



(11) FREMLÆGGELSESSKRIFT 143031

DANMARK

(51) Int. Cl.³ G 07 D 501/12



(21) Ansøgning nr. 1234/71 (22) Indleveret den 16. mar. 1971

(24) Løbedag 30. jun. 1969

(44) Ansøgningen fremlagt og
fremlæggeskriftet offentliggjort den 16. mar. 1981

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(30) Prioritet begæret fra den
1. jul. 1968, 741301, US
1. jul. 1968, 741351, US

(71) BRISTOL-MYERS COMPANY, 345 Park Avenue, New York, N.Y. 10022, US.

(72) Opfinder: David Aaron Johnson, 106 Margo Lane, Fayetteville, New York, US: Elwin J. Richardson, R.D. No. 2, Kirkville, New York, US: John McKenna Roubie, 126 N. Edwards Avenue, Syracuse, New York, US: Herbert Horatius Silvestri, 199 Hathaway Road, East Syracuse, New York, US: Richard Root Smith, 112 Kessler Lane, Fayetteville, New York, US.

(74) Fuldmægtig under sagens behandling:
Th. Ostenfeld Patentbureau A/S.

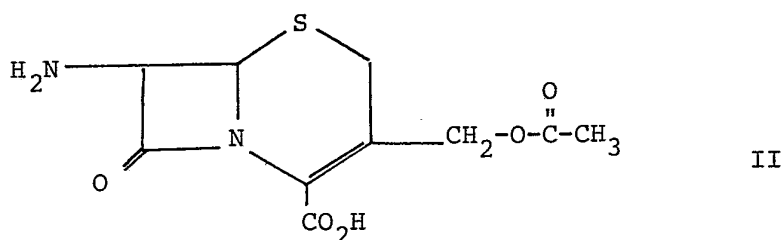
(54) Fremgangsmåde til fremstilling af 7-aminocephalosporansyre.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af 7-aminocephalosporansyre ved in situ fremstilling og udvinding af et derivat af cephalosporin C og efterfølgende spaltning deraf.

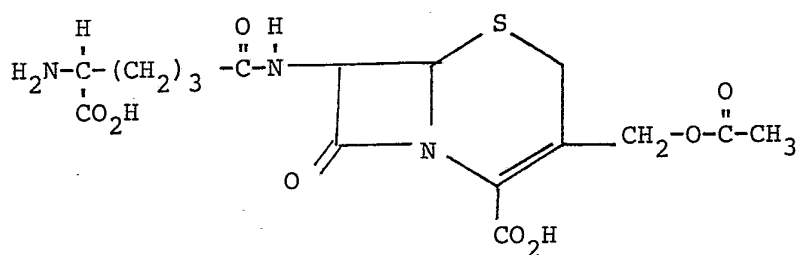
Metoder til udvinding af cephalosporin C af et dyrkningsmedium er omhandlet i beskrivelserne til U.S.A. patenter nr. 3.093.638 og 3.094.527, hvor cephalosporin C adsorberes på en adsorbant i stedet for ekstraktion ved hjælp af et opløsningsmiddel. Mens lavere alkyloxycarbonyl eller aryloxycarbonyl- eller (lavere)alkylcarbamoyl- eller arylcarbomoyl-cephalosporin C derivater ikke er beskrevet som dannet "in situ" i cephalosporin C dyrkningsmediet, eller som anvendelige ved ekstraktion af cephalosporin C fra næringsmediet eller som anvendelige som udgangsmaterialet til fremstilling af 7-ACA er nogle af disse forbindelser beskrevet i patentlitteraturen (engelske patenter nr. 1.014.883 og 1.064.495 samt U.S.A. patenterne 3.227.707 og 3.227.712 som antibiotika). Adskillige fremgangsmåder til kemisk spaltning af cephalosporin C eller visse af dets derivater er beskrevet i patentlitteraturen (U.S.A. patenter nr. 1.188.311, 3.234.223 og 3.124.576 samt engelsk patent nr. 1.041.985). Ingen af disse frem-

gangsmåder anvender N-(lavere)alkyloxycarbonyl- eller N-(lavere) alkyl- eller arylcarbamoylcephalosporin C og en silylester deraf som udgangsmateriale.

7-aminocephalosporansyre (7-ACA), der har formelen:



er et yderst værdifuldt mellemprodukt ved fremstillingen af et stort antal semi-syntetiske cephalosporansyre-antibakterielle midler. På grund af vanskelighederne ved en total syntese af 7-ACA i stor målestok, fremstilles denne forbindelse i praksis ved kemisk nedbrydning af naturligt forekommende cephalosporansyre, d.v.s. cephalosporin C, der fremstilles ved gæring. Det meste 7-ACA fremstilles af cephalosporin C (U.S.A. patent nr. 3.093.638) der har formelen:



Fremstillingen af 7-ACA ved de metoder, som idag er tilgængelige, er fyldt med vanskeligheder lige fra gæringen til den kemiske spaltning af cephalosporin C. Lave udbytter af 7-ACA har gjort det vanskeligt for cephalosporansyrer at indtage den disse tilkommende plads indenfor den antibiotiske terapi. Af denne grund betegner fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse en væsentlig forbedring i forhold til teknikens standpunkt.

Cephalosporin C er karakteriseret ved en aminosyrefunktion i sidekæden. Aminosyren eksisterer i form af en zwitterion i vandig opløsning, og som sådan er den meget vandopløselig. På grund af dens stærkt

ioniske karakter er den yderst vanskelig at udvinde ved ekstraktion med opløsningsmiddel fra dyrkningsmediet. Udvindingsmetoden, som idag anvendes, omfatter adsorption af det rå cephalosporin C fra dyrkningsmediet på en passende adsorbant, fx. trækul, en ionbytterharpiks eller tilsvarende efterfulgt af eluering, koncentrering og udfældning ved det isoelektriske punkt eller ved saltdannelse (U.S.A. patent nr. 3.094.527). Den lave effektivitetsgrad i forbindelse med kompleksiteten for hvert trin ved denne fremgangsmåde gør det alt i alt meget vanskeligt at fremstille 7-ACA.

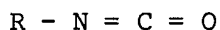
Det meste 7-ACA fremstilles ved partiel nedbrydning af cephalosporin C eller dets derivater ved kemiske midler (U.S.A. patenter nr. 3.124.576, 3.188.311 og 3.234.223).

Igen gælder det, at disse metoder giver praktiske udbytter, som er uønskeligt lave. Endvidere må disse metoder uundgåeligt som udgangsmateriale anvende en rensed form af cephalosporin C, som er vanskelig at opnå.

