

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 145262 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

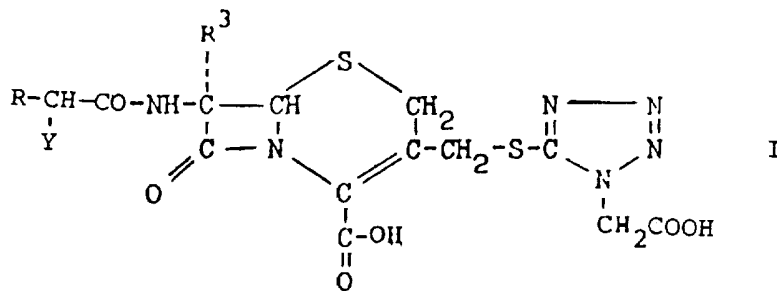
- (21) Ansøgning nr. 3910/75 (51) Int.Cl.³ C 07 D 501/36
(22) Indleveringsdag 29. aug. 1975
(24) Løbedag 29. aug. 1975
(41) Alm. tilgængelig 4. mar. 1976
(44) Fremlagt 18. okt. 1982
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 3. sep. 1974, 502991, US 27. jun. 1975, 590971, US

(71) Ansøger BRISTOL-MYERS COMPANY, New York, US.
(72) Opfinder William J. Gottstein, US: Murray A. Kaplan, US: Alphonse P. Granatek, US.
(74) Fuldmægtig Th. Ostenfeld Patentbureau A/S.




- (54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af cephalosporansyrederivater og estere og salte deraf.

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte cephalosporansyrederivater, der er værdifulde som antibakterielle midler.

De ifølge opfindelsen fremstillede forbindelser har den almene formel



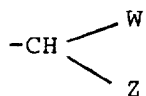
DK 145262 B

hvori R betegner R^2 -, R^2 - eller R^2 -,

hvor R^2 betyder hydrogen, hydroxy eller en eventuelt substitueret aminomethylgruppe, Y betyder hydrogen, hydroxy eller en eventuelt substitueret aminogruppe og R^3 betegner hydrogen eller methoxy, eller let hydrolyserbare estere eller ikke-toksiske farmaceutisk acceptable salte deraf.

Fra de danske fremlæggelsesskrifter nr. 132.119 og 137.192 kendes beslægtede cephalosporansyrederivater, som i sidekæden i 3-stillingen kan indeholde en methyl-substitueret tetrazolring, mens tetrazolringen i de ifølge opfindelsen fremstillede forbindelser er substitueret med carboxymethyl. Forbindelserne med formlen I udmærker sig ved en forbedret vandopløselighed og har ved parallelforsøg vist sig at give forbedret antibakteriel aktivitet, især over for Gram-negative bakterier i forhold til de kendte cephalosporansyrederivater.

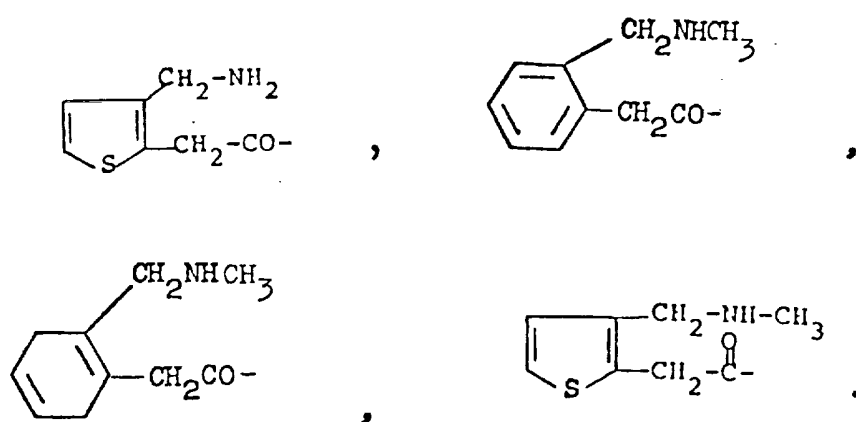
De let hydrolyserbare estere af forbindelserne med formlen I omfatter forbindelser indeholdende gruppen med formlen



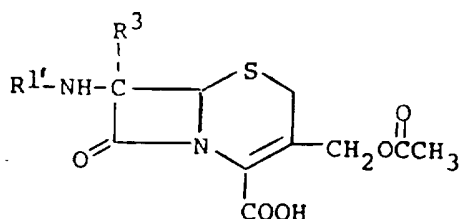
hvori W betegner hydrogen og Z betegner lavere alkanoyl, benzoyl, naphthoyl, furoyl, thenoyl, nitrobenzoyl, methylbenzoyl, halogenbenzoyl, phenylbenzoyl, N-phthalimido, N-succinimido, N-saccharino, N-(lavere)alkylcarbamoyl, lavere alkoxy, lavere-alkylthio, phenoxy, carbalkoxy, carbobenzoxo, carbamoyl, benzyloxy, chlorbenzyloxy, carbophenoxy, carbo-tert.-butoxy eller (lavere)alkylsulfonyl, eller W betegner carbalkoxy og Z betegner carbalkoxy, eller W betegner phenyl og Z betegner benzoyl eller cyano, eller W og Z betegner tilsammen 2-oxocycloalkyl indeholdende 4 til 8 carbonatomer inkl. Gruppen $-\text{CH} \begin{array}{l} \diagup \text{W} \\ \diagdown \text{Z} \end{array}$ betegner fortrinsvis pivaloyloxymethyl, acetoxymethyl, methoxymethyl, acetonyl, phenacyl, p-nitrobenzyl, β,β,β -trichlorethyl, 3-phthalidyl eller 5-indanyl.

Som anført mere detaljeret nedenfor tilvejebringer den foreliggende opfindelse også salte af disse syrer. Den bicycliske strukturs stereokemi er som hos cephalosporin C.

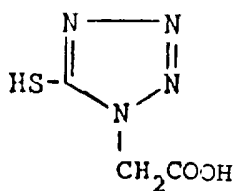
I formel I kan $R-\underset{\underset{Y}{|}}{CH}-CO-$ fx. være phenylacetyl, o-, m- og p-aminomethylphenylacetyl, hydroxyphenylacetyl, thien-2- og -3-acetyl, 1,4-cyclohexadienylacetyl eller 2-aminomethyl-1,4-cyclohexadienylacetyl, eller have strukturen



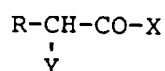
Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er karakteriseret ved, at man omsætter en forbindelse med den almene formel



hvor R^1 betegner H eller $R-CHY-CO-$, hvor R, Y og R^3 har de ovenfor anførte betydninger, eller et salt eller en let hydrolyserbar ester deraf, med en forbindelse med formlen



eller et salt deraf,
 og, når R^1 betegner H behandler den resulterende forbindelse med
 et acyleringsmiddel med formlen



hvor X betegner halogen eller et funktionelt ækvivalent deraf, og R og Y har den ovenfor angivne betydning, som når Y er fri amino eller hydroxyl, beskyttes på disse grupper ved hjælp af konventionelle beskyttende grupper, som senere fjernes til frembringelse af en forbindelse med formel I, og at man om ønsket omdanner en resulterende fri syre eller et salt af en forbindelse med formel I til en let hydrolyserbar ester eller et ikke-toksisk farmaceutisk acceptabelt salt deraf eller omdanner et resulterende salt eller en let hydrolyserbar ester af en forbindelse med formel I til den tilsvarende frie syre med formlen I.

Som acyleringsmiddel anvendes som nævnt et halogenid eller et funktionelt ækvivalent deraf.

Sådanne funktionelle ækvivalenter omfatter de tilsvarende syreanhydrider, herunder blandede anhydrider og især de blandede anhydrider fremstillet ud fra stærkere syrer såsom de lavere aliphatiske monoestere af carbonsyre, eller alkyl- og arylsulfonsyrer og af mere hindrede syrer såsom diphenyleddikesyre. Et særligt værdifuldt anhydrid er et N-carboxy-anhydrid (også kaldet et Leuch's anhydrid; se USA Patentskrifter nr. 3.080.356 og 3.206.455) inklusive men ikke begrænset til D-mandelsyrecarboxy-anhydrid (USA Patentskrift nr. 3.167.549) eller det tilsvarende substituerede D-mandelsyrecarboxyanhydrid. Endvidere kan anvendes et syreazid eller en aktiv ester eller thioester (f.eks. med p-nitrophenyl, 2,4-dinitrophenol, thiophenol eller thioeddikesyre)

eller selve den frie syre kan kobles med 7-amino-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyren (forbindelse II) efter forudgående omsætning af den frie syre med N,N'-dimethylchlorformiminiumchlorid [Britisk Patentskrift nr. 1.008.170 og Novak og Weichet, Experientia XXI, 6, 360 (1965)] eller ved anvendelse af enzymer eller af en N,N'-carbonyldiimidazol eller en N,N'-carbonylditriazol [jv. Sydafrikansk Patentskrift nr. 63/2684] eller et carbodiimid reagens [især N,N'-dicyclohexylcarbodiimid, N,N'-diisopropylcarbodiimid eller N-cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)carbodiimid; jvf. Sheehan og Hess, J. Amer. Chem. Soc., 77, 1967, (1955)] eller af alkylylamin-reagens [jvf. R. Buijle og H. G. Viehe, Angew. Chem. International Edition 3, 582, (1964)] eller af et isoxasoliumsalt-reagens [jvf. R. B. Woodward, R. A. Olofson og H. Mayer, J. Amer. Chem. Soc., 83, 1010 (1961)], eller af et ketenimin-reagens [jvf. C. L. Stevens og M. E. Munk, J. Amer. Chem. Soc., 80, 4065 (1958)] eller af hexachlorcyclotriphosphatriazin eller hexabromcyclotriphosphatriazin (USA Patentskrift nr. 3.651.050) eller af diphenylphosphorylazid [DPPA; J. Amer. Chem. Soc., 94, 6203-6205 (1972)] eller af diethylphosphorylcyanid [DEPC; Tetrahedron Letters nr. 18, pp. 1595-1598 (1973)] eller af diphenylphosphit [Tetrahedron Letters nr. 49, pp. 5047-5050 (1972)]. Et andet ækvivalent af syrechloridet er et tilsvarende azolid, d.v.s. et amid af den tilsvarende syre, hvis amidnitrogen indgår i en quasi-aromatisk 5-leddet ring indeholdende mindst to nitrogenatomer, d.v.s. imidazol, pyrazol, triazolenerne, benzimidazol, benzotriazol og deres substituerede derivater. Som et eksempel på den almene fremgangsmåde til fremstilling af et azolid, omsættes N,N'-carbonyldiimidazol med en carboxylsyre i ækvimolære mængder ved stuetemperatur i tetrahydrofuran, chloroform, dimethylformamid eller et tilsvarende inert opløsningsmiddel til dannelse af carboxylsyre-imidazolidet i praktisk taget kvantitativt udbytte under frigørelse af carbon-dioxid og et mol imidazol. Dicarboxylsyrer danner diimidazolid. Biproduktet, imidazol, udfælder og kan fraskilles og imidazolidet isoleres, men dette er ikke væsentligt. Fremgangsmåderne til udførelse af disse omsætninger til fremstilling af en cephalosporin, og fremgangsmåderne som anvendes til isolering af den således fremstillede cephalosporin er i og for sig kendte.

Ovenfor omtaltes anvendelsen af enzymer til kobling af den frie syre med forbindelse II. Indenfor rammerne af sådanne fremgangsmåder falder anvendelsen af en ester, f.eks. methylesteren, af den pågældende frie syre med enzymer tilvejebragt af forskellige microorganismer, f.eks. de som er beskrevet af T. Takahashi et al., J. Amer. Chem. Soc., 94(11), 4035-4037 og af T. Nara et al., J. Antibiotics (Japan) 24(5), 321-323 (1971) og i USA Patentskrift nr. 3.682.777.

Til kobling af den organiske carboxylsyre, inklusive men ikke begrænset til en substitueret eller usubstitueret D-mandelsyre (med eller uden en beskyttende gruppe på α -hydroxylgruppen) som beskrevet ovenfor med forbindelse II (eller et salt eller fortrinsvis en let hydrolyseret ester eller Schiff-base såsom med benzaldehyd, deraf) er det også hensigtsmæssigt og effektivt som koblingsmiddel at benytte phosphonitrilchlorid-trimer (J. Org. Chem., 33(7), 2979-81, 1968) eller N-ethoxy-1.2-dihydroquinolin (EEDQ) som beskrevet i J. Amer. Chem. Soc., 90, 823-824 og 1652-1653 (1968) og USA Patentskrift nr. 3.455.929. Omsætningen udføres fortrinsvis ved 30-35^o C i benzen, ethanol eller tetrahydrofuran under anvendelse af omtrentlig ækvimolære mængder af alle 3 reagenser efterfulgt af konventionel isolering og fjernelse ved hjælp af konventionelle metoder af eventuelle tilstedeværende blokerende grupper.

Omsætningen af l-carboxymethyl-5-mercaprotetrazolen med 7-acylaminocephalosporansyren kan udføres i opløsning såsom i vand eller vandig acetone ved en temperatur ved mindst stuetemperatur og fortrinsvis i intervallet fra ca. 50^o til ca. 100^o C i nærværelse af en mild base såsom natriumhydrogencarbonat, fx. fortrinsvis nær neutralitet såsom ved en pH-værdi på ca. 6. Et overskud af thiolen foretrækkes fortrinsvis. Reaktionsproduktet isoleres ved forsigtig syrning af reaktionsblandingen efterfulgt af ekstraktion med et med vand ublandbart organisk opløsningsmiddel.

Når den organiske carboxylsyre indeholder en funktionel gruppe såsom amino eller hydroxyl, er det ofte ønskeligt først at blokere (eller beskytte) amino- eller hydroxygruppen, dernæst udføre koblingsreaktionen og endelig underkaste den resulterende forbindelse kemisk fjernelse af den beskyttende gruppe, d.v.s. underkaste den resulterende forbindelse en elimineringsreaktion for den beskyttende gruppe.

De omtalte salte omfatter de ikke-toksiske carboxylsyresalte af cephalosporansyrederivaterne, herunder ikke-toksiske metalsalte såsom med natrium, kalium, calcium og aluminium, ammoniumsaltet og de substituerede ammoniumsalte, f. eks. salte af ikke-toksiske aminer såsom trialkylaminer, herunder triethylamin, procain, dibenzylamin, N-benzyl-beta-phenethylamin, 1-ephenamin, N,N'-dibenzylethylendiamin, dehydroabietylamin, N,N'-bis-dehydroabietylethylendiamin, N-(lavere)-alkylpiperidin, f.eks. N-ethylpiperidin og andre aminer, som har været anvendt til at danne salte med benzylpenicillin; endvidere de ikke-toksiske syreadditionssalte deraf (d.v.s. aminsalte) herunder mineralsyreadditionssalte såsom hydrogenchloridet, hydrogenbromidet, hydrogeniodidet, sulfatet, sulfamatet og phosphatet og de organiske syreadditionssalte såsom maleatet, acetatet, citratet, oxalatet, succinatet, benzoatet, tartratet, fumaratet, malatet, mandelatet, ascorbatet og lignende.

