

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 750463 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **750463**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC¹)
C12D

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **19.02.1975**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **19.02.1975**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **21.08.1975**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etu oikeus - Prioritet - Priority

20.02.1974 GB 747699

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Alfa Farmaceutici S.P.A., Via Ragazzi del '99 no. 5, 40133 Bologna, ITALIA, (IT)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Andrisano, Renato, Italia, ITALIA, (IT)

2 •Mascellani, Giuseppe, Italia, ITALIA, (IT)

3 •Guerra, Guido, Italia, ITALIA, (IT)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä kefalosporiini C:n ja sen johdannaisten talteenottamiseksi

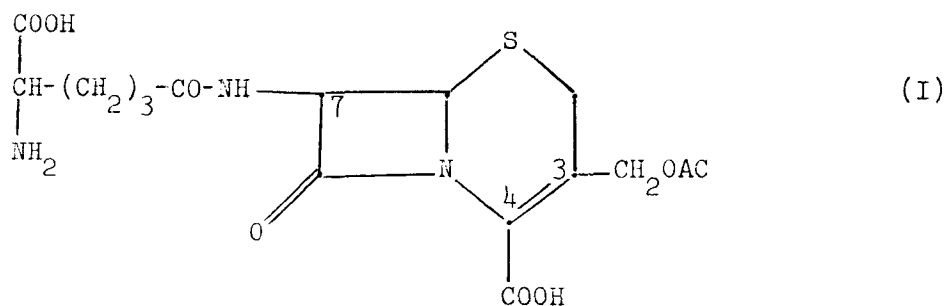
Förfarande för utvinning av kefalosporin C och dess derivat

Alfa Farmaceutici S.p.A., Via Ragazzi del 99, No. 5 40133 Bologna, Italia.

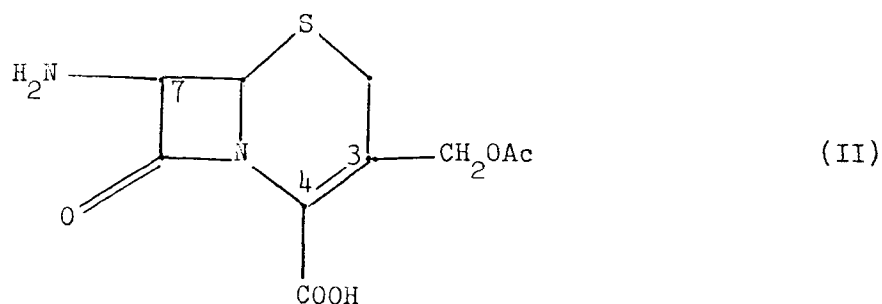
Menetelmä kefalosporiini C:n ja sen johdannaisten talteenottamiseksi - Förfarande för utvinning av kefalosporin C och dess derivat

Tämän keksinnön kohteena on kefalosporiini C:n eristäminen vesiliuoksista ja erityisesti käymiskulttureista sellaisen johdannaisen muodossa, joka on helpos-
ti uutettavissa pääasiallisesti veteen sekoittumattomilla liuottimilla. Keksintö koskee myöskin 7-aminokefalosporaanihapon valmistamista näin eristetyistä uutteis-
ta.

Kefalosporiini C, jolla on kaava:



on saavuttanut huomattavan merkityksen kemoterapian alalla. Yhdisteellä ei ole ainoastaan tiettyä, vaikkakin rajoitettua, antibioottista vaikutusta itsessään, vaan se on myös tärkeä lähtöaine 7-aminokefalosporaanihapon valmistamiseksi, (jota happoa seuraavassa nimitetään 7-ACA:ksi), joka yhdiste on myöskin tunnettu puolisyntetisellä nimellä 7-aminopenicillan-3-asetoksimetyyli-3-em-4-karboksylihappo, ja jolla on kaava:



Molemmissa yllä olevissa kaavoissa symboli Ac merkitsee asettyyliryhmää $-\text{CO}\cdot\text{CH}_3$. 7-ACA on käyttökelpoinen välituote valmistettaessa useita puolisynteettisiä kefalosporiineja.

Kefalosporiini C:tä valmistetaan teollisessa mittakaavassa saattamalla Cephalosporium-sukuaisia mikro-organismeja käymään vesipitoisessa reaktioväliaineessa. Käymisen lopussa kefalosporiini C:tä on liemessä yhdessä monien muiden aineiden kanssa, joista osa on jo alunperin väliaineessa olleita ravintoaineita, ja muut ovat käymistuotteita. Kefalosporiini C:n eristäminen tämänkaltaisista käymisliemistä on tästä syystä jo pitemmän ajan ollut sangen vaikea ongelma. Niihin menetelmiin, joita tähän eristämiseen yleisesti käytetään, sisältyy hartseilla, ionivaihtohartsit mukaanluettuna, suoritettuja kalliita ja monimutkaisia absorptio- ja eluointiprosesseja. Näillä menetelmillä on monta haittaa, joihin kuuluvat: vaikeakäyttöisyys; hartsikolonniin vaatimat suuret investoinnit; aikaa vievät operaatiot, jotka saattavat merkitä kefalosporiini C:n osittaista hajoamista; suurten liuotinmäärien tarve, jotka aineet eivät kaikissa tapauksissa ole talteenotettavissa; alhaiset saannit absorptiossa. Useita menetelmiä kefalosporiini C:n eristämiseksi kemiallisesti käymisliemistä on myös selostettu: ne tapahtuvat käsittelemällä suodatettuja liemiä reagensseilla, jotka pystyvät reagoimaan kefalosporiini C:n aminoryhmän kanssa, jolloin näin saadut kefalosporiini C-johdannaiset uutetaan sopivilla liuotusaineilla. Kuitenkaan eivät tähän asti käytetyt menetelmät ole olleet täysin tyydyttäviä siinä suhteessa, että liuotusaineesta eristettyjen johdannaisten puhtaus ja saanti ovat alhaisia. Tämän otaksutaan johtuvan siitä tosiseikasta että monet käymisliemessä olevista aineista sisältävät aminoryhmiä, jotka voivat reagoida reagenssin kanssa, jolloin

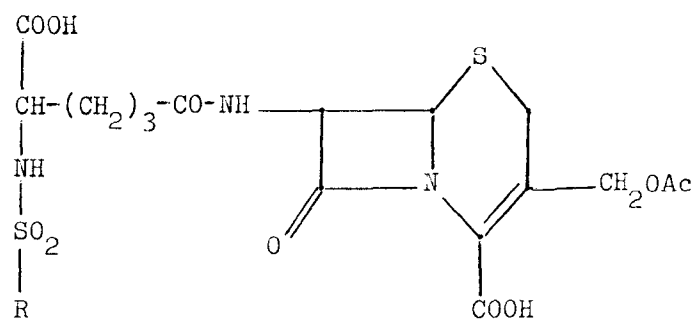
saadaan johdannaisia, jotka uuttuvat liuotusaineeseen yhdessä kefalosporiini C-johdannaisten kanssa.

