



Patentdirektoratet

TAASTRUP

- | | | |
|---|---------------|--|
| (21) Patentansøgning nr.: 2850/86 | (51) Int.Cl.6 | C 07 D 498/06
//(C 07 D 498/06,
C 07 D 215:00,
C 07 D 295:00) |
| (22) Indleveringsdag: 18 jun 1986 | | |
| (41) Alm. tilgængelig: 21 dec 1986 | | |
| (45) Patentets meddelelse bkg. den: 11 sep 1995 | | |
| (86) International ansøgning nr.: - | | |
| (30) Prioritet: 20 jun 1985 JP 134712/85 11 okt 1985 JP 226499/85 28 jan 1986 JP 16496/86 | | |

(73) Patenthaver: *Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.; No. 14-10, Nihonbashi 3-chome; Chuo-ku; Tokyo, JP

(72) Opfinder: Isao *Hayakawa; JP, Shohgo *Atarashi; JP, Shuichi *Yokohama; JP, Masazumi *Imamura; JP, Katsuichi *Sakano; JP, Nobuyuki *Higashihashi; JP, Masayuki *Ohshima; JP

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

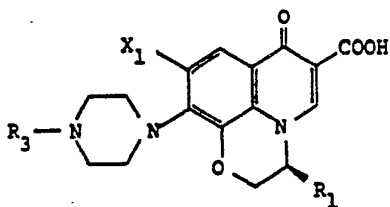
(54) S(-)-pyridobenzoxazinforbindelser

(56) Fremdragne publikationer

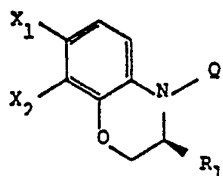
(57) Sammendrag:

2850-86

Optisk aktive S(-)-pyridobenzoxazinforbindelser med den almene formel (VI),

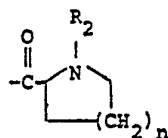


hvor X_1 betegner et hydrogenatom, R_1 betegner en alkylgruppe, og R_3 betegner alkylgruppe, kan opnås ved, at man først fremstiller et mellemprodukt med den almene formel (X).

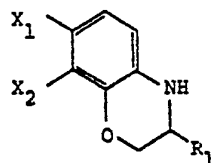


(X)

hvori R_1 og X_1 er som defineret ovenfor, X_2 betegner et halogenatom, og Q betegner et hydrogenatom eller en gruppe



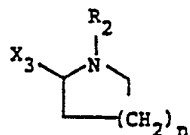
hvori R_2 betegner en substitueret sulfonyl-, en alkoxy-carbonyl- eller aralkyloxycarbonylgruppe, og n er et helt talt fra 1-3, ved omsætning af 7,8-dihalogen-3-alkyl-2,3-dihydro-4H-[1,4]benzoxazin med den almene formel (X'')



(X'')

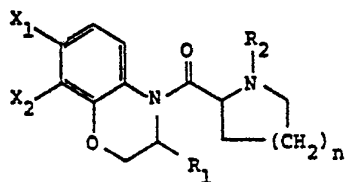
(X'')

hvori X_1 , X_2 og R_1 er som defineret ovenfor, med en forbindelse med den almene formel (XIV)



(XIV)

hvori R_2 og n er som defineret ovenfor til opnåelse af et 4-substitueret benzoxazinderivat med den almene formel (X''')



(X''')

(X''')

hvori X_1 , X_2 , R_1 , R_2 og n er som defineret ovenfor, adskillelse af den således opnåede i optisk aktive isomere til opnåelse af en forbindelse med formelen (X), hvori Q ikke er hydrogen, og eventuelt hydrolyse af denne til dannelse af forbindelsen med formelen (X), hvori Q er hydrogen, og dernæst behandler mellemproduktet ved en sædvanlig fremgangsmåde.

De optisk aktive pyridobenzoxazinderivater har forbedret antimikrobiel virkning og formindsket toksicitet.

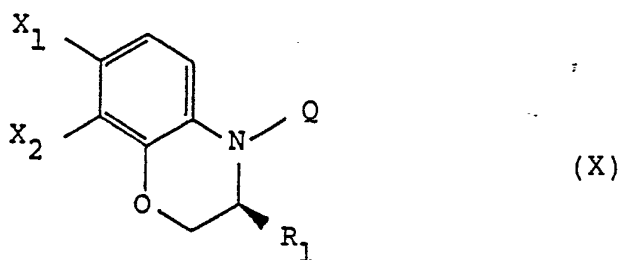
Opfindelsen angår optisk aktive pyridobenzoxazinderivater. Opfindelsen angår nærmere angivet hidtil ukendte S(-)-pyridobenzoxazinforbindelser, der er optisk aktive forbindelser af ofloxacin og dens analoger.

5 Ofloxacin ((±)-9-fluor-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperaziny1)-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]-benzoxazin-6-carboxylsyre) er kendt som værende et fortrinligt syntetisk antimikrobielt middel som beskrevet i japansk patentansøgning (OPI) nr. 46986/82 (betegnelsen
10 "OPI" anvendes heri i betydningen "ikke-prøvet offentliggjort patentansøgning").

Ofloxacin har et asymmetrisk carbonatom i 3-stillingen og opnås som et racemat (specifik drejning $[\alpha]_D = 0^\circ$) ved kendte fremgangsmåder. Ifølge den foreliggende
15 opfindelse har man opnået optisk aktive forbindelser af den racemiske forbindelse ofloxacin og fundet, at S(-)-forbindelsen har en antimikrobiel virkning, der er ca. to gange større end virkningen for (±)-forbindelsen og en akut toksicitet (LD_{50}), der er svagere end for (±)-
20 forbindelsen, bestemt i mus ved intravenøs administrering. På den anden side har man ifølge den foreliggende opfindelse fundet, at R(+)-forbindelsen har en antimikrobiel virkning på ca. 1/10 til 1/100 gange virkningen af (±)-forbindelsen, medens den har en akut toksicitet,
25 der i det væsentlige er lig med toksiciteten for (±)-forbindelsen. Det vil sige, at S(-)-formen af ofloxacin har vist sig at have meget ønskelige egenskaber, dvs. en større antimikrobiel virkning og reduceret toksicitet, og den forventes at være et meget nyttigt farmaceutisk
30 middel i sammenligning med (±)-forbindelsen. Endvidere har både R(+)- og S(-)-forbindelserne af ofloxacin i den frie form en bemærkelsesværdig høj vandopløselighed i sammenligning med (±)-forbindelsen og i sammenligning med frie forbindelser af denne type, og de kan anvendes
35 som injicerbare præparater. Disse fordele vil fremgå af

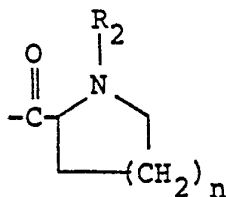
de eksperimentelle data vist senere.

Som et resultat af undersøgelser med det formål at fremstille især S(-)-formen, der har den stærkeste virkning blandt ofloxacin-isomererne har det vist sig, at forbindelser med den nedenstående formel (X) er nyttige som mellemprodukter til fremstilling af en ofloxacinisomer og andre isomere af pyridobenzoxazinderivater med fortrinlig antimikrobiologisk virkning:



20 hvori X_1 og X_2 , der kan være ens eller forskellige, hver betegner et halogenatom, såsom et fluor- eller chloratom, idet begge X_1 og X_2 fortrinsvis er fluoratomer, R_1 betegner en alkylgruppe med fra 1 til 4 carbonatomer, som en methyl-, ethyl- eller propylgruppe, osv. fortrinsvis en methylgruppe, Q betegner et hydrogenatom eller en gruppe med den almene formel:

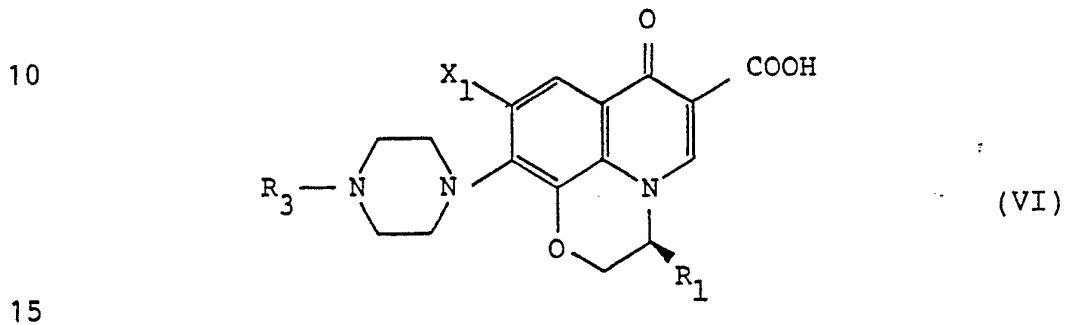
25



35 hvori R_2 betegner en substitueret sulfonylgruppe, en alkoxy-carbonylgruppe eller en aralkyloxy-carbonylgruppe, og n betegner et helt tal fra 1 til 3. Disse mellemprodukter med formelen (X) er gjort til genstand for dansk patentansøgning nr. 6416/88.

Det tilsigtes med opfindelsen at tilvejebringe optisk aktivt ofloxacin og dets analoger.

Det optisk aktive ofloxacin og dets analoger ifølge den foreliggende opfindelse er S(-)-pyridobenzoxazinforbindelser, der er ejendommelige ved, at de har den almene formel (VI):

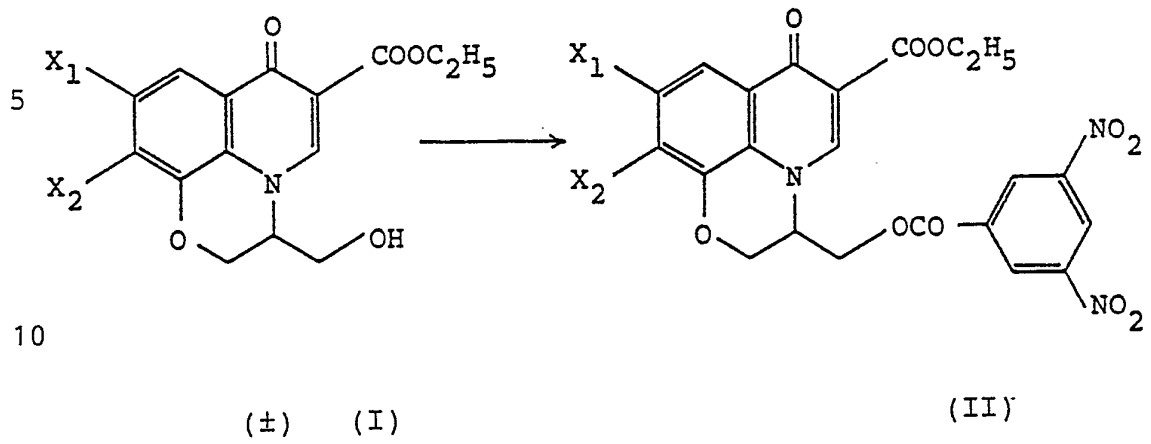


hvor X_1 betegner et halogenatom, R_1 betegner en alkylgruppe med 1 til 4 carbonatomer, og R_3 betegner en alkylgruppe med 1 til 3 carbonatomer.