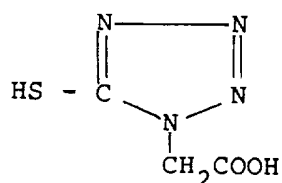
I de forbindelser (anvendt enten som mellemprodukter eller metaboliske prekursorer) hvori aminogruppen er "blokeret" kan f.eks. anvendes substituenten såsom 2-iodethoxycarbonyl (Britisk Patentskrift nr. 1.349.673) t-butoxycarbonyl, carbobenzyloxy, formyl, o-nitrophenylsulfenyl, β,β,β -trichlor-ethoxycarbonyl, 4-oxo-2-pentenyl-2, 1-carbomethoxy-1-propenyl-2- og lignende. Navnlige omfatter sådanne blokerende grupper ketonerne (specielt acetone) og aldehyderne (specielt formaldehyd og acetaldehyd) som eksempelvis er omhandlet i USA Patentskrifter nr. 3.198.804 og 3.347.851 samt β -ketoestrene og β -diketonerne, der f.eks. er omhandlet i USA Patentskrift nr. 3.325.479 og β -ketoamiderne, som er omhandlet i Japansk Patentskrift nr. 71/24714 (Farmdoc 47.321S).

De foretrukne estere af cephalosporinerne fremstillet eller anvendt som udgangsmaterialer ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse er pivaloyloxymethyl-, acetoxymethyl-, methoxymethyl-, acetyl- og phenacylestre. Alle er værdifulde mellemprodukter til fremstilling af cephalosporinen med en fri carboxylsyregruppe, og de 3 førstnævnte er endvidere af interesse, fordi de ved oral administrering tilvejebringer forskellige absorptions-hastigheder og -mængder og giver varierende koncentrationer af det aktive antibakterielle middel i blod og væv.

Som antyd det ovenfor fremstilles hver af disse 5 estere af 7-aminocephalosporansyre ved hjælp af i og for sig kendte fremgangsmåder. En særlig god fremgangsmåde er den i USA Patentskrift nr. 3.284.451 omhandlede, ifølge hvilken natriumcephalothin esterificeres ved omsætning med den tilsvarende aktive chlor- eller bromforbindelse (f.eks. phenacylbromid, chloracetone, chlormethylether, pivaloyloxymethylchlorid [også kaldet chlormethylpivalat] acetoxy-methylchlorid) hvorefter thienyleddikesyre-sidekæden fjernes enzymatisk såsom i samme patentskrift beskrevet eller kemisk som i USA Patentskrift nr. 3.575.970 og i Journal of Antibiotics, XXIV, 811), 767-773 (1971). En anden god fremgangsmåde består i at triethylaminsaltet af 7-aminocephalosporansyre omsættes direkte med den aktive halogenforbindelse såsom i Britisk Patentskrift nr. 1.229.453.

En ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillet ester af cephalosporinen kan, hvis den ikke anvendes direkte, omdannes til sin frie syre, herunder dens zwitterion (og om ønsket ethvert salt) ved fjernelse af den esterificerende gruppe, såsom ved vandig eller enzymatisk hydrolyse (såsom med humant eller animalsk serum) eller ved sur eller alkalisk hydrolyse eller ved behandling med natriumthiophenoxid som omhandlet i USA Patentskrift nr. 3.284.451 og i penicillinrækken af Sheehan et al., J. Org. Chem. 29(7), 2006-2008 (1964).

Til behandling af bakterielle infektioner hos mennesker administreres de omhandlede forbindelser parenteralt eller oralt i en mængde på fra ca. 5 til ca. 200 mg/kg/dag og fortrinsvis ca. 5 til 20 mg/kg/dag i opdeltede doser, f.eks. 3 til 4 gange dagligt. De administreres i dosis-enheder indeholdende f.eks. 125, 250 eller 500 mg aktiv bestanddel med passende fysiologisk acceptable bærere eller strækkemidler. Dosis-enhederne har form som flydende præparater såsom opløsninger eller suspensioner.

UDGANGSMATERIALERA. 1-Carboxymethyl-5-mercaptotetrazola) OmkrySTALLISATION af 1-methyl-5-mercaptotetrazolFremgangsmåde:

1. 110 g 1-methyl-5-mercaptotetrazol oplømmes i 350 ml kogende chloroform. Der opnås næsten fuldstændig opløsning.
2. Den varme opløsning (50-60°) filtreres hurtigt ved hjælp af vakuum gennem en opvarmet Büchner-tragt (11 cm SS nr. 604 papir indeholdende ca. 6.4 til ca. 8.5 mm pakket filtreringshjælpemiddel ("Supercel"). Filtreringspuden udvaskes med 50 ml 50-60° C chloroform, som sættes til filtratet.
3. Filtratet afkøles til ca. 0-6° C og holdes ved 0-6° C i to timer. Krystallerne, som er dannet, opsamles ved filtrering ved 0-6° C og vaskes med 60 ml 0-6° C chloroform, som sættes til filtratet. Krystallerne (portion A) lufttørres ved 37-45° C i 18 timer.
4. Filtratet koncentrerer på vakuum-rotationsfordamper (60° C bad) til ca. halvt volumen. Denne opløsning afkøles til 0-6° C og holdes ved 0-6° C i 2 timer. Krystallerne opsamles ved filtrering ved 0-6° C, vaskes med 40 ml 0-6° C chloroform, som sættes til fil-

tratet. Krystallerne (portion B) lufttørres ved 37-45° C i 18 timer. Krystalportionerne A og B blandes til opnåelse af et udbytte på ca. 65 vægtprocent.

5. Filtratet fra portion B, trin 4, kan omarbejdes to gange som beskrevet i trin 4 til opnåelse af yderligere 15% udbytte.

b) Fremstilling af di-natriumsaltet af l-carboxymethyl-5-mercaptotetrazol

Fremgangsmåde:

1. 500 ml praktisk taget tør og ren tetrahydrofuran i en 2 l 3-halset kolbe med omrører afkøles i et salt-acetone-is bad til ca. -10°C. Tør nitrogen gas blæses på væskeoverfladen.
2. 500 ml 15.06% (1.6 N) butyllithium i hexan (Foote Mineral Co.) sættes til tetrahydrofuranen over et tidsrum af 10 minutter under tør nitrogen, og der omrøres. Den praktisk taget fuldstændige opløsning afkøles til -5 - -10° C.
3. 46.4 g l-methyl-5-mercaptotetrazol (omkrystalliseret som ovenfor) opløses i 200 ml i det væsentlige ren og tør tetrahydrofuran. Opløsningen filtreres, hvis den er uklar og afkøles dernæst til 5 - 10° C.
4. Den afkølede opløsning fra trin 3 sættes over et tidsrum af 10 minutter under omrøring og under tør nitrogen til butyllithiumopløsningen. Temperaturen bør holdes på -5° C til højst +10° C. Et bundfald kan dannes.
5. Blandingen omrøres under tør nitrogen og 0° C til +10° C i en halv time.
6. Vandig carbondioxidgas bobles ved stor hastighed og under hurtig omrøring igennem i 15 - 30 minutter ved omtrentlig omgivelsernes temperatur (0 - 10° C) og ikke højere end +20° C.
7. Det hvide bundfald som dannes opsamles på passende måde ved filtrering i et område med lav fugtighed. Bundfaldet udvaskes med ca. 75 ml tetrahydrofuran.

8. Bundfaldet opløses i 250 ml vand (pH-værdi 8.5-9.5). Et andet lag tetrahydrofuran kan være tilstede. Dette fjernes på vakuum-rotationsfordamperen (50° C bad).

9. Den vandige opløsning indstilles på pH-værdien 1.6-2.0 med koncentreret saltsyre.

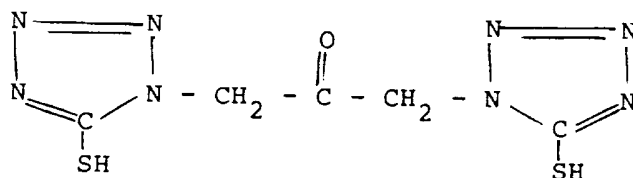
10. Den sure vandige opløsning ekstraheres to gange med 250 ml portioner ethylacetat. Hver 250 ml ethylacetat-ekstrakt modstrøms-ekstraheres med 100 ml portioner vand. Vand-ekstrakterne kasseres. Ethylacetat-ekstrakterne (uden noget vandlag) filtreres og blandes.

11. De forenede ethylacetat-ekstrakter koncentrerer til tørhed på vakuum-rotationsfordamperen (60° C bad).

12. Krystallerne i kolben koges med 300 ml chloroform i ca. 2 minutter. Den varme opslæmning (50-60° C) vakuumfiltreres gennem en opvarmet Büchner tragt (11 cm-SS-604 papir). Krystallerne vaskes med ca. 75 ml. - 50° C chloroform. Krystallerne lufttørres ved stuetemperatur i ca. 3 timer og bringes dernæst til ca. 100 - 200 mesh.

13. De 100-200 mesh store krystaller behandles med kogende chloroform nøjagtig som beskrevet i trin 12 (den varme chloroform fjerner det meste af den uomsatte 1-methyl-5-mercaptotetrazol). Udbytte: ca. 45 - 50 g krystallinsk 1-carboxymethyl-5-mercaptotetrazol. Disse krystaller kan indeholde 0.02 - 0.05 mol 1-methyl-5-mercaptotetrazol.

14. Krystallerne fra trin 13 opslættes med 250 ml ethylether ved stuetemperatur i 3 - 5 minutter. Blandingen filtreres. De uopløselige stoffer (0.5 - 5%) kan være en forurenende symmetrisk mercaptotetrazol-keon med følgende formodede struktur:



ADVARSEL: Denne forbindelse EKSPLODERER ved ca. 205-210° C.

15. Etherfiltratet fra trin 14 inddampes til tørhed på vakuumrotationsfordamperen (50° C. bad). Ca. 42 til ca. 48 g krystallinsk 1-carboxymethyl-5-mercaptotetrazol indeholdende ca. 0.01 til ca. 0.05 mol 1-methyl-5-mercaptotetrazol udvindes.

16. Krystallerne opløses i 420 ml absolut ethanol (ca. 100 mg/ml). Opløsningen varmes til 50-60° C.

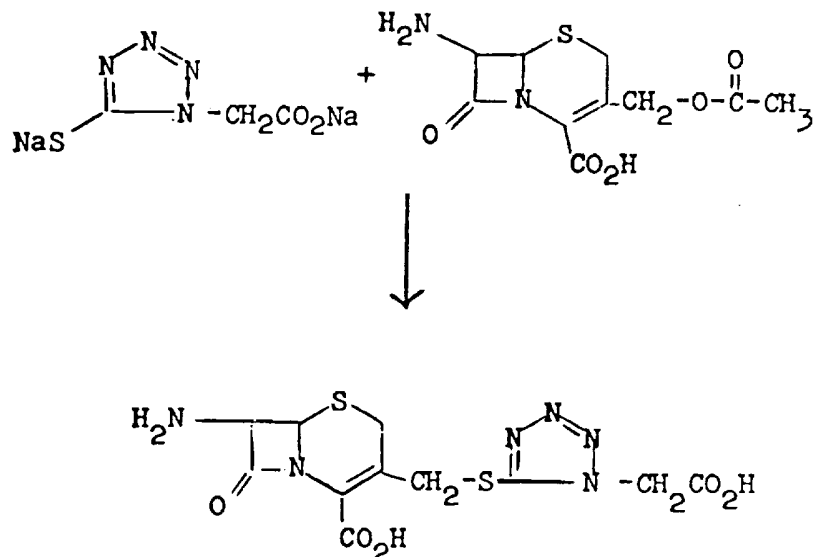
17. Til den varme opløsning fra trin 16 sættes 310 ml af en 41% natrium 2-ethylhexanoat (SEH) opløsning i isopropanol under meget hurtig omrøring over et tidsrum af 10 minutter. Et krystallinsk bundfald dannes. Blandingen opslæmmes ved 50-60° C i 20 minutter.

18. Blandingen filtreres varm (50-60° C) gennem en opvarmet Büchner tragt (11 cm-SS-nr. 604 papir). Krystallerne vaskes med 75 ml 50° C ethanol.

19. De ethanol-fugtige krystaller fra trin 18 opslæmmes i 200-300 ml ethanol. Opslæmningen ledes gennem en 200 mesh sigte. Opslæmningen opvarmes til 50-60° C i 5 minutter under hurtig omrøring (uomsat natrium 1-methyl-5-mercaptotetrazol er meget opløselig i varm ethanol).

20. Krystallerne opsamles ved 50-60° C på et 11 cm-SS nr. 604 papir i en opvarmet Büchner tragt. Krystallerne vaskes med 75-100 ml ethanol og vakuumtørres ved 50-60° C i 24-48 timer. Udbytte: 40-48 g di-natrium 1-carboxymethyl-5-mercaptotetrazol (uden 1-methyl-5-mercaptotetrazol påvist ved NMR).

B. 7-Amino-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxysyre.



1. I en 3-halset kolbe forsynet med omrører, temperaturregulator, termometer og nitrogentilførselsrør, anbringes 18 g (0.066 mol) 7-aminocephalosporansyre og 300ml 0.1 M pH 6.4 fosfat-buffer (20.7 g monobasisk natriumphosphat, H_2O + 8.5 g dibasisk vandfrit natriumphosphat, q.s. til 2 liter).

2. Under omrøring af den i trin 1 beskrevne blanding tilsættes 1.5 g natriumbisulfit og 16 g (0,078 mol) 1-carboxymethyl-5-mercaptotetrazol-dinatrium.

3. Under fortsat omrøring bobles nitrogen gennem blandingen i 10 minutter.

4. Under opretholdelse af omrøring og nitrogentilførsel opvarmes opslæmningen over en 20 minutters periode til 56°C . I løbet af dette tidsrum tilsættes 6.5 g natriumbicarbonat i små portioner.