Nyt on löydetty eräs joukko kefalosporiini C:n johdannaisia, jotka ovat eristettävissä käymisliemistä ja jotka ovat helposti talteenotettavissa uuttamalla pääasiallisesti veteen sekoittumattomalla liuottimella, samalla kuin liemissä olevien toisten aminoryhmien samankaltaisten johdannaisten uuttaminen huomattavasti vähenee. Tällä johdannaisten joukolla on edelleen etuna se, että niitä voidaan käyttää suoraan 7-ACA:n saamiseksi ilman, että niitä tarvitsee välillä muuttaa kefalosporiini C:ksi. Nämä johdannaiset ovat sulfonamideja.

Täten edessäolevan keksinnön kohteena on menetelmä kefalosporiini C:n talteenottamiseksi sulfonamidin muodossa vesipitoisesta väliaineesta, esim. käymisliemestä, joka sisältää kefalosporiini C:tä, johon menetelmään sisältyy: väliaineen käsittelyminen kaavan $R-SO_2Cl$ mukaisella sulfonyylikloridilla (jossa R on substituoitu tai ei-substituoitu, edullisesti ei-substituoitu alkyyliryhmä, jolla on 4-10 hiiliatomia tai substituoitu tai ei-substituoitu aryyli-, esim. fenyyli- tai naftyyli-, ryhmä) kefalosporiini C:n muuttamiseksi vastaavaksi sulfonamidiksi; sekä sulfonamidin uuttaminen pääasiassa veteen sekoittumattomalla liuottimella.

R-ryhmän substituentit, etenkin kun R on substituoitu aryyli-ryhmä, ovat ensisijaisesti: 1-6 C-atomiset alkyyliryhmät, 1-6 C-atomiset alkoksiryhmä, halogeeni-(esim. kloori, bromi, jodi)atomeja sekä nitroryhmä.

Eristetyn johdannaisten kaavan otaksutaan olevan:



(III)

jossa R on yllä olevaa määritelmän mukainen.

"Pääasiallisesti veteen sekoittumattomalla liuotusaineella" tarkoitetaan liuotusainetta, jota ei voida sekoittaa veteen, tai joka, jos se osittain on sekoitettavissa, on kylliksi sekoittumaton, jotta se mahdollistaisi liuottimen ja vesifaasin separoimisen.

Kefalosporiini C:tä sisältävä väliaine voi olla käymällä valmistettu liemi, edullisesti sellainen, josta huovasto on poistettu suodattamalla. Haluttaessa voidaan liemestä, paitsi että huovasto on poistettu siitä jo aiemmin suodattamalla, poistaa tiettyjä muita epäpuhtauksia käsittelemällä sitä hapolla sekä/tai liuottimilla, esim. asetonilla, tunnettuja menetelmiä noudattaen. On myöskin mahdollista käyttää puhdistettuja käymisliemiä, jotka on konsentroidu tavantomaaisia teknisiä menetelmiä noudattaen, esim. konsentroimalla tyhjiössä tai hartsiaabsorptiolla, jota seuraa eluointi.

Edessäolevan keksinnön mukaisella menetelmällä on monta etua verrattuna muihin tunnettuihin samankaltaisiin menetelmiin kefalosporiini C:n talteenottamiseksi käymisliemistä eri johdannaisia hyväksikäyttäen. Eräs suurimmista eduista on se, että edessä selostetun keksinnön mukainen menetelmä antaa hyviä tuloksia vaikka kefalosporiini C:n konsentraatio käymisliemessä on alhainen. Tämä ainutlaatuinen piirre mahdollistaa edelläselostetun keksinnön mukaisen menetelmän laajan teollisen käytön.

Esimerkkejä sulfonyyliklorideista, joita voidaan käyttää edellä selostetussa keksinnössä, ovat: tolueeni-p-sulfonyylikloridi, dimetyylibentseenisulfonyylikloridi, p-isopropylibentseenisulfonyylikloridi, butyylibentseenisulfonyylikloridi, β -naftaleenisulfonyylikloridi ja p-nitrobentseenisulfonyylikloridi. Näillä sulfonyyliklorideilla aikaansaadaan seuraavat kefalosporiini C:n sulfoniamidit: kefalosporiini C:n tolueeni-p-sulfoniamidi, kefalosporiini C:n dimetyylibentseenisulfoniamidi, kefalosporiini C:n p-isopropylibentseenisulfoniamidi, kefalosporiini C:n butyylibentseenisulfoniamidi, kefalosporiini C:n β -naftaleenisulfoniamidi sekä kefalosporiini C:n p-nitrobentseenisulfoniamidi. Näistä ovat kefalosporiini C:n p-isopropylibentseenisulfoniamidi sekä kefalosporiini C:n β -naftaleenisulfoniamidi uusia yhdisteitä, jotka muodostavat osan edessäolevasta keksinnöstä.

Jotta kävisi kefalosporiini C:n täydellinen poistaminen vesipitoisesta väliaineesta kävisi mahdolliseksi on pienimmän käytetyn sulfonyylikloridin määrän oltava 1 mooli vesipitoisessa väliaineessa olevaa kefalosporiini C-moolia kohden; kuitenkin suosittelemme käytettäväksi enemmän kuin 1 mooli sulfonyylikloridia kefalosporiini C moolia kohden ja erityisen suositeltavaa on 3-10 moolin käyttö jokaista kefalosporiini C-moolia kohden. Menetelmä voidaan suorittaa missä sopivassa lämpötilassa tahansa, joskin se suoritetaan normaalisti 0-40°C:n lämpötilassa. Lämpötila valitaan niin, että saadaan tyydyttävä reaktionopeus samalla kuin vältetään kefalosporiini C:n ja sen johdannaisten hajoamiselta.

