

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 164225 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 2004/88

(51) Int.Cl.5

C 07 D 501/58
/(A 23 K 1/17)

(22) Indleveringsdag: 12 apr 1988

(24) Løbedag: 04 okt 1976

(41) Alm. tilgængelig: 12 apr 1988

(44) Fremlagt: 25 maj 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(62) Stamansøgning nr.: 4465/76

(30) Prioritet: 06 okt 1975 US 620005 10 okt 1975 US 622306 12 dec 1975 US 640317

30 jan 1976 US 653999 02 feb 1976 US 654314

(71) Ansøger: *Bristol-Myers Squibb Company; 345 Park Avenue; New York; 10154 N.Y., US

(72) Opfinder: Murray Arthur *Kaplan; US, William J. *Gottstein; US, Alphonse Peter *Granatek; US

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

(54) Cephalosporinforbindelser til anvendelse som ernæringsmæssige tilskud i dyrefoder

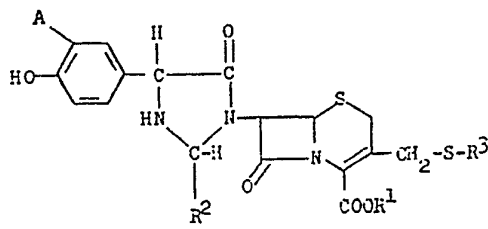
(56) Fremdragne publikationer

US pat. nr. 3489751, 3489752

(57) Sammendrag:

2004-88

1. En forbindelse kendt tegnet ved, at den har den almene formel:



hvor

A er hydrogen, hydroxy, methyl eller methoxy,

R¹ er hydrogen, natrium eller kalium,

R² er carboxyl eller 2-furyl eller et alifatisk aromatisk eller heterocyclisk radikal, hvortil der også er forbundet en stærkt sur gruppe i form af natrium- eller kaliumsaltet deraf, og

R³ er 1,2,3-triazol-5-yl, tetrazol-5-yl, 1,2,4-thiadiazol-5-yl, 1,3,4-thiadiazol-2-yl, 1,3,4-oxadiazol-3-yl eller 1,2,4-triazol-5-yl, hvor enhver af disse grupper er usubstitueret eller substitueret med 1 eller 2 lavalkylgrupper med 1 til 4 carbonatomer.

fortsættes

2004-88

2. Forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at R² er 2-furyl, 2-furan-5-sulfonsyre, phenyl-2-sulfonsyre, 4-methoxyphenyl-3-sulfonsyre, 4-hydroxyphenyl-3-sulfonsyre, 2-carboxymethoxyphenyl, 4-carboxymethoxyphenyl, 3-hydroxy-4-carboxyphenyl, 4-(2'-carboxy)vinylphenyl, carboxyl, 2-carboxyphenyl, 3-carboxyphenyl, methansulfonsyre eller methandisulfonsyre.

Den foreliggende opfindelse angår hidtil ukendte syntetiske cephalosporinforbindelser, som er værdifulde som ernæringsmæssige tilskud i dyrefoder.

5 Mere specielt angår den foreliggende opfindelse kondensationsprodukterne af aldehyder, som er forskellige fra formaldehyd og acet-
aldehyd, med 3-thiolerede cephalosporiner, der i 7-stillingen har en α -aminophenylacetamido-substituent, som er substitueret i benzenringen med en para-hydroxygruppe.

10 Derivater af forskellige α -aminocephalosporiner med nitrosubstituerede heterocycliskealdehyder er beskrevet i USA patentskrift nr. 3.647.781. Reaktionsprodukter af forskellige α -aminocephalosporiner med formaldehyd er omtalt i Sydafrikansk patentskrift nr. 72/8475, med acet-
aldehyd i Sydafrikansk patentskrift nr. 72/8474 og med forskellige aldehyder og ketoner i Sydafrikansk patentskrift nr. 72/8476.