5. Under fortsat omrøring og nitrogentilførsel holdes opløsningens temperatur på 56° C i 4 timer. pH-Værdien bør forblive mellem 6.2 og 6.6.
6. Reaktionsblandingen afkøles i et isbad til 5° C.
7. Der tilsættes 50 ml 1:1 phosphorsyre/vandopløsning til blandingen eller koncentreret HCl til en pH-værdi på 2.0 - 3.0.
8. Produktet opsamles ved filtrering. Filterkagen udvaskes med 20 ml koldt vand efterfulgt af 200 ml kold methanol.
9. Det faste stof lufttørres til konstant vægt. (Et typisk forsøg gav 14.5 g produkt). Dette produkt kan variere i farve fra gult til mørkebrunt.
10. Produktet ledes gennem en 200 mesh rustfri stålsigte.
11. 10 g af 200 mesh pulveret suspenderes i 200 ml n-propanol under kraftig omrøring.
12. 2.0 ml koncentreret saltsyre tilsættes, og der omrøres kraftigt i 0.5 time ved stuetemperatur.
13. Opslæmningen filtreres. De brune faste stoffer udvaskes med 20 ml n-propanol, og vaskevæsken sættes til filtratet (filterkagen gemmes til eventuel udvinding af yderligere produkt).
14. 1.5 g trækul ("Darco G-60") sættes til n-propanol filtratet fra trin 13. Der opslæmmes i 0.5 time. Carbonet fjernes ved filtrering. Carbonet vaskes med 20 ml. n-propanol, og vaskevæsken sættes til filtratet.
15. Under kraftig omrøring sættes triethylamin til n-propanol-filtratet til en tilsyneladende pH-værdi på 3.0. Der dannes krystaller. Der opslæmmes i 10 minutter.
16. De hvide krystaller opsamles ved filtrering og vaskes med 30 ml n-propanol, 50 ml methanol og vakuumtørres ved 40° i 24 timer. Udbytte: 4 - 8 g 7-amino-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre.

17. En alternativ fremgangsmåde til rensning af 7-amino-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre er følgende:

a) 10 g af 200 mesh produktet (fra trin 10) opslættes i 75 ml 1 N saltsyre i 10-15 minutter ved stuetemperatur. Der filtreres til fjernelse af mørkebrune stoffer.

b) 2.5 g trækul ("Darco G-60") tilsættes, og der opslættes i 0.5 time.

c) Carbonet fjernes ved filtrering. Carbonet vaskes med 15 ml vand, og vaskevæsken sættes til filtratet.

d) Under kraftig omrøring sættes koncentreret ammoniakvand til filtratet til pH-værdi 2.5 - 3.0. Krystaller dannes.

e) Krystalmassen opslættes i 25 minutter. Krystallerne fjernes ved filtrering. Krystallerne vaskes med 30 ml vand, 50 ml methanol og vakuumtørres ved stuetemperatur. Udbytte: 4-7 g næsten hvide krystaller.

De øvrige reagenser som anvendes til fremstilling af de her omhandlede forbindelser, syntetiseres enten som beskrevet i den kendte teknik (som f.eks. i de ovenfor nævnte patentskrifter og publikationer) eller ved hermed helt analoge fremgangsmåder. Når der eksempelvis anvendes en D-(-)- α -aminosyre fremstilles den i henhold til de fremgangsmåder, der er omtalt i USA Patentskrifter nr. 3.198.804, 3.342.677 eller 3.634.418 eller af Friis et al., Acta Chem. Scand. 17, 2391-2396 (1966) eller af Neims et al., Biochemistry (Wash.) 5, 203-213 (1966) eller i andre publikationer om dette emne. Som en hjælp og til belysning er der imidlertid nedenfor anført nogle specifikke eksempler på sådanne synteser til fremstilling af carboxylsyrer indeholdende en fri aminogruppe, som "blokeres" med tert.-butoxycarbonyl.

C. 2-(tert.-butoxycarbonylaminomethyl)-1.4-cyclohexadienyleddikesyre.

En opløsning af 16.5 g (0.1 mol) o-aminomethylphenyleddikesyre i 1.5 l flydende ammoniak (der forud er behandlet med 50 mg Li

til fjernelse af spor af fugt) fortyndedes langsomt med 500 ml tør t-BuOH. Til opløsningen sattes i små portioner 3.4 g (0.5 g. atom) af Li over et tidsrum af 4 timer, og blandingen omrørtes i 16 timer ved stuetemperatur, idet den flydende ammoniak fjernedes i stinkskab og endelig inddampedes til tørhed under 40° C. Remanensen opløstes i 500 ml vand, og opløsningen kromatograferedes på en kolonne af "IR-120"-harpiks (H⁺, 700 ml) og elueredes med 1% NH₄OH opløsning. Ninhydrin-positive fraktioner af eluatet forenedes og inddampedes til tørhed. Remanensen vaskedes med fire 50 ml portioner varm acetone og omkrystalliseredes fra 500 ml ethanol-vand (1:1) til dannelse af 11.2 g (67%) farveløse nåle af o-(2-aminomethyl-1.4-cyclohexadienyl)eddikesyre. Smeltepunkt 183° C.

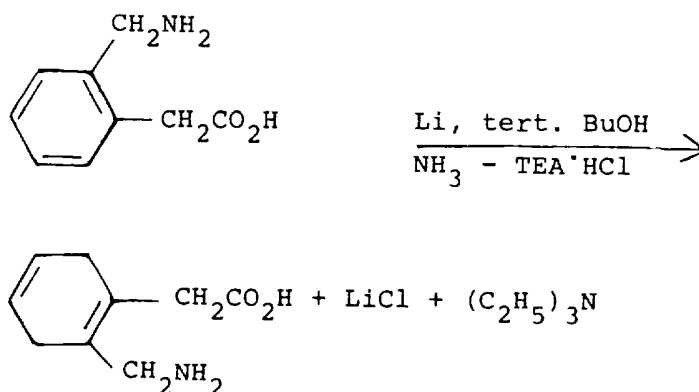
IR: ν_{\max}^{nuj} 1630, 1520, 1380, 1356 cm⁻¹.

NMR: $\delta^{\text{D}_2\text{O}} + \text{K}_2\text{CO}_3$ 2.72 (4H, s, $\text{H}_2\text{C}^{\text{F}}$), 3.01 (2H, s, CH_2CO), 3.20 (2H, s, $\text{CH}_2\text{-N}$), 5.78 (2H, s, $\text{H}^{\text{H}}\text{=C=}$).

Analyse beregnet for C₉H₁₃NO₂: C, 64.65; H, 7.84; N, 8.38.

Fundet: C, 64.77; H, 8.06; N, 8.44.

Forbedret fremgangsmåde til fremstilling af o-(2-aminomethyl-1.4-cyclohexadienyl)-eddikesyre



Der foretoges en tilpasning af den af Welch, Dolfini og Giarrusso i USA Patentskrift nr. 3.720.665 (eksempel 1) anvendte fremgangsmåde til fremstilling af D-2-amino-2-(1.4-cyclohexadienyl)-eddikesyre. En opløsning af 830 ml destilleret flydende ammoniak tørredes med 40 mg lithium under en argon atmosfære. Til denne omrørte opløsning sattes 11.0 g (0.07 mol) 2-aminomethylphenyl-eddikesyre og 340 ml tert. butylalcohol. Ialt 1.6 g (0.225 mol) lithium sattes til den kraftigt omrørte opløsning over et tidsrum af 2 timer. Den grå blanding behandledes dernæst med 35 g (0.215 mol) triethylamin (TEA) hydrochlorid og omrørtes natten over ved stuetemperatur i 18 timer. Tert. butylalcoholen fjernedes ved 40° (15 mm) til opnåelse af en hvid remanens, der tørredes i vakuum over P₂O₅ natten over. Det faste stof opløstes i 30 ml 1:1 methanol-vand og sattes under omrøring til 3.1 l. 1:1 chloroform-acetone ved 5°. Blandingen omrørtes i 20 minutter, og aminosyren α-(2-aminomethyl-1.4-cyclohexadienyl)eddikesyre opsamledes og tørredes i 16 timer i vakuum over P₂O₅ til dannelse af 6.3 g (58%) hvide krystaller, smeltepunkt 190° decomp. IR- og NMR-spektrene var i overensstemmelse med den formodede struktur.

En opløsning af 19.31 g (0.135 m) tert.-butoxycarbonylazid i 152 ml tetrahydrofuran (THF) sattes til en omrørt opløsning af 14.89 g (0.09 m) 2-aminomethyl-1.4-cyclohexadienyleddikesyre og 7.20 g (0.18 m) natriumhydroxid i 281 ml vand. Opløsningen omrørtes i 18 timer ved 25° og filtreredes dernæst gennem diatoméjerd ("Super-cel"). Tetrahydrofuranen fjernedes ved 40° (15 mm), og den tilbageblevne opløsning vaskedes med ether (2 x 175 ml) og syrnedes med 6 N saltsyre (HCl). Blandingen omrørtes på et isbad, og bundfaldet opsamledes og tørredes i 18 timer i vakuum over P₂O₅ ved 25° til et udbytte på 17.3 g (72.6%) 2-(tert.-butoxycarbonylaminomethyl)-1.4-cyclohexadienyleddikesyre som et hvidt pulver. IR- og NMR-spektrene var i overensstemmelse med strukturen.

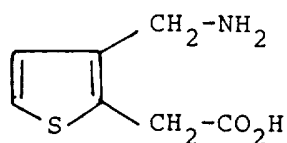
D. D-(-)-p-Hydroxy- α -tert.-butoxycarboxamidophenyleddikesyre.

I en morter tritureredes 5.65 g (0.14 m) magnesiumoxid og 11.7 g (0.07 m) D-(-)-p-hydroxyphenylglycin og sattes til 177 ml 50% dioxan. Langsomt sattes 20.0 g (0.14 m) tert.-butoxycarbonylazid til den hurtigt omrørte blanding, og der omrørtes i 20 timer ved 45° - 50°. Blandingen fortyndedes dernæst med 710 ml isvand og 177 ml ethylacetat. Blandingen filtreredes, og filtratet skiltes i to faser. Den organiske fase vaskedes med 3 x 50 ml 3% natriumbicarbonatopløsning og med 3 x 50 ml vand. Alle vandfaserne forenedes, afkøledes og indstilledes på pH-værdi 5.0 med koncentreret saltsyre. Produktet ekstraheredes med 3 x 125 ml ethylacetat. Ethylacetatet vaskedes med 2 x 50 ml vand, tørredes over magnesiumsulfat og inddampedes dernæst ved 35° og 15 mm til en olie. Olien tritureredes med petroleumsether til dannelse af D-(-)-p-hydroxy- α -tert.-butoxycarboxamidophenyleddikesyre som et hvidt fast stof. Dette produkt opsamledes og tørredes 18 timer i vakuum over P₂O₅ ved 25° til opnåelse af et udbytte på 13.5 g (72.2%) off-white pulver. Smeltepunkt 102°. IR- og NMR-spektrene var i overensstemmelse med strukturen.

E. D-(-)- α -tert.-Butoxycarboxamidophenyleddikesyre.

Der anvendtes den ovenfor anførte fremgangsmåde for D-(-)-p-hydroxy- α -tert.-butoxycarboxamidophenyleddikesyre. To prøveportioner opnåedes til et udbytte på 5.2 g (30%), smeltepunkt 82°. IR- og NMR-spektrene var i overensstemmelse med strukturen.

F. 2-t-butoxycarbonylaminomethylphenyleddikesyre
fremstilles for eksempel ifølge USA Patentskrift nr. 3.766.175.

Fremstilling af 3-aminomethyl-2-thiopheneddikesyreA) Thiophen-3-carboxaldehyddimethylacetal (2a)

En blanding af thiophen-3-carboxaldehyd ¹⁾ (322 g, 1.9 mol), trimethoxymethan (636 g, 6 mol) og "IR-120" harpiks (H⁺, 6 g) i methanol (200 ml) tilbagesvales over en periode på 4 timer. Harpiksen fjernes, og filtratet inddampes under reduceret tryk til dannelse af en farveløs olie, som destilleredes under reduceret tryk. Udbytte 423 g (94%), kogepunkt 90-95° C 13 mmHg.

IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{liq}}$ 3150, 1045, 1025⁻¹

NMR: $\delta_{\text{ppm}}^{\text{neat}}$ 3.21 (6H, s, OCH₃), 5.43 (1H, s, OH O^-),
7.0-7.4 (3H, m, thiophen-H)

1) S. Gronowitz, Arkev, kemi., 8, 411 (1955).

B) 2-Formylthiophen-3-carboxaldehyddimethylacetal (3a)

Til en omrørt opløsning af 2a (423 g, 2.68 mol) i vandfri ether (1 L) tilsattes dråbevis over en time en frisk fremstillet opløsning af n-butyllithium (27 mol) i ether under moderat tilbagesvaling under tør N₂. Medens tilbagesvaling fortsatte i 0.5 time, tilsattes dråbevis en opløsning af DMF (dimethylformamid) (432 g, 6 mol) i vandfri ether (0.9 liter) til blandingen over en periode på 0.75 time med kraftig omrøring. Efter endt tilsætning omrørtes blandingen natten over, hældtes på knust is (1 kg) med omrøring og temperaturen fik lov at stige til stuetemperatur. Det organiske lag fraskiltes, og vandlaget mættedes med NaCl og ekstraheredes grundigt med ether (2 x 200 ml). Etherekstrakterne forenedes, tørredes over MgSO₄ og koncentreredes. Remanensen destilleredes under reduceret tryk, og den lysegule olie opsamledes ved 100-125° C, 0.7 mmHg. Udbytte 277 g (56%).

IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{liq}}$ 3110, 1660, 1100⁻¹

NMR: $\delta_{\text{ppm}}^{\text{neat}}$ 3.40, (6H, s, OCH₃), 5.86 (1H, s,

$\text{CH} \left\langle \begin{smallmatrix} \text{O}^- \\ \text{O}^- \end{smallmatrix} \right\rangle$, 7.27 (1H, d, $J=6\text{Hz}$, thiophen-H β), 7.81 (1H, d-d, $J=6\text{Hz}$, thiophen-H α), 10.34 (1H, d, $J=1, 5\text{Hz}$, -CHO).

C) 1-methylsulfinyl-1-methylthio-2-(3-carboxaldehydethylen) (4b)

Fremstilling af 4b udførtes i henhold til den samme fremgangsmåde, der er beskrevet af K. Ogura et al.⁴⁾ Triton B (40% i methanol, 2 ml) i THF (tetrahydrofuran) (5 ml) sættes til en opløsning af methylmethylthiomethylsulfoxid²⁾ (2.5 g, 20 mmol) og 2-formyl-3-thiophencarboxaldehydethylenacetal³⁾ (3b). Blandingen tilbagesvales i ca. en time og koncentrerendes under reduceret tryk. Remanensen opløstes i benzen (150 ml) og ekstraheredes med vand (3 x 20 ml). Det organiske lag tørredes over MgSO_4 og inddampedes til tørhed under reduceret tryk. Remanensen opløstes i benzen (150 ml) og ekstraheredes med vand (3 x 20 ml). Det organiske lag tørredes over MgSO_4 og inddampedes til tørhed under reduceret tryk. Remanensen søjle-kromatograferedes på silicagel (80 g) eluerende med benzen (500 ml) og chloroform (100 ml) successivt. Fra chloroform-eluatet 4.9 g (85%) af produktet isoleredes 4b som en lysegul olie.

IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{lig}}$ 3110, 1600⁻¹.

NMR: $\delta_{\text{ppm}}^{\text{CDCl}_3}$ 2.42 (3H, x, S-CH $_3$), 2.78 (3H, s, SO-CH $_3$), 4.15 (4H, m, CH $_2$ CH $_2$ -), 6.12 (1H, s, OH $\left\langle \begin{smallmatrix} \text{O}^- \\ \text{O}^- \end{smallmatrix} \right\rangle$), 7.34 (1H, d, $J=4.5\text{Hz}$, thiophen-H β), 7.40 (1H, d, $J=4.5\text{Hz}$, thiophen-H α), 8.28 (1H, s, -CH=).

Semicarbazonet fra 4 fremstilledes på almindelig måde og krystalliserede fra ethanol-DMF. Smeltepunkt 212-213°C.

Analyse beregnet for $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$: C, 39.58; H, 4.32; N, 13.85; S, 31.70.

Fundet: C, 39.46; H, 4.24; N, 14.05; S, 31.63.

2) K. Ogura, et al., Bull. Chem. Soc. (Japan), 45, 2203 ('72)

3) D. W. McDowell et al., J. Org. Chem. 31, 3592 ('66)

4) K. Ogura, et al., Tetrahedron Letters, 1383 (1972).

D) 1-Methylsulfinyl-1-methylthio-2-(3-carboxaldehyddimethylacetal-2-thienyl)ethylen (4a).

Forbindelsen 4a fremstilledes ved samme fremgangsmåde anvendt for 4b. Triton B (40% i methanol, 50 ml) tilsattes en opløsning af methylmethylthiomethylsulfoxid (72 g, 0.58 mol) og 3a (108 g, 0.58 mol) i THF (300 ml), og blandingen tilbagesvales i 4 timer. Adskillelse ved søjlekomatografering med silicagel (400 g) eluerende med chloroform (5 liter) gav 130.5 g (78%) 4a som en lysegul olie.

IR: ν_{\max}^{liq} 3100, 1580, 1100, 1050⁻¹.

NMR: $\delta_{\text{ppm}}^{\text{CCl}_4}$ 2.42 (3H, s, S-CH₃), 2.70 (3H, s, SO-CH₃), 3.34 (6H, s, OCH₃), 5.56 (1H, s, CH=C^O), 7.20 (1H, d, J=6Hz, thiophen-H_B), 7.40 (1H, d, J=6Hz, thiophen-H_A), 8.12 (1H, s, -CH=).

E) Ethyl 3-formyl-2-thienylacetat⁴⁾ (5)

Tør hydrogenchlorid (33 g) absorberedes i vandfri ethanol (500 ml). Til denne opløsning sættes 4a (130 g, 0.45 mol), og blandingen opvarmedes under tilbagesvaling i 5 minutter. Reaktionsblandingen fortyndedes med vand og inddampedes under reduceret tryk. Remanensen ekstraheredes med benzen (2 x 100 ml), og benzenekstrakterne forenedes, vaskedes med vand (50 ml), tørredes over MgSO₄ og inddampedes til tørhed. Den olieagtige remanens søjle-kromatograferedes på silicagel (400 g) eluerende med chloroform (5 liter). Fraktioner der indeholdt det ønskede produkt forenedes og koncentreredes. Den tilbageblevne olie (60 g) destilleredes under reduceret tryk til dannelse af 23 g (23%) 5, kogning ved 120-126^o C/1 mmHg.

IR: ν_{\max}^{liq} 3110, 1730, 1670 cm⁻¹.

NMR: $\delta_{\text{ppm}}^{\text{CDCl}_3}$ 1.30 (3H, t, J=6Hz, -CH₂CH₃), 4.25 (2H, q, J=6Hz, -CH₂CH₃), 4.26 (2H, s, -CH₂CO), 7.25 (1H, d, J=5Hz, thiophen-H_B), 7.48 (1H, d, J=5Hz, thiophen-H_A), 10.15 (1H, s, CHO).

Den analytiske prøve 5 omdannedes til 2.4-dinitrophenylhydrazon, som krystalliserede fra chloroform. Smeltepunkt 178-179^o C.

IR: $\nu_{\max}^{\text{nujol}}$ 1720, 1610, 1570 cm⁻¹.

Analyse beregnet for C₁₅H₁₄N₄O₆S: C, 47.62; H, 3.73; N, 14.81; S, 8.47.

Fundet: C, 47.33; H, 3.47; N, 14.77; S, 8.68.

Ifølge samme fremgangsmåde behandlede 2.2 g (7.6 mmol) ethylenacetal 4b med 1.1 g tør hydrogenchlorid i 800 ml vandfri ethanol til dannelse af 5, som blev rensed ved søjle-kromatografering på silicagel (30 g). Eluering med chloroform gav 663 mg (44%) 5 som en lysegul olie.

F) Ethyl 3-formyl-2-thienylacetatoxim. (6)

Natriumcarbonat (1.7 g, 16 mmol) tilsattes en opløsning af aldehydet 5, (3.14 g, 16 mmol) og hydroxylaminhydrochlorid (2.2 g, 32 mmol) i 50% vandig ethanol (40 ml) ved 5° C med omrøring. Reaktionsblandingen opvarmedes til stuetemperatur. Efter 2.5 time koncentreredes reaktionsblandingen under reduceret tryk. Remanensen ekstraheredes med benzen (3 x 50 ml). Benzenekstrakterne vaskedes med vand (10 ml), tørredes over MgSO₄, og inddampedes under reduceret tryk. Adskillelse ved søjle-kromatografering på silicagel (60 g) gav 2.7 g (80%) farveløs olie 6.

IR: ν_{\max}^{liq} 3400, 1730, 1620 cm⁻¹.

NMR: $\delta_{\text{ppm}}^{\text{acetone-d}_6}$ 1.23 (3H, t, J=7.5Hz, -CH₂CH₃), 4.01 (2H, s, -CH₂CO), 4.14 (2H, q, J=7.5Hz, -OH₂CH₃), 7.31 (2H, s, thiophen-H), 8.26 (1H, s, -CH-N), 10.15 (1H, s, NOH, forsvandt ved tilsætning af D₂O).

G) δ -laktamet af 3-aminomethyl-2-thienyleddikesyre (7)

Fremgangsmåde A: Katalytisk reduktion.

En blanding af oximet 6 (2.65 g, 12.4 mmol), 10% palladium - på-trækul, tør hydrogenchlorid (1.4 g, 37.2 mmol) i vandig ethanol (68 ml) hydrogeneredes natten over under atmosfærisk tryk ved stuetemperatur. Katalysatoren udskiftedes to gange, og reaktionen udførtes over en periode på 3 dage. Katalysatoren fjernedes, og filtratet koncentreredes under reduceret tryk. Til remanensen sattes vand (10 ml), og blandingen vaskedes med ethylacetat (2 x 10 ml). Det vandige lag indstilledes til en pH-værdi 9 med natriumcarbonat, mættedes med natriumchlorid og ekstraheredes med ethylacetat (3 x 20 ml). Ethylacetat-ekstrakterne tørredes over MgSO₄, behandlede med trækul og inddampedes under reduceret tryk. Omkrystallisering fra ethylacetat gav 417 mg (22%) farveløse nåle 7 med smeltepunkt 194-195° C.

IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3200, 1650, 1480 cm^{-1} .

NMR: $\delta_{\text{ppm}}^{\text{DMSO-d}_6}$ 3.53 (2H, t, $J=3\text{Hz}$, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 4.36

(2H, d-t, $J=3, 1.5\text{Hz}$, ændret til et triplet ved tilsætning af D_2O , $J=3\text{Hz}$, CH_2N), 6.95 (1H, d, $J=4.5\text{Hz}$, thiophen- $\underline{\text{H}}\beta$), 7.45 (1H, d, $J=4.5\text{Hz}$, thiophen- $\underline{\text{H}}\alpha$), 8.0 (1H, m, forsvandt ved tilsætning af D_2O , NH).

Analyse beregnet for $\text{C}_7\text{H}_7\text{NOS}$: C, 54.88; H, 4.61; N, 9.14; S, 20.93.

Fundet: C, 55.04; H, 4.45; N, 9.13; S, 20.50.

Fremgangsmåde B: Zn-støv reduktion.

Til en opløsning af oximet 6 (18.3 g, 86 mmol) i eddikesyre (200 ml) sattes portionsvis zinkstøv (17 g, 258 mmol) over en periode på 1 time ved $40-50^\circ\text{C}$ med kraftig omrøring. Reaktionsblandingen omrørtes natten over ved stuetemperatur og opvarmedes til 60°C i 4 timer. Indholdet filtreredes, og filtratet koncentreredes under reduceret tryk. Til den tilbageblevne olie sattes vand (100 ml), og blandingen vaskedes med ether (2 x 50 ml). Den vandige opløsning lagdeltes med ethylacetat (100 ml) og indstillede til en pH-værdi 10 med natriumcarbonat. Bundfaldet frafiltreredes. Filtratet ekstraheredes med ethylacetat. Ethylacetat-ekstrakterne vaskedes med vand (10 ml), tørredes over MgSO_4 , og inddampedes under reduceret tryk. Det tilbageblevne faste stof tritereredes med benzen. Krystallisering fra ethylacetat gav 2.7 g (21%) af laktamet 7, hvilket var identisk til fremgangsmåden A i IR- og NMR-spektrene.

H. 3-aminomethyl-2-thienyleddikesyre (8)

En blanding af laktamet 7 (2.88 g, 18.8 mmol) og 6b saltsyre (50 ml) opvarmedes under tilbagesvaling i 3 timer. Reaktionsblandingen koncentreredes under reduceret tryk. Til remanensen sattes vand (20 ml), og blandingen behandlede med trækul og inddampedes

under reduceret tryk. Triturering af remanensen med THF gav aminosyre 8 hydrochlorid (3.72 g, 95%, smeltepunkt 171-172° C; IR (KBr) cm^{-1} : 3450, 3000, 1700, 1200; NMR (D_2O)ppm: 4.80 (2H, s, $-\text{CH}_2\text{CO}$), 4.27 (2H, s, $\text{CH}_2\text{-N}$), 7.26 (1H, d, $J=6\text{Hz}$, thiophen- $\underline{\text{H}}\beta$), 7.53 (1H, d, $J=6\text{Hz}$, thiophen- $\underline{\text{H}}\alpha$). Hydrochloridet (3.71 g, 17.9 mmol) opløstes i vand (10 ml) søjlekromatograferedes på "IR-120" (H, 30 ml) og fremkaldtes successivt med vand (100 ml) og 5N- NH_4OH (2 l). Ammoniakeluatet indampedes til tørhed. Remanensen krystalliseredes fra den vandige acetone til dannelse af 3.0 g (98%) 8, smeltepunkt 223-225° C.

IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{HBr}}$ 3000, 1620, 1520 cm^{-1} .

NMR: $\delta^{\text{D}_2\text{O}-\text{Na}_2\text{CO}_3}$ 3.20 (sH, s, $-\text{CH}_2\text{OC}$), 4.13 (2H, s, CH_2N), 7.04 (1H, d, $J=6\text{Hz}$, thiophen- $\underline{\text{H}}\beta$), 7.30 (1H, d, $J=6\text{Hz}$, thiophen- $\underline{\text{H}}\alpha$).

Analyse beregnet for $\text{C}_7\text{H}_9\text{NO}_2\text{S}$: C, 49.10; H, 5.30; N, 8.18; S, 18.73.

Fundet: C, 48.53; H, 5.22; N, 7.98; S, 18.97.

I. 3-t-butoxycarbonylaminomethyl-2-thienyleddikesyre (9).

En blanding af 3-aminomethyl-2-thienyleddikesyre 8 (3.1 g, 18 mmol) og triethylamin (8 g, 80 mmol) i 50% vandig acetone (80 ml) sættes dråbevis til t-butoxycarbonylazid (5.7 g, 40 mmol) over en periode på 20 minutter ved 0° C med kraftig omrøring. Reaktionsblandingen omrørtes natten over ved stuetemperatur og koncentreredes under reduceret tryk. Koncentratet vaskedes med ether (2 x 20 ml), indstilledes til en pH-værdi 2 med koncentreret HCl og ekstraheredes med ethylacetat (2 x 50 ml). Ethylacetat-ekstrakterne vaskedes med mættet vandig natriumchlorid, tørredes over MgSO_4 , behandlede med trækul og indampedes under reduceret tryk. Remanensen tritureredes med n-hexan og krystalliserede fra n-hexan og benzen til dannelse af 4.5 g (92%) farveløse nåle 9,

smeltepunkt 62-63° C.

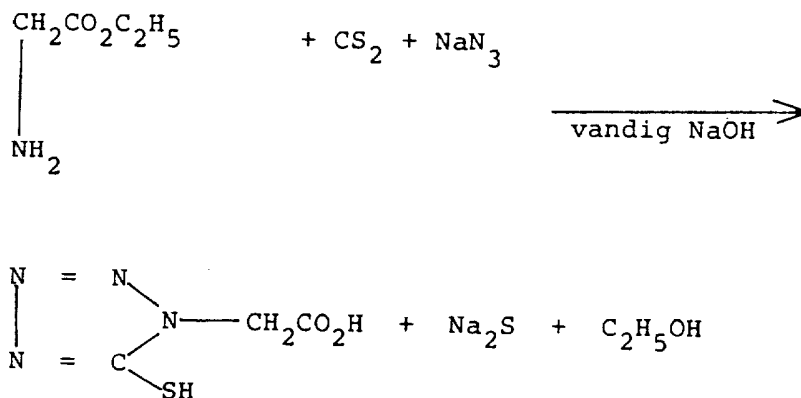
IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{nujol}}$ 3350, 1700 cm^{-1} .

NMR: $\delta_{\text{ppm}}^{\text{CDCl}_3}$ 1.43 (9H, s, BOC-H), 3.27 (2H, s, CH_2CO), 4.16 (2H, d, $J=6\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{-N}$, et singlet når D_2O tilsættes), 5.00 (1H, br, -NH-, forsvandt ved tilsætning af D_2O), 6.30 (1H, bred s, -COOH, forsvandt ved tilsætning af D_2O), 6.86 (1H, d, $J=6\text{Hz}$, thiophen-H β), 7.06 (1H, d, $J=6\text{Hz}$, thiophen-H α).

Analyse beregnet for $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_4\text{S}$: C, 52.89; H, 6.29; N, 5.14; S, 11.77.