Keksinnön mukainen menetelmä suoritetaan edullisesti 10-20°C:n lämpötilassa.

Sulfonyylikloridin ja kefalosporiini C:n välisessä reaktiossa saadaan vetykloridia sivutuotteena, ja se poistetaan ensisijaisesti reaktion aikana. Tämän vetykloridin poistaminen aikaansaadaan parhaiten suorittamalla reaktio sellaisen aineen läsnäolossa, joka pystyy sitomaan hapon. Erityisen suotavaa on, että reaktioväliaineen pH-arvo reaktion aikana pidetään yli 7, edullisesti alueella 7,5-9,5 yhden tai useamman emäksisen yhdisteen, kuten alkalimetallihydroksidien, -karbonaattien tai vetykarbonaattien, tai orgaanisten emäksien avulla. Vielä paremmin reaktioväliaineen pH pidetään osoitetussa arvossa puskuriaineella, kuten booraksi. Kefalosporiini C:n reagoitua sulfonyylikloridin kanssa, uutetaan vesipitoinen reaktioväliaine sellaisella liuottimella, joka on veteen sekoittumaton tai pääasiallisesti veteen sekoittumaton ja johon kefalosporiini C:n sulfoniamidi liukenee. Kefalosporiini C:n sulfoniamidin uuttaminen suoritetaan edullisesti pH:n ollessa alle 7, mieluiten 1-4.

Esimerkkejä uuttamiseen käytettävistä liuottimista ovat: alhaisten alifaattisten happojen alhaiset alkyyliesterit, kuten etyyliasettaatti, propyyliasettaatti ja butyyliasettaatti, alkoholit, joilla on vähitään 4 hiiliatomia, kuten n-butanoli, di-(alhaiset alkyyli)ketonit, kuten metyyli-isobutyryliketoni, sykloheksanoni ja halogenoidut hiilivedyt, kuten metyleenikloridi ja kloroformi. "Alhaisella alkyyylillä" tarkoitetaan 1-5 hiiliatomista alkyyyliryhmää, ja "alhainen alifaattinen" on tulkittava samalla tavalla. Alhainen alifaattinen happo sisältää ensisijaisesti 2 tai 3 hiiliatomia.

Kefalosporiini C:n sulfoniamidijohdannainen voidaan eristää orgaanisesta uutteesta haihduttamalla orgaaninen liuotin, mieluiten alennetussa paineessa. Sulfoniamidijohdannainen voidaan tämän jälkeen muuttaa vaikealiukoiseksi suolaksi, esim. alkalimetallisuolaksi tai jonkun orgaanisen emäksen suolaksi. Muuttaminen alkalimetallisuolaksi, esim. natriumsuolaksi, voidaan suorittaa liuottamalla jäännös haihduttamisen jälkeen liuotusaineeseen kuten n-butanoliin, johon asteittain lisätään n-butanoliin liuotettua natrium-2-etyyliheksanoaattia kunnes pH saavuttaa loppuarvon 5-6. Seos jäähdytetään 0-5°C:seen muutaman tunnin ajan, jonka jälkeen kefalosporiini C:n sulfoniamidin kiinteä natriumsuola suodatetaan talteen, pestään ja kuivataan alhaisessa lämpötilassa alennetussa paineessa. Vaihtoehtoisesti voidaan orgaanisen emäksen suola valmistaa lisäämällä jotain seuraavista yhdisteistä kuten: kinoliini, sykloheksamiini, 5-etyyli-2-metyyli-pyridiini, 2-pikoliini, 3-pikoliini, 4-pikoliini, N-etyylimorfoliini, 2,6-lutiidiini, N,N-dietyylisykloheksyyliamiini, heksametyleenitetramiini, N,N-dietyylibentsyyliamiini tai N,N-dibentsyylietyleenidiamiini.

Kefalosporiini C:n sulfoniamidijohdannaisia, joko vapaan hapon tai suolan muodossa, voidaan käyttää suoraan 7-ACA:n valmistamiseksi. Menetelmä voidaan suorittaa tunnetuilla teknisillä menetelmillä, ja siihen sisältyy yleensä seuraavat vaiheet:

- (a) karboksyylihapporyhmän suojaaminen muodostamalla esteri,
- (b) esterin halogenointi vastaavan iminohalogenidin aikaansaamiseksi,
- (c) iminohalogenidin ja alhaisen alifaattisen alkoholin välinen reaktio vastaavan iminoeetterin aikaansaamiseksi ja
- (d) happamassa ympäristössä tapahtuva iminoeetterin hydrolyysi 7-ACA:n aikaansaamiseksi.

Edelläselostetun keksinnön avulla ovat 7-ACA:n saannit suuremmat kefalosporiini C:hen nähden kuin, jos kefalosporiini C:n lähtösulfoniamidijohdannaiset puhdistettaisiin ioninvaihtohartseilla ennen muuttamista 7-ACA:ksi.

Huolimatta siitä, että keksintöä on kuvattu kefalosporiini C:n itsensä eristämiseen viitaten, keksintö on yhtä hyvin sovellettavissa muiden kefalosporiini C-johdannaisten eristämiseen, joilla johdannaisilla on erilaisia substituentteja 3- ja 4-asemissa, esim. niiden johdannaisten, joissa asemassa 3 oleva CH_2OAc -ryhmä on korvattu toisella ryhmällä (yleensä substituoitulla tai e-substituoitulla asyylioksimetyyli- tai alkoksimetyyliryhmällä) ja/tai, jossa asemassa 4 oleva karboksyylihapporyhmä on korvattu toisella ryhmällä, yleensä esteriryhmällä, tai jossa 3 ja 4 asemat on yhdistetty laktonihapon atomilla. Tarpeelliseksi tällaisten lisäjohdannaisten eristäminen saattaa osoittautua mikäli kemiallisia muutoksia tehdään kefalosporiini C:hen ennen sen täydellistä eristämistä käymisliemestä.

Keksintöä kuvataan edelleen seuraaviin esimerkkeihin viitaten.