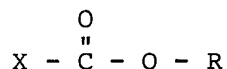
Ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse til fremstilling af 7-ACA går man via et derivat af cephalosporin C, som ikke behøver at foreligge i en rensed form, og der opnås uventet høje udbytter af 7-ACA.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte og den omfatter i almindelighed følgende trin, hvor de fortrinsvise angivelser omhandler foretrukne udførelsesformer af opfindelsen, der giver særligt høje udbytter af 7-ACA:

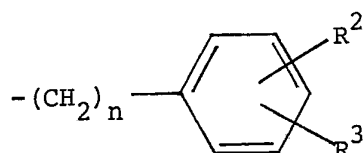
(A) Tilsætning af et acyleringsmiddel, i form af et isocyanat med formlen:



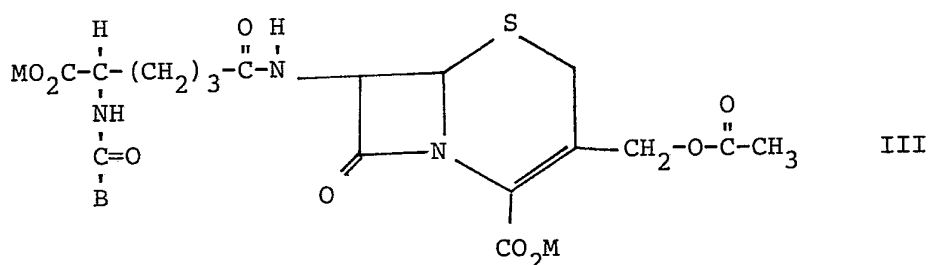
eller et halogenformiat med formlen:



hvor R betegner alkyl med 1-10 carbonatomer, fortrinsvis ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl eller isobutyl eller en gruppe med formelen:



hvor n er et helt tal fra 1-6, når B i nedenstående formel III er -OR, og fra 0-6, når B betegner -NHR, og R^2 og R^3 er ens eller forskellige og hver betegner H, Cl, Br, F, NO_2 , alkyl indeholdende 1-10 carbonatomer eller alkoxy indeholdende 1-10 carbonatomer, fortrinsvis hydrogen, og X betegner chlor, brom eller iod, til et syreinkuberet dyrkningssubstrat, fortrinsvis på forhånd filtreret, indeholdende cephalosporin C, i et forhold på mindst 2 mol acyleringsmiddel pr. mol cephalosporin C, men fortrinsvis i et forhold fra 2-10 mol acyleringsmiddel pr. mol cephalosporin C, og særlig foretrukket 5-8 mol acyleringsmiddel pr. mol cephalosporin C, ved en pH-værdi over 7, fortrinsvis ca. 8, ved en temperatur under 40°C , fortrinsvis fra -5 til 20°C til dannelsen af et derivat af cephalosporin C med den almene formel:

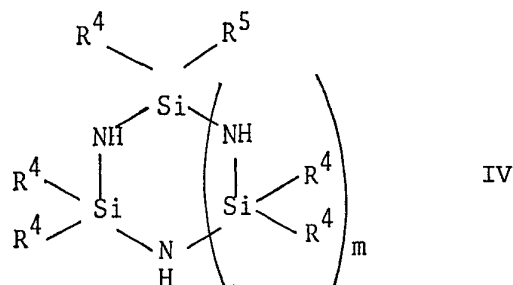


hvor M betegner hydrogen eller en metal- eller aminkation, og B betegner en gruppe med formelen -NHR eller -OR, idet R har den ovenfor anførte betydning,

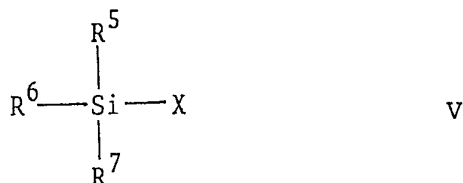
(B) udvinding af derivatet af cephalosporin C med formel III, fortrinsvis ved ekstraktion ved anvendelse af et med vand ikke blandbart organisk opløsningsmiddel, såsom methylisobutylketon, butanol, ethylacetat eller lignende, fortrinsvis methylisobutylketon, når B betegner -OR og n-butanol, når B betegner -NHR ved en pH værdi fra 1-3, fortrinsvis ca. 2,

(C) blanding af forbindelsen med formel III med en silylforbindelse

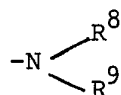
med formlen:



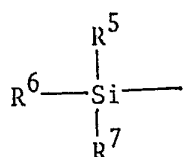
eller



hvor R^5 , R^6 og R^7 betegner hydrogen, halogen, (lavere)alkyl, halogen-(lavere)alkyl eller phenyl, idet mindst én af grupperne R^5 , R^6 og R^7 er forskellige fra halogen og hydrogen, R^4 betegner (lavere)alkyl, m er 1 eller 2 og X betegner halogen eller gruppen:



hvor R^8 betegner hydrogen eller (lavere)alkyl, og R^9 betegner hydrogen, (lavere)alkyl eller gruppen:



fortrinsvis dimethyldichlorsilan eller trimethylchlorsilan, under vandfrie betingelser i nærværelse af en syredeaktiverende tertiær amin, der kan være triethylamin, dimethylanilin, quinolin, lutidin eller pyridin, i et inert opløsningsmiddel, der kan være methylenchlorid, dichlorethan, chloroform, tetrachlorethan, nitromethan eller diethylether til frembringelse af den tilsvarende silylester af forbindelsen III,

(D) blanding af silylesteren med et halogeneringsmiddel, der fortrinsvis er phosphorpentachlorid, phosphorpentabromid, phosphortrichlorid, phosphortribromid, oxalylchlorid, p-toluensulfonylhalogenid, phosphor-

oxychlorid, phosgen eller lignende i et molært forhold på mindst ét mol halogeneringsmiddel pr. mol silylester, fortrinsvis ca. 2 mol, under vandfrie betingelser i et inert opløsningsmiddel, såsom methylenchlorid, dichlorethan, chloroform, tetrachlorethan, nitromethan, diethylether eller lignende i nærværelse af en syre-deaktiverende tertiær amin, i form af triethylamin, diethylanilin, quinolin, lutidin, pyridin eller lignende ved temperaturer under 0°C , fortrinsvis i intervallet fra -40°C til -60°C , til frembringelse i opløsning af det tilsvarende imino-halogenid,

(E) blanding af nævnte opløsning af imino-halogenid med en alkohol, fortrinsvis i form af aliphatiske alkoholer, indeholdende 1-12 carbonatomer eller phenylalkylalkoholer, indeholdende 1-7 carbonatomer, ved en temperatur under 0°C , fortrinsvis -40° til -70°C til frembringelse i opløsning af den tilsvarende iminoether, samt

(F) blanding af nævnte opløsning af imino-ether under sure betingelser med vand eller en alkohol, især en aliphatisk alkohol eller en blanding af begge til frembringelse af 7-aminocephalosporansyre.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen giver uventet høje udbytter, såvel under laboratoriebetingelser som i kommerciel målestok. Udbytterne, der kan være af størrelsesordenen 50-70% tilskrives anvendelsen af silylestere på carboxylgrupperne for forbindelserne med formlen III. Silylestrene kan fremstilles og hydrolyseres til syren igen uden tab af produkt, især dersom omsætningen foregår ved temperaturer under -20°C , fortrinsvis -40° til -70°C under dannelse af iminoetheren. Desuden gør anvendelsen af silylestere i stedet for de estere, som anvendtes i de ovenfor anførte patentskrifter, fremgangsmåden simplere, eftersom silylesteren hydrolyserer øjeblikkeligt under spaltning af iminogruppens dobbeltbinding, og man undgår det separate trin med at spalte 4-carboxylsyreestrene ved de kendte metoder.