15 Derivater af cephalosporiner, som i acylaminogruppen i 7-stillingen har en α -aminogruppe, der er blevet omsat med et aldehyd (men begrænset til methyl eller acetoxymethyl i 3-stillingen) er omtalt i USA patentskrift nr. 3.880.842, USA patentskrift nr. 3.887.546 og Farmdoc 49804W.

20 Reaktionsprodukterne af acetone med forskellige α -aminocephalosporiner er omtalt i patentlitteraturen som følger

1) med cephaloglycin, i USA patentskrift nr. 3.303.193,
2) med cephalixin, i USA patentskrift nr. 3.714.146 og britisk patentskrift nr. 1.314.758 samt USA patentskrift nr. 3.780.028,
3) med 7-[α -amino-(2'-thienyl)acetamido]cephalosporansyre, i USA
25 patentskrift nr. 3.311.621,
4) med visse ring-substituerede cephaloglyciner, i USA patentskrift nr. 3.464.985, og

5) med visse ring-substituerede cephaloxiner og cephaloglyciner, i USA patentskrifterne nr. 3.489.750, 3.489.751 og 3.489.752.

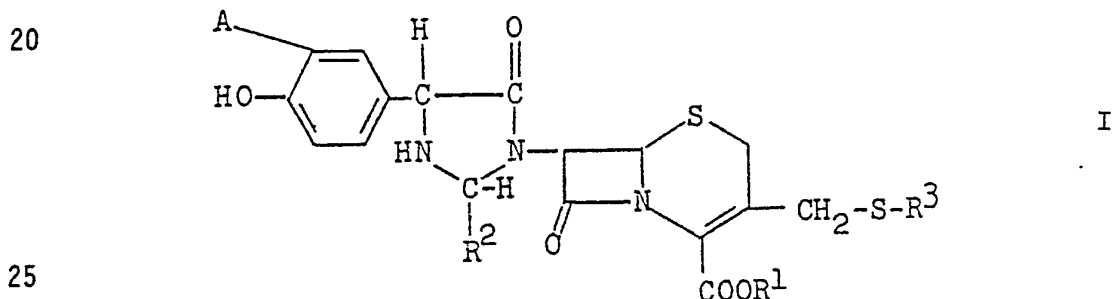
30 De fra USA patentskrifterne nr. 3.489.751 og 3.489.752 kendte reaktionsprodukter er blandt andet angivet at være ernæringsmæssige tilskud i dyrefoder. Til en sådan anvendelse er det imidlertid væsentligt at reaktionsprodukterne hurtigt hydrolyseres i legemet under gendannelse af den oprindelige cephalosporin. I forhold til disse kendte
35 reaktionsprodukter besidder kondensationsprodukterne ifølge opfindelsen som nedenfor angivet en overraskende fordel.

Fjernere beslægtede forbindelser er mellemprodukterne, som fremstilles, når en cephalosporinkerne, f.eks. 7-ACA eller 7-ADCA, acyleres

med et reaktivt derivat af en α -aminosyre, hvori α -aminogruppen er blevet beskyttet ved forudgående omsætning med en β -diketoforbindelse, såsom methyl-acetoacetat, methyl-acetoacetamid eller acetylacetone, eksempler herpå findes i Farmdoc 22850W og 60669 V.

- 5 På penicillinområdet blev penicillinerne, som indeholder en α -aminogruppe i 7-acylamidosubstituenten, f.eks. ampicillin, og er omsat med ketoner og aldehyder, tilsyneladende først omtalt i USA patentskrifterne nr. 3.198.804 og nr. 3.198.788. Lignende reaktionsprodukter, som er fremstillet ud fra forskellige sådanne penicilliner ved omsætning
- 10 med de samme eller forskellige aldehyder og ketoner, blev senere beskrevet i USA patentskrifterne nr. 3.230.214, 3.316.247 (diketoner), nr. 3.325.479 (diketoner), 3.489.746, 3.549.746, 3.558.602, 3.635.953, 3.641.000, 3.647.781 (som omfatter nogle cephalosporiner), 3.725.389, 3.780.028, 3.784.562 (diketon), 3.886.140, 3.888.848, 3.905.955 og
- 15 3.904.604 samt britisk patentskrift nr. 1.267.936.