I den ovenfor angivne formel VI betegner X_1 fortrinsvis et fluoratom, R_1 fortrinsvis en methylgruppe og R_3 fortrinsvis en methyl- eller ethylgruppe.

Det optisk aktive ofloxacin og dets analoger ifølge opfindelsen, dvs. S(-)-pyridobenzoxazinforbindelser med ovenstående formel (VI), kan i øvrigt fremstilles ved enhver af fremgangsmåderne A, B og C vist nedenfor:

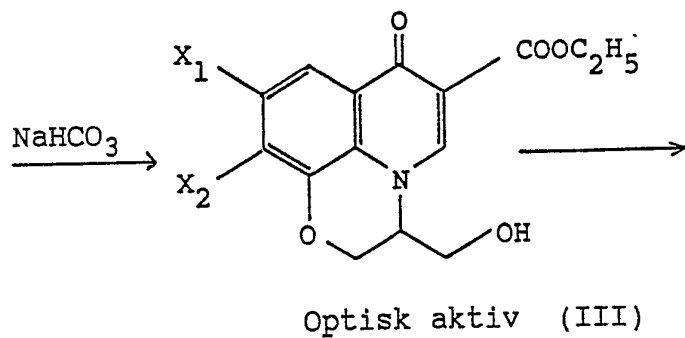
4

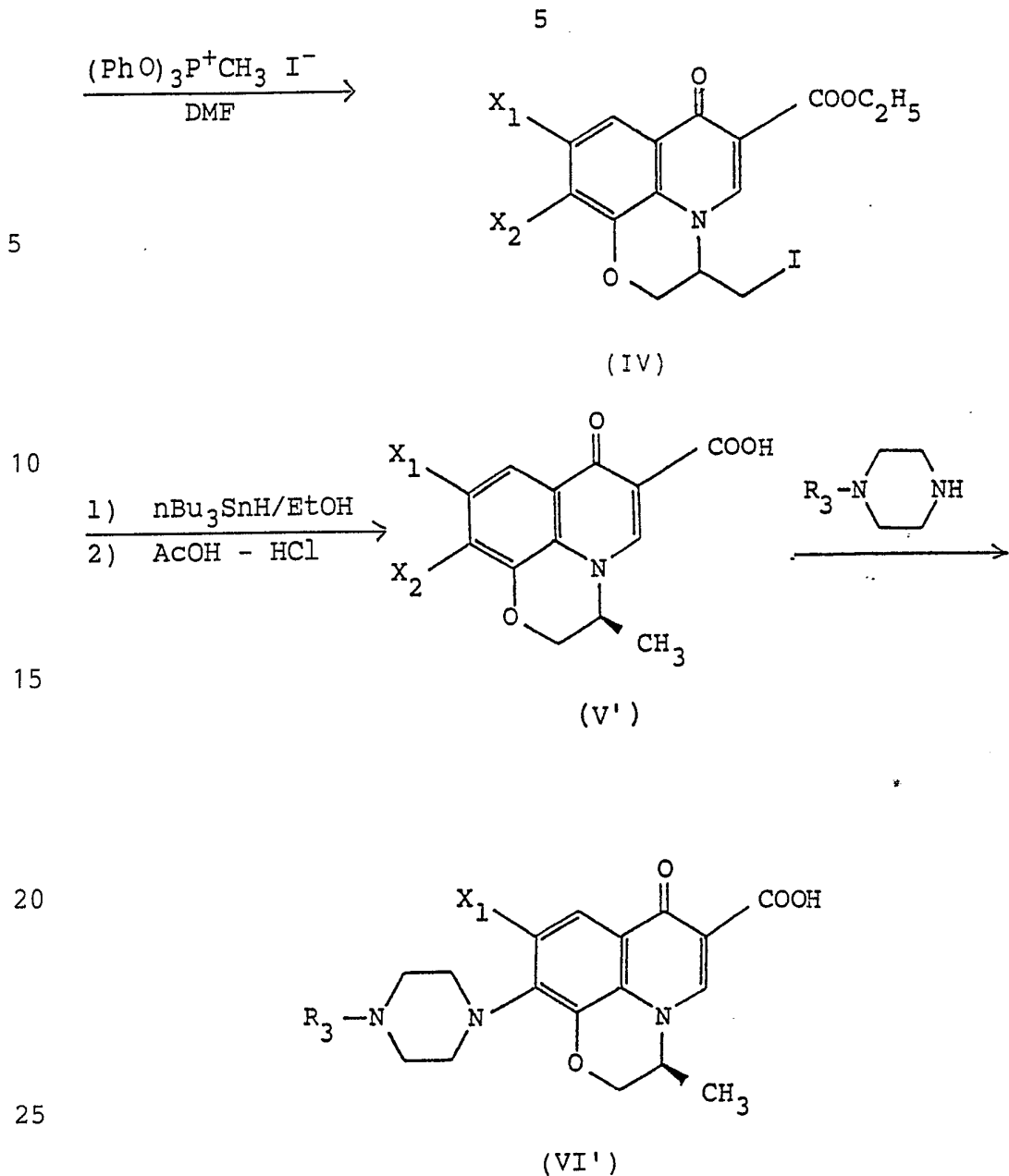
Fremgangsmåde A:

15

Spaltning i
optisk aktive
isomere

20





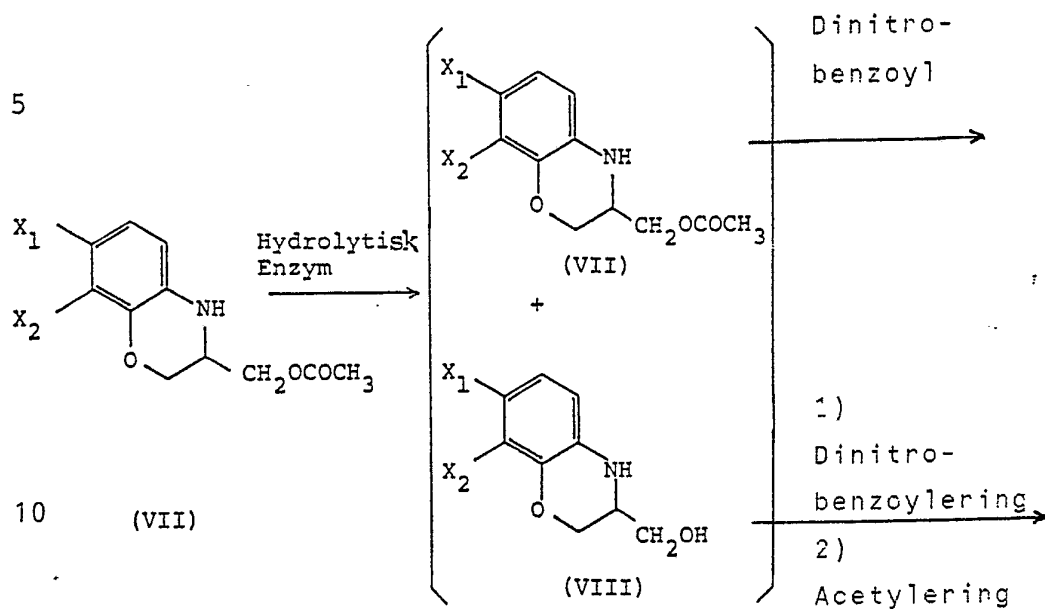
hvor X_1 , X_2 og R_3 er som defineret ovenfor.

Mere specifikt behandles (\pm)-3-hydroxymethylforbindelsen (I) med 3,5-dinitrobenzoylchlorid, ovs. til
 30 bindelsen (II) med 3,5-dinitrobenzoylchlorid, ovs. til
 opnåelse af et derivat deraf, såsom (\pm)-3,5-dinitrobenzoatforbindelsen (II), som dernæst adskilles i to optisk aktive forbindelser ved en passende fremgangsmåde, såsom HPLC. De efterfølgende procedurer kan udføres enten med
 35 S(-)-forbindelsen eller R(+)-forbindelsen for at føre til de respektive slutprodukter, men i betragtning af

det tilsigtede med den foreliggende opfindelse er slutproduktet (VI') vist som S(-)-form.

Den opnåede optisk aktive forbindelse behandles med natriumhydrogencarbonat, osv. til selektiv hydrolyse af benzoatdelen til dannelselse af hydroxymethylforbindelsen (III). Hydroxymethylforbindelsen omdannes til 3-iodmethylforbindelsen (IV) ved anvendelse af et ioderingsmiddel, hvilken forbindelse dernæst reduceres med n-tributyltinhydrid, osv. til fremstilling af 3-methylforbindelsen. Denne forbindelse kan uden at være isoleret og rensat hydrolyseres som sådan under sure betingelser til opnåelse af 3-methyl-6-carboxylsyren (V'). Carboxylsyren behandles dernæst med en N-alkylpiperazin, f. eks. ved opvarmning under omrøring til opnåelse af 10-(4-alkylpiperazinyl)forbindelsen (VI') som slutprodukt.

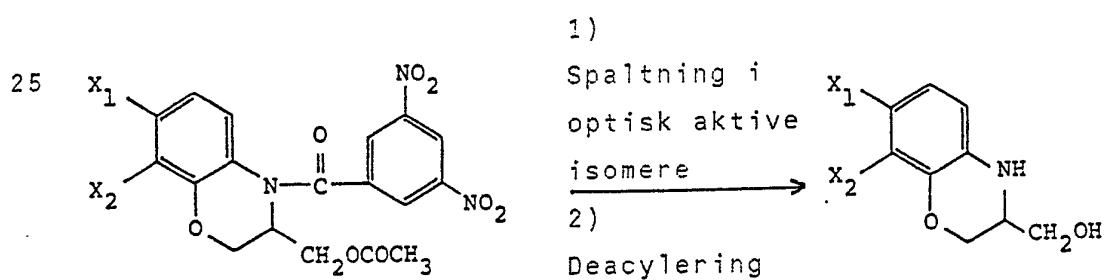
Forbindelserne med formlen VI, hvori R_1 betegner en alkylgruppe, bortset fra methylgruppen, kan også fremstilles på samme måde ud fra en passende (\pm)-3-hydroxyalkylforbindelse med formlen I.