Dannelsen af silylesteren sker ved at omsætte en silylforbindelse med formlen IV eller V under vandfrie betingelser i et inert organisk opløsningsmiddel med forbindelsen med formlen III eller et salt deraf i nærværelse af en syredeaktiverende tertiær amin.

Inerte opløsningsmidler, der kan anvendes, omfatter bl.a. methylenchlorid, dichlormethan, chloroform, tetrachlormethan, nitromethan,

benzen og diethylether.

Salte af forbindelse III, der kan anvendes, omfatter blandt andre alkalimetall- og jordalkalimetallsalte, såsom kalium, natrium, calcium, aluminium o.s.v. Ligeledes kan der anvendes ammonium- og aminsalte, fortrinsvis af tertiære aminer, såsom triethylamin, dibenzylamin, trimethylamin, N-methylmorpholin, pyridin, N-benzyl- β -phenethylamin, 1-phenamin, N,N'-dibenzylethylen-diamin, dehydroabiethylamin, samt N-(lavere)alkyl-piperidiner, såsom N-ethylpiperidin. Tertiære aminsalte foretrækkes.

Syredeaktiverende tertiære aminer, der kan anvendes, omfatter blandt andet, triethylamin, dimethylanilin, quinolin, lutidin og pyridin. Mængden af syredeaktiverende amin, som anvendes, er fortrinsvis en mængde, der er ækvivalent med ca. 75% af den totale syre udviklet under processen af halogeneringsmidlet og halogensilanforbindelsen, der reagerer med forbindelse III.

Silylforbindelser med formlerne IV og V, som kan anvendes, er: trimethylchlorsilan, hexamethyldisilan, triethylchlorsilan, methyltrichlorsilan, dimethyldichlorsilan, triethylbromsilan, tri-n-propylchlorsilan, brommethyldimethylchlorsilan, tri-n-butylchlorsilan, methyldiethylchlorsilan, dimethylethylchlorsilan, phenyldimethylbromsilan, benzylmethylethylchlorsilan, phenylethylmethylchlorsilan, triphenylchlorsilan, triphenylfluorsilan, tri-o-tolylchlorsilan, tri-p-dimethylaminophenylchlorsilan, N-ethyltriethylsilylamin, hexaethyldisilazan, triphenylsilylamin, tri-n-propylsilylamin, tetraethyldimethyldisilazan, tetramethyldiethyldisilazan, tetramethyldiphenyldisilazan, hexaphenyldisilazan og hexa-p-tolyldisilazan. Den samme virkning opnås ved hexa-alkylcyclotrisilazaner eller octa-alkylcyclotetrasilazaner. Andre egnede silyleringsmidler er silylamider og silylureider, såsom trialkylsilylacetamid og bis-trialkylsilylacetamid.

Iminoforbindelsen er fortrinsvis et iminoklorid eller -bromid, der kan fremstilles ved at omsætte silylesteren af forbindelser III med et halogeneringsmiddel, såsom phosphorpentachlorid, phosphor-pentabromid, phosphortrichlorid, phosphortribromid, oxalylchlorid, p-toluensulfonsyrehalogenid, phosphoroxychlorid eller phosgen under vandfrie betingelser i nærværelse af syrebindende midler ved temperaturer, fortrinsvis under 0°C, såsom -40° til -60°C.

Et meget vigtigt trin for opnåelsen af høje udbytter ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er dannelsen af iminoetheren ved omsætning af iminohalogenidet under vandfrie betingelser med en primær eller sekundær alkohol ved temperaturer mellem -20°C og -70°C , fortrinsvis ca. -40°C til -70°C . Temperaturer på over -40° fører til en væsentlig formindskelse af udbyttet.

Alkoholer, som kan anvendes til fremstilling af iminoetherne ud fra iminohalogeniderne omfatter primære og sekundære alkoholer med den almene formel R^{10}OH , hvor R^{10} betegner (A) alkyl, indeholdende 1-10 carbonatomer, fortrinsvis 1-3 carbonatomer, såsom ethanol, propanol, isopropanol, n-butanol, amylalkohol og decanol, (B) phenylalkyl med 1-7 alkylcarbonatomer, såsom benzylalkohol og 2-phenylethanol-1, (C) cycloalkyl, såsom cyclohexylalkohol, (D) hydroxyalkyl med 2-12 carbonatomer, fortrinsvis mindst 3 carbonatomer, såsom 1,6-hexandiol, (E) alkoxyalkyl, indeholdende 3-12 carbonatomer, såsom 2-methoxyethanol, 2-isopropoxyethanol, 2-butoxyethanol, (F) arylalkoxyalkyl med 3-7 carbonatomer i den aliphatiske kæde, såsom 2-p-chlorphenoxyethanol, (G) aralkoxyalkyl med 3-7 carbonatomer i den aliphatiske kæde, såsom 2-(p-methoxybenzoyloxy)-ethanol, (H) hydroxyalkoxyalkyl med 4-7 carbonatomer, såsom diglycol. Også blandinger af disse alkoholer er egnede til fremstilling af iminoetherne.

Efter dannelse af iminoetheren ud fra iminohalogenidet skal iminobindingen spaltes til frembringelse af 7-ACA. Dette opnås ved mild hydrolyse eller alkoholyse. Dersom mængden af syredeaktiverende tertiære amin, som er til stede under processen, er en mængde, som er mindre end den syre, der frembringes ved silyleringen og halogeneringen vil spaltningen sandsynligvis ske samtidig med afslutningen af dannelsen af iminoetheren. Dersom mængden af syredeaktiverende amin imidlertid er mere end den frembragte syre, vil spaltningsstrinet kræve omhyggelig tilsætning af en mængde H^{+} for at bevirke spaltningen.

7-ACA udvindes fra reaktionsblandingen ved at indstille blandingernes pH-værdi til eller i nærheden af det isoelektriske punkt for 7-ACA, hvorefter 7-ACA udkrystalliseres og opsamles ved filtrering.