Esimerkki 1

2 000 ml asetonia ja 2 000 ml 14,45 g kefalosporiini C-natriumdihydraattia sisältävää vesiliuosta yhdistettiin ja pH nostettiin 8,5:teen lisäämällä 30 %:sta veteen liuotettua natriumhydroksidia. 30 minuutin aikana lisättiin hämmentäen 17,4 g tolueeni-p-sulfonyylikloridia liuotettuna 100 ml:aan asetonia samalla kuin pH koko ajan pidettiin 8,5:dessä 30 %:lla natriumhydroksidin vesiliuoksella. Hämmentämistä jatkettiin vielä 1 h. pH säädettiin sen jälkeen 7:ään ja asetoni haihdutettiin tyhjiössä 30°C:ssa.

1 000 ml metyyli-isobutyryliketonia (MIBK) lisättiin ja pH-arvo alennettiin 2,0:aan lisäämällä konsentroitua suolahappoa hämmentäen. Natriumkloridia lisättiin ja orgaaninen kerros separoitiin. Vesikerrosta uutettiin kolmasti, joka kerralla 600 ml MIBK:ta. Uutteet yhdistettiin ja kuivatettiin vedettömällä nat-

umsulfaatilla ja liuotusaine haihdutettiin sen jälkeen tyhjiössä 30°C:n lämpötilassa. Jäljelle jäävään 150^o ml n-butanolia liuotettu öljyyn joka lisättiin 24 ml 2,6 molaarista natrium-2-etyyliheksanoaattia pH:n ollessa lopussa 5,5. Seoksen seistystä yli yön alhaisessa lämpötilassa, muodostunut sakka suodatettiin talteen, pestiin eetterillä ja kuivattiin tyhjiössä.

Saatiin 15,8 g kefalosporiini C:n tolueeni-p-sulfonamidin natriumsuolaa, jonka tiitteri oli 87,1 %. Tämä vastaa 73,5 % saantia.

Esimerkki 2

Kefalosporiini C:tä sisältävä käymisliemi tehtiin happameksi, suodatettiin, sekoitettiin tilavuudeltaan samaan määrään asetonia ja suodatettiin uudelleen. 2 000 ml:aikaansaadusta liuoksesta, jonka kefalosporiini C-pitoisuus (ilmaistuna natriumsuoladihydraattina) oli 1 730 µg/ml, saatettiin pH-arvoon 8,8 ± 0,2 lisäämällä 20 %:sta natriumhydroksidin vesiliuosta. Liuos, jossa 8,3 g tolueeni-p-sulfonyylikloridia on liuotettu 50 ml asetonia lisättiin sen jälkeen hämmentäen 5 minuutin aikana. Hämmentämistä jatkettiin edelleen 90 minuuttia, jona aikana pH-arvo pidettiin samassa lukemassa 20 %:lla natriumhydroksidin vesiliuoksella. Tämän jälkeen pH-arvo säädettiin 7,0:aan, ja asetoni haihdutettiin tyhjiössä 30°C:n lämpötilassa. 300 ml MIBK:ta lisättiin ja pH alennettiin 2,0:aan lisäämällä 5N suolahappoa. Orgaaninen faasi separoitiin ja vesifaasi uutettiin viidellä 100 ml:n annoksella MIBK:ta. Orgaaniset uutteet yhdistettiin, kuivattiin vedettömällä natriumsulfaatilla ja konsentroitiin tyhjiössä 35°C:n lämpötilassa. Jäljelle jäävä öljy liuotettiin sen jälkeen 70 ml:aan n-butanolia ja pH-arvo säädettiin 6,5:teen 15 ml:lla 1,84 molaarista natrium-2-etyyliheksanoaatin n-butanoli - liuosta. Seoksen oltua yli yön alhaisessa lämpötilassa, muodostunut sakka suodatettiin talteen, pestiin eetterillä, kuivattiin tyhjiössä, jolloin saatiin 7,94 g kefalosporiini C:n tolueeni-p-sulfonamidin natrium-suolaa, jonka spektrofotometrinen tiitteri oli 42 %. Saanti oli 73 %.

Samalla menetelmällä kuin yllä, mutta ainoana erona se, että reaktioseoksen pH-arvoa pidettiin 9:ässä Na₂B₄O₇ · 10H₂O:lla NaOH:n sijasta, saatiin kefalosporiini C:n tolueeni-p-sulfonamidin natrium-suolan saanniksi 89 %, jonka spektrofotometrinen tiitteri oli 45 %.

Esimerkki 3

Kefalosporiini C:tä sisältävä käymisliemi tehtiin happamaksi, suodatettiin, sekoitettiin yhteen tilavuudeltaan saman määrän asetonia kanssa ja suodatettiin uudelleen. 1 000 ml muodostuneesta liuoksesta, jonka kefalosporiini C-pitoisuus

(ilmaistuna natriumsuolan dihydraattina) oli 1 780 $\mu\text{g/ml}$, säädettiin pH-arvoon 7 lisäämällä 20 %:sta natriumhydroksidin vesiliuosta. Muodostuneeseen liuokseen lisättiin 4,8 g natriumvetykarbonaattia, jonka jälkeen 2,9 g asetoniin liuotettua tolueeni-p-sulfonyylikloridia lisättiin 5 minuutin aikana. Tunnin kuluttua lisättiin vielä 1,45 g tolueeni-p-sulfonyylikloridia, ja 2 tunnin kuluttua lisättiin vielä 1,45 g. pH pidettiin vakiona 8,5:ssä. 3 tunnin kuluttua pH laskettiin 7,0:aan lisäämällä suolahappoa ja asetoni haihdutettiin tyhjiössä 30°C:n lämpötilassa. 200 ml MIBK:ta lisättiin ja pH säädettiin 2,0:aan samalla hämmentäen. Orgaaninen faasi separoitiin ja vesifaasia uutettiin kolmella 100 ml annoksella MIBK:ta. Orgaaniset uutteen yhdistettiin ja pestiin 100 ml:lla haaleaa vettä; pesuvesi uutettiin 50 ml MIBK:ta. Kaikki orgaaniset uutteen yhdistettiin ja kuivattiin vedettömällä natriumsulfaatilla ja liuotusaine haihdutettiin tämän jälkeen tyhjiössä 35°C:n lämpötilassa.