Den foreliggende opfindelse angår således kondensationsprodukter med den almene formel



hvor

A er hydrogen, hydroxy, methyl eller methoxy,

30 R^1 er hydrogen, natrium eller kalium,

R^2 er 2-furyl, 2-furan-5-sulfonyl, phenyl-2-sulfonsyre, 4-methoxyphenyl-3-sulfonsyre, 4-hydroxyphenyl-3-sulfonsyre, 2-carboxymethoxyphenyl, 4-carboxymethoxyphenyl, 3-hydroxy-4-carboxyphenyl, 4-(2'-carboxy)vinylphenyl, carboxyl, 2-carboxyphenyl, 3-carboxyphenyl, methansulfonsyre

35 eller methandisulfonsyre, og

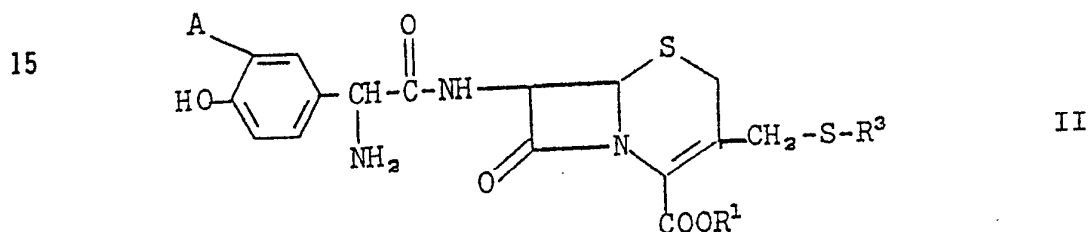
R^3 er 1,2,3-triazol-5-yl, tetrazol-5-yl, 1,2,4-thiadiazol-5-yl, 1,3,4-thiadiazol-2-yl, 1,3,4-oxadiazol-2-yl eller 1,2,4-triazol-5-yl, hvor enhver af disse grupper er usubstitueret eller substitueret med 1 eller

2 alkylgrupper med 1 til 4 carbonatomer.

I de foretrukne udførelsesformer har det til benzenringen (para-stillet i forhold til hydroxylgruppen) forbundne carbonatom D-konfiguration.

- 5 Natrium- eller kaliumsaltet af omhandlede kondensationsprodukter med formel I er således det ækvimolære kondensationsprodukt af a) et aldehyd med den almene formel R^2 -CHO, hvori R^2 har den ovenfor angivne betydning, med b) en amfoter 3-thioleret cephalosporin, som indeholder en α -substitueret α -aminoacetatamidogruppe i 7-stillingen og i sin
- 10 zwitterionform har en vandopløselighed på mindre end 125 mg/ml.

Cephalosporinforbindelserne ifølge opfindelsen giver ved hydrolyse amfotere cephalosporiner med formlen II



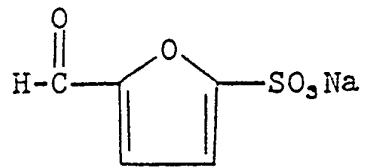
20

hvori A, R^1 og R^3 har de ovennævnte betydninger.