Fundet: C, 53.30; H, 6.39; N, 5.13; S, 11.72.

J. Alternativ syntese af 1-carboxymethyl-5-mercaptotetrazol



Til en omrørt blanding af 13.95 g (0.10 m) glycinethyl-esterchlorid, 8.0 g (0.20 m) natriumhydroxid og 8.37 g (0.11 m) carbondisulfid sættes en opløsning af 7.47 g (0.115 m) natriumazid i 125 ml vand. Opløsningen opvarmedes ved tilbagesvaling i 6 1/2 time og opbevarede i 16 timer ved 25°. Den mørkebrune blanding filtreredes, og filtratet syrnedes til en pH-værdi 1.5

med koncentreret saltsyre. Opløsningen blev behandlet med carbon, og det gule filtrat ekstraheredes 4 x 100 ml med ethylacetat. Ethylacetatet vaskedes med vand, tørredes over magnesiumsulfat og inddampedes ved 40° (15 mm) til en olie. Olien tritureredes med methylenchlorid, og produktet opsamledes. Prøven tørredes i vakuum over phosphorpentoxid i 16 timer ved 25°. IR- og NMR-spektrene var i overensstemmelse med strukturen.

Reference: Tysk Patentskrift nr. 106645.

K. Fremstilling af 7β-(o-N-t-butoxycarbonylamino-methylphenylacetamido)-7α-methoxycephalosporansyre.

1) Benzhydryl 7-(o-N-t-butoxycarbonylamino-methylphenylacetamid)cephalosporanat.

Gul mercurioxid (16.12 g, 74 mmol) tilsattes en blanding af benzophenonhydrazon (5.88 g 30 mmol) og vandfri natriumsulfat (8 g) i tør ether (100 ml). Til den omrørte blanding sattes KOH-mættet ethanol (1.5 ml), og omrøring fortsattes i 1.5 time ved stuetemperatur. Blandingen filtreredes, og filtratet tilsattes en opløsning af 7-(o-N-t-butoxycarbonylamino-methylphenylacetamido)-cephalosporansyre (10.38 g, 20 mmol) i tetrahydrofuran (THF) (60 ml). Reaktionsblandingen omrørtes i 3 timer ved stuetemperatur og indampedes under reduceret tryk. Remanensen tritureredes med n-hexan (200 ml) og opsamledes ved filtrering. Det rå produkt opløstes i varm benzen (100 ml) og behandledes med en lille mængde carbon. Filtratet fortyndedes med ether (500 ml) og henstod i køleskab natten over til dannelse af titelproduktet som et farveløst, krystallinsk fast stof. Udbytte 12.25 g (89%); smeltepunkt 150-153° C.

IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3340, 3300, 1785, 1740, 1720, 1680, 1540, 1230, 1170 cm^{-1} .

UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 263 nm (ϵ 8580)

$[\alpha]_{\text{D}}^{26}$: + 5°, (c=1.0, chloroform)

NMR: $\delta_{\text{ppm}}^{\text{CDCl}_3}$ 1.45 (9H, s, t-Bu-H), 2.02 (3H, s, OAc), 3.39 (2H, m 2-H), 3.68 (2H, s, CH₂CO), 4.32 (2H, d, 4Hz, CH₂N, et singlet ved tilsætning af D₂O), 4.72 (1H, d, 14Hz, 3-H), 4.93 (1H, d, 4Hz, 6-H), 5.05 (1H, d, 14Hz, 3-H), 5.35 (1H, br, CH₂NH, forsvandt ved tilsætning af D₂O), 5.86 (1H, d-d, 4 & 8Hz, 7-H, et doublet med J=4Hz ved tilsætning af D₂O), 6.95 (1H, s, Ph₂CH), 7.2 - 7.6 (14H, m, phenyl-H).

Analyse beregnet for C₃₇H₃₉N₃O₈S: C, 64.80; H, 5.73; N, 6.13; S, 4.68.

Fundet: C, 64.70, 64.65; H, 5.95, 5.70; N, 6.12, 6.00; S, 4.82, 4.68.

2) Benzhydryl 7β(o-N-t-butoxycarbonylamino-methylphenylacetamido)-7α-methoxycephalosporan.

En kold opløsning (-65° C) af forbindelsen fra trin 1 (3050 mg, 4.45 mmol) i tør THF (20 ml) hældtes på én gang i en opløsning af lithium (108 mg, 15.6 mmol) i methanol-THF (12 ml: 20 ml) som var afkølet ved -65° C i tør is-acetonebad. Efter ét minut tilsattes t-butylhypochlorit (529 mg, 0.58 ml, 4.9 mmol) blandingen og omrørtes i 15 minutter ved den samme temperatur. Eddikesyre (1 ml) tilsattes blandingen for at køle reaktionen. Blandingen hældtes i vand (200 ml) og ekstraheredes med ethylacetat (4 x 50 ml). De forenede ekstrakter vaskedes med vand og inddampedes under reduceret tryk. Remanensen opløstes i varm benzen (20 ml) og behandlede med en lille mængde carbon. Filtratet fortyndedes med ether (200 ml) og henstod i køleskab til dannelse af titel-forbindelsen som et krystallinsk produkt. Udbytte 2094 mg (66%); smeltepunkt 171-173° C. Omkrystalliseret fra benzen-ether, smeltepunkt 174-175° C.

IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3350, 3250, 1785, 1750, 1735, 1680, 1525, 1230, 1170, 1080 cm^{-1} .

UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 247 nm (ϵ 6790), 267 nm (ϵ 7070).

$[\alpha]_{\text{D}}^{22}$: + 98° ($c=0.5$, chloroform).

NMR: $\delta_{\text{ppm}}^{\text{CDCl}_3}$ 1.43 (9H, s, t-Bu-H), 2.00 (3H, s, OAc), 3.2 - 3.4 (2H, m, 2-H) 3.49 (3H, s, OMe), 3.72, (2H, s, CH₂DO), 4.34 (2H, d, 6Hz, et singlet ved tilsætning af D₂O, CH₂N), 4.74 (1H, d, 14Hz, 3-H), 5.04 (1H, s, 6-H), 5.10 (1H, d, 14Hz, 3-H), 6.93 (1H, s, CHPh₂), 7.2 - 7.5 (14H, m, phenyl-H).

Analyse beregnet for C₃₈H₄₁N₃O₉S: C, 63.76; H, 5.77; N, 5.87; S, 4.38.

Fundet: C, 63.62, 63.67; H, 5.83, 5.65; N, 5.87, 5.73; S, 4.89, 4.72.

3) 7 β -(o-Aminomethylphenylacetamido)-7 α -methoxycephalosporansyre.

En blanding af produktet fra trin 2 (4.60 g, 6.43 mmol) og trifluoreddikesyre (TFA) (8 ml) omrørtes i 20 minutter fra 0-20° C til dannelse af en viskos opløsning, som fortyndedes med ether (100 ml) til udfældning af TFA-saltet af titelproduktet, som opsamledes ved filtrering og opløstes i acetonitril (200 ml). Opløsningen behandledes med en lille mængde carbon. En blanding af koncentreret NH₄OH-acetonitril (1:1) sattes dråbevis til filtratet med omrøring, indtil der ikke forekom nogen bundfældning. Titelproduktet opsamledes ved filtrering, vaskedes med acetonitril (50 ml) og tørredes. Udbytte 2.49 g (86%), smeltepunkt 161-165° C. (dekomp.).

IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3600 - 2400, 1770, 1740(sh), 1665,
1600, 1230, 1135 cm^{-1} .

UV: $\lambda_{\text{max}}^{1\% \text{NaHCO}_3}$ 237 nm (ϵ 6300), 265 nm (ϵ 7700).

NMR: $\delta_{\text{ppm}}^{\text{D}_2\text{O}+\text{NaHCO}_3}$ 2.10 (3H, s, OAc), 3.15 (1H,
d, 18 Hz, 2-H), 3.53 (3H, s, OCH₃) 3.62 (1H, d, 18Hz,
2-H), 3.90 (2H, s, CH₂N), 5.12 (1H, s, 6-H), 7.45
(4H, s, phenyl-H).

Analyse beregnet for C₂₀H₂₃N₃O₇S·2H₂O: C, 49.48;
H, 5.61; N, 8.65; S, 6.60.

Fundet: C, 49.64, 49.38; H, 4.93, 4.86;
N, 8.86, 8.92; S, 6.57.

4) 7 β -(o-N-t-Butoxycarbonylaminoethylphenyl-
acetamido)-7 α -methoxycephalosporansyre

En blanding af produktet fra trin 3 (800 mg, 1.8 mmol), t-butyl 3.6-dimethylprymidin-2-ylthiocarbonat (864 mg, 3.7 mmol) og triethylamin (273 mg, 0.38 ml, 2.7 mmol) i 50% vandig THF (12 ml) omrørtes i 4 timer ved stuetemperatur. Blandingen fortyndedes med ethylacetat (100 ml) og vaskedes adskillige gange med 10-ml portioner 6N HCl indtil den gule farve af det vandige lag forsvandt. Det organiske lag vaskedes med vand og tørredes. Afdampning af opløsningsmidlet under reduceret tryk gav titelproduktet, som opsamledes ved filtrering, vaskedes med n-hexan og tørredes. Udbytte 568 mg (57%), smeltepunkt 102-106°C. (dekomp.).

IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3300, 1780, 1720, 1700, 1515, 1230, 1165 cm^{-1} .

UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 244 nm (ϵ 6630), 266 nm (ϵ 7150).

NMR: $\delta_{\text{ppm}}^{\text{CDCl}_3}$ 1.48 (9H, s, t-Bu-H), 2.08 (3H, s,
COCH₃) 3.3 - 3.4 (2H, m, 2-H), 3.48 (3H, s, OCH₃),
3.78 (2H, s, CH₂CO₂), 4.30 (2H, d, 6Hz, et singlet ved
tilsætning af D₂O), 4.82 (1H, d, 15Hz, 3-H), 5.08 (1H,

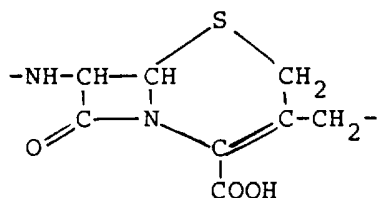
s, 6-H), 5.12 (1H, d, 15Hz, 3-H), 7.26 (4H, s, phenyl-H), 8.20 (1H, br, forsvandt ved tilsætning af D₂O, NH eller COOH), 8.85 (1H, br-s, forsvandt ved tilsætning af D₂O).

Analyse beregnet for C₂₅H₃₁N₃O₉S: C, 54.63; H, 5.69; N, 7.65; S, 5.84.

Fundet: C, 54.33, 54.42; H, 5.73, 5.59; N, 7.44, 7.39; S, 6.01, 5.97.

De mest aktive af de her omhandlede forbindelser er sådanne, som har D-configuration ved α-carbonatomet i 7-sidekæden, d.v.s. de som fremstilles ud fra D-2-phenylglycin eller D-mandelsyre eller en monosubstitueret D-2-phenylglycin eller D-mandelsyre som belyst her. Endvidere er configurationen ved de to optisk aktive asymmetriske centre i β-lactamkernen den samme som i cephalosporin C fremstillet ved fermentering og i 7-aminocephalosporansyre afledt deraf.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen belyses i det følgende nærmere ved udførelseseksempler. Alle temperaturer er i grader Celcius. 7-Aminocephalosporansyre forkortes til 7-ACA; -ACA- betegner den del, som har strukturen

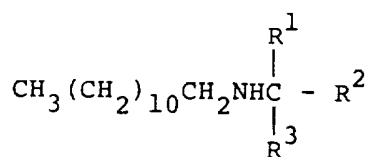


og 7-ACA kan derfor betegnes H-ACA-O-C(=O)-CH₃.

Methylisobutylketon betegnes MIBK.

"Skellysolve B" er en petroleumsetherfraktion med kogepunkt 60 - 68° C bestående i det væsentlige af n-hexan.

"LA-1" harpiks er en blanding af sekundære aminer, hvori hver sekundær amin har formlen

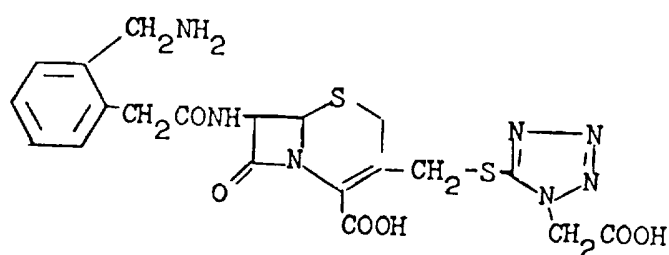


hvor i hver af R^1 , R^2 og R^3 er en monovalent aliphatisk carbonhydrid-gruppe, og hvor i R^1 , R^2 og R^3 i aggregatet indeholder fra 11 til 14 carbonatomer. Denne særlige blanding af sekundære aminer, der undertiden i eksemplerne er betegnet som "flydende aminblanding nr. II", er en klar ravgul væske med følgende fysiske egenskaber: Viskositet ved 25°C 70 cpd, vægtfylde ved 20°C 0.826, brydningsindeks ved 25°C 1.4554, destillationsinterval ved 10 mm, indtil 170°C - 0.5%, $170\text{-}220^\circ\text{C}$ - 3%, $220\text{-}230^\circ\text{C}$ - 90% og over 230°C - 6.5%.

"IR-120" kaldes også "Amberlite IR-120" og er en stærk kationbytter-harpiks indeholdende sulfonsyreradikaler. "Amberlite IR-120" er en i handelen tilgængelig kationbytter-harpiks af polystyren-sulfonsyretypen, og den er mere speciel end kernesulfoneret polystyrenharpiks tværbundet med divinylbenzen opnået ved den fremgangsmåde, som er anført af Kunin, Ion Exchange Resins, 2. udgave (1958), John Wiley and Sons, Inc. Der henvises der f.eks. til sider 84 og 87.

Eksempel 1.

7-(2-Aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre



1. I en 3-halset kolbe indeholdende 100 ml afioniseret vand og forsynet med en omrører og termometer tilsættes 7.6 g (0.021 mol) 7-amino-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, fremstillet som angivet under "udgangsmaterialer", og 3.4 g (0.034 mol) N-methylmorpholin. Der afkøles til 0°C . Med omrøring holdes opløsningen på 0°C ved anvendelse af isbad.

2. I en separat kolbe forsynet med en omrører anbringes 9.6 g (0.03 mol) natrium 2-(1-methoxycarbonyl-1-propen-2-ylaminomethyl)-phenylacetat og 184 ml tetrahydrofuran. Med omrøring afkøles

suspensionen til -30°C ved anvendelse af et tørt isacetone-bad. Under fortsat omrøring og temperaturen på -30°C tilsættes 20 dråber dimethylbenzylamin og 4.4 g (0.03 mol) isobutylchlorformat. Den fremkomne blanding omrøres i 5 minutter.