Jäljelle jäävään öljyyn, joka oli liuotettu 40 ml:aan n-butanolia, lisättiin 6,6 ml 6,6 molaarista n-butanoliin liuotettua natrium-2-etyyliheksanoaattia, ja pH-arvo säädettiin 5,6:teen. Seoksen seistystä yli yön alhaisessa lämpötilassa, muodostunut sakka suodatettiin talteen, pestiin eetterillä ja kuivattiin tyhjiössä, jolloin saatiin 3,73 g kefalosporiini C:n tolueeni-p-sulfonamidin natrium-suolaa, jonka tiitteri oli 40,3 %. Saanti oli 65,2 %.

Esimerkki 4

1 000 ml suodatettua käymislientä konsentroitiin 35°C:n lämpötilassa tyhjiössä 280 ml:n tilavuuteen. Kefalosporiini C-pitoisuus (ilmaistuna natriumsuolan dihydraattina) oli 10 910 $\mu\text{g/ml}$. 280 ml asetonia lisättiin, sakka suodatettiin pois, pestiin 40 ml:lla 1:1 asetonin ja veden seosta, ja heitettiin pois. Pesunesteet yhdistettiin suodatettuun liuokseen. pH-arvo nostettiin 8,8 $\pm$ 0,2:teen lisäämällä 30 %:sta natriumhydroksidia ja 7,2 g tolueeni-p-sulfonyylikloridia liuotettuna 50 ml asetonia lisättiin 3 tunnin aikana, jolloin pH-arvo pidettiin 8,5 ja 9:n välillä lisäämällä hämmentäen 30 %:sta natriumhydroksidia. Hämmentämistä jatkettiin yhä tunnin ajan, jona aikana pH pidettiin samassa arvossa lisäämällä 30 %:sta natriumhydroksidia. pH-arvo alennettiin tämän jälkeen 7,0:aan lisäämällä konsentroitua suolahappoa ja asetoni haihdutettiin tyhjiössä 30°C:n lämpötilassa. 100 ml:aa MIBK:ta lisättiin ja pH-arvo alennettiin 2,0:aan lisäämällä sekoittaen konsentroitua suolahappoa.

Orgaaninen faasi separoitiin ja vesifaasia uutettiin 4 kertaa 50 ml:n MIBK-annoksella. Orgaaniset uutteen yhdistettiin ja kuivattiin. Tämän jälkeen liuotusaine haihdutettiin tyhjiössä ja jäljelle jäävä öljy liuotettiin 80 ml:aan

n-butanolia, jonka jälkeen n-butanoliin liuotettua natrium-2-etyyliheksanoaattia lisättiin kunnes pH oli 6,5. Muodostunut sakka otettiin talteen ja kuivattiin ja näin saatiin 6,24 g (73 %) kefalosporiini C:n tolueeni-p-sulfoniamidin natrium-suolaa, jonka spektrofotometrinen tiitteri oli 45,2 %.

Esimerkki 5

1 000 ml suodatettua käymislientä, jonka kefalosporiini C-pitoisuus (ilmaistuna natrium-suolan dihydraattina) oli 3 300 $\mu\text{g/ml}$, ja 1 000 ml asetonia sekoitettiin yhteen, ja sakka suodatettiin pois. Seoksen pH säädettiin $8,8 \pm 0,2$ ja pidettiin tässä arvossa lisäämällä 30 %:sta natriumhydroksidin vesiliuosta sillä aikaa kun 7,2 g tolueeni-p-sulfonyylikloridia liuotettuna 50 ml:aan asetonia lisättiin kolmen tunnin aikana, jonka jälkeen seosta hämmennettiin vielä tunnin ajan. pH-arvo laskettiin tämän jälkeen 7,0:aan lisäämällä konsentroitua suolahappoa ja asetoni haihdutettiin tyhjiössä. Liuosta uutettiin tämän jälkeen pH 2:ssa yhdellä 200 ml annoksella ja neljällä 100 ml annoksella MIBK:ta. Orgaaniset uutteet pestiin neljällä 50 ml annoksella haaleaa vettä, jonka jälkeen pesuvedet uutettiin 50 ml:lla MIBK:ta.

Yhdistetyt orgaaniset uutteet konsentroitiin tyhjiössä 100 ml:aan ja 3,5 ml:aa kinoliinia lisättiin. Kun seos oli seissyt yli yön alhaisessa lämpötilassa suodatettiin muodostunut sakka talteen, pestiin eetterillä ja kuivattiin, jolloin saatiin 3,8 g kefalosporiini C:n tolueeni-p-sulfoniamidin kinoliini-suolaa, jonka spektrofotometrinen tiitteri oli 68,5 %. Saanti oli 53,5 %.

Esimerkki 6

Kefalosporiini C:tä sisältävä käymisliemi tehtiin happamaksi, suodatettiin, sekoitettiin tilavuudeltaan samaan määrään asetonia ja suodatettiin uudestaan. 3 000 ml suodatetusta nesteestä, jonka kefalosporiini C-pitoisuus (ilmaistuna natriumsuolan dihydraattina) oli 1 750 $\mu\text{g/ml}$, säädettiin pH-arvoon 9,0 lisäämällä 30 %:sta natriumhydroksidia hämmennäen, jonka jälkeen 12,6 g tolueeni-p-sulfonyylikloridia liuotettuna 50 ml:aan asetonia lisättiin 5 min. aikana jolloin pH-arvo pidettiin 9:ssä. Liuosta sekoitettiin 90 min. ajan pH-arvossa 9.

pH-arvo alennettiin tämän jälkeen 7,0:aan ja asetoni haihdutettiin tyhjiössä 30°C :ssa. Kun liuosta oli uutettu pH-arvoon 2 yhdellä 700 ml annoksella ja neljällä 200 ml annoksella MIBK:ta, orgaaniset uutteet yhdistettiin ja pestiin 300 ml:lla vettä. Pesuvettä uutettiin 150 ml:lla MIBK:ta, joka tämän jälkeen lisättiin muihin orgaanisiin uutteisiin. Yhdistetyt orgaaniset uutteet kuivatettiin vedettömällä natriumsulfaattilla, ja jaettiin tämän jälkeen kolmeen yhtä suureen osaan, jotka käsiteltiin seuraavasti:

Osa (A). Liuotusaine haihdutettiin tästä osasta ja jäännös liuotettiin 50 ml:aan n-butanolia. 8 ml 1,84 molaarista natrium-2-etyyliheksanoaatin n-butanoliliuosta lisättiin tämän jälkeen, jolloin loppu-pH oli 5,6, ja näin saatiin 3,95 g kefalosporiini C:n tolueeni-p-sulfoniamidin natriumsuolaa, jonka tiitteri oli 43,2 %. Saanti oli 75 %.