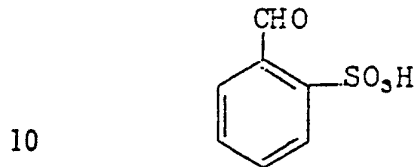
- Forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse udviser ønskværdig opløselighed, stabilitet og absorption. De foretrukne arter
- 25 hydrolyserer hurtigt og fuldstændigt i legemet under gendannelse af den oprindelige amfotere cephalosporin med formlen II; dette er ikke tilfældet med tilsvarende derivater, som er fremstillet ud fra formaldehyd, acetaldehyd eller acetone, som f.eks. de fra USA patentskrifterne nr. 3.489.751 og 3.489.752 nærmestliggende kendte reaktionsprodukter, idet
- 30 de hydrolyserer fuldstændigt, men med en uønskværdig lavere hastighed. Forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse løser således problemerne, som skyldes ustabiliteten ved høj pH-værdi og den hyppige relative uopløselighed i zwitterionformen af de amfotere cephalosporiner med formlen II.

- 35 I de foretrukne udførelsesformer af den foreliggende opfindelse er aldehydet med en syrefunktion i form af

4

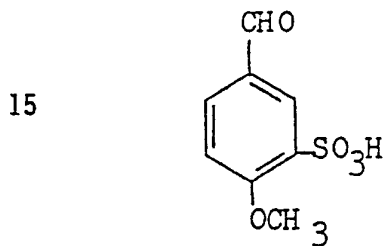


5 5-formyl-2-furansulfonatsyrenatriumsalt,



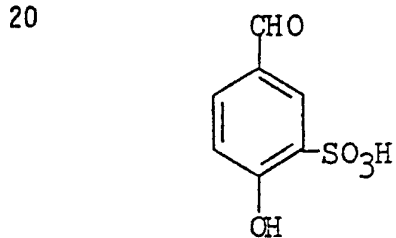
10

o-benzaldehydsulfonsyre,



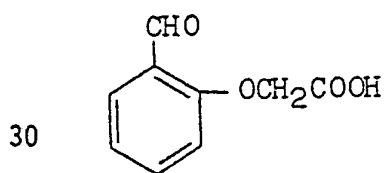
15

4-methoxybenzaldehyd-3-sulfonsyre,

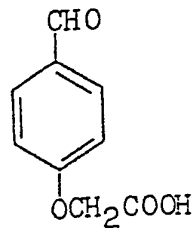


20

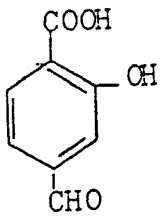
25 4-hydroxybenzaldehyd-3-sulfonsyre,



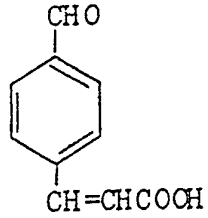
30



35 o- og p-formylphenoxyeddikesyre,



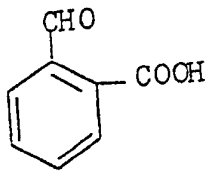
5 5-formyl-salicylsyre,



10 p-formyl-kanelisyre,

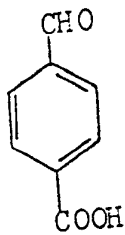
OCH - COOH

15 glyoxylsyre,



20

phthalaldehydsyre,



25

30 p-formyl-benzoesyre,

OHC - CH₂SO₃Na

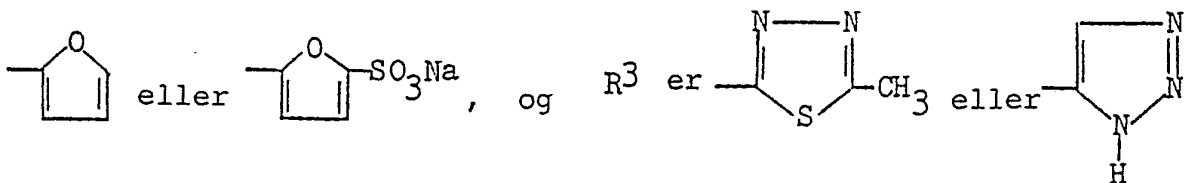
acetaldehydsulfonsyrenatriumsalt eller OHC - CH(SO₃Na)₂

35

acetaldehydisulfonsyrenatriumsalt.