3. Tilsæt hele blandingen fra trin 2 til omrøringsopløsningen i trin 1 på én gang. Den resulterende opløsning holdes på 3°C med omrøring 1 time.

4. Afdamp tetrahydrofuranen fra reaktionsblandingen ved 30°C ved at anvende vakuum (15 mm).

5. Indstil pH-værdien af den tilbageblevne vandige opløsning til 4.0 ved anvendelse af koncentreret saltsyre.

6. Tilsæt 2.5 g trækul ("Darco G-60") til opløsningen og bland i 20 minutter. Fjern carbonet ved filtrering.

7. Filtratet lagdeles med 120 ml ethylacetat, og med omrøring sænkes pH-værdien til 3.8 med koncentreret saltsyre. Lyst tanfarvet fast stof kan udskille og fjernes ved filtrering. (Gemmes til oparbejdning og genindvinding).

8. Ved anvendelse af isbad afkøles filtratet til 5°C , og med omrøring sænkes pH-værdien til 2.5 - 2.8 med koncentreret saltsyre. Temperaturen holdes ved 5°C , og omrøringen fortsættes 1 time.

9. Produktet opsamles ved filtrering. Filterkagen vaskes med 5 ml koldt afioniseret vand efterfulgt af 5 ml kold methanol.

10. Den faste 7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre lufttørres til konstant vægtmængde. (Ved et typisk forsøg opnåedes 4.1 g af produktet).

11. Det opnåede produkt fra trin 10 ledes gennem en 200 mesh rustfri stålsigte.

12. 10 g af dette 200 mesh produkt opslæmmes i 100 ml chloroform. 5 ml triethylamin tilsættes, og blandingen opvarmes til 50°C med hurtig omrøring. Blandingen opslæmmes ved 50°C i 5 minutter.

13. Blandingen filtreres varm (7-ACA, 7-amino-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, pigmenter og andre urenheder er opløselige i den varme chloroformtriethylamin opløsning). Filterkagen vaskes med 25 ml chloroform og lufttørres i 2 timer. Udbytte: 1-8 g 7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-yl-thiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre.

14. Produktet der opnåedes i trin 13 ledes gennem en 200 mesh sigte.

15. 10 g af dette 200 mesh produkt opslættes i 75 ml 0.1 N saltsyre i 10 - 15 minutter. Blandingen filtreres, og filterkagen vaskes med 25 ml vand, 50 ml methanol og lufttørres ved stuetemperatur i 2 - 3 timer. Udbytte: Der opnåedes op til 10 g.

16. 10 g 7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyl-tetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, der opnåedes i trin 15, opslættes i 65 ml methanol.

a) Der tilsættes 2 ml koncentreret saltsyre. Der opnås en opløsning eller næsten opløsning. Der omrøres i 5 minutter.

b) Til opløsningen a) ovenfor sættes hurtigt 130 ml vand med kraftig omrøring. Der opnåedes en øjeblikkelig udfældning (indeholdende det meste af farven). (Det er nødvendigt med en pH-værdi på 1.3 til 1.6).

c) Blandingen opslættes i 1 minut og filtreres hurtigt. (Det faste stof gemmes til oparbejdning og genindvinding).

d) Filtratet podes og omrøres moderat. Krystalliseringen vil indtræde efter 15 - 30 minutter.

e) Blandingen omrøres ved omgivende stuetemperatur eller ved 4° C i 2 timer efter krystalliseringen er begyndt.

f) Krystallerne fjernes ved filtration, vaskes med 25 ml 65% vand-, 35% methanolblanding (v/v), 50 ml methanol og vakuumtørres ved 50° C i 24 timer. Udbytte: Op til 9 g rensat, hvidt 7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre opnås.

17. I det følgende belyses to vekslende fremgangsmåder for krystalliseringen af 7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre.

A.

1. 10 g af det opnåede produkt i trin 15 opslættes i 100 ml methanol.

2. Der tilsættes 2 ml koncentreret saltsyre, og der opnåedes en opløsning eller næsten opløsning.

3. Der tilsættes 1.5 g trækul ("Darco G-60"), og blandingen opslættes i 0.5 time.

4. Carbonet fjernes ved filtrering og vaskes med 20 ml methanol. Methanolvaskevæsken tilsættes filtratet.

5. 120 ml vand tilsættes filtratet. (En lille mængde udfældning kan vise sig. Dette fjernes ved filtrering og gemmes til oparbejdning og genindvinding).

6. Opløsningen fra trin 5 omrøres hurtigt og indstilles til en pH-værdi 2.5 - 3.0 med 10% natriumhydroxid. Der dannes krystaller.

7. Blandingen opslættes i 0.5 time. Krystallerne fjernes ved krystallisering, vaskes med 20 ml 50% methanolvand (v/v), 30 ml methanol og vakuumtørres ved 50° C i 24 timer. Udbytte: Der opnås op til 9 g rensat 7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre.

B.

1. 10 g af det opnåede produkt i trin 15 opslættes i 75 ml vand.

2. 10% natriumhydroxid tilsættes en fastholdt pH-værdi 6.8-7.2. Der kan opnås en opløsning eller delvis opløsning.

3. Der tilsættes 1.5 g trækul ("Darco G-60"), og blandingen opslættes i 0.5 time med en fastholdt pH-værdi 6.8 - 7.2 (fortsat tilsætning af 0.1 til 1 N natriumhydroxid).

4. Carbonet fjernes ved filtrering. Carbonet vaskes med 20 ml vand som tilsættes filtratet.

5. pH 6.8-7.2 opløsningen i trin 4 kan krystalliseres ved en pH-værdi 2.5-3.0 som beskrevet under A, trin 6 og 7 ovenfor, eller ved en pH-værdi 1.2-1.5 (ved tilsætning af saltsyre) og som beskrevet i d, e, og f i trin 16. I begge tilfælde opnås op til 9 g

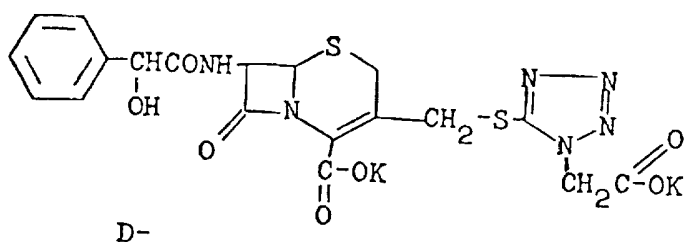
krystallinsk 7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyl-tetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre.

Dette produkt er ofte opnået som et krystallinsk monohydrat. Når denne forbindelse administreredes intramuskulær ved injektion i en dosis på 10mg/kg legemsvægt i mus, opnåedes på 15 minutter en blodspejlsværdi på 19.7 mg/ml.

Den beskyttende dosis i 50% af dyrene, der var udsat for titel-forbindelsen i mus overfor en lethal intramuskulær dosis af E. Coli A 15119, K. Pneumoniae A 9977 og E. cloacae A21020 var 0.39-0.42, 1.5-25 og 1-3.2 mg/kg.

Eksempel 2.

Dikalium 7-(D- α -hydroxyphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylat.



A). 7-(D- α -formyloxyphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyl-tetrazol-5-yl-thiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre.

Til en opløsning af 500 mg (0.0134 mol) 7-amino-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, fremstillet som angivet under "udgangsmaterialer", i 10 ml vand ved 0° sattes med omrøring 200 mg natriumbicarbonat. Så snart opløsningen var færdig tilsattes på én gang 340 mg (0.0172 mol) D-(-)-2-formyloxy-2-phenyl-acetylchlorid i 10 ml acetone. Så snart der var dannet bundfald tilsattes fast natriumbicarbonat, og opløsningen omrørtes med en pH-værdi 8 i 1 time. Acetonen afdampedes ved 15 mm's tryk og 30°, og opløsningen lagdeltes med 20 ml ethylacetat og syrnedes med 1:1 phosphorsyre. Efter ekstraktion med ethylacetat filtreredes blandingen, og det organiske lag fraskiltes og inddampedes til dannelse af det der identificeredes som så godt som ren 7-(D- α -formyloxyphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-

5-yl-thiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre.

B) Dikalium 7-(D- α -hydroxyphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylat

Det faste stof isoleret i trin A) opløstes i 5 ml methanol og 5 dråber koncentreret saltsyre. Opløsningen behandlede med carbon og opvarmedes i 3 minutter på dampbad. Blandingen filtreredes og fortyndedes med 15 ml vand. Det gummiagtige faste stof tritureredes med koldt vand og tilsidst med vandfri ether. Det faste stof opløstes i 5 ml acetone og behandlede med 50 mg kalium 2-ethylhexanoat. Dikalium 7-(D- α -hydroxyphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylat opsamledes som et hvidt fast stof og vejede 90 mg, smeltepunkt 375^o, langsom dekomp.

Analyse beregnet for C₁₉H₁₆K₂N₆O₇S₂: C, 39.19; H, 2.77; N, 14.42.

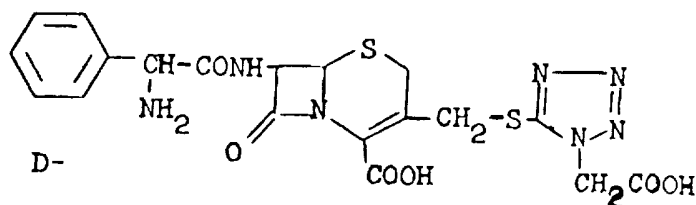
Fundet: C, 39.87; H, 3.50; N, 12.58.

Når denne forbindelse administreredes intramuskulært ved injektion i en dosis på 10 mg/kg legemsvægt i mus opnåedes en blodspejlsværdi på 21.4 mg/ml på 15 minutter.

Den beskyttende dosis i 50% af dyrene, der var udsat for titelforbindelsen i mus overfor en lethal intramuskulær dosis af E. Coli A 15119, var 0.8 mg/kg.

Eksempel 3.

7-(D- α -Aminophenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre



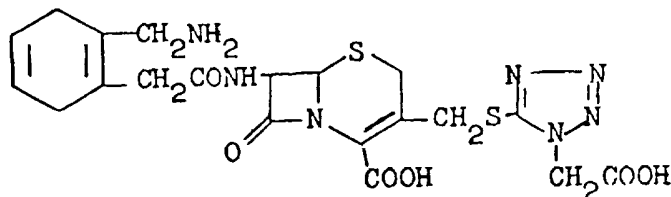
En opløsning af 0.55 g (0.0022 mol) D-(-)- α -tert.-butoxycarboxamidophenyleddikesyre og 0.22 g (0.0022 mol) triethylamin (TEA) i 17 ml tetrahydrofuran (THF) omrørtes kraftigt ved 0° med 0.300 g (0.0022 mol) isobutyl chlorformat. Blandingen omrørtes i 30 minutter ved 0°, og en opløsning af 0.0022 mol 7-amino-3-(1-carboxymethyl-tetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, fremstillet som angivet under "udgangsmaterialer", og 0.445 g (0.0044 mol) TEA i 6.8 ml 50% THF tilsattes. Den resulterende opløsning omrørtes i 2 timer ved 25° og dernæst afdampedes THF ved 40° ved 15 mm's tryk til en olie. Olien vaskedes med 2 x 50 ml ether, fortyndedes til halvdelen med vand og syrnedes til en pH-værdi 3.0 med fortyndet saltsyre. Blandingen omrørtes i en time på et isbad og produktet ekstraheredes til 75 ml ethylacetat. Ekstrakten vaskedes med 2 x 20 ml vand og 2 x 50 ml mættet natriumchlorid-opløsning. Ethylacetatet afdampedes ved 15 mm's tryk og 35° til en olie og tritureredes med "Skellysolve B" til dannelse af 480 mg (35.3%) 7-(D- α -tert.-butoxycarboxamidophenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre. Denne prøve sættes til 1 ml trifluoreddikesyre og opløsningen omrørtes en time ved 0° og fortyndedes dernæst med 50 ml ether. Saltet opsamledes, opløstes i 10 ml H₂O og indstillede til en pH-værdi 4,0 med fortyndet ammoniumhydroxid (NH₄OH). Produktet opsamledes, vaskedes med vand og acetone og tørredes i vakuum over P₂O₅ i 18 timer ved 25° til dannelse af 150 mg (23.96%) 7-(D- α -aminophenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, smeltepunkt > 180°, langsom decomp. IR- og NMR-spektrene var i overensstemmelse med strukturen.

Analyse beregnet for C₁₉H₁₉N₇O₆S₂ · 1 1/2 H₂O:
C, 42.84; H, 4.16; N, 18.41.

Fundet: C, 43.12; H, 4.12; N, 16.74.

Eksempel 4.

7-(2-Aminomethyl-1.4-cyclohexadienylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre.



En opløsning af 0.80 g (0.003 mol) 2-t-butoxycarbonylamino-methyl-1.4-cyclohexadienyleddikesyre og 0.303 g (0.003 mol) triethylamin i 19.2 ml THF omrørtes ved 0°, og 0.41 g (0.003 mol) isobutylchlorformat tilsattes. Blandingen omrørtes i 30 minutter ved 0° og sattes til en opløsning af 0.003 mol 7-amino-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, fremstillet som angivet under "udgangsmaterialer", og 0.61 g (0.006 mol) TEA i 9.2 ml 50% THF. Den resulterende opløsning omrørtes i 1 1/2 time ved 25°. Tetrahydrofuranen afdampedes ved 15 mm's tryk og 30°, og remanensen vaskedes med 2 x 30 ml ether og fortyndedes dernæst til halvdelen med vand. Opløsningen syndes til en pH-værdi 3.5 ved fortyndet saltsyre, og produktet opsamledes, tørredes i 18 timer i vakuum over P₂O₅ ved 25° til dannelse af 1.55 g (54.0%) hvidt pulver. Der sattes ialt 3.4 ml trifluoreddikesyre til ovenstående 7-(α-(2-t-butoxycarbonylaminomethyl-1.4-cyclohexadienylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre og omrørtes 1 time ved 0°. Opløsningen fortyndedes med 150 ml ether og bundfaldet opsamledes ved filtrering. Trifluoracetatsaltet suspenderedes i 3.4 ml vand og indstilledes til en pH-værdi 4.5 ved fortyndet ammoniumhydroxid. Den gummiagtige remanens tritureredes med vand, opsamledes og vaskedes med vand og acetone. Produktet tørredes i 18 timer i vakuum over P₂O₅ til dannelse af 53 mg (15.72%) 7-(2-aminomethyl-

1.4-cyclohexadienylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthio-
methyl)-3-cephem-4-carboxylsyre; smeltepunkt $>160^{\circ}$, langsom dekomp.