Fremgangsmåde B

(VII)

(VIII)

20



(IX)

(VIII)

Optisk aktiv
isomer

35

hvori X_1 , X_2 og R_3 er som defineret ovenfor.

Som beskrevet tidligere er 7,8-difluor-2,3-dihydro-3-methyl-4H-[1,4]benzoxazin med formlen X, hvori X_1 og X_2 betegner fluoratomer, Q betegner et hydrogenatom, og R_1 betegner en methylgruppe, et vigtigt mellemprodukt til fremstilling af ofloxacin. Ifølge opfindelsen er der udført forskellige undersøgelser efter en hensigtsmæssig fremgangsmåde til fremstilling af en optisk isomer af denne forbindelse, idet man forventede at denne ville være et nyttigt udgangsmateriale til fremstilling af S(-)-isomeren af ofloxacin.

Som et resultat heraf har det vist sig, at der er en forskel mellem hydrolysehastigheden af (+)-isomeren og (-)-isomeren, når en racemisk 7,8-dihalogen-2,3-dihydro-3-acetoxymethyl-4H-[1,4]benzoxamin (VII), som et substrat, hydrolyseres med et passende enzym, såsom en vis type lipase til dannelselse af en 7,8-dihalogen-2,3-dihydro-3-hydroxymethyl-4H-[1,4]benzoxazin (VIII).

For eksempel omsattes forbindelsen (VII) med lipoproteinlipase (LPL Amano 3 opnået ud fra *Pseudomonas aeruginosa*, fremstillet af Amano Seiyaku K.K.) eller lipase (opnået ud fra svinepancreas, fremstillet af Shigma Chemical Company (USA), opnået ud fra *Candida cylindracea*, fremstillet af Shigma Chemical Company, eller opnået ud fra *Rhizopus delemar*, fremstillet af Seikagaku Kogyo Co., Ltd.), og reaktionsændringen med tiden blev bestemt gennem HPLC (kolonne: TSK gel ODS-120A, 4,6 x 250 mm, opløsningsmiddel: acetonitril/vand = 1/1 på basis af volumen, hastighed: 1 ml/min). Når hydrolysegraden nåede ca. 55%, blev forbindelsen (VII) opsamlet og bragt i kontakt med et 3,5-dinitrobenzoylderivat (IX). Det opnåede reaktionsprodukt blev bestemt kvantitativt ved HPLC (kolonne; Sumipacks OA-4200, 4,0 x 250 mm, opløsningsmiddel: n-hexan/1,2-dichlorethan/ethanol = 92/6,4/1,6 på basis af volumen, hastighed: 1,6 ml/min) til opnåelse af forholdet (+)-isomer/(-)-isomer for for-

bindelsen (VII). De opnåede resultater var som vist i Tabel 1 nedenfor.

T a b e l 1

5	Enzym (Oprindelse)	Hydrolysegrad %	(+)/(-)
	LPL Amano 3 (P. aeruginosa)	54,7	23,0/77,0
10	Lipase (R. Delemar)	53,6	42,6/57,4
	Lipase (C. cylindracea)	54,5	61,9/38,1
15	Lipase (Svine pancreas)	55,2	56,8/43,2

20 Disse resultater førte til den konklusion, at de optisk aktive forbindelser (VII) og (VIII) kan opnås ved anvendelse af såkaldt asymmetrisk hydrolyse med disse enzymer.

25 Fremgangsmåden B ifølge det ovenfor anførte skema omfatter, at man omsætter racemisk 7,8-dihalogen-2,3-dihydro-3-acetoxymethyl-4H-[1,4]benzoxazin (VII) med et asymmetrisk hydrolytisk enzym til udvinding af en blanding omfattende udgangsforbindelsen (VII), som er
30 mere og en 3-hydroxymethylforbindelse (VIII), adskiller blandingen i hver af forbindelserne, dinitrobenzoylerer enten den ene eller begge disse forbindelser og yderligere acetylerer den benzoylerede 3-hydroxymethylforbin-
delse (VIII) til opnåelse af forbindelsen (IX), adskil-
35 ler forbindelsen i et racemat og en optisk aktiv isomer ved krystallisation, udsætter den opnåede optisk aktive

isomer for deacylering og dehydroxylering ved hjælp af kendte kemiske fremgangsmåder til opnåelse af en optisk aktiv 7,8-dihalogen-2,3-dihydro-3-methyl-4H-[1,4]benzoxazin (X') og ud fra denne opnår optisk aktivt ofloxacin eller dets analog (VI') ved kendte fremgangsmåder.

Fremgangsmåden B vil blive belyst mere detaljeret ved hjælp af specifikke eksempler.

Den racemiske forbindelse (VII) opløses i en 0,1M phosphorsyrepudder (pH 7,0), og lipoproteinlipase (LPL Amano 3) tilsættes til opløsningen til fremkaldelse af en enzymatisk reaktion ved 37°C. Ved denne reaktion hydrolyseres (+)-forbindelsen fortrinsvis til dannelselse af en blanding af forbindelsen (VII), der er rig på (-)-isomeren og forbindelsen (VIII), der er rig på (+)-isomeren. Reaktionsblandingen udtages i et passende trin ved ekstraktion med et organisk opløsningsmiddel, såsom ethylacetat.

Reaktionen i et organisk opløsningsmiddel ved hjælp af passende dispergerings- eller fikseringsmidler, som beskrevet ovenfor, er hensigtsmæssig, idet substratet kan omsættes i højere koncentrationer end i en vandig opløsning, og idet behandlingerne efter reaktionen kan simplificeres. Ved udførelse af reaktionen i et organisk opløsningsmiddel kan reaktionsblandingen faktisk opsamles i høje udbytter, blot ved frafiltrering af dispergerings- eller fikseringsmidlet under et passende stadium og koncentrering af filtratet. Fikseringsmidlerne kan endvidere med fordel anvendes gentagne gange.

Forbindelserne (VII) og (VIII) i reaktionsblandingen kan adskilles og renses ved en sædvanlig isolationsmetode, såsom silicagel-kolonnekromatografi. Den således fraskilte forbindelse (VII) behandles f.eks. med 3,5-dinitrobenzoylchlorid i tetrahydrofuran i tilstedeværelse af pyridin til dannelselse af 3,5-dinitrobenzoylderivatet (IX), som dernæst omkrystalliseres af et passende opløsningsmiddel, f.eks. en blanding af ethylace-

tat og n-hexan, hvorved fortrinsvis racematet krystalliseres. De racemiske krystaller separeres ved filtrering, og (-)-7,8-dihalogen-2,3-dihydro-3-acetoxymethyl-4H-[1,4]benzoxazin-3,5-dinitrobenzoylderivatet (IX) med en høj optisk renhed opnås ud fra filtratet.

Forbindelsen (IX) udsættes dernæst for deacyle-ringsbehandling, f.eks. ved hydrolyse under alkaliske betingelser til dannelse af (-)-isomeren af forbindelsen (VIII). Denne forbindelse opløses i pyridin og behandles med thionylchlorid, og produktet udsættes desuden for dehydroxylering på sædvanlig måde, som ved reduktion med natriumborhydrid i dimethylsulfoxid, til opnåelse af (-)-7,8-dihalogen-2,3-dihydro-3-methyl-4H-[1,4]benzoxazin (X') med en optisk renhed på 99% eller mere.

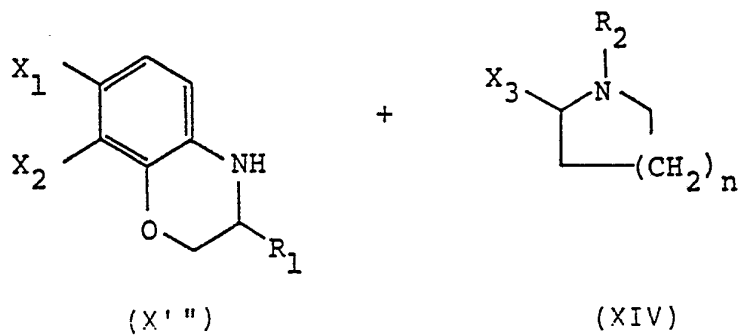
Når den racemiske forbindelse (VII) behandles med lipase (opnået ud fra *Candida cylindracea* eller svinepancreas), hydrolyseres fortrinsvis (-)-forbindelsen til opnåelse af forbindelsen (VIII), der er rig på (-)-isomeren. Den opnåede forbindelse bringes i kontakt med en forbindelse (IX), som dernæst behandles ifølge de ovenfor beskrevne fremgangsmåder, såsom separation ved krystallisation til dannelse af (-)-isomeren af forbindelsen (VIII). (-)-isomeren af forbindelsen (X') kan dernæst fremstilles ud fra dette produkt på samme måde som beskrevet ovenfor med høj renhed.

Andre asymmetriske hydrolyser, der kan opfylde det tilsigtede foruden de ovenfor angivne enzymer, kan findes på basis af den ovennævnte redegørelse. Endvidere kan de samme fremgangsmåder som beskrevet ovenfor følges på basis af den ovennævnte redegørelse, når det tilsigtes at opnå (+)-forbindelserne.

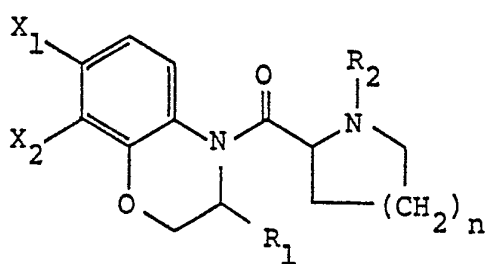
(-)-forbindelsen af ofloxacin og analoge deraf kan fremstilles ud fra de hidtil ukendte mellemprodukter med formlen (X') ved fremgangsmåden C, som nærmere beskrevet nedenfor.