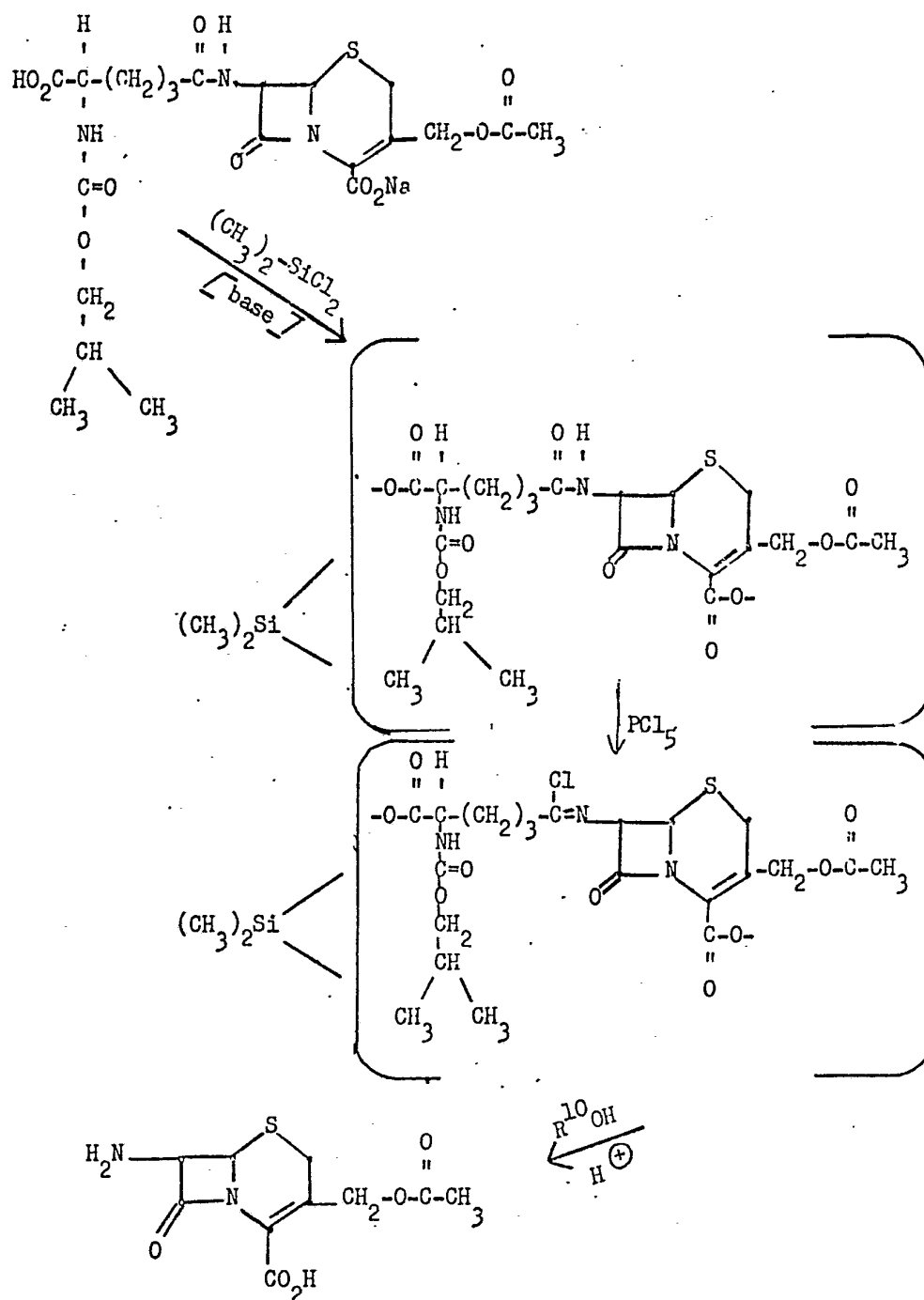
For at opnå størst mulige udbytter af 7-ACA, foretrækkes det at anvende høje koncentrationer af reaktanterne. Til fremstilling af silylestre suspenderes fx. 20% til 30%, fortrinsvis 25 vægtprocent af

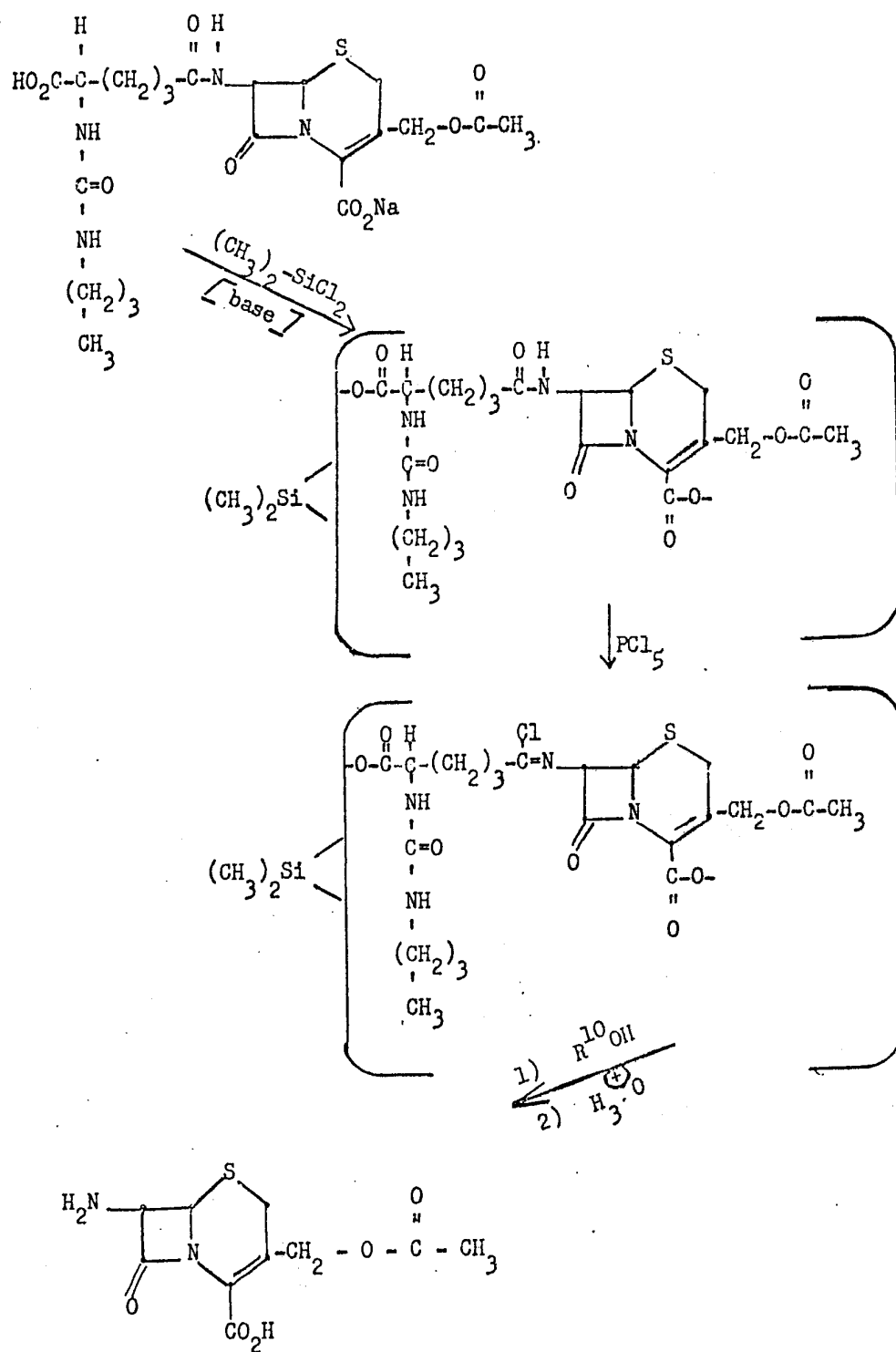
forbindelse III i et inert organisk opløsningsmiddel og en base for at opnå de bedste resultater. Silanen anvendes fortrinsvis i overskud, d.v.s. 10% til 60% over de teoretiske mængder.

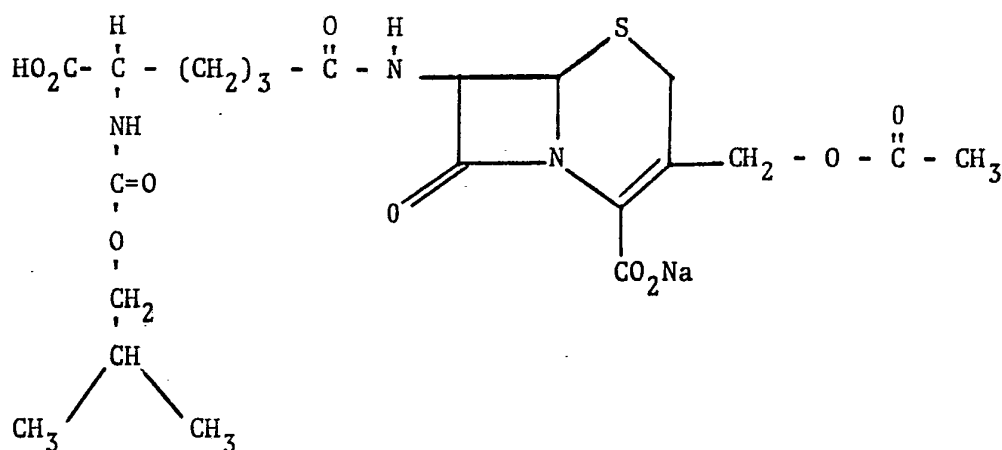
Et molekyle cephalosporin C derivat III har to reaktionsdygtige carboxylsyregrupper, som er i stand til at danne silylestere. For silyleringsreaktionens vedkommende er 1 mol III derfor lig to vægtækvivalenter.

Når forbindelse III behandles med dichlordimethylsilan, bliver derfor 1 molekyle forbindelse III (to vægtækvivalenter) behandlet med mindst 1 molekyle (2 vægtækvivalenter) dichlordimethylsilan. Tilsvarende når forbindelse III behandles med chlortrimethylsilan bliver 1 molekyle III (2 vægtækvivalenter) behandlet med mindst to molekyler (2 vægtækvivalenter) chlortrimethylsilan.

Dette muliggør, at der kan anvendes opløsningsmidler, som ikke er fuldstændig tørre, fordi spor af vand fjernes derfra ved omsætning med overskud af silyleringsmidlet. Naturligvis afhænger den mængde silanforbindelse, som kræves, af om den ene eller begge carboxylsyregrupper i forbindelse III er tilgængelige for silylesterdannelse. Reaktionsskemaet er belyst nedenfor:

Procesforløb I

Procesforløb II

Eksempel 1Fremstilling af natrium N-carbisobutoxycephalosporin C

Totusindenihundrede liter dyrkningssubstrat, indeholdende cephalosporin C blandedes med 108 kg filtreringshjælpemiddel og 300 ml silicaneantiskumstof og filtreredes dernæst ved en pH-værdi 6,9 ved 10°C.

Til det filtrerede medium sattes tilstrækkeligt oxalsyre til at opnå en pH-værdi på 3,1. Efter denne tilsætning indstilledes pH-værdien til 2 med tilsætning af 30% svovlsyre. Der tilsattes 54 kg frisk filtreringshjælpemiddel, og blandingen filtreredes. Det således opnåede filtrat ekstraheredes med ½ volumen methyilisobutylketon (MIBK) ved en pH-værdi 2 og fraskiltes dernæst. MIBK-fasen kastedes bort.

En fjerdedel volumen acetone tilsattes det ekstraherede medium og pH-værdien indstilledes til 7,85 med en opløsning af natriumhydroxid. 2 kg isobutylchlorformiat pr. 1000 liter filtreret medium tilsattes langsomt under omrøring (et molært forhold på 5,9 mol isobutylchlorformiat pr. mol cephalosporin C). pH-værdien holdtes konstant ved 7,8 - 8,0 ved tilsætning af 15% natriumhydroxid, og temperaturen holdtes i intervallet 0 - 10°C under tilsætningen. Omrøring fortsattes, indtil pH-værdien blev konstant uden tilsætning af yderligere natriumhydroxid, i et tidsrum på ca. 2 timer.

pH-værdien indstilledes til 2 ved tilsætning af 13% svovlsyre, og det acylerede medium ekstraheredes med ½ volumen MIBK. MIBK-fasen vaskedes med vand og koncentreredes dernæst til ca. 1/3 af det oprindelige volumen ved 36°C i vakuum. Vandindholdet af konzentratet var

0,2% (Karl Fishers metode).

Koncentratet afkøledes, og en opløsning af natriummethylhexanoat i MIBK tilsattes til en pH-værdi 4,8. Natriumsaltet af en carbisobutoxycephalosporin C udfældedes og opsamledes ved filtrering. Bundfaldet vaskedes med MIBK, opslæmmedes i petroleumether, filtreredes og tørredes i en vakuumovn ved 40°C til 60°C, hvorved der fremkom 7,2 kg produkt. Undersøgelse af det tilbageblevne medium viste tilstedeværelse af mindre end 1% cephalosporin C aktivitet. Produktet, som opsamledes, skønnedes at være 42% til 50% ren natrium n-carbisobutoxycephalosporin C. Produktet var af tilstrækkelig renhed til den efterfølgende fremstilling af 7-aminocephalosporansyre.

Eksempel 2

Natrium N-carbisobutoxycephalosporin C (13,5 g) fra eksempel 1, 45 ml methylenchlorid, 3,0 ml dimethylanilin og 3,67 ml triethylamin blandedes sammen. 6,2 ml dichlordimethylsilan tilsattes under omrøring ved en temperatur på 28°C. Opløsningen omrørtes i 40 minutter. Dernæst afkøledes opløsningen til -60°C og 12,0 g phosphorpentachlorid opløst i 100 ml methylenchlorid tilsattes. Der tilsattes yderligere 11,0 ml dimethylanilin, mens reaktionsblandingens temperatur holdtes under -40°C. Temperaturen sænkedes brat til -73°C efter to timer, og en blanding af 60 ml methanol og 2,5 ml dimethylanilin afkølet til 78°C tilsattes langsomt. Temperaturen steg til -45°C. Blandingen omrørtes og afkøledes igen til -50°C. Efter to timers forløb tilsattes 55 ml vand, opvarmet til +90°C. Temperaturen steg til +3°C. Blandingen afkøledes på isbad og omrørtes i fire minutter. 22 ml. ammoniakvand tilsattes i løbet af otte minutter til en pH-værdi 3,7. Blandingen omrørtes adskillige timer og filtreredes dernæst. Bundfaldet opsamledes, vaskedes med 50 ml methylenchlorid, dernæst 40 ml vand, dernæst 50 ml methanol og endelig 50 ml acetone. Det faste stof tørredes, hvorved der fremkom 2,25 g 92,5% 7-ACA.

Eksempel 3

Fremstilling af natrium N-carbisobutoxycephalosporin C

Den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde gentoges, idet der i stedet for et molforhold på 5,9:1 mellem isobutylchlorformiat og cephalosporin C anvendtes et molært forhold på 4,5:1, og der fremkom 10,4 kg produkt. Undersøgelse af det tilbageblevne dyrkningsmedium efter ekstraktion viste tilstedeværelse af mindre end 14% cephalosporin C aktivitet.

Eksempel 4

13,5 g natrium N-carbisobutoxycephalosporin C fremstillet som beskrevet i eksempel 3, 50 ml methylenchlorid, 3 ml dimethylanilin og 3,67 ml triethylamin blandedes sammen. 6,2 ml dichlordimethylsilan tilsattes under omrøring ved en temperatur på 25-29°C. Opløsningen omrørtes i 30 minutter, afkøledes dernæst til -60°C og 12,0 g PCl_5 i 100 ml methylenchlorid tilsattes. Temperaturen holdtes ved -40°C i to timer. Opløsningen afkøledes til -73°C, og en opløsning af 60 ml methanol og 2,5 ml dimethylanilin afkølet til -78°C tilsattes. Temperaturen steg til -46°C. Temperaturen holdtes i intervallet -45° til -50°C i to timer. 55 ml vand opvarmet til 95°C tilsattes under omrøring. Temperaturen steg til +5°C. Efter fire minutters omrøring (pH-værdi 0,2) tilsattes 22 ml ammoniakvand i løbet af 7 minutter til en pH-værdi 3,8. Omrøring fortsattes i adskillige dage under afkøling. Det udfældede 7-ACA opsamledes ved filtrering, vaskedes med 50 ml methylenchlorid, 40 ml vand, 50 ml methanol og dernæst 50 ml acetone. Det tørrede, faste stof vejede 2,3 g og var 95,4% 7-ACA.

Eksempel 5Fremstilling af natrium N-carbethoxycephalosporin C

Den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde gentoges med den undtagelse, at der i stedet for et molært forhold på 5,9:1 mellem isobutylchlorformiat og cephalosporin C anvendtes et molært forhold på 7,0:1 af ethylchlorformiat pr. mol cephalosporin C, hvorved der fremkom natrium N-carbethoxycephalosporin C.

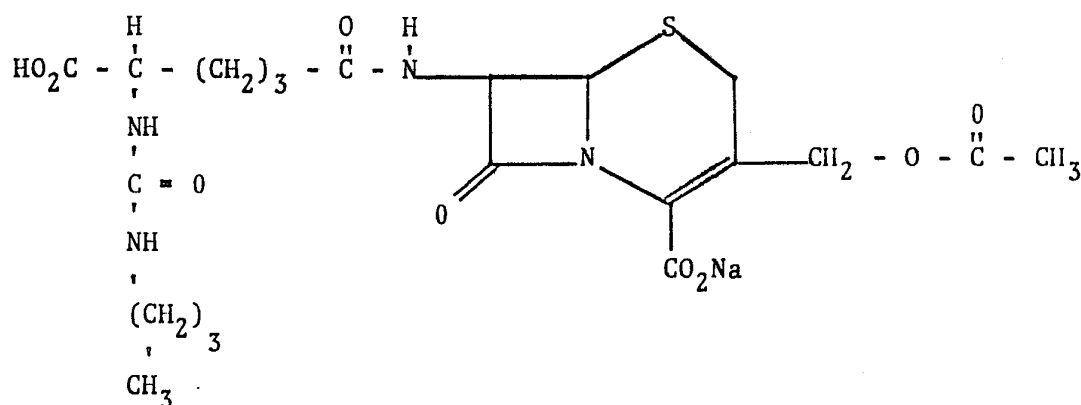
Eksempel 6

12,0 g natrium N-carbethoxycephalosporin C, fremstillet som i eksempel 5, 45 ml methylenchlorid, 3,47 ml triethylamin og 7,0 ml N,N-dimethylanilin sættes til en 500 ml kolbe. Opslæmningen omrørtes, og 4,75 ml dichlordimethylsilan tilsattes dråbevist ved 25-28°C. Reaktionen holdtes ved ca. 25°C i 45 minutter. Reaktionen køledes brat til -60°C, og 10,8 g PCl_5 (0,052 mol) i 100 ml methylenchlorid tilsattes med en sådan hastighed, at temperaturen holdtes under -40°C. Herefter tilsattes 11,7 ml N,N-dimethylanilin, idet temperaturen holdtes ved -40°C. Reaktionen holdtes ved -40°C i to timer. Reaktionen afkøledes til -73°C og 60 ml methanol indeholdende 2,36 ml N,N-dimethylanilin ved -78°C tilsattes i en hurtig strøm til reaktionen. Temperaturen steg til -43°C, reaktionen køledes til -50°C og holdtes ved -50°C i to timer. 45 ml vand ved

+65°C sattes til reaktionen, og reaktionen opvarmedes til +5°C og omrørtes i fire minutter. pH-værdien var ca. 0. 10 ml koncentreret ammoniakvand tilsattes dråbevist i løbet af ca. 6 minutter (pH-værdi = 1,6). Temperaturen holdtes ved 0 til +5°C med et isbad. 5 g ammoniumcarbonat i 10 ml vand sattes til hydrolyseblandingen (pH-værdi = 3,0). pH-værdien indstilledes dernæst til 3,8 med 3,0 ml ammoniakvand. Krystallisationsblandingen omrørtes i to timer på isbad og holdtes i is i 16 timer. Krystallerne frafiltreredes, vaskedes med methylenchlorid, 20 ml vand, 50 ml methanol og acetone. Krystallerne tørredes. 3,72 g udbytte = 58,2%.

Eksempel 7

Fremstilling af N-(N'-butylcarbomoyl)cephalosporin C



Totusindenihundrede liter dyrkningssubstrat indeholdende cephalosporin C blandedes med 108 kg filtreringshjælpemiddel og 300 ml silicaneantiskumstof og filtreredes dernæst ved en pH-værdi 6,9 ved 10°C.

Til den filtrerede medium sattes tilstrækkeligt oxalsyre til at opnå en pH-værdi 3,1. Efter denne tilsætning indstilledes pH-værdien til 2 ved tilsætning af 30% svovlsyre. Der tilsattes 54 kg frisk filtreringshjælpemiddel og blandingen filtreredes. Det således opnåede filtrat ekstraheredes $\frac{1}{2}$ volumen methylisobutylketon (MIBK) ved en pH-værdi 2 og fraskiltes dernæst. MIBK-fasen kastedes bort.

Et kvart volumen acetone sattes til det ekstraherede medium, og pH-værdien indstilledes til 7,85 med en opløsning af natriumhydroxid. n-butylisocyanat (2 kg/1000 l medium) tilsattes langsomt under omrøring (et molært forhold på ca. 6,1 mol n-butylisocyanat pr. mol

cephalosporin C).

pH-værdien holdtes konstant ved 7,8 til 8,0 ved tilsætning af 15% natriumhydroxid, og temperaturen holdtes i intervallet 0 til 10°C under tilsætning. Omrøring fortsattes, indtil pH-værdien forblev konstant uden yderligere tilsætning af natriumhydroxid, i et tidsrum på ca. to timer.

pH-værdien indstilledes til 2 ved tilsætning af 30% svovlsyre, og det acylerede medium ekstraheredes med 3/4 volumen n-butanol. Butanol-fasen vaskedes med vand og koncentreredes dernæst til ca. det halve af udgangsvolumenet i 36°C i vakuum. Koncentratets vandindhold var negligabelt.

Koncentratet afkøledes, og en opløsning af natriumethylhexanoat i n-butanol tilsattes til en pH-værdi 4,8. Natriumsaltet af N,N'-butyl-carbamoylcephalosporin C udfældedes og opsamledes ved filtrering. Bundfaldet vaskedes med butanol, opslæmmedes i petroleumether, vaskedes med acetone, filtreredes og tørredes i en vakuumovn ved 40 - 60°C til frembringelse af produktet. Undersøgelse af det tilbageblevne medium viste tilstedeværelse af mindre end 15% cephalosporin C aktivitet. Produktet var tilstrækkeligt rent til efterfølgende fremstilling af 7-ACA. Det optrådte som di-syren.

Analyse beregnet for $C_{21}H_{30}N_4O_9S \cdot H_2O$: C 47,36; H 6,06; N 10,54; H_2O 3,38.

Fundet : C 47,85; H 6,52; N 10,54; H_2O 3,48.

Eksempel 8

13,4 g natrium N-(N'-butylcarbamoyl)cephalosporin C, fremstillet som i eksempel 7, 45 ml methylenchlorid, 1,0 ml dimethylanilin og 3,67 triethylamin blandedes sammen, 5,0 ml dichlordimethylsilan tilsattes under omrøring ved en temperatur på 25 til 28°C. Opløsningen omrørtes i 30 minutter. Opløsningen afkøledes dernæst til -60°C og 11,5 g phosphorpentachlorid opløst i 100 ml methylenchlorid tilsattes, mens temperaturen for reaktionen holdtes under -40°C. Der tilsattes yderligere 12,4 ml N,N-dimethylanilin i 10 ml methylenchlorid. Temperaturen holdtes under -40°C i to timer, køledes dernæst brat til -73°C, og en

blanding af 60 ml methanol og 2,5 ml dimethylanilin kølet til -78°C tilsattes langsomt. Temperaturen steg til -47°C . Blandingen omrørtes og afkøledes igen til -50°C . Efter to timers forløb tilsattes 55 ml vand, opvarmet til $+95^{\circ}\text{C}$. Temperaturen steg til $+45^{\circ}\text{C}$. Blandingen afkøledes på isbad og omrørtes i fire minutter. pH-værdien var mindre end 0,1. 21,5 ml ammoniakvand tilsattes i løbet af 8 minutter til en pH-værdi 3,8. Blandingen omrørtes adskillige timer og filtreredes dernæst. Bundfaldet opsamledes, vaskedes med 25 ml methylenchlorid, dernæst 25 ml vand, dernæst 50 ml methanol og endelig med 50 ml acetone. Det faste stof tørredes, hvorved der fremkom 4,05 g 93,7% 7-ACA.

Eksempel 9

Fremstilling af natrium N-(N'-phenylcarbamoyl)-cephalosporin C

Fremgangsmåden ifølge eksempel 7 gentoges, idet der i stedet for et molært forhold på 6,1:1 mellem n-butylisocyanat og cephalosporin C anvendtes et molært forhold på 7:1 mellem phenylisocyanat og cephalosporin C. Der fremkom et produkt, som var tilfredsstillende for spaltning til 7-ACA. Undersøgelse af den tilbageblevne medium efter ekstraktion viste tilstedeværelse af mindre end 15% cephalosporin C aktivitet. Det blev undersøgt som di-syren.

Analyse beregnet for $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}$: C 51,68; H 4,90; N 10,48; S 6,00.

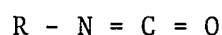
Fundet : C 51,63; H 5,27; N 10,62; S 6,14.

Eksempel 10

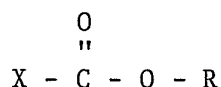
13,9 g natrium N-(N'-phenylcarbamoyl)cephalosporin C, fremstillet som i eksempel 9, 45 ml methylenchlorid, 1 ml dimethylanilin og 3,67 ml triethylamin blandedes sammen. 5,5 ml dichlordimethylsilan tilsattes under omrøring ved en temperatur på 25 til 28°C . Opslæmningen omrørtes i 75 minutter, afkøledes dernæst til -60°C og 12,0 g PCl_5 i 100 ml methylenchlorid tilsattes. Der tilsattes yderligere 11,8 ml dimethylanilin i 10 ml methylenchlorid. Temperaturen holdtes ved -40°C i to timer. Opløsningen afkøledes til -75°C , og der tilsattes en opløsning af 60 ml methanol og 2,5 ml dimethylanilin afkølet til -78°C . Temperaturen steg til -52°C . Temperaturen holdtes i intervallet -45°C til -50°C i to timer. 50 ml vand opvarmet til 95°C tilsattes under omrøring. Temperaturen steg til $+5^{\circ}\text{C}$. Efter fire minutters omrøring (pH-værdi 0,0) tilsattes 22 ml ammoniakvand i løbet af 8 minutter til en pH-værdi 3,7. Opslæmningen omrørtes i adskillige dage under afkøling. Den udfældede 7-ACA opsamledes ved filtrering, vaskedes med 50 ml methylenchlorid, 40 ml vand, 50 ml methanol og dernæst med 50 ml acetone.

PATENTKRAV

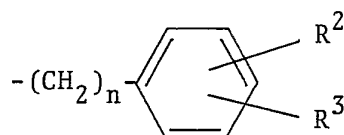
1. Fremgangsmåde til fremstilling af 7-aminocephalosporansyre ved in situ fremstilling og udvinding af et derivat af cephalosporin C og efterfølgende spaltning heraf, k e n d e t e g n e t ved, at man sætter et acyleringsmiddel i form af et isocyanat med formlen



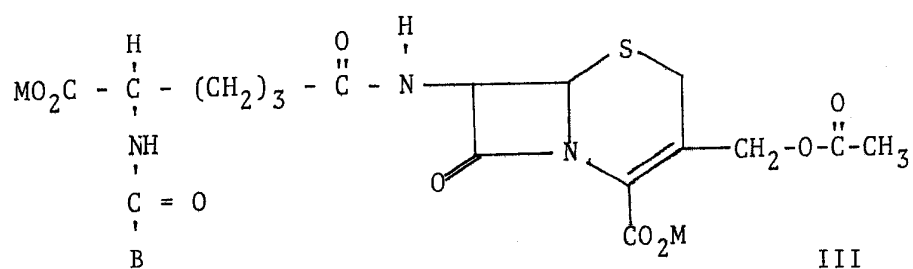
eller et halogenformiat med formlen



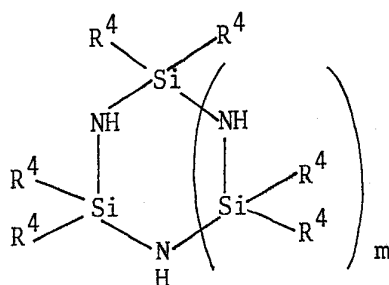
hvor R betegner alkyl med 1-10 carbonatomer eller en gruppe med formlen