Analyse beregnet for $C_{20}H_{23}N_7O_6S_2 \cdot 1/2 H_2O$;

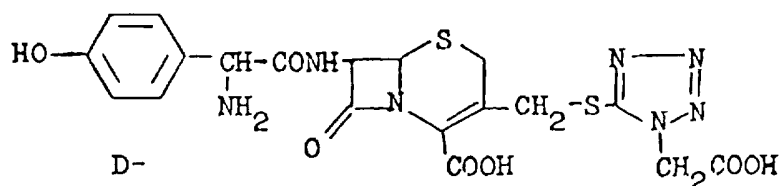
C, 45.18; H, 4.55; N, 18.44.

Fundet: C, 45.46; H, 4.68; N, 17.09.

IR- og NMR-spektrene var i overensstemmelse med strukturen.

Eksempel 5.

7-(α -Amino-4-hydroxyphenylacetamido)-3-(1-
carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-
4-carboxylsyre.



Til en opløsning af 2.7 g (0.01 mol) D-(-)-N-tert.-butoxy-carbonyl-p-hydroxyphenylglycin i 92 ml tetrahydrofuran sættes 1.1 g (0.01 mol) N-methylmorpholin. Opløsningen afkøledes til 0° , og 1.4 g (0.01 mol) isobutylchlorformat tilsættes straks på én gang. Omrøringen fortsatte i 10 minutter og den blandede anhydrid opløsning sættes til en 0° opløsning af 3.7 g (0.01 mol) 7-amino-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, fremstillet som angivet under "udgangsmaterialer, og 1.1 g (0.01 mol) N-methylmorpholin i 50 ml vand. Opløsningen omrørtes 1 time, og tetrahydrofuranen afdampedes ved 30° (15 mm) til et totalt volumen på 45 ml. Opløsningens pH-værdi sænktes til 2 med 1:1 phosphorsyre og ekstraheredes med ethylacetat, vaskedes med vand og opløsningsmidlet azeotrop destilleredes til et glasagtigt fast stof ved 30° (15 mm). Remanensen tritureredes

med ether for at fjerne eventuel udgangssyre og opsamledes ved filtrering. Denne var hydroskopisk og blev øjeblikkelig overført til 5 ml. trifluoreddikesyre og omrørt i 1 time ved 27°. Opløsningen fortyndedes med 25 ml ether, og produktet opsamledes ved filtrering og suspenderedes i 5 ml vand. Blandingen indstilledes til pH-værdi 3 med koncentreret ammoniumhydroxid og fortyndedes med 10 ml isopropanol. Det lyse tanfarvede faste stof opsamledes ved filtrering og tørredes i vakuum over P_2O_5 i 24 timer til dannelse af 300 mg 7-(α -amino-4-hydroxyphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyl-tetrazol-5-ylthiomethyl-3-cephem-4-carboxylsyre. Smeltepunkt 175° langsom dekomp.

Analyse beregnet for $C_{19}H_{19}N_7O_7S_2 \cdot 3/4 i-C_3H_7O$:

C, 42.78; H, 4.44; N, 17.32.

Fundet: C, 42.86; H, 4.55; N, 15.39.

IR- og NMR-spektrene var i overensstemmelse med strukturen. NMR-spektret viste dog tilstedeværelsen af 0.75 mol isopropylalcohol i produktet.

Eksempel 6 .

Natrium 7- { D- α -[3-(2-furoyl)ureido]-4-hydroxyphenyl-acetamido } cephalosporanat.

Triethylamin (6.4 ml, 0.0454 mol) og 12.7 g (0.1039 mol) 2-furoylisocyanat tilsattes en isafkølet suspension, 20.8 g (0.0413 mol) 7-(D- α -amino-4-hydroxyphenylacetamido)cephalosporansyre (som et dimethylformamidvandsolvat) i 175 ml tør dimethylformamid. Efter ca. 1 minut fjernedes isbadet, og blandingen omrørtes i en time. Den mørke opløsning fortyndedes med 600 ml vand, lagdeltes med ethylacetat, og den vandige fase syrnedes til en pH-værdi 2.5 med 42% phosphorsyre. Faserne adskiltes, og den vandige dimethylformamidfase ekstraheredes 4 gange til med ethylacetat. De forenede organiske ekstrakter vaskedes 5 gange med vand, behandledes med carbon, filtreredes og koncentreredes ved reduceret tryk for at fjerne tilbageblivende vand. Frisk ethylacetat tilsattes, og den omrørte opløsning behandledes langsomt med 15.1 ml (0.0408 mol) natrium 2-ethylhexanoat i 1-butanol, hvilket fik produktet til at krystallisere; 18.1 g, 75.5%. IR- spektret var i overensstemmelse med det ønskede produkt.

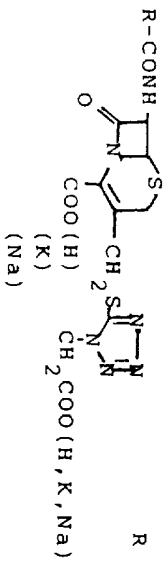
7- { D- α -[3-(2-Furoyl)ureido]-4-hydroxyphenylacetamido } -
3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-cephem-4-
carboxylsyre dinatriumsalt.

En blanding af 4.0 g (0.0069 mol) natrium 7- { D- α -[3-(2-furoyl)ureido]-4-hydroxyphenylacetamido } -cephalosporanat, 1.83 g (0.00895 mol) 5-mercapto-1-tetrazoleddikesyre dinatriumsalt og 200 ml med pH-værdi 6.4 0.1 M fosfatpuffer opvarmedes ved 75^o i 6 timer under en nitrogenatmosfære. Reaktionsblandingen, som var henstillet i køleskab natten over, filtreredes for at fjerne en lille smule bundfald. Filtratet indstilledes til en pH-værdi med 6 N HCl og blandingen ekstraheredes 3 gange med ethylacetat. Blandingen filtreredes under den første ekstraktion for at fjerne en lille smule uopløseligt stof. De forenede ethylacetatekstrakter (volumen = 500 ml) vaskedes 2 gange med vand, tørredes (natriumsulfat), filtreredes og behandledes med 5.1 ml (0.0138 mol, 2 ækv.) natrium 2-ethylhexanoat i 1-butanol, hvilket fik en olie til at udskilles. Opløsningsmidlet koncentreredes noget for at fjerne vand, og blandingen henstilledes i køleskab. Opløsningsmidlet dekanteredes og det gummiagtige produkt tritureredes med acetone, der gav et filtrerbart fast stof; udbytte 2.0 g. Produktet tørredes i vakuum over phosphorpentoxid. IR-spektret var i overensstemmelse med det ønskede produkt.

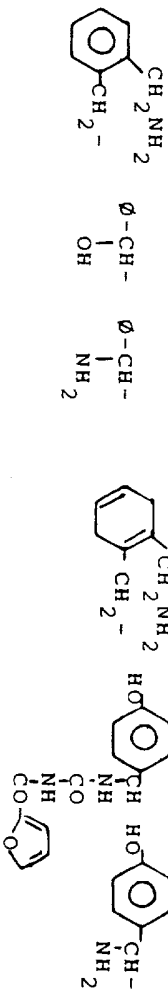
Prøver af forbindelserne fremstillet i eksemplerne 1, 2, 3, 4, 5 og 6 viste sig efter opløsning i vand og fortynding med næringssubstrat at udvise følgende minimaleinhibitoriske koncentrationer (M.I.K) i mcg/ml overfor de anførte mikroorganismer bestemt ved inkubering natten over ved 37^o C ved seriefortyndingsmetode.

In Vitro antibakterisk aktivitet M.I.K. ($\mu\text{g/ml}$).

Organismer	Eksempel 1 (opløseligt ved ≈ 250 mg/ml som Na salt)						
	Eksempel 1	Eksempel 2	Eksempel 3	Eksempel 4	Eksempel 6	Eksempel 5	
Str. pneumoniae * (10 ⁻³)**	A9585	0.13	0.6	0.6	0.06	0.13	0.25
Str. pyogenes * (10 ⁻³)	A9604	0.13	0.6	0.6	0.13	0.13	1
S. aureus Smith (10 ⁻⁴)	A9537	1	1.3	2.5	0.5	>1	>1
S. aureus-50% serum (10 ⁻⁴)	A9537	4	16	32	>0.5	>63	16
S. aureus BX1633 (10 ⁻³)	A9606	1	2.5	>2.5	1.3	2	8
S. aureus BX1633 (10 ⁻²)	A9606	2	4	16	2.5	8	8
S. aureus Meth-Res (10 ⁻³)	A15097	4	8	16	4	63	32
Sal. enteritidis (10 ⁻⁴)	A9531	0.06	0.08	0.3	0.16	0.5	0.5
E. coli Juhl (10 ⁻⁴)	A15119	0.5	4	8	1.3	16	8
E. coli (10 ⁻⁴)	A9675	16	32	16	16	16	32
K. pneumoniae (10 ⁻⁴)	A9977	0.13	1	1	0.3	1	1
K. pneumoniae (10 ⁻⁴)	A15130	2	32	8	2	125	8
Pr. mirabilis (10 ⁻⁴)	A9900	0.13	0.5	1	0.3	0.5	1
Pr. Morganii (10 ⁻⁴)	A15153	32	16	32	8	32	125
Ps. aeruginosa (10 ⁻⁴)	A9843A	>125	>125	>125	>125	16	>125
Ser. marcescens (10 ⁻⁴)	A20019	125	>125	>125	>125	>125	>125
Ent. cloacae (10 ⁻⁴)	A9656	>125	>125	>125	>125	>125	>125
Ent. cloacae (10 ⁻⁴)	A9657	0.25	2	1	0.3	63	2
Ent. cloacae (10 ⁻⁴)	A9659	32	>125	63	32	>125	125



R =



* 45% Antibiotisk prøvesubstrat + 50% næringssubstrat + 5% serum
 ** Fortynding af substratkultur natten over

Eksempel 7 .

Trihydrat af mononatriumsalt af 7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-yl-thiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre.

1. 10 g krystallinsk 7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-yl-thiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (som omhandlet og fremstillet i Eksempel 1) suspenderes i 50 ml afioniseret vand.
 2. 10% Natriumhydroxid tilsættes langsomt med hurtig omrøring til en stadig eller konstant pH-værdi på 7.4 - 7.7. Der opnås en opløsning eller næsten opløsning.
 3. Der tilsættes 2 g aktiveret trækul ("Darco G-60"), og blandingen opslæmmes i 0.5 time. pH-værdien holdes på 7.4 - 7.7 med 1 N natriumhydroxid.
 4. Carbonet fjernes ved filtrering og vaskes med 10 ml vand. Vaskevæsken tilsættes filtratet.
 5. Opløsningen fra trin 4 med pH-værdien 7.4 - 7.7 gøres steril og pyrogenfri ved hjælp af passende aseptisk filtrering og teknik.
- Den nødvendige tid til færdiggørelse af trin 3, 4 og 5 skulle ikke overstige 5 timer ved omgivende stuetemperatur.
6. Ved anvendelse af den sterile teknik sættes en omtrentlig lige så stor volumen (65 ml) steril, pyrogenfri acetone til den hurtigt omrørte sterile opløsning i trin 5 over en 5 minutters periode.
 7. Baseret på det næsten originale vandige volumen tilsættes yderligere 2 volumen (120 ml) steril, pyrogenfri acetone med hurtig omrøring i 15-20 minutter. Der dannes krystaller.
 8. Blandingen opslæmmes i 10 minutter.
 9. Der tilsættes yderligere 3 volumen (180 ml) steril acetone over et 15 minutters interval. Blandingen opslæmmes i 0.5 time.

10. Krystallerne opsamles ved filtrering, vaskes med 75 ml steril acetone og vakuumtørres ved 45-50° C eller lufttørres ved 50-56° C i 24 timer. Udbytte: ca. 8.8 g.

Egenskaber for trihydrat af mononatriumsalt fra
7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyl-
tetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre:

% vand (KF) = 9.2 (teori = 9.05%)

% natrium (flammefotometer) = 4.0 (teori = 3.86%)

opløselighed i vand = 500 mg/ml

stabilitet i vand = stabil for i det mindste 24 timer
ved stuetemperatur ved 250 mg/ml.

Formulering af injektionsprodukter.

In situ fremstilling af mononatriumsalt af 7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre:

A) 2.5 g af 7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (zwitterion) suspenderes i 8.5 ml vand med hurtig omrøring, natriumcitrat eller Na_2HPO_4 eller Na_3PO_4 eller andre passende "baser" tilsættes indtil der opnås en opløsning (pH-værdien bør ikke være over 7.8). Mængden af tilsat "base" noteres.

B) Der fremstilles en fysisk blanding af 2.5 g 7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre og den faste "base" i forhold bestemt i "A" ovenfor. Den senere tilsætning af vand til opnåelse af forskellige koncentrationer af 7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre giver en opløsning af in situ fremstillet mononatriumsalt af 7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre.

Denne fremgangsmåde kan være ønskelig fordi trihydrat af mononatriumsalt af 7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyl-tetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre ikke er så stabil ved høvede temperaturer som den fri syre 7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (zwitterion) monohydrat.

Med hensyn til stabiliteten af 7-(o-amino-methylphenylacetamido)-3-(1-methyl-1,2,3,4-tetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre-opløsninger ved stuetemperatur og en pH-værdi 10.3 (den laveste pH-værdi der er i stand til at opløse 150 mg/ml) bemærkes et næsten øjeblikkeligt 50% tab af bioaktivitet. I løbet af de næste 30 minutter tabes yderligere 21% aktivitet.

Som modsætning viste en opløsning der indeholdt 125.0 mg/ml af trihydratet af mononatriumsalt af 7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre med pH-værdi 7.0 intet særligt tab ved stuetemperatur for i det mindste 24 timer.