Fremgangsmåde C

5



15

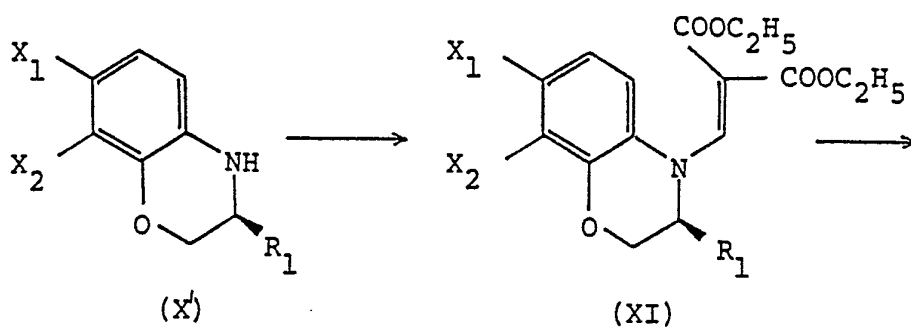


- 1) Adskillelse i optiske isomere
- 2) Hydrolyse

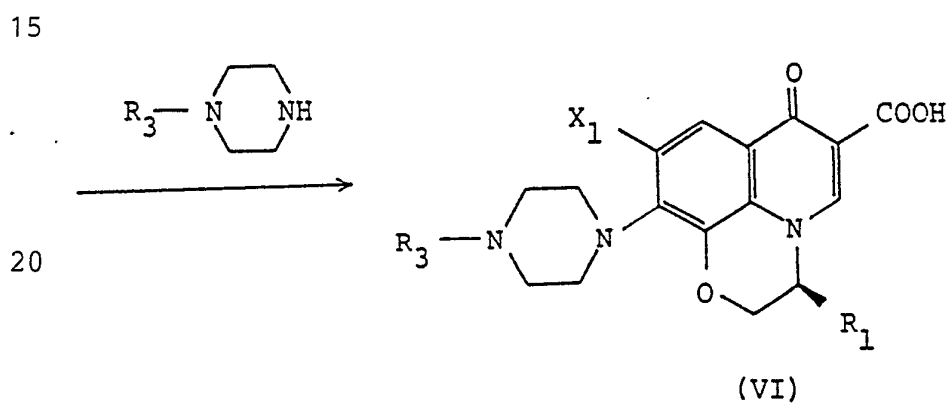
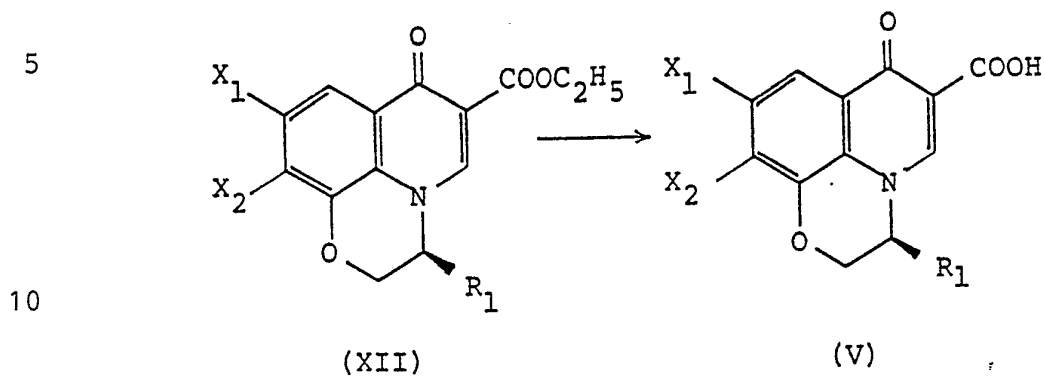
20

(X'')

25



30



25

(VI)

I formlerne er n , X_1 , X_2 , R_1 , R_2 og R_3 er som defineret ovenfor, og X_3 er en carboxylgruppe eller et reaktivt derivat deraf, f.eks. en aktiv ester, et halogenid eller et syreanhydrid af carboxylsyren.

I fremgangsmåde C kondenseres 7,8-dihalogen-1,4-benzoxazinderivatet (X'') med en cyklisk aminosyre eller et reaktivt derivat deraf (XIV) ved amidbindingsdannelse til opnåelse af forbindelsen (X''). Kondensationsreaktionen kan udføres ved enhver af den aktive estermetode,

35

syreanhydridmetoden eller DCD-metoden, men i almindelighed omsættes forbindelsen (X') og syrechloridet (XIV), hvori X_3 er $-COCl$, i et organisk opløsningsmiddel, såsom et halogeneret carbonhydrid, f.eks. dichlormethan, i 5 tilstedeværelse af en syreacceptor, såsom pyridin, triethylamin eller kaliumcarbonat, ved stuetemperatur under omrøring. Reaktionsproduktet kan isoleres og renses på sædvanlig måde, såsom krystallisation, kolonnekromatografi osv.

10 Ved denne kondensationsreaktion kan separation af den diastereomere blanding af forbindelsen (X'') let udføres, når enten den ene eller den anden af de to isomere af den cykliske aminosyre eller det reaktive derivat deraf (XIV), dvs. en S-forbindelse eller en R-forbindelse, anvendes. Nærmere betegnet anvendes derivater 15 (XIV), såsom S- eller R-prolin, S- eller R-pipecolsyre (piperidin-2-carboxylsyre) osv., hensigtsmæssigt. De mest foretrukne forbindelser (XIV) omfatter (S)-N-benzensulfonylprolin og (S)-N-p-toluensulfonylprolin.

20 Den diastereomere blanding af forbindelsen (X'') kan separeres ved fraktioneret krystallisation, kromatografi ved anvendelse af silicagel osv. som en bærer, eller en kombination heraf.

Den således separerede diastereomer hydrolyseres, 25 sædvanligvis under basiske betingelser, til dannelsen af en 7,8-dihalogen-3-(S eller R)-lavere alkyl-[1,4]benzoxazin (X'). Denne forbindelse kan omdannes til en 9,10-dihalogen-3-(S eller R)-lavere alkyl-7-oxo2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]benzoxazin-6-carboxylsyre (V) 30 gennem kendte reaktioner, hvilken forbindelse dernæst kan omdannes til en 10-(4-alkylpiperazinyl)-forbindelse (VI).

Af de ovenfor beskrevne fremgangsmåder A, B og C er fremgangsmåde C særligt foretrukket.

Antimikrobiel virkning

De antimikrobielle virkninger af de optiske isomere [(-) og (+)] af ofloxacin og en analog forbindelse overfor forskellige mikroorganismer blev sammenlignet med virkningen af ofloxacin (racemat), og resultaterne er vist i Tabel 2 nedenfor. Testmetoden var i overensstemmelse med standardmetoden angivet af The Japan Society of Chemotherapy.

T a b e l 2

Minimal inhibitorisk koncentration (MIC, µg/ml)

Mikroorganisme	S(-)- Ofloxacin	Racemisk Ofloxacin	R(+)- Ofloxacin	Forbindelse ifølge Eksempel 17
E. Coli, NIHJ	<0,1	<0,10	0,39	<0,1
K. pneumoniae, type 2	<0,1	0,10	1,56	<0,1
Ser. marcescens, 10100	<0,1	0,10	1,56	<0,1
Ps. aeruginosa, 32104	0,39	0,78	12,5	0,39
Ps. aeruginosa, 32121	0,10	0,20	6,25	0,10
Ps. maltophilia, IID1275	0,39	0,78	12,5	0,10
S. aureus, Smith	0,10	0,20	6,25	<0,1
S. aureus, 209P	0,20	0,39	25	0,10
Str. pyogenes, G-36	0,78	1,56	<100	1,56

Akut toksicitet

Den akutte intravenøse toksicitet af (\pm), R(+)- og S(-)-formerne af ofloxacin i hanmus er vist i Tabel 3 nedenfor.

5

T a b e l 3

10	Forbindelse	Dosis (mg/kg)	Antal mus	Antal dage efter behandling			Dødelighed
				1	2	3	
	(\pm)	100	5	0	0	0	0/5
		200	5	2	0	0	2/5
		400	5	5	0	0	5/5
15	R(+)	100	5	0	0	0	0/5
		200	5	3	0	0	3/5
		400	5	5	0	0	* 5/5
20	S(-)	100	5	0	0	0	0/5
		200	5	0	0	0	0/5
		400	5	5	0	0	5/5
25	LD ₅₀ (i.v. i mus)						
			(\pm)-form	203	mg/kg		
			S(-)-form	244	mg/kg		

Opløselighed

30 Opløseligheden af (\pm), R(+)- og S(-)-formerne af ofloxacin i vand ved en temperatur i området fra 23 til 26°C er vist i Tabel 4 nedenfor.

T a b e l 4

	<u>Forbindelse</u>	<u>Vandopløselighed (µg/ml)</u>
5	(±)	2.400
	R(+)	25.800
	S(-)	22.500

10

Omdannelsen af mellemprodukterne med formlen (X) til den ønskede ofloxacin eller en analog deraf kan udføres ved velkendte fremgangsmåder, f.eks. som beskrevet i US patentskrift 4 382 892, EPC patent 47005, japansk patentansøgning (OPI) 29789/83 og 43977/83.

15

Opfindelsen vil i det følgende blive belyst mere detaillert ved hjælp af de følgende eksempler, men det må forstås, at de ikke må opfattes som begrænsende for opfindelsens omfang. I Eksemplerne 1 til 7 beskrives fremstilling af ofloxacin ifølge Fremgangsmåde A, i Eksemplerne 8 til 11 beskrives fremstillingen af ofloxacin ifølge Fremgangsmåde B, og i Eksemplerne 12 til 17 beskrives fremstillingen af ofloxacin og analoge forbindelser ifølge Fremgangsmåde C.

20

25

Eksempel 1Fremstilling af benzoyloxy-forbindelse

Et gram (±)-9,10-difluor-3-hydroxymethyl-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]benzoxazin-6-carboxylsyre-ethylester (I) og 500 mg pyridin blev suspenderet i 100 ml vandfri tetrahydrofuran (THF), og 1,6 g 3,5-dinitrobenzoylchlorid sattes dertil, hvorefter der blev refluxet ved 90°C. Suspensionen blev opløst og dernæst dannedes et farveløst bundfald. Reaktionen fortsatte i 1,5 timer. Efter afkøling blev bundfaldet opsamlet ved

30

35

filtrering, vasket med methanol og diethylether og tørret til opnåelse af 1,2 g (\pm)-9,10-difluor-3-(3,5-dinitrobenzoyloxy)methyl-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]benzoxazin-6-carboxylsyreethylester (II) som et farveløst pulver med et smeltepunkt på 240-242°C.

NMR (CDCl₃/5% DMSO-d₆) δ (ppm).

1,30 (3H, t, J=7,0 Hz, -CH₂CH₃), 4,26 (2H, q, J = 7,0 Hz, -CH₂CH₃), 4,4-4,5 (5H, m), 7,76 (1H, dd, J = 11,0 Hz, 7,0 Hz, C₈-H), 8,8 (1H, s, C₅-H), 9,0 (2H, d, J = 3,0 Hz, aromatisk ringproton) og 9,2 (1H, t, J = 3,0 Hz, aromatisk ringproton).

Eksempel 2

15 Adskillelse af optiske isomere

Seks mg af benzoylforbindelsen opnået i Eksempel 1 blev opløst i ca. 0,6 ml dimethylformamid (DMF), som var rensset ved destillation. Opløsningen blev filtreret gennem et milliporefilter og udsat for HPLC ved anvendelse af en kolonne af Sumipacks OA-4200 (2 cm x 25 cm) og et opløsningsmiddel af n-hexan/1,2-dichlorethan/ethanol = 6/3/1 (på basis af volumen) ved en hastighed på 8 ml/min.

Idet de første fraktioner (fraktioner af (+)-forbindelsen) indeholdt små mængder af den racemiske forbindelse (I) på grund af den partielle hydrolyse, når den blev opløst i DMF, blev de rensset yderligere ved silicagelkromatografi ved anvendelse af chloroform til 10% methanol/chloroform som elueringsmiddel. Disse rensningsprocedurer blev gentaget til opnåelse af 250 mg af hver af de to optisk aktive forbindelser [(-)isomeren og (+)-isomeren] ud fra 600 mg af benzoyloxyforbindelsen (II).

(+)-Isomer: Retentionstid 56-76 min. (kolonne-temperatur: 22°C), smp. 235-240°C, $[\alpha]_D^{23} = +90,8^\circ$ (c = 0,852, DMF)

(-)-Isomer: Retentionstid: 78-98 min. (kolonne-
temperatur: 22°C), smp. 244-249°C,
 $[\alpha]_D^{23} = 92,5^\circ$ (c = 0,889, DMF).

5

Eksempel 3

Fremstilling af ethyl(-)-9,10-difluor-3-hydroxymethyl-
7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]benzoxazin-6-
carboxylat (III)

10 I en blanding af 10 ml ethanol og 4 ml mættet,
vandig natriumhydrogencarbonatopløsning suspenderedes
120 mg af den optisk aktive benzoyloxyforbindelse [(-)-
isomeren], og suspensionen blev opvarmet til 50 til 60°C
i to timer under omrøring. Efter koncentrering tilsat-
15 tes vand til reaktionsblandingen, og alt uopløselige ma-
teriale blev opsamlet ved filtrering, vasket successivt
med vand, 95% ethanol og diethylether til opnåelse af 68
mg af en optisk aktiv 3-hydroxymethylforbindelse [(III),
(-)-isomer] som farveløse krystaller med et smp. på 235
20 - 240°C.

Elementæranalyse for $C_{15}H_{13}F_2NO_5$:

Beregnet: (%) C 55,39 H 4,03 N 4,31

Fundet: C 55,44 H 4,01 N 4,49.

$[\alpha]_D^{23} = -125,9^\circ$ (c = 0,918, DMF).

25 På samme måde som beskrevet ovenfor fremstilledes
en (+)-3-hydroxymethylforbindelse ud fra (+)-benzoyloxy-
forbindelsen. Smp.: 231-234°C. $[\alpha]_D^{23} = +125,9^\circ$ (c =
0,715, DMF).

30

Eksempel 4

Fremstilling af ethyl(-)-9,10-difluor-3-iodmethyl-7-oxo-
2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]benzoxazin-6-carboxy-
-lat (IV)

35 I 12 ml vandfri DMF suspenderes 63 mg af (-)-3-
hydroxymethylforbindelsen (III), og suspensionen blev

opvarmet til 70 til 80°C under omrøring til dannelse af en opløsning, hvorefter den blev afkølet til stuetemperatur. Til opløsningen sattes 340 mg triphenylphosphitmethiodid, hvorefter der omrørtes i 1,5 timer. Opløsningsmidlet blev fjernet ved destillation under reduceret tryk, og remanensen blev opløst i chloroform. Opløsningen blev udrystet med en vandig natriumthiosulfatopløsning og dernæst med mættet vandig natriumchloridopløsning. Chloroformfasen blev tørret over vandfrit magnesiumsulfat, og opløsningsmidlet blev fjernet ved destillation. Til remanensen sattes diethylether, hvorefter der omrørtes, og det udfældede faste stof blev opsamlet ved filtrering, vasket med diethylether og tørret under reduceret tryk til opnåelse af 78 mg af en iodmethylforbindelse (IV) som et hvidt pulver med et smp. på 214-217°C.

Elementæranalyse for $C_{15}H_{12}F_2INO_4$:

Beregnet: (%) C 41,40 H 2,78 N 3,22

Fundet: C 41,16 H 2,58 N 2,99

(+)-Forbindelsen opnåedes på samme måde som beskrevet ovenfor.

Eksempel 5

Fremstilling af S(-)-9,10-difluor-3-methyl-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido-[1,2,3-de][1,4]-benzoxazine-6-carboxylsyre (V').

I 18 ml absolut ethanol suspenderedes 78 mg af iodmethylforbindelsen (IV), og suspensionen blev opvarmet til 60 til 70°C under omrøring til dannelse af en opløsning, som man lod afkøle til stuetemperatur. Til den opnåede opløsning sattes 0,2 ml n-tributhyltinhydrid, og blandingen blev omrørt ved 50 til 60°C i en time og dernæst ved stuetemperatur i en time. Opløsningsmidlet blev fjernet ved destillation, og remanensen blev udsat for kolonnekromatografi ved anvendelse af 8 g si-

licagel som en bærer og chloroform:methanol (40:1 på basis af volumen) som elueringsmiddel til opnåelse af en rå methylforbindelse. Råproduktet blev opløst i to ml iseddikesyre, og 4 ml koncentreret saltsyre sattes der-
 5 til. Efter opvarmning til refluxning i 40 minutter blev reaktionsblandingen koncentreret. Der tilsattes vand til koncentratet, og de således udfældede krystaller blev opsamlet ved filtrering, vasket successivt med vand, ethanol og diethylether og tørret under reduceret
 10 tryk til opnåelse af 22 mg krystaller af en S(-)-forbindelse (V') med et smp. på 300°C eller mere.

Elementæranalyse for $C_{13}H_9F_2NO_4$:

Beregnet: (%)	C	55,52	H	3,23	N	4,98
Fundet: (%)	C	55,79	H	3,20	N	4,91.

15

Eksempel 6

Fremstilling af S(-)-9-fluor-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]-
 20 benzoxazin-6-carboxylsyre

I 3 ml vandfrit dimethylsulfoxid opløstes 21 mg af S(-)-9,10-difluor-3-methyl-6-carboxylsyren (V') og 30 mg N-methylpiperazin, og opløsningen blev omrørt ved 130 til 140°C i en time. Opløsningsmidlet blev fjernet
 25 ved destillation, og 2 ml ethanol sattes til remanensen. Det således udfældede faste stof blev opsamlet ved filtrering og vasket successivt med en lille mængde ethanol og diethylether. Det opnåede pulver, der vejede 14 mg, blev ledt gennem en kolonne af 5 g silicagel og elueret
 30 med et nedre lag opløsning af chloroform-methanol-vand (7:3:1 på basis af volumen) til opnåelse af titelforbindelsen, 10-(4-methyl-1-piperazinyl)forbindelsen (VI'). Moderluden, der blev tilbage efter filtreringen, blev udsat for tyndtlagskromatografi (silicagel, 20 cm x 20
 35 cm, 5 mm (t)) og fremkaldt med de nedre lag opløsning af chloroform-methanol-vand (15:3:1 på basis af volumen. De

næst opløst i 20 ml 95% ethanol, indeholdende 0,5 ml triethylamin, og opløsningen blev opvarmet til reflux i 8 timer. Efter afkøling blev reaktionsblandingen opkoncentreret til tørhed under reduceret tryk. Remanensen blev opløst i 5% fortyndet saltsyre, og opløsningen blev udrystet mellem chloroform og vand. pH i den vandige fase blev indstillet til 11 med 1N natriumhydroxid og dernæst til 7,4 med 1N saltsyre. Opløsningen blev ekstraheret tre gange med portioner af 50 ml chloroform, og ekstrakten blev tørret over natriumsulfat. Chloroformen blev fjernet ved destillation. Omkrystallisation af det opnåede pulver af ethanol-diethylether gav 120 mg af telforbindelsen som et transparent, fint, nålelignende, krystallinsk produkt med et smp. på 225-227°C (med sønderdeling). $[\alpha]_D^{24} = -76,9^\circ$ (c = 0,385, 0,05N NaOH).

Elementæranalyse for $C_{18}H_{20}FN_3O_4 \cdot \frac{1}{2}H_2O$:

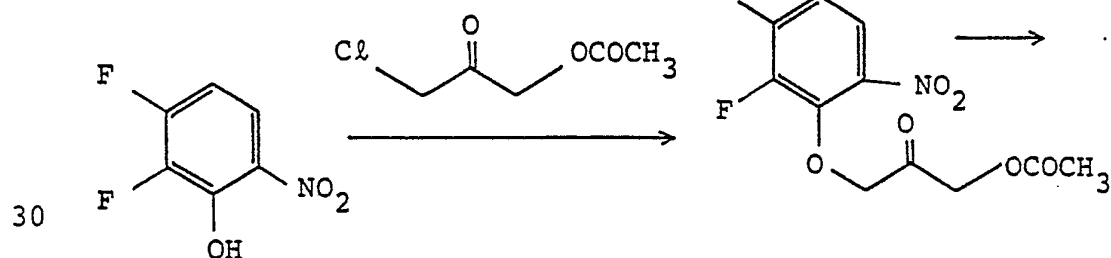
Beregnet: (%)	C	58,37	H	5,72	N	11,35
Fundet: (%)	C	58,17	H	5,58	N	11,27.

20

Referenceeksempel 1

Fremstilling af (±)-3-acetoxymethyl-7,8-difluor-2,3-dihydro-4H-[1,4]benzoxazin

25



30

(A)

I 1,0 liter acetone opløstes 60,0 g 2,3-difluor-6-nitrophenol, og 70,0 g 1-acetoxy-3-chlor-2-propan hvorefter 33,1 g kaliumcarbonat tilsættes til opløsningen under omrøring ved stuetemperatur. Efter omrøring i

35

yderligere 30 minutter sættes 6,6 g kaliumiodid dertil, og blandingen blev refluxet i fire timer. Efter man havde ladet blandingen afkøle, filtreredes reaktionsblandingen, og filtratet blev opkoncentreret under reduceret tryk. Koncentratet blev opløst i 4,0 liter af en opløsningsmiddelblanding af ethylacetat:benzen (1:1 på basis af volumen). Den opnåede opløsning blev vasket med vand, tørret over vandfrit natriumsulfat og koncentreret under reduceret tryk. Koncentratet blev udsat for kolonnekromatografi under anvendelse af 1,2 kg silicagel og benzen/ethylacetat (10/1) som elueringsmiddel til opnåelse af 32,8 g af Forbindelsen (A) som et olieagtigt produkt. Forbindelsen (A) opløstes i 300 ml methanol, og 115 ml Raney-nikkel sættes dertil til fremkaldelse af katalytisk reduktion under atmosfæretryk. Reaktionsblandingen blev filtreret, og filtratet blev opkoncentreret under reduceret tryk. Koncentratet blev rensat ved kolonnekromatografi ved anvendelse af 400 g silicagel og benzen/ethylacetat (10/1 på basis af volumen) som elueringsmiddel, og produktet blev omkrystalliseret af benzen-n-hexan til opnåelse af 17,9 g (\pm)-3-acetoxymethyl-7,8-difluor-2,3-dihydro-4H-[1,4]benzoxazin (VII) som farveløse krystaller med smp. på 73-74°C.

Elementæranalyse for $C_{11}H_{11}F_2NO_3$:

25	Beregnet; (%)	C	54,32	H	4,56	N	5,76
	Fundet: (%)	C	54,09	H	4,42	N	5,76.

Eksempel 8

30 Fremstilling af (-)-3-acetoxymethyl-7,8-difluor-2,3-dihydro-4H-[1,4]benzoxazin-3,5-dinitrobenzoylderivat
(IX)

a) Ti gram (\pm)-3-acetoxymethyl-7,8-difluor-2,3-dihydro-4H-[1,4]benzoxazin (VII) som substrat blev opløst i 1,00 liter af en blanding af benzen/n-hexan (4/1 på basis af volumen). En harpisk i våd tilstand, som var

fremstillet ved suspension af 100 ml DEAE-Toyopearl 650M i en 0,05M phosphorsyrepuuffer (pH 7,0) efterfulgt af filtrering ved sugning, og tilsætning af 200 mg lipoproteinlipase (LPL Amano 3), sættes til den ovenfor fremstillede substratopløsning. Man lod reaktionsblandingen reagere ved 37°C i seks timer under omrøring. Reaktionsblandingen blev filtreret ved sugning, og harpiksen blev vasket med 200 ml benzen. Filtratet og vaskevæskan blev hældt sammen og opkoncentreret under reduceret tryk. Koncentratet, der vejede 9,68 g, blev udsat for kolonnekromatografi under anvendelse af 200 g silicagel som en bærer og benzen/ethylacetat (10/1 på basis af volumen) som elueringsmiddel til opnåelse af 4,67 g 3-acetoxymethyl-7,8difluor-2,3-dihydro-4H[1,4]benzoxazin.

Den opnåede forbindelse blev opløst i 200 ml tetrahydrofuran, og 5,76 g 3,5-dinitrobenzoylchlorid og 3,3 ml pyridin sættes dertil, hvorefter der opvarmedes til 60°C i tre timer. Reaktionsblandingen blev opkoncentreret under reduceret tryk, og koncentratet blev opløst i 400 ml ethylacetat, vasket successivt med fortyndet saltsyre, en vandig opløsning af natriumhydrogencarbonat og vand, tørret over vandfrit natriumsulfat og opkoncentreret under reduceret tryk. Tilsætning af n-hexan til koncentratet forårsagede udfældning af lysegule krystaller af et racemat. Efter tilstrækkelig udfældning blev bundfaldet skilt fra ved filtrering, og filtratet blev opkoncentreret til tørhed til opnåelse af 3,93 g af et 3,5-dinitrobenzoylderivat af (-)-3-acetoxymethyl-7,8-difluor-2,3-dihydro-4H-[1,4]benzoxazin (IX).

b) Til ca. 2,0 ml Amberlite XAD 7 sættes 2,0 ml af en 0,05M phosphorsyrepuuffer (pH 7,0), hvori der var opløst 20 mg lipoproteinlipase (LPL Amano 3), og man lod blandingen henstå ved stuetemperatur i 18 timer, således at enzymet kunne adsorberes på harpiksen. Harpiksen blev filtreret fra ved sugning og vasket med 10 ml af en 0,05M phosphorsyrepuuffer (pH 7,0). En opløsning af 250

mg (\pm)-3-acetoxymethyl-7,8-difluor-2,3-dihydro-4H-[1,4]-benzoxazin som et substrat i 25 ml af en opløsningsmiddelblanding af benzen og n-hexan (4:1 på basis af volumen) sattes til den således fremstillede harpiks i våd tilstand, hvorefter man lod blandingen reagere ved 37°C i fire timer under omrøring. Reaktionsblandingen blev oparbejdet på samme måde som beskrevet i a) ovenfor til opnåelse af 117 mg optisk aktiv 3-acetoxymethyl-7,8-difluor-2,3-dihydro-4H-[1,4]benzoxazin. På samme måde opnåedes 65 mg af et 3,5-dinitrobenzoylderivat af (-)-3-acetoxymethyl-7,8-difluor-2,3-dihydro-4H-[1,4]benzoxazin.

c) Til 3,60 liter af en 0,1M phosphorsyrepuffer (pH 7,0) sattes 3,60 g (\pm)-3-acetoxymethyl-7,8-difluor-2,3-dihydro-4H-[1,4]benzoxazin som et substrat, og blandingen omrørtes ved 37°C i 18 timer til dannelselse af en opløsning. Til den opnåede opløsning sattes 50 mg lipoproteinlipase (LPL Amano 3), hvorefter man lod reaktionsblandingen reagere ved 37°C i 190 minutter under omrøring. Reaktionsblandingen blev ekstraheret tre gange med 2,0 l portioner af ethylacetat. Det forenede ekstrakt blev vasket med vand, tørret over vandfrit natriumsulfat og opkoncentreret under reduceret tryk. Koncentratet blev udsat for kolonnekromatografi under anvendelse af 70 g silicagel som en bærer og chloroform som elueringsmiddel til opnåelse af 1,07 g optisk aktiv 3-acetoxymethyl-7,8-difluor-2,3-dihydro-4H-[1,4]benzoxazin. Den opnåede forbindelse blev behandlet på samme måde som beskrevet i a) ovenfor til opnåelse af 0,9 g af et 3,5-dinitrobenzoylderivat af (-)-3-acetoxymethyl-7,8-difluor-2,3-dihydro-4H-[1,4]benzoxazin.

d) Til 3,70 liter 0,1M phosphorsyrepuffer (pH 7,0) sattes 3,70 g (\pm)-3-acetoxymethyl-7,8-difluor-2,3-dihydro-4H-[1,4]benzoxazin som et substrat, hvorefter der omrørtes ved 37°C i 3,5 timer til dannelselse af en opløsning. Til den opnåede opløsning sattes 2,22 g lipase

(opnået ud fra *Candida cylindracea*), hvorefter man lod
blandingen reagere ved 37°C i 3,5 timer under omrøring.
Reaktionsblandingen blev ekstraheret tre gange med 2,0
l portioner af ethylacetat. Det forenede ekstrakt blev
5 vasket med vand, tørret over vandfrit natriumsulfat og
opkoncentreret under reduceret tryk. Koncentratet blev
udsat for kolonnekromatografi under anvendelse af 70 g
silicagel og først behandlet med benzen/ethylacetat (5/1
på basis af volumen) til eluering af 3-acetoxymethyl-
10 7,8-difluor-2,3-dihydro-4H-[1,4]benzoxazin og dernæst
med benzen/ethylacetat (1/1 på basis af volumen) til
eluering af 7,8-difluor-2,3-dihydro-3-hydroxymethyl-4H-
[1,4]benzoxazin.

Det sidstnævnte eluat, der vejede 1,31 g, blev
15 opløst i 60 ml tetrahydrofuran, og 1,70 g 3,5-dinitro-
benzoylchlorid sættes dertil, hvorefter der blev opvar-
met til 37°C i 20 timer. Reaktionsblandingen blev op-
koncentreret under reduceret tryk, og koncentratet blev
opløst i 400 ml ethylacetat, vasket successivt med en
20 vandig natriumhydrogencarbonatopløsning og vand og tør-
ret over vandfrit natriumsulfat og opkoncentreret til
tørhed under reduceret tryk til opnåelse af 2,52 g af et
reaktionsprodukt. Reaktionsproduktet opløstes i 10 ml
pyridin, og 10 ml eddikesyreanhydrid sættes dertil,
25 hvorefter der blev opvarmet til 37°C i 20 timer. Reak-
tionsblandingen blev oparbejdet og omkrystalliseret på
samme måde som beskrevet i a) ovenfor til fjernelse af
racematekrystallerne og derved til forøgelse af den op-
tiske renhed. Idet produktet stadig indeholdt små mæng-
30 der biprodukter fra reaktionen, rensedes den yderligere
ved Toyopearl HW-40-kolonnekromatografi (kolonne: 2,5 x
95 cm, elueringsmiddel: methanol/acetonitril = 1/1 på
basis af volumen) og dernæst silicagelkolonnekromatogra-
fi (kolonne: 1,8 x 34 cm, elueringsmiddel: chloroform/
35 acetone = 20/1 på basis af volumen) for til sidst at op-
nå 0,44 g af et 3,5-dinitrobenzoylderivat af (-)-3-

acetoxymethyl-7,8-difluor-2,3-dihydro-4H-[1,4]benzoxazin.

MS (m/z: 437 (M^+))

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm):

5 2,14 (3H, s, $-\text{OCOCH}_3$), 4,26 (2H, d, $J = 7,0$ Hz,
 $-\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$), 4,45 (1H, dd, $J=3,0$ Hz, 12,0 Hz, $\text{C}_2\text{-H}$),
 4,71 (1H, d, $J=12,0$ Hz, $\text{C}_2\text{-H}$), 4,94 (1H, m, $\text{C}_3\text{-H}$), 6,60
 (2H, m, aromatisk ringproton), 8,73 (2H, d, $J=2,0$ Hz,
 10 aromatisk ringproton) og 9,19 (1H, t, aromatisk ringproton).

Eksempel 9

15 Fremstilling af (-)-7,8-difluor-2,3-dihydro-3-hydroxymethyl-4H-[1,4]benzoxazin (VIII)

I 135 ml tetrahydrofuran opløstes 3,03 g af et 3,5-dinitrobenzoylderivat af (-)-3-acetoxymethyl-7,8-difluor-2,3-dihydro-4H-[1,4]benzoxazin, og 135 ml ethanol og 30 ml 1,0N kaliumhydroxid sættes til opløsningen.
 20 Efter omrøring af reaktionsblandingen ved stuetemperatur i 30 minutter tilsættes 3 ml eddikesyre til neutralisering. Blandingen blev opkoncentreret under reduceret tryk, og koncentratet blev opløst i 400 ml chloroform, vasket successivt med en vandig natriumhydrogencarbonatopløsning og vand, tørret over vandfrit natriumsulfat og opkoncentreret til tørhed under reduceret tryk. Det faste stof blev udsat for kolonnekromatografi under anvendelse af 40 g silicagel og elueret med chloroform/methanol (50/1 på basis af volumen) til opnåelse af 1,17 g
 30 (-)-7,8-difluor-2,3-dihydro-3-hydroxymethyl-4H-[1,4]benzoxazin.

$[\alpha]_D^{22} = -14,1^\circ$ ($c = 1,80$, CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm):

35 3,5 - 4,4 (5H, m), 6,30 - 6,42 (1H, m, aromatisk ringproton) og 6,54 - 6,74 (1H, m, aromatisk ringproton).

Eksempel 10

Fremstilling af (-)-7,8-difluor-2,3-dihydro-3-methyl-4H-[1,4]benzoxazin (X')

Til 20 ml pyridin sættes 1,17 g (-)-7,8-difluor-2,3-dihydro-3-hydroxymethyl-4H-[1,4]benzoxazin, og 2,77 g thionylchlorid sættes dråbevis dertil under afkøling med is, hvorefter der omrøres ved 50-60°C i 40 minutter. Reaktionsblandingen blev koncentreret under reduceret tryk, og koncentratet blev opløst i 300 ml chloroform og vasket med 100 ml vandig natriumhydrogencarbonatopløsning. Vaskevæsken blev ekstraheret to gange med chloroform i portioner af 200 ml. De forenede chloroformfaser blev vasket med vand, tørret over vandfrit natriumsulfat og opkoncentreret under reduceret tryk. Koncentratet blev udsat for kolonnekromatografi under anvendelse af 40 g silicagel og elueret med chloroform til opnåelse af 1,18 g af reaktionsproduktet som et farveløst olieagtigt produkt. Dette produkt blev opløst i 30 ml dimethylsulfoxid, og 0,41 g natriumborhydrid sættes dertil, hvorefter der blev opvarmet til 80 til 90°C i en time. Reaktionsblandingen blev opløst i 500 ml benzen, vasket med vand til fjernelse af dimethylsulfoxid, tørret over vandfrit natriumsulfat og opkoncentreret under reduceret tryk. Koncentratet blev udsat for kolonnekromatografi under anvendelse af 40 g silicagel og elueret med benzen til opnåelse af 0,80 g (-)-7,8-difluor-2,3-dihydro-3-methyl-4H-[1,4]benzoxazin som et farveløst, olieagtigt produkt.

$[\alpha]_D^{25} = -9,6^\circ$ (c = 2,17, CHCl₃):

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm):

1,20 (3H, d, J=6,0 Hz, -CH₃), 3,53 (1H, m, C₃-H), 3,81 (1H, dd, J=8,0 Hz, 10,0 Hz, C₂-H), 4,31 (1H, dd, J = 3,0 Hz, 10,0 Hz, C₂-H), 6,24 - 6,36 (1H, m, aromatisk ringproton) og 6,52 - 6,70 (1H, m, aromatisk ringproton).

Optisk renhed: >99% e.e.

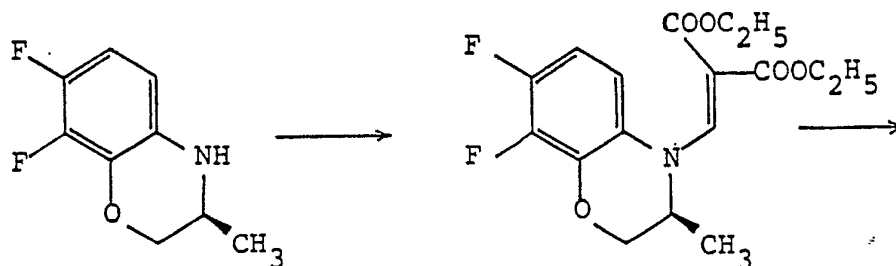
Produktet blev ledt til 3,5-dinitrobenzoylderivatet og bestemt kvantitativt ved HPLC under anvendelse af en Sumipacks OA-4200 kolonne, 4,0 x 250 mm, og en opløsningsmiddelblanding af n-hexan/1,2-dichlorethan/ethanol (90/9,1/0,9 på basis af volumen) med en hastighed på 1,5 ml/min.

10

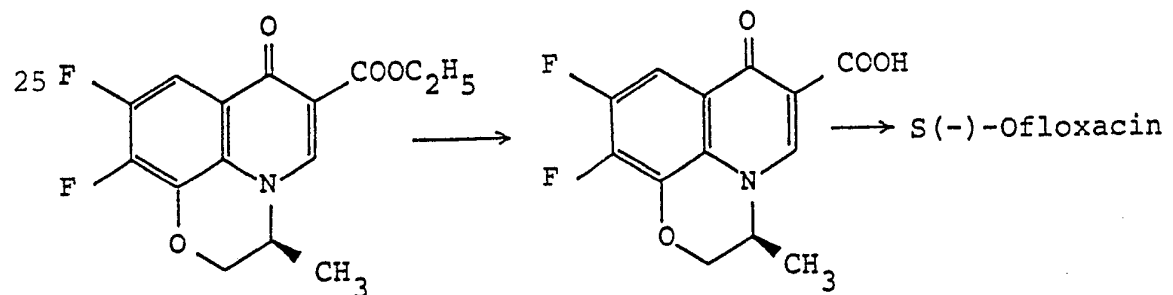
Eksempel 11

Fremstilling af S(-)-ofloxacin

15



20



30

Til 1,13 g (-)-7,8-difluor-2,3-dihydro-2,3-methyl-4H-[1,4]benzoxazin sættes 1,58 g diethylethoxymethylenmalonat, og blandingen blev omrørt ved 130 til 140°C i

35

70 minutter. Reaktionsblandingen blev som sådan udsat for kolonnekromatografi under anvendelse af 50 g silica-gel og elueret med chloroform til opnåelse af 2,47 g diethyl[(-)-7,8-difluor-3-methyl-2,3-dihydro-4H-[1,4]benzoxazin-4-yl]methylenmalonat. Dette produkt blev opløst i 5 ml eddikesyreanhydrid og 10 ml af en blanding af eddikesyreanhydrid og koncentreret svovlsyre (2/1 på basis af volumen) under omrøring og isafkøling, hvorefter der omrørtes ved 50 til 60°C i 40 minutter. Til reaktionsblandingen sattes is og en vandig opløsning af natriumhydrogencarbonat, og reaktionsproduktet blev ekstraheret tre gange med portioner af 150 ml chloroform. Det forenede ekstrakt blev vasket med vand, tørret over vandfrit natriumsulfat og opkoncentreret under reduceret tryk. Da et fast stof begyndte at fælde ud, tilsattes en lille mængde diethylether, og bundfaldet blev opsamlet ved filtrering. Bundfaldet blev vasket med en lille mængde diethylether til opnåelse af 1,32 g (-)-ethyl-9,10-difluor-3-methyl-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]benzoxazin-6-carboxylat.

I 12 ml eddikesyre opløstes 1,20 g af den opnåede forbindelse, og 25 ml koncentreret saltsyre tilsattes til opløsningen, hvorefter der blev refluxet ved 120 til 130°C i 90 minutter. Efter henstand af reaktionsblandingen ved stuetemperatur, udfældedes nålelignende krystaller, som blev opsamlet ved filtrering og vasket succesivt med en lille mængde vand, ethanol og diethylether til opnåelse af 0,96 g (-)-9,10-difluor-3-methyl-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]benzoxazin-6-carboxylsyre.

I 30 ml diethylether suspenderedes 324 mg af den opnåede forbindelse, og et stort overskud af bortrifluoridethyletherat tilsattes, hvorefter der blev omrørt ved stuetemperatur i 30 minutter til dannelse af en chelatforbindelse. Produktet blev opsamlet ved filtrering og vasket med en lille mængde diethylether til opnåelse af

373 mg af et pulver. Pulveret blev opløst i 7 ml dime-
 thylsulfoxid, og 136 mg N-methylpiperazin og 228 mg
 triethylamin tilsattes, hvorefter der omrørtes ved stue-
 temperatur i 17 timer. Reaktionsblandingen blev opkon-
 5 centreret til tørhed under reduceret tryk, og til det
 faste stof sattes 15 ml 95% methanol og 0,31 ml tri-
 ethylamin. Den opnåede blanding blev refluxet i tre
 timer. Reaktionsblandingen blev opkoncentreret under re-
 duceret tryk, og remanensen blev filtreret og vasket
 10 successivt med en lille mængde ethanol og diethylether
 til opnåelse af 350 mg af et hvidt pulver. Omkrystalli-
 sation af en opløsningsmiddelblanding af ethanol og kon-
 centreret vandig ammoniak gav 230 mg S(-)-ofloxacin.

Smeltepunkt: 225-227°C (med sønderdeling).

15 $[\alpha]_D^{23} = -76,9^\circ$ (c = 0,39, 0,05N NaOH).

Ms (m/e): 361 (M⁺).

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm):

1,63 (3H, d, C₃-CH₃), 2,38 (3H, s, N-CH₃), 2,54 -
 2,60 (4H, m, 2 x CH₂N), 3,40 - 3,44 (4H, m, 2 x CH₂N),
 20 4,35 - 4,52 (3H, m, CH og CH₂), 7,76 (1H, d, aromatisk
 ring C₈-H) og 8,64 (1H, s, C₅-H).

Eksempel 12

25 Fremstilling af 3S-(+)-7,8-difluor-2,3-dihydro-3-methyl-
 -4-[(S)-N-para-toluen-sulfonylprolyl]-4H-[1,4]benzoxazin
 (X'')

En opløsning af et syrechlorid, der var fremstil-
 let ud fra 61,9 g (S)-N-p-toluensulfonylprolin og thio-
 30 nylchlorid i 350 ml tørret dichlormethan tilsattes lang-
 somt og dråbevis til en opløsning på 32,8 g (±)-7,8-di-
 fluor-2,3-dihydro-3-methyl-4H-[1,4]benzoxazin og 28 ml
 pyridin i 300 ml tørret dichlormethan ved stuetemperatur
 under omrøring. Omrøringen fortsattes i yderligere fire
 35 timer ved stuetemperatur. Reaktionsblandingen blev
 vasket successivt med 10% saltsyre, en mættet vandig na-

triumhydrogencarbonatopløsning og en mættet vandig natriumchloridopløsning og tørret over vandfrit magnesiumsulfat. Dichlormethanet blev fjernet ved destillation, og den olieagtige remanens blev opløst i 200 mg ethylacetat. Til opløsningen sattes langsomt og dråbevis 750 ml n-hexan under omrøring, hvorved krystaller (-)-isomer af forbindelsen (X"), hvori $X_1 = X_2 = F$, $R_1 = CH_3$, $R_2 = p$ -toluenmsulfonyl, og $n = 1$) udfældede øjeblikkeligt. De udfældede krystaller blev skilt fra ved filtrering, og filtratet blev opkoncentreret til tørhed under reduceret tryk. Remanensen blev udsat for kolonnekromatografi under anvendelse af 500 g silicagel og elueret med benzen/ethylacetat (50/1 - 25/1 på basis af volumen) til opnåelse af et olieagtigt produkt. Det olieagtige produkt blev opløst i 500 ml ethanol, og man lod opløsningen henstå ved stuetemperatur i en dag til udfældning af krystaller. Ethanolet blev destilleret fra, og til de således udvundne krystaller sattes diethylether og n-hexan, hvorefter der filtreredes. Det faste stof blev tørret under reduceret tryk til opnåelse af 33,4 g 3S-(+)-7,8-difluor-2,3-dihydro-3-methyl-4-[(S)-N-p-toluen-sulfonylpropyl]-4H-[1,4]benzoxazin ((+)-isomeren af forbindelsen X"), hvori $X_1 = X_2 = F$, $R_1 = CH_3$, $R_2 = p$ -toluensulfonyl, og $n = 1$) med et smeltepunkt på 107-108°C.

$[\alpha]_D = +70,7^\circ$ ($c = 0,953$, chloroform).

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 1685, 1510, 1490.

Elementæranalyse for $C_{21}H_{22}F_2N_2O_4S$:

Beregnet: (%)	C	57,79	H	5,08	N	6,42
Fundet: (5)	C	58,05	H	5,14	N	6,47.

30

Eksempel 13

Fremstilling af S-(-)-7,8-difluor-2,3-dihydro-3-methyl-4H-[1,4]benzoxazin (X)

I en liter ethanol opløstes 32,8 g af (+)-isomeren som opnået i Eksempel 12, og 300 ml 1N natriumhy-

35

droxid tilsattes, hvorefter der blev refluxet i tre timer. Ethanolet blev fjernet ved destillation, og den olieagtige remanens blev ekstraheret med benzen. Ekstrakten blev vasket med en mættet vandig natriumchloridopløsning, tørret over natriumsulfat og destilleret til fjernelse af benzen. Remanensen blev udsat for kolonnekromatografi under anvendelse af 200 g silicagel som bærer og benzen som elueringsmiddel til opnåelse af 12,7 g (udbytte: 91,4%) S-(-)-7,8-difluor-2,3-dihydro-3-methyl-4H-[1,4]benzoxazin som et olieagtigt produkt.

$$[\alpha]_D = -9,6^\circ \quad (c = 2,17, \text{ chloroform}).$$

Den absolutte konfiguration af denne forbindelse blev bestemt som værende en S-konfiguration ved røntgenanalyse på dens hydrochlorid.

15

Eksempel 14

Fremstilling af ethyl-(S)-(-)-9,10-difluor-3-methyl-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]benzoxazin-6-carboxylat (XII)

Til 15,8 g af (S)-(-)-benzoxazinderivatet som opnået i Eksempel 13 sattes 24,0 g diethylethoxymethylenmalonat, og blandingen blev omrørt ved 130 til 140°C i en time under reduceret tryk. Efter afkøling blev reaktionsblandingen opløst i 50 ml eddikesyreanhydrid, og 80 ml af en blanding af eddikesyreanhydrid og koncentreret svovlsyre (2:1 på basis af volumen) tilsattes langsomt og dråbevis til opløsningen under omrøring og isafkøling. Efter fortsættelse af omrøringen i yderligere en time ved stuetemperatur blev reaktionsblandingen omrørt i et varmt bad med en temperatur på 50 til 60°C i 30 minutter. Isvand sattes til reaktionsblandingen, og pulverformigt kaliumcarbonat tilsattes til neutralisation. Blandingen blev ekstraheret med chloroform, og ekstrakten blev vasket successivt med en mættet vandig natriumhydrogencarbonatopløsning og en mættet vandig natrium-

35

chloridopløsning og tørret over natriumsulfat. Chloroformen blev fjernet ved destillation, og til remanensen sattes diethylether. De således dannede krystaller blev opsamlet ved filtrering til opnåelse af 20,0 g af titel-
5 forbindelsen med et smeltepunkt på 257-258°C.

$$[\alpha]_D = -68,1^\circ \text{ (c = 0,250, eddikesyre).}$$

Eksempel 15

10 Fremstilling af S-(-)-9,10-difluor-3-methyl-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido-[1,2,3-de][1,4]benzoxazin-6-carboxylsyre

I 150 ml eddikesyre opløstes 19,5 g af esterforbindelsen opnået i Eksempel 14, og 400 ml koncentreret
15 saltsyre tilsattes, hvorefter der blev refluxet i tre timer. Efter afkøling blev de udfældede krystaller opsamlet ved filtrering, vasket successivt med vand, ethanol og diethylether og tørret til opnåelse af 16,2 g af den tilsvarende carboxylsyre med et smeltepunkt på 300°C
20 eller højere.

$$[\alpha]_D = -65,6^\circ \text{ (c = 0,985, DMSO).}$$

Eksempel 16

Fremstilling af S-(-)-9-fluor-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperaziny)-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]-benzoxazin-6-carboxylsyre (VI) (S-(-)-isomer af ofloxacin)

I 600 ml diethylether suspenderedes 14,3 g af carboxylsyren opnået i Eksempel 15, og 70 ml bortrifluoriddiethyletherat sættes dertil, hvorefter der omrørtes ved stuetemperatur i fem timer. Supernatantvæsken blev fjernet ved dekantering, og diethylether sættes til remanensen, hvorefter der blev filtreret. Det faste stof blev vasket med diethylether og tørret. Produktet blev opløst i 100 ml dimethylsulfoxid, og 14,2 ml triethylamin og 7,3 ml N-methylpiperazin sættes til opløsningen. Efter at blandingen var omrørt ved stuetemperatur i 18 timer, blev opløsningsmidlet fjernet ved destillation. Diethylether sættes til remanensen, hvorefter der blev filtreret. Det opsamlede gule pulver blev suspenderet i 400 ml 95% methanol, og 25 ml triethylamin blev tilsat. Blandingen blev opvarmet til refluxning i 25 timer. Opløsningsmidlet blev afdestilleret under reduceret tryk, og remanensen blev opløst i 500 ml 10% saltsyre og vasket tre gange med chloroform. Den vaskede opløsnings pH-værdi blev indstillet til 11 med en vandig 4N natriumhydroxidopløsning og dernæst til 7,3 med 1N saltsyre. Opløsningen blev ekstraheret tre gange med portioner af to liter chloroform, og det forenede ekstrakt blev tørret over natriumsulfat. Chloroformen blev fjernet ved destillation, og de opnåede krystaller blev omkrystalliseret af ethanol/diethylether til opnåelse af 12,0 g af titelforbindelsen med et smeltepunkt på 226-230°C (med sønderdeling).

$$[\alpha]_D = -76,9^\circ \quad (c = 0,655, 0,05N \text{ NaOH}).$$

Eksempel 17

Fremstilling af (S)-(-)-9-fluor-3-methyl-10-(4-ethyl-1-piperazinyl)-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]-benzoxazin-6-carboxylsyre (VI)

5 På samme måde som beskrevet i Eksempel 16, bortset fra at N-ethylpiperazin anvendtes i stedet for N-methylpiperazin, opnåedes titelforbindelsen med et smeltepunkt på 229-230°C (med sønderdeling).

Elementæranalyse for $C_{19}H_{22}FN_3O_4$:

10 Beregnet: (%) C 60,79 H 5,91 N 11,19
Fundet: (%) C 60,97 H 5,91 N 11,30

$[\alpha]_D = -67,0^\circ$ (c = 0,585, H_2).

NMR ($CDCl_3$) δ (ppm):

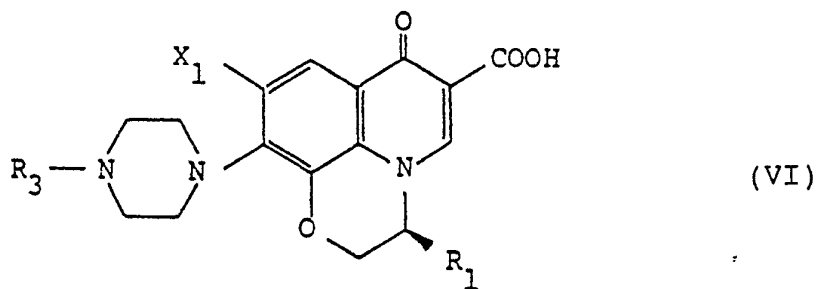
15 1,16 (3H, t, J=7 Hz, $-CH_2CH_3$), 1,63 (3H, d, J=7 Hz, CH_3), 2,53 (2H, q, J=7 Hz, CH_2CH_3), 2,57 - 2,69 (4H, m, 2 x CH_2), 3,40 - 3,53 (4H, m, 2 x CH_2), 4,32 - 4,58 (3H, m, CH og CH_2), 7,77 (1H, d, J= 12 Hz, C_8-H), 8,67 (1H, s, C_5-H).

20 Skønt opfindelsen er beskrevet i detaljer og ved hjælp af specifikke udførelsesformer, vil det være klart for fagmanden, at forskellige ændringer og modifikationer kan udføres, uden at man går uden for opfindelsens idé og rammer.

P A T E N T K R A V

1. S(-)-pyridobenzoxazinforbindelser, k e n d e -
t e g n e t ved, at de har den almene formel (VI)

5



10

hvor X_1 betegner et halogenatom, R_1 betegner en alkyl-
gruppe med 1 til 4 carbonatomer, og R_3 betegner en alkyl-
gruppe med 1 til 3 carbonatomer.

15

2. S(-)-9-Fluor-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]benzoxazin-6-carboxylsyre ifølge krav 1.

20

3. S(-)-9-Fluor-3-methyl-10-(4-ethyl-1-piperazinyl)-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]benzoxazin-6-carboxylsyre ifølge krav 1.