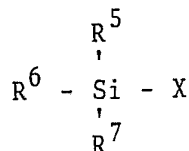
hvor n er et helt tal fra 1-6, når B i nedenstående formel III er -OR, og fra 0-6, når B er -NHR, og R^2 og R^3 er ens eller forskellige og hver betegner H, Cl, Br, F, NO_2 , alkyl indeholdende 1-10 carbonatomer eller alkoxy indeholdende 1-10 carbonatomer, og X betegner chlor, brom eller iod til et syreinkuberet dyrkningsmedium, indeholdende cephalosporin C i et forhold på mindst to mol acyleringsmiddel pr. mol cephalosporin C ved en pH-værdi over 7 ved en temperatur under $40^{\circ}C$ til dannelse af et derivat af cephalosporin C med den almene formel:



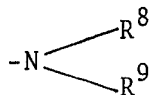
hvor M betegner hydrogen eller en metal- eller aminkation, og B betegner en gruppe med formelen -NHR eller -OR, idet R har den ovenfor anførte betydning, at derivatet af cephalosporin C med formelen (III) udvindes fra dyrkningsmediet og blandes med en silylforbindelse med formelen



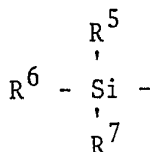
eller



hvor R^5 , R^6 og R^7 betegner hydrogen, halogen, (lavere)alkyl, halogen- (lavere)alkyl eller phenyl, idet mindst én af grupperne R^5 , R^6 og R^7 er forskellige fra halogen og hydrogen, R^4 betegner (lavere)alkyl, m er 1 eller 2, og X betegner halogen eller



hvor R^8 betegner hydrogen eller (lavere)alkyl, og R^9 betegner hydrogen, (lavere)alkyl eller gruppen



under vandfri betingelser i nærværelse af en syredeaktiverende tertier

amin i et inert opløsningsmiddel til frembringelse af den tilsvarende silylester af forbindelse III, at silylesteren blandes med et halogeneringsmiddel i et molært forhold på mindst et mol halogeneringsmiddel pr. mol silylester i et inert opløsningsmiddel i nærværelse af en syredeaktiverende tertiær amin ved en temperatur under 0°C til frembringelse i opløsning af det tilsvarende iminohalogenid, at opløsningen af iminohalogenid blandes med en alkohol ved en temperatur under 0°C til frembringelse i opløsning af den tilsvarende iminoether, samt at opløsningen af iminoether under sure betingelser blandes med vand eller en alkohol eller en blanding af begge til frembringelse af 7-aminocephalosporansyre.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at acyleringsmidlet sættes til et på forhånd filtreret og syreinkuberet dyrkningsmedium i et forhold på fra 2-10 mol pr. mol cephalosporin C ved en pH-værdi fra 7-9 ved en temperatur fra $0-25^{\circ}\text{C}$, og at derivatet udvindes ved ekstraktion med et med vand ikke blandbart organisk opløsningsmiddel ved en pH-værdi fra 1-3.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at R^3 betegner H, molforholdet mellem acyleringsmiddel og cephalosporin C er fra 5:1 til 8:1, temperaturen er fra 0°C til 15°C og opløsningsmidlet er methyilisobutylketon, ethylacetat, butanol, chloroform, methylenchlorid eller dichlorethan.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 2-3, k e n d e t e g n e t ved, at R betegner ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl eller isobutyl, R^2 og R^3 betegner H, og at der anvendes ca. 6 mol acyleringsmiddel pr. mol cephalosporin C ved en pH-værdi på ca. 8 ved en temperatur fra 0 til 5°C , og at udvindingen af forbindelsen med formlen III sker ved en pH-værdi på ca. 2 ved anvendelse af n-butanol, når acyleringsmidlet er et isocyanat og af methyilisobutylketon, når acyleringsmidlet er et halogenformiat.

5. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-4, k e n d e t e g n e t ved, at acyleringsmidlet er et chlorformiat.

6. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-4, k e n d e t e g n e t ved, at acyleringsmidlet er isobutylchlorformiat.

7. Fremgangsmåde ifølge ethvert af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at forholdet mellem ækvivalenter silyleringsmiddel til forbindelse III er 1:1, at den syredeaktiverende tertiære amin i hvert trin er triethylamin, trimethylamin, dimethylanilin, quinolin, lutidin eller pyridin, at det inerte opløsningsmiddel i hvert trin er methylenchlorid, dichlorethan, chloroform, tetrachlorethan, nitromethan eller

diethylether, at halogeneringsmidlet er phosphorpentachlorid, phosphor-pentabromid, phosphortrichlorid, phosphortribromid, oxalylchlorid, p-toluensulfonhalogenid, phosphoroxychlorid eller phosgen og foreligger i et molært forhold på 2-4 mol halogeneringsmiddel pr. mol silylester, at halogeneringstemperaturen er fra -10°C til -60°C , at alkoholen i iminoether-fremstillingstrinnet er en alifatisk alkohol med fra 1 til 12 carbonatomer eller en phenylalkylalkohol med 1-7 alkylcarbonatomer, og at temperaturen i dette trin er fra -20°C til -70°C , samt at alkoholen i syreproduktionstrinnet er en alifatisk alkohol, og at temperaturen for dette trin er ca. 0°C .

8. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-5, k e n d e - t e g n e t ved, at R betegner ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl eller isobutyl, og R^3 betegner H, at forholdet mellem ækvivalenter silyleringsmiddel til forbindelse III er fra 12:1 til 2:1, at halogeneringsmidlet er phosphorpentachlorid eller phosphoroxychlorid, og at molforholdet halogeneringsmiddel til silylester er fra 2:1 til 3:1, at halogeneringsmidlets temperatur er fra -40°C til -60°C , at alkoholen er methanol, ethanol, n-propanol eller isopropanol, at etherificeringen foretages ved fra -40°C til -70°C , og at alkoholen, når den anvendes i syreproduktionstrinnet, er methanol, n-propanol eller isopropanol eller blandinger deraf, idet temperaturen i det sidste trin er fra -10° til $+10^{\circ}\text{C}$.

9. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-3, 5 og 7, k e n d e - t e g n e t ved, at R betegner ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl eller isobutyl, phenyl eller phenethyl, at silylforbindelsen er dimethyldichlorsilan eller trimethyldichlorsilan, at det inerte opløsningsmiddel i hvert trin er methylenchlorid eller dichlorethan, og at halogeneringsmidlet er phosphorpentachlorid, anvendt i et molært forhold til silylester på 2:1.

10. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-5 og 7-9, k e n d e - t e g n e t ved, at B betegner OR og R betegner isobutyl.

Fremdragne publikationer:

Dansk patentansøgning nr. 3720/68.