-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-

Forbindelsen kaldet 7-(o-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-methyl-1,2,3,4-tetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre ifølge eksempel 1 og krav 1 af USA Patentskrift nr. 3.766.175 er en meget kraftigt virkende cephalosporin, som udviser et særlig ønskeligt aktivitetsspektrum, især overfor visse gram-negative organismer. Desværre udviser denne zwitterion imidlertid en meget lav opløselighed i vand og især i blodstrømmen, hvilket vil sige ved en pH-værdi på ca. 7.2 eller deromkring. Mere specielt gav forsøg på at måle denne opløselighed resultater i intervallet ca. 1.0 - 3.0 mg/ml i både forpufret vandigt medium og i hundeurin ved stuetemperatur. pH-værdien af frisk beagle hundeurin er 7.6. Dette rejser spørgsmålet hvorvidt der er en eventuel toksisk effekt ved indgivelse af denne zwitterion i mennesker, fordi det kan antages, at den ville udfælde på krystallinsk form i nyrenerne,

når den koncentrerer heri under udskillelse. Dette ville hos mennesker være særdeles uønsket. Konventionelle forsøg på at løse dette mulige problem ved anvendelse af sædvanlige vandopløselige former og derivater af 7-(o-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-methyl-1,2,3,4-tetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre har været uden resultat på grund af omdannelse i legemet af saltet eller derivatet til zwitterionen, der så udviser sin naturlige lave opløselighed i vandige medier og blod. Den foreliggende opfindelse har til formål at løse dette problem uden tab af den værdifulde biologiske aktivitet af 7-(o-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-methyl-1,2,3,4-tetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre. Efter forskellige mislykkede forsøg løstes problemet ved tilvejebringelsen ifølge den foreliggende opfindelse af 7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, der har de ønskede egenskaber. Mere specielt udviser en prøve af 7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre i phosphatpuffer med pH-værdi 7.0 ved 25° C en opløselighed i mg/ml på mindre end 15.3 og mere end 13.6. I dette tilfælde var pufferens kapacitet ikke tilstrækkelig og pH-værdien faldt til 6.48. Således er 7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre tilvejebragt ifølge den foreliggende opfindelse selv på zwitterionformen for opløselig i blodstrømmen til at krystallisere i nyrene og herved bevirke risiko for toksiske resultater hos i det mindste visse patienter.

Trihydratet af mononatriumsaltet af 7-(2-aminomethylphenylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse udviser ønsket opløselighed ved pH-værdier, som er egnede til injektion i mennesker såsom pH-værdi ca. 7 og udviser fortsat tilfredsstillende opløselighed i blodstrømmen og i nyrevæskerne selv efter omdannelse i legemet til zwitterionformen.

I overensstemmelse med det foregående udviser de her omhandlede forbindelser, således forbedret vandopløselighed i forhold til mange andre kendte forbindelser og endvidere i almindelighed højere blodspejlsværdier ved parenteral administrering af den intramuskulære vej.

Eksempel 8 .7-(3-aminomethyl-2-thienylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyreA) 7-(3-t-butoxycarbonylaminomethyl-2-thienylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre

En blanding af 3-t-butoxycarbonyl-aminomethyl-2-thienyl eddikesyre (542 mg, 2 mmol), 2,4-dinitrophenol (368 mg, 2 mmol) og dicyclohexylcarbodiimid (412 mg, 2 mmol) i tetrahydrofuran (THF) omrørtes ved stuetemperatur i 1.5 time. Det udfældede urinstof fjernedes og filtratet inddampedes under reduceret tryk. Den resulterende aktive ester (1.0 g) opløstes i 10 ml THF og sattes til en blanding af 7-amino-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (656 g, 2 mmol), fremstillet som angivet under "udgangsmaterialer", og triethylamin (816 g, 8 mmol) i vand (5 ml) ved 0°C med omrøring. Omrøringen fortsattes i 3,5 time ved stuetemperatur, og reaktionsblandingen sattes til vand (20 ml) og vaskedes med ether (4 x 20 ml). Den vandige opløsning skiltes med ethylacetat og indstilledes til en pH-værdi 2 med koncentreret HCl ved 5°C. Det organiske lag fra-skiltes, og det vandige lag ekstraheredes med ethylacetat (2 x 50 ml). Ethylacetat-ekstrakterne forenedes, vaskedes med mættet vandig natriumchlorid, tørredes over HgSO₄ og inddampedes under reduceret tryk. Den tilbageblevne olie kromatograferedes på silicagel (10 g). Kolonnen udvikledes successivt med chloroform (150 ml) og 3% methanol-chloroform (100 ml). Fra chloroformeluatet udvandt 2,4-dinitrophenol (50 mg), og titel-cephalosporinen isoleredes ved afdampning af methanol-chloroformeluatet.

Udbytte: 29%, smeltepunkt 185-188°C med dekomponering.

Analyse beregnet for C₂₃H₂₇N₇O₈S₃: C, 42.91; H, 4.54; N, 15.23; S, 14.94.

Fundet: C 43.02; H, 4.17; N, 15.07; S, 15.04.

B) 7-(3-aminomethyl-2-thienylacetamido)-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre.

Trifluoreddikesyre (0.6 ml) sattes til den blokerede cephalosporin, der var opnået i trin A (610 mg, 1.05 mmol) og 0°C, og blandingen omrørtes ved stuetemperatur i 15 minutter. Til reaktionsblandingen sattes vandfri ether (15 ml) for at udskille bundfaldet,

som opsamledes ved filtrering, vaskedes med vandfri ether (2 x 10 ml) og opløstes i acetonitril (10 ml). Til opløsningen sattes 2 dråber koncentreret ammoniumhydroxid. Det udskilte faste stof opsamledes ved filtrering, vaskedes med acetonitril (2 x 10 ml) og tørredes ved 75°C/1mmHg i 7 timer til dannelse af titelproduktet, som opsamledes som monoammoniumsaltet efter behandling med én ækvivalent ammoniumhydroid.

Udbytte: 83%, smeltepunkt 174-178°C med dekomponering.

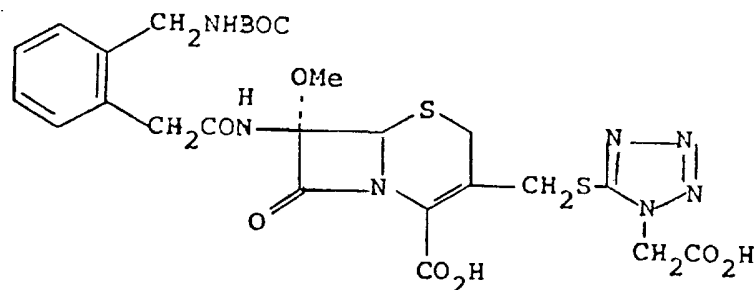
Analyse beregnet for $C_{18}H_{21}N_8O_6S_3 \cdot H_2O$: C, 38.56; H, 4.32; N, 19.98; S, 17.16.

Fundet: C, 38.89; H, 4.06; N, 18.83; S, 15.24.

IR- og NMR-spektrene var i overensstemmelse med strukturen.

Eksempel 9 .

7β-(o-N-t-butoxycarbonylaminoethylphenylacetamido)-7α-methoxy-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre.



En blanding af 7β-(O-N-t-butoxycarbonylaminoethylphenylacetamido)-7α-methoxycephalosporansyre (549 mg, 1 mmol), natriumbicarbonat (84 mg, 1 mmol) og 1-carboxymethyl-5-mercaptotetrazol dinatriumsalt (816 mg, 4 mmol) i 0.1 M pH-værdi 7.0 phosphatpuffer (5 ml) opvarmedes i en time ved 85°C. Efter afkøling syrnedes blandingen til en pH-værdi 1 med fortyndet HCl og ekstraheredes med ethylacetat (3 x 20 ml). De forenede ekstrakter vaskedes med vand, tørredes og indampedes under reduceret tryk til dannelse af en olieagtig remanens, som kromatograferedes på en silicagel-kolonne (Wako-gel, C-200, 10 g). Kolonnen elueredes med chloroformmethanol (50:1). Det første eluat indeholdt udgangsmercaptanet (0.30 g). Det andet eluat (50 ml), der indeholdt det

ønskede produkt, behandles med en lille smule carbon og inddampes under reduceret tryk og gav titelproduktet som amorph pulver (140 mg, 22%); smeltepunkt 110-120°C (dekom.).

IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3600 - 2400, 1780, 1690, 1520, 1385, 1250, 1160 cm^{-1} .

UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 246 nm (ϵ 6300), 274 nm (ϵ 6700).

NMR: $\delta_{\text{ppm}}^{\text{DMSO-d}_6}$ 1.35 (9H, s, t-Bu-H), 3.38 (3H, s,

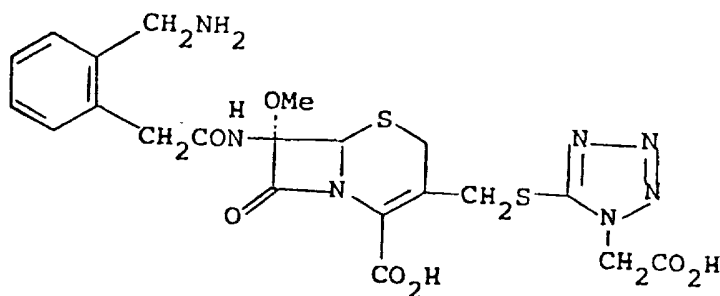
OCH₃), 3.65 (2H, s, CH₂CO), 4.13 (1H, d, 14Hz, 3-H), 4.16 (2H, d, 6Hz, et singlet med D₂O, CH₂N), 4.50 (1H, d, 14 Hz, 3-H), 5.01 (1H, s, 6-H), 5.26 (2H, s, tetrazol-CH₂CO), 7.20 (4H, s, phenyl-H), 9.20 (1H, s, CONH, forsvandt ved tilsætning af D₂O).

Analyse beregnet for C₂₆H₃₁N₇O₉S₂·2H₂O: C, 45.54; H, 5.14; N, 14.30.

Fundet: C, 45.71, 45.73; H, 4.51, 4.42; N, 13.65, 13.91.

Eksempel 10.

7β-(o-aminomethylphenylacetamido)-7α-methoxy-3-(1-carboxymethyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre.



En kold blanding af det produkt, der opnåedes i Eksempel 9, (120 mg, 0.18 mmol), og trifluoreddikesyre (TFA) (0.3 ml) omrørtes ved stuetemperatur i 20 minutter og gav en viskos opløsning. Tilsætningen af ether (20 ml) til opløsningen gav TFA-saltet af produktet, som opsamledes ved filtrering og opløstes i acetonitrilvand (50:1, 20 ml). Opløsningen behandlede med en lille smule carbon. En blanding af koncentreret NH₄OH-acetonitril (1:2) tilsattes dråbevis i filtratet med omrøring indtil der ikke viste sig

bundfald. Det gummiagtige bundfald opsamledes og tritureredes i acetonitril (20 ml) til dannelse af titelproduktet, som opsamledes ved filtrering, vaskedes med acetonitril (5 ml) og tørredes.

Udbytte 62 mg (63%); smeltepunkt 185-190° C (decomp.).

IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3600 - 2600, 1700, 1605, 1380, 1300, 1110, 1085 cm^{-1} .

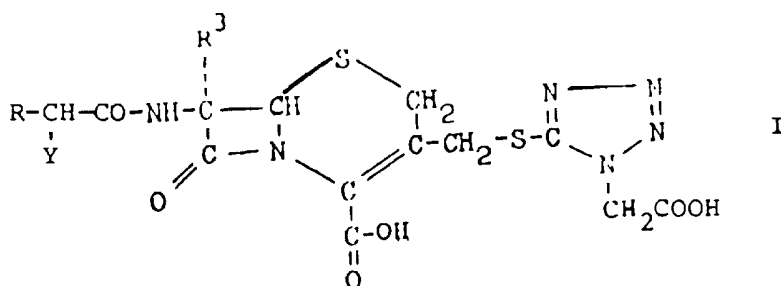
UV: $\lambda_{\text{max}}^{1\% \text{NaHCO}_3}$ 238 nm (ϵ 8300) 270 nm (ϵ 9100).


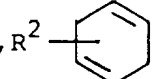
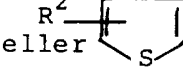
Analyse beregnet for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}_7\text{S}_2 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$: C 45.15; H, 4.23; N, 17.55.

Fundet: C, 45,26; H, 4.81; N, 18.51.

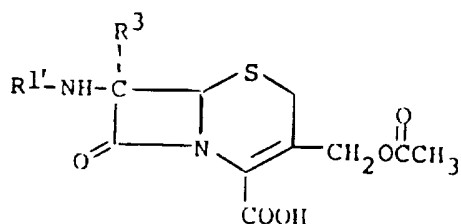
PATENTKRAV

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af cephalosporansyre-derivater med den almene formel

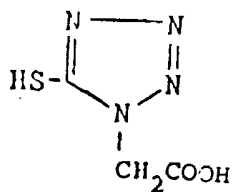


hvor R betegner R^2 -, R^2 - eller ,

hvor R^2 betyder hydrogen, hydroxy eller en eventuelt substitueret aminomethylgruppe, Y betyder hydrogen, hydroxy eller en eventuelt substitueret aminogruppe og R^3 betegner hydrogen eller methoxy, eller let hydrolyserbare estere eller ikke-toksiske farmaceutisk acceptable salte deraf, KENDETEGNET ved, at man omsætter en forbindelse med den almene formel

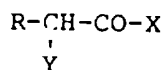


hvor R^1 betegner H eller $R-CHY-CO-$, hvor R , Y og R^3 har de ovenfor anførte betydninger, eller et salt eller en let hydrolyserbar ester deraf, med en forbindelse med formlen



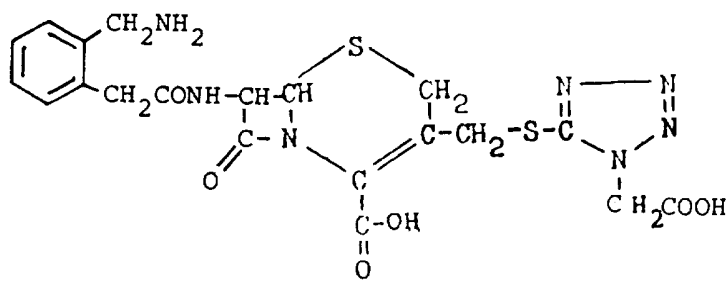
eller et salt deraf,

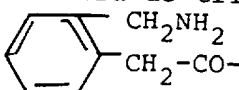
og, når R^1 betegner H behandler den resulterende forbindelse med et acyleringsmiddel med formlen



hvor X betegner halogen eller et funktionelt ækvivalent deraf, og R og Y har den ovenfor angivne betydning, som når Y er fri amino eller hydroxyl, beskyttes på disse grupper ved hjælp af konventionelle beskyttende grupper, som senere fjernes til frembringelse af en forbindelse med formel I, og at man om ønsket omdanner en resulterende fri syre eller et salt af en forbindelse med formel I til en let hydrolyserbar ester eller et ikke-toksisk farmaceutisk acceptabelt salt deraf eller omdanner et resulterende salt eller en let hydrolyserbar ester af en forbindelse med formel I til den tilsvarende frie syre med formel I.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1 til fremstilling af en forbindelse med formel



KENDETEGNET ved, at man går ud fra de tilsvarende udgangsmaterialer, hvori R^1 betegner H eller  og R^3 betegner hydrogen.

Fremdragne publikationer:

DK fremlæggeskrift nr. 132119 (patent nr. 132119)
 fremlæggeskrift nr. 137192 (patent nr. 137192).