Osa (B). Tähän osaan lisättiin 6,6 ml yllä mainittua natrium-2-etyyliheksanoaattiliuosta loppu-pH:n ollessa 5,6. Näin saatu suspensio konsentroitiin tämän jälkeen tyhjiössä 35°C:ssa 100 ml:n tilavuuteen ja jäähdyttämisen jälkeen sakka suodatettiin ja kuivattiin, jolloin saatiin 3,85 g kefalosporiini C:n tolueeni-p-sulfoniamidin natriumsuolaa, jonka tiitteri oli 44,2 %. Saanti oli 75 %.

Osa (C). Tämän osan liuotusaine haihdutettiin ja jäännös liuotettiin 40 ml:aan n-butanolia, jonka jälkeen 2,45 ml N-metyylimorfoliinia lisättiin. Jäljelle jäävä tervamainen aine separoitiin, murskattiin eetterissä ja kuivattiin tyhjiössä, jolloin tervamainen aine separoitiin, murskattiin eetterissä ja kuivatettiin tyhjiössä, jolloin saatiin 2,6 g tolueeni-p-sulfoniamidikefalosporiini C:n N-metyylimorfoliinisuoletta, jonka tiitteri oli 55 %. Saanti oli 57,5 %.

Esimerkki 7

600 ml:aan puhdistettua ja konsentroitua lientä, joka sisälsi 15 490 µg/ml kefalosporiini C:tä (ilmaistuna natriumsuolan dihydraattina) lisättiin 500 ml asetonia. Muodostuneen seoksen pH säädettiin arvoon 8 lisäämällä 30 %:sta natriumin vesiliuosta 10°C:n lämpötilassa, jonka jälkeen 15 g tolueeni-p-sulfonyylikloridia liuotettuna 100 ml:aan asetonia lisättiin 3 tunnin aikana, jolloin pH pidettiin arvossa 8 lisäämällä 30 %:sta natriumhydroksidia. 90 minuutin sekoittamisen jälkeen asetoni haihdutettiin ja liuosta uutettiin yhdellä 200 ml annoksella ja kahdella 100 ml annoksella MIBK:ta. Yhdistetyt uutteen pestiin kahdesti kyllästetyllä natriumkloridiliuoksella, ja tämän jälkeen liuotusaine haihdutettiin. Jäännös liuotettiin n-butanoliin ja käsiteltiin 3 molaarisella natrium-2-etyyliheksanoaatin n-butanoliliuoksella, jolloin loppu-pH oli 5,5.

Näin aikaansaatu sakka suodatettiin, pestiin eetterillä ja kuivattiin, jolloin saatiin 9,5 g (saanti oli 78,5 %) kefalosporiini C:n tolueeni-p-sulfoniamidin natriumsuolaa, jonka tiitteri oli 85,1 %.

Sulamispiste 149-153°C.

UV-absorptiotaipumispiste 262 nm:n kohdalla.

Infrapuna-absorptiomaksimit 3440, 2960, 1765, 1655, 1610, 1528, 1398, 1230, 1158, 1090, 1025, 812 sekä 658 cm⁻¹:n kohdilla.

Ohutlevykromatografialla, jolloin liikkuvana faasina käytettiin isopropanoli/metanoli/puskuri seosta suhteessa 125:25:6,5 pH-arvossa 5,8, saatiin läikkä kohdassa R_f 0,7, joka oli eroitettavissa valkoisena läikkänä lämmössä, käyttämällä yhdistettä I_2/NaN_3 .

Esimerkki 8

1 000 ml 4 800 $\mu\text{g/ml}$ kefalosporiini C:tä sisältävää vesiliuosta sekoitettiin 1 000 ml:aan asetonia, pH-arvo säädettiin 8,5-9 lisäämällä 30 %:sta natriumhydroksidin vesiliuosta ja sillä aikaa kun pH arvo pidettiin samassa lisättiin 6,7 g p-isopropyylibentseenisulfonyylikloridia liuotettuna 50 ml:aan asetonia. Seosta sekoitettiin yhä 90 minuuttia samassa pH:ssa, jonka jälkeen pH-arvo alennettiin 7:ään ja asetoni haihdutettiin tyhjiössä 30°C :n lämpötilassa. pH alennettiin vielä arvoon 2 ja liuosta uutettiin yhdellä 400 ml annoksella ja kolmella 100 ml annoksella MIBK:ta. Yhdistetyt orgaaniset uutteet kuivattiin ja liuotusaineet haihdutettiin. Jäännös liuotettiin tämän jälkeen 80 ml:aan n-butanolia ja saatettiin pH-arvoon 6,5 lisäämällä 1,84 molaarista natrium-2-etyyliheksanoaatin n-butanoliliuosta. Muodostunut sakka suodatettiin, pestiin eetterillä ja kuivattiin, jolloin saatiin 6,4 g (75 %) kefalosporiini C:n p-isopropyylibentseenisulfoniamidin natrium-suolaa, jonka tiitteri oli 75,9 %.

Infrapuna-absorptiomaksimit 3430, 3380, 3050, 2960, 1755, 1655, 1600, 1540, 1400, 1230, 1160, 1090, 1030, 830, 750, 690, 650 cm^{-1} :n kohdilla.

Esimerkki 9

Kefalosporiini C:tä sisältävä käymisliemi tehtiin happamaksi, suodatettiin, sekoitettiin tilavuudeltaan samaan määrään asetonia ja suodatettiin vielä kerran. 1 350 ml suodatettua liuosta, joka sisälsi 1 730 $\mu\text{g/ml}$ kefalosporiini C:n natrium-suolaa (ilmaistuna natriumsuolan dihydraattina) säädettiin tämän jälkeen pH-arvoon $8,8 \pm 0,2$ lisäämällä 20 %:sta natriumhydroksidia. Tämän jälkeen lisättiin 6,5 g p-isopropyylibentseenisulfonyylikloridia liuotettuna 50 ml:aan asetonia hämmentäen 5 min aikana. Sekoittamista jatkettiin 1 h samassa pH-arvossa, jonka jälkeen asetoni haihdutettiin tyhjiössä ja jäännöstä uutettiin pH-arvossa 2 yhdellä 150 ml annoksella sekä sen jälkeen viidellä 75 ml annoksella MIBK:ta. Orgaaniset uutteet yhdistettiin, kuivattiin vedettömällä natriumsulfaatilla ja haihdutettiin tyhjiössä. Jäljelle jäävä öljy liuotettiin tämän jälkeen 50 ml:aan n-butanolia ja 1,84 molaarista natrium-2-etyyliheksanoaatin n-butanoliliuosta lisättiin pH-arvoon 6,5. Kun seos oli saanut seistä yli yön alhaisessa lämpötilassa suodatettiin muodostunut sakka, pestiin eetterillä ja kuivattiin tyhjiössä,

joten saatiin 6,4 g (81 %:in saanti) kefalosporiini C:n p-isopropyylibentseeni-sulfoniamidin natriumsuolaa, jonka tiitteri oli 40,5 %.

Esimerkki 10

Kun käymisliemi oli saatettu happamaksi ja suodatettu sekoitettiin 335 ml suodatettua lientä 670 ml:aan asetonia ja suodatettiin uudelleen. Liuokseen, joka sisälsi 1g kefalosporiini C:n natriumsuolaa (dihydraattina) lisättiin sekoittaen 5 min aikana 3,85 g 2-naftaleenisulfonyylikloridia liuotettuna 50 ml:aan asetonia, jolloin pH pidettiin arvossa 9 lisäämällä 30 %:sta natriumhydroksidin vesiliuosta. Sekoittamista jatkettiin vielä 2 h samassa pH:ssa, jonka jälkeen pH laskettiin 7,5:teen ja asetoni haihdutettiin tyhjiössä. Jäännöksen pH-arvo alennettiin vielä 2:teen ja jäännös uutettiin tämän jälkeen yhdellä 200 ml annoksella ja kolmella 100 ml annoksella MIBK:ta. Orgaaniset uutteen yhdistettiin ja pestiin 100 ml:lla vettä ja vesipesunesteitä uutettiin 50 ml:lla MIBK:ta. Kaikki yhdistetyt orgaaniset uutteen kuivatettiin ja liuotusaine haihdutettiin tyhjiössä. Öljyinen jäännös liuotettiin 40 ml:aan n-butanolia ja 6 ml 2 molaarista natrium-2-etyyliheksanoaatin n-butanoliliuosta lisättiin, jolloin loppu-pH oli 5,5. Seos sai seistä alhaisessa lämpötilassa yli yön, jolloin sakka muodostui, joka suodatettiin, pestiin eetterillä ja kuivatettiin, ja näin saatiin 4,1 g kefalosporiini C:n 2-naftaleenibentseenisulfoniamidia.

Infrapuna-absorptiomaksimit 3450, 3060, 2925, 1770, 1730, 1660, 1530, 1385, 1230, 1160, 1075, 1035, 820, 750, 660 cm^{-1} :n kohdilla.

Esimerkki 11

3,07 g kefalosporiini C:n tolueeni-p-sulfoniamidin natriumsuolaa, jonka tiitteri oli 83,8 %, suspensioitiin 30 ml:aan metyleenikloridia. 1,4 ml trietyyliamiinia ja 1,9 ml N,N-dimetyylianiiliinia lisättiin tämän jälkeen, jonka jälkeen lisättiin hämmentäen 2,4 ml dimetyyliklorisilaania 5 min. aikana. Sekoittamista jatkettiin 1h ajan 28°C:n lämpötilassa. Liuos jäädytettiin tämän jälkeen 60°C:n lämpötilaan, jonka jälkeen 3,13 g PCl_5 liuotettuna 30 ml:aan metyleenikloridia hitaasti lisättiin, jota seurasi 2,5 ml N,N-dimetyylianiiliinia. Kahden tunnin sekoittamisen jälkeen -40°C:n lämpötilassa alennettiin lämpötila uudelleen -60°C:hen ja 0,34 g N,N-dimetyylianiiliinia liuotettuna 9 ml:aan metanolia lisättiin. Kahden tunnin sekoittamisen jälkeen -40°C:n lämpötilassa lisättiin 10 ml vettä 90°C:n lämpötilassa ja sekoittamista jatkettiin 5 minuuttia 4°C:ssa. Vesifaasi otettiin tämän jälkeen talteen ja orgaaninen faasi uutettiin 10 ml:lla lauhaa vettä. Yhdistetyt vesifaasit pestiin 10 ml:lla metyleenikloridia ja pH

säädettiin arvoon 3,6 - 3,7 lisäämällä sekoittaen konsentroitua ammoniakin vesiliuosta. Kun seos oli saanut seistä yli yön alhaisessa lämpötilassa muodostunut sakka suodatettiin, pestiin metyleenikloridilla, vedellä, asetonilla ja eetterillä, ja näin saatiin 0,80 g (65 %) 7-aminokefalosporaanihappoa, jonka spektrofotometrisen tiitteri oli 94,4 %.

Esimerkki 12

Noudattamalla esimerkin 11 mukaista menetelmää muilta osin paitsi että siinä käytetyn kefalosporiini C:n tolueeni-p-sulfoniamidin natriumsuolan tiitteri nyt oli 38,8 %, saatiin 7-ACA:aa jonka tiitteri oli 90,7 % saannin ollessa 55,1 %.

Esimerkki 13

Noudattamalla esimerkin 11 mukaista menetelmää saatiin 94,1 % tiitteriä olevaa 7-ACA:aa saannin ollessa 68 %, käyttämällä 76 %:n tiitteriä olevaa kefalosporiini C:n p-isopropyylibentseenisulfoniamidin natriumsuolaa.

Esimerkki 14

Noudattamalla esimerkin 11 mukaista menetelmää saatiin 91,4 %:n tiitteriä olevaa 7-ACA:aa saannin ollessa 41,4 %, käyttämällä 43,8 %:n tiitteriä olevaa kefalosporiini C:n p-isopropyylibentseenisulfoniamidin natriumsuolaa.

Patenttivaatimukset.

1. Menetelmä kefalosporiini C:n eristämiseksi vesipitoisista väliaineista, t u n n e t t u siitä, että väliaine käsitellään kaavan $R-SO_2Cl$ mukaisella sulfonyylikloridilla, jossa R on substituoitu tai ei-substituoitu 4-10 hiiliatominen alkyyliryhmä, tai substituoitu tai ei-substituoitu aryyli-ryhmä, kefalosporiini C:n muuttamiseksi vastaavaksi sulfoniamidiksi ja että sulfoniamidi uutetaan pääasiallisesti veteen sekoittamattomalla liuotusaineella.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vesipitoinen väliaine on kefalosporiini C:tä sisältävä käymisliemi.

3. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R on substituoitu aryyli-ryhmä, jolloin R-ryhmän substituentit muodostuvat yhdestä tai useasta radikaalista, jotka on valittu 1-6:en hiiliatomisten alkyyliryhmien, 1-6:en hiiliatomisten alkoksiryhmien, halogeeniatomien ja nitro-ryhmien muodostamasta joukosta.

4. Jonkin tai joidenkin edellisten patenttivaatimusten mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sulfonyylikloridi on tolueeni-p-sulfonyylikloridi.

5. Jonkin tai joidenkin patenttivaatimusten mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sulfonyylikloridi on p-isopropyylibentseenisulfonyylikloridi.

6. Jonkin tai joidenkin patenttivaatimusten 1-3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sulfonyylikloridi on β -naftaleenisulfonyylikloridi.

7. Jonkin tai joidenkin edellisten patenttivaatimusten mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että molaarinen suhde sulfonyylikloridi/kefalosporiini C vesipitoisessa väliaineessa on suurempi kuin 1, edullisesti 3-10:n välillä.

8. Jonkin tai joidenkin edellisten patenttivaatimusten mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sulfonyylikloridin ja kefalosporiini C:n välisen reaktion lämpötila pidetään $0-40^{\circ}C$:n, edullisesti $10-20^{\circ}C$:n välillä.

9. Jonkin tai joidenkin edellisten patenttivaatimusten mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että veteen sekoittumattomana liuotusaineena käytetään liuotusainetta, joka muodostuu etyyliasetaatista, n-butanolista tai metyyliisobutyyliketonista.

10. Jonkin tai joidenkin edellisten patenttivaatimusten mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että reaktioväliaineen pH-arvoa pidetään yli 7 edullisesti alueella 7,5-9,5 käyttämällä puskuriainetta.

11. Jonkin tai joidenkin edellisten patenttivaatimusten mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kefalosporiini C:n sulfoniamidin uuttaminen suoritetaan pH-arvossa joka on alle 7, edullisesti pH-arvossa 1-4.

413

PATENTKRAV

1. Förfarande för utvinning av cefalosporin C ur ett vattenhaltigt medium, k ä n n e t e c k n a t av att mediet behandlas med en sulfonylklorid med formeln $R-SO_2Cl$, i vilken R är en substituerad eller osubstituerad alkylgrupp med 4-10 kolatomer, eller en substituerad eller osubstituerad arylgrupp, för att omvandla cefalosporin C till motsvarande sulfonamid och sulfonamiden extraheras med ett huvudsakligen vattenoblandbart lösningsmedel.

2. Förfarande enligt krav 1, k ä n n e t e c k n a t av att det vattenhaltiga mediet är en jäsningbuljong innehållande cefalosporin C.

3. Förfarande enligt något av föregående krav, k ä n n e t e c k n a t av att R är en substituerad arylgrupp, varvid substituenterna på gruppen R är en eller flera radikaler valda bland alkylgrupper med 1-6 kolatomer, alkoxigrupper med 1-6 kolatomer, halogenatomer och nitrogrupper.

4. Förfarande enligt ett eller flera av föregående krav, k ä n n e t e c k n a t av att sulfonylkloriden är toluen-p-sulfonylklorid.

5. Förfarande enligt ett eller flera av kraven 1-3, k ä n n e t e c k n a t av att sulfonylkloriden är p-isopropylbensensulfonylklorid.

6. Förfarande enligt ett eller flera av kraven 1-3, k ä n n e t e c k n a t av att sulfonylkloriden är β -naftalensulfonylklorid.

7. Förfarande enligt ett eller flera av föregående krav, k ä n n e t e c k n a t av att det molara förhållandet sulfonylklorid/cefalosporin C i det vattenhaltiga mediet är högre än 1, företrädesvis inom området 3-10.

8. Förfarande enligt ett eller flera av föregående krav, k ä n n e t e c k n a t av att temperaturen vid reaktionen mellan sulfonylklorid och cefalosporin C hålls inom området $0^{\circ} - 40^{\circ}C$, företrädesvis $10^{\circ} - 20^{\circ}C$.

9. Förfarande enligt ett eller flera av föregående krav, k ä n n e t e c k n a t av att som vattenoblandbart lösningsmedel användes ett lösningsmedel bestående av etylacetat, n-butanol eller metylisobutylketon.

10. Förfarande enligt ett eller flera av föregående krav, k ä n n e t e c k n a t av att pH i reaktionsmediet hålls vid ett värde över 7 och företrädesvis inom området 7,5 - 9,5 medelst ett buffertmedel.

11. Förfarande enligt ett eller flera av föregående krav,
k ä n n e t e c k n a t av att extraktionen av sulfonamiden av
cefalosporin C genomföres vid ett pH-värde under 7, företrädesvis
vid ett pH-värde av 1-4.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patent-
ansökningar: _____

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patenskrifter:

Suomi - Finland _____

Iso-Britannia - Storbritannien _____

Norja - Norge _____

Ranska - Frankrike _____

Ruotsi - Sverige _____

Saksa - BRD - Tyskland H 2.031.754, 2.056.538, 2.157.693, 2.216.589

~~Sveitsi - Schweiz~~ 2.332.045 (07d 99/84)

Tanska - Danmark _____

USA _____

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P

10.9.1980

Lohs Arvola

Allekirjoitus