Yderligere foretrukne udførelsesformer af den foreliggende opfindelse er de former med formlen I, hvori A er hydrogen, R^2 er afledt fra et af de ovennævnte aldehyder og fortrinsvis især er

5



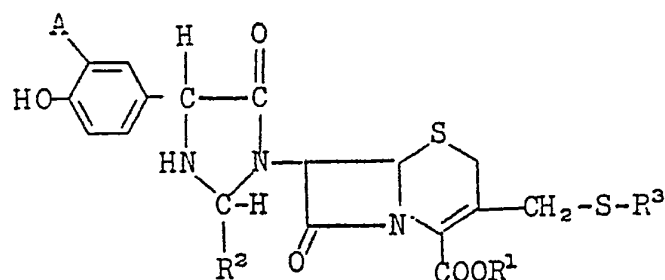
10

Amfotere 3-thiolerede cephalosporiner, som i deres zwitterionform har en vandopløselighed på mindre end omkring 125 mg/ml, er tydeligvis ikke velegnede som ernæringsmæssige tilskud til dyrefoder og kan til-
 lige sædvanligvis ikke omdannes til almindelige, opløselige natriumsalte (ulig deres ikke-amfotere modparter, såsom cephalothin etc.), fordi den krævede pH-værdi er så høj, at den forårsager dekomponering, og end-
 videre formodes den ved den pH-værdi eksisterende frie aminogruppe at katalysere dekomponering.

20

Cephalosporinerne ifølge opfindelsen med formlen I

25



I

30

hvori

A, R^1 , R^2 og R^3 har de ovenfor angivne betydninger, kan fremstilles ved

a) behandling af en vandholdig suspension af en amfoter cephalosporin med den ovenfor angivne formel II, eller et solvat eller hydrat deraf med et aldehyd med formlen R^2 -CHO, hvori R^2 har den ovenfor anførte betydning, og en tilstrækkelig mængde vandopløselig natrium- eller kaliumbase til at hæve reaktionsblandingsens pH-værdi til mellem

35

5,5 og 8, til dannelse af den ønskede forbindelse I som salt i opløsning, og derpå

b) udvinding af forbindelsen I som salt fra opløsningen.

Forbindelserne med formlen I har et asymmetricenter ved carbon-
5 atomet, som er forbundet til 2 nitrogenatomer. Således kan forbindelser med formel I eksistere i form af DL-blandingen eller som de enkelte D- eller L-isomere.

Det i trin a) i den ovennævnte fremgangsmåde anvendte cephalo-
sporin-udgangsmateriale kan være en hvilken som helst form af den
10 amfotere cephalosporin med formel II, indbefattet den frie sure zwitterion eller et hydrat eller solvat af denne zwitterion.

Koncentrationen af amfoter cephalosporin-udgangsmateriale er ikke
kritisk, og gode resultater er blevet opnået med koncentrationer mellem
omkring 25 og 300 mg cephalosporin-udgangsmateriale pr. ml opløsnings-
15 middel. Udgangsmaterialet formales og sigtes fortrinsvis til en findelt tilstand, formales fortrinsvis især til en partikelstørrelse på mindre end 0,127 mm (200 mesh) til forøgelse af overfladearealet og omsætnings-
hastigheden.

Det amfotere cephalosporin-udgangsmateriale opslættes i vand til
20 dannelse af en vandig opslætning. Et alternativ til anvendelse af en vandig opslætning i trin a) ville være at opslætne cephalosporin-udgangsmaterialet i et organisk opløsningsmiddel, som er 1) et opløsningsmiddel for alkalimetsalt-slutproduktet, 2) blandbart med aldehydet, 3) kemisk inert overfor cephalosporin-udgangsmaterialet og slut-
25 produktet og 4) let fjerneligt fra slutproduktet såsom ved mild tørring. Eksempler på organiske opløsningsmidler, som kunne anvendes, er dimethylsulfoxid og dimethylformamid. På grund af vanskeligheden med fjernelse af resterende organisk opløsningsmiddel fra alkalimetsalt-slutproduktet tilvejebringes udgangsmaterialet imidlertid fortrinsvis
30 som en vandig opslætning.

Efter opnåelse af cephalosporin-udgangsmaterialet i opslætning dannes det ønskede alkalimetsalt med formel I i opløsning ved tilsætning af aldehydet og en mængde vandopløselig alkalimetalbase, fortrinsvis en natrium- eller kaliumbase, tilstrækkelig til forøgelse af reaktionsblandingsens pH-værdi til mellem omkring 5,5 og 8. Efterhånden som
35 pH-værdien forøges, indtil den ligger inden for dette område, dannes alkalimetsaltet af reaktionsproduktet af den amfotere cephalosporin og aldehydet og går i opløsning.

Temperaturen, ved hvilken trin a) udføres, er ikke kritisk. Omsætningen kan udføres ved stuetemperatur; men højere eller lavere temperaturer kan anvendes, og temperaturer i området mellem 50 og 60°C foretrækkes.

5 Omkring 1 mol aldehyd kræves pr. mol cephalosporin-udgangsmateriale, men aldehydet tilsættes fortrinsvis i noget overskud i forhold til den nødvendige teoretiske mængde til sikring af fuldstændig omsætning, dvs. et lille molært overskud. Det mest foretrukne forhold mellem aldehyd og cephalosporin-udgangsmateriale er omkring 1,3 til 1,4:1, og
10 ofte foretrækkes 1:1.

Natrium- eller kaliumbasen kan være en hvilken som helst vandopløselig base, som er i stand til 1) tilvejebringelse af natrium- eller kaliumioner, og 2) forøgelse af reaktionsblandingsens pH-værdi til mellem omkring 5,5 og 8, fortrinsvis især omkring 6,2 til 7,2. Foretrukne baser
15 er natrium eller kaliumhydroxid, på grund af deres ønskværdige opløselighedsegenskaber. R3-S-delen af forbindelse I kan spalte fra ved høj pH-værdi. Af denne grund sættes basen til reaktionsblandingen på en sådan måde, at pH-værdien ikke får lov til at stige over omkring 8. Fortrinsvis anvendes basen i form af en vandig opløsning og tilsættes langsomt
20 til reaktionsblandingen under omrøring, indtil omsætningen viser sig at være fuldstændig ved pH-værdimåling og ved dannelse af en opløsning eller næsten en opløsning. Mængden af anvendt base er ikke kritisk, men fortrinsvis anvendes omkring 1 mol base pr. mol cephalosporinudgangsmateriale.

25 Til opnåelse af de bedste resultater filtreres den ved afslutningen af trin a) opnåede opløsning til fjernelse af faste urenheder før udvindingstrin b). Før filtrering kan opløsningen eventuelt carbonbehandles med aktiveret carbon til hjælp for fjernelse af alle farvede urenheder.

30 Det ønskede produkt med formel I udvindes derpå fra vandig eller ikke-vandig opløsning, såsom ved udfældning eller lyofilisering. Udfældning af alkalimetalsaltet kan udføres ved tilsætning af et organisk opløsningsmiddel, hvori det ønskede salt er uopløseligt, dvs. et anti-opløsningsmiddel. Eksempler på sådanne anti-opløsningsmidler er iso-
35 propanol, n-propanol, t-butanol og acetonitril.

Opløsningsmidlet til anvendelse i udfældningstrin b) bør være et, som let kan fjernes fra slutproduktet under betingelser, som ikke vil resultere i nogen nævneværdig dekomponering af alkalimetalsaltet. Det

mest foretrukne anti-opløsningsmiddel er isopropanol. Anti-opløsningsmidlet kan sættes til den fra trin a) resulterende opløsning, eller, alternativt og fortrinsvis, opløsningen, som indeholder det ønskede alkalimetalsalt, sættes under omrøring til et stort overskud af anti-opløsningsmidlet. Alkalimetalsaltet med formel I udvindes derpå ved filtrering, udvaskes med et passende organisk opløsningsmiddel, f.eks. isopropanol, og tørres ved koventionelle fremgangsmåder, f.eks. vakuumtørring ved 50 til 56°C i 24 til 48 timer eller luft-tørring ved 60°C i 48 timer. Som en alternativ fremgangsmåde til udvinding af slutproduktet ved udfældning kan saltet med formel I også udvindes ved lyofilisering af den i trin a) fremstillede opløsning.

En alternativ fremgangsmåde til fremstilling af forbindelserne med formel I omfatter:

a) dannelse af en opslæmning af den amfotere cephalosporin eller et solvat eller hydrat deraf i et velegnet inert organisk opløsningsmiddel, hvor dette opløsningsmiddel er et opløsningsmiddel for triethylaminsaltet af aldehydreaktionsproduktet af den amfotere cephalosporin og et ikke-opløsningsmiddel for alkalimetalsaltet med formel I,

b) behandling af opslæmningen med aldehydet og tilstrækkeligt triethylamin til dannelse af triethylaminsaltet af aldehydreaktionsproduktet af den amfotere cephalosporin i opløsning, og

c) udfældning af det ønskede alkalimetalsalt med formel I fra opløsningen ved tilsætning af en opløsningsmiddel-opløselig natrium- eller kaliumbase.

Udgangsmaterialet opslættes i et inert organisk opløsningsmiddel, som er et opløsningsmiddel for triethylaminsaltet eller aldehydreaktionsproduktet af den amfotere cephalosporin, men som er et ikke-opløsningsmiddel for det ønskede alkalimetalsalt med formel I. Det for trin a) valgte opløsningsmiddel bør fortrinsvis være let fjerneligt fra slutproduktet under betingelser, som ikke vil resultere i nogen nævneværdig dekomponering af slutproduktet. Passende opløsningsmidler for trin a) kan bestemmes ved simple forsøg.

Den i trin a) dannede opslæmning behandles derpå med et aldehyd, fortrinsvis med et molært overskud og især fortrinsvis med fra omkring 1,3 til 1,4 mol aldehyd pr. mol cephalosporinudgangsmateriale, og tilstrækkelig triethylamin til dannelse af triethylaminsaltet af det cycliske reaktionsprodukt af aldehydet og den amfotere cephalosporin i opløsning. Reaktionsblandingen omrøres fortrinsvis i mindst omkring 30

minutter til sikring af fuldstændig omsætning. Mængden af anvendt triethylamin er ikke kritisk, men fortrinsvis anvendes omkring 1 mol pr. mol cephalosporin-udgangsmateriale. Omsætningen i trin b) udføres bekvemt ved stuetemperatur, men temperaturer, som er højere eller lavere end denne, kan vælges med den forventede henholdsvis formindskelse eller forøgelse i omsætningstid.

Efter dannelse af en opløsning eller næsten en opløsning i trin b) carbon-behandles og filtreres reaktionsblandingen fortrinsvis, som i den ovenfor beskrevne førstnævnte fremgangsmåde.

10 Det ønskede alkalimetalsalt med formel I kan dernæst udvindes fra opløsningen i trin) ved tilsætning af et opløsningsmiddel-opløseligt natrium- eller kaliumsalt. De foretrukne salte er natrium- eller kaliumsalte af organiske syrer med mellem omkring 2 og 18 carbonatomer, f.eks. opløsningsmiddel-opløselige salte af sådanne syrer som 2-ethyl-
15 hexansyre, capronsyre, oliesyre, glycolsyre, propionsyre, eddikesyre etc.

Foretrukne salte for methanol-opløsningsmiddelsystemet er natrium- eller kalium-2-ethylhexanoat, fortrinsvis især opløsninger af disse salte i et methanol-blandbart organisk opløsningsmiddel, såsom isopropanol. De mest foretrukne alkalimetalsalte er opløsninger af natrium- eller kalium-2-ethylhexanoat i isopropanol. Alkalimetalsaltet tilsættes, fortrinsvis langsomt og under omrøring, i tilstrækkelig mængde til opnåelse af den maksimale mængde bundfald fra opløsningen. Efter at fuldstændig udfældning har fundet sted, omrøres reaktionsblandingen, fortrinsvis i mindst omkring 1 time, og filtreres derpå. Bundfaldet udvaskes med et passende organisk opløsningsmiddel, f.eks. methanol, og tørres ved konventionelle fremgangsmåder, f.eks. vakuum-tørring ved 50 til 56°C i 24 til 48 timer eller lufttørring ved 60°C i 48 timer.

Den anden fremgangsmåde kan også følges uden brug af triethylamin i trin b). Ved denne modificerede fremgangsmåde opslættes opløsningen af den amfotere cephalosporin eller solvat eller hydrat deraf, fortrinsvis methanol- eller propylenglycol-solvatformen eller hydratformen og især fortrinsvis methanol-solvatet, i et inert organisk opløsningsmiddel, som er et ikke-opløsningsmiddel for produktet med
30 formel I, fortrinsvis methanol, og opslætningen behandles dernæst med aldehydet, fortrinsvis i et molært overskud, og en opløsningsmiddel-opløselig natrium- eller kaliumbase, hvor denne base tilsættes i en mængde som er tilstrækkelig til forøgelse af reaktionsblandings pH-

værdi til mellem omkring 5,5 og 8. Det fremtrækkes at anvende som baser natrium- eller kaliumsaltene, der er nævnt ovenfor som værende de foretrukne ved den anden fremgangsmåde. Ved den modificerede fremgangsmåde går cephalosporin-udgangsmaterialet i opløsning, og det uopløselige alkalimetalsalt udfældes derpå næsten øjeblikkeligt. Eftersom en opløsning ikke opnås ved fuldførelse af denne omsætning, udføres fortrinsvis omrøring af reaktionsblandingen og opvarmning til omkring 45 til 50°C i en tidsperiode på op til adskillige timer til sikring af maksimale udbytter af slutprodukt. Det faste produkt fjernes ved filtrering, udvaskes og tørres til opnåelse af det ønskede salt med formel I.

Alkalimetalsaltene ifølge den foreliggende opfindelse kan anvendes som ernæringsmæssige tilskud, som har acceptabel termisk stabilitet i den faste tilstand, stor opløselighed i vand, tilfredsstillende vandstabilitet og udmærket in vivo og in vitro antibakteriel aktivitet mod mange forskellige Gram-positive og Gram-negative bakterier.

Natrium- og kaliumsaltene med formel I kan opløses i vand til dannelsen af forholdsvis koncentrerede opløsninger med mindst 250 mg/ml aktivitet. Koncentrationer med 250 mg/ml aktivitet (pH-værdi 5,7 - 6,8) af disse salte har acceptable vandstabiliteter.

Aktiviteter af forbindelserne med formel I er i det væsentlige ækvivalente med aktiviteterne af den oprindelige amfotere cephalosporin med formel II.

Forbindelserne med formel I er værdifulde ernæringsmæssige tilskud til dyrefoder som følge af kombinationen af høj stabilitet, god oral absorption og hurtig biologisk hydrolyse i dyr samt lav middelpræventiv dosis PD_{50} . Disse virkninger og det overraskende herved i forhold til den nærmestliggende kendte teknik fremgår nedenfor.

I det følgende beskrives fremgangsmåder til fremstilling af udgangsmaterialer.

30

Fremgangsmåde til fremstilling af 7-[D-a-amino-a(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, -methanol solvat

I en trