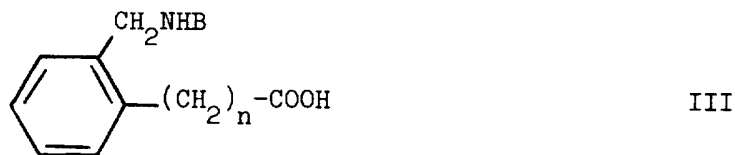
Menetelmä bakteerinvastaisten 7-(o-aminometyylifenyyli-asetamido- ja -propionamido)-3-(tetratsolo[4,5-b]pyridatsin-6-yyli-tiometyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappojen valmistamiseksi, joilla on kaava



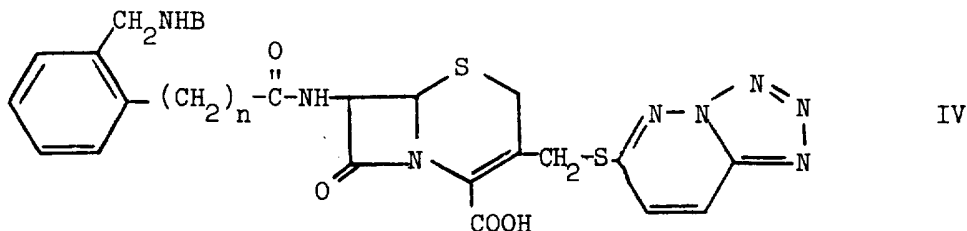
jossa n on 1 tai 2 ja niiden myrkyttömien, farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi; t u n n e t t u siitä, että yhdiste, jolla on kaava



tai sen suola saatetaan reagoimaan reaktiivisen happojohdannaisen kanssa, jolla hapolla on kaava



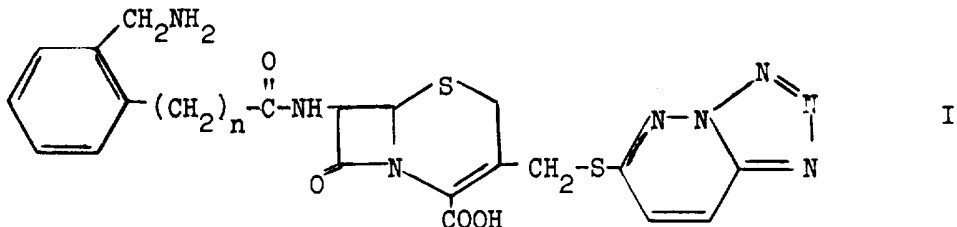
jossa B on aminoryhmää suojaava ryhmä ja n on sama kuin yllä, yhdisteen valmistamiseksi, jolla on kaava



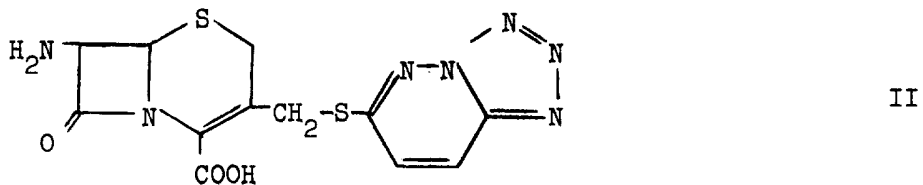
jossa B ja n ovat samoja kuin yllä tai sen suolan valmistamiseksi, ja sen jälkeen poistetaan aminoryhmää suojaava ryhmä B halutun kaavan I mukaisen yhdisteen tai sen myrkyttömän, farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan valmistamiseksi.

## Patentkrav:

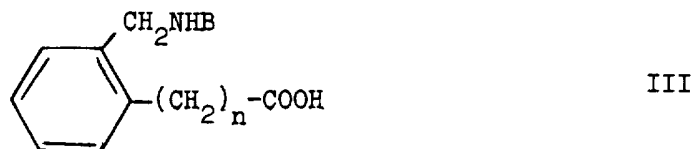
Förfarande för framställning av antibakteriella 7-(o-aminometylfenyl-acetamido- och -propionamido)-3-(tetrazolo[4,5-b]pyridazin-6-yltiometyl)-3-cefem-4-karboxylsyror med formeln



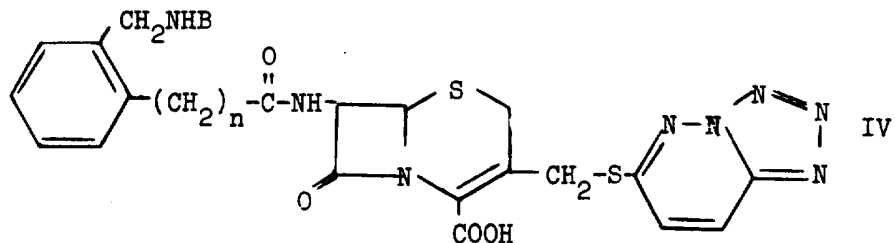
vari n är 1 eller 2, och giftfria, farmaceutiskt godtagbara salter därav, k ä n n e t e c k n a t därav, att man omsätter föreningen med formeln



eller ett salt därav med ett reaktivt derivat av en syra med formeln



vari B är en skyddsgrupp för aminogruppen och n har ovan nämnda betydelse, för framställning av en förening med formeln



vari B och n har ovan nämnda betydelse, eller ett salt därav, och därefter avlägsnar skyddsgruppen B för aminogruppen för framställning av föreningen med formeln I eller ett giftfritt, farmaceutiskt godtagbart salt därav.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Hakemusjulkaisuja:-Ansökningspublikationer: Saksan Liittotasavalta-Förbundsrepubliken Tyskland(DE) 2 055 796 (C 07 d 99/24).

Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: Suomi-Finland(FI) 50 427 (C 07 D 501/36), 51 200 (C 07 D 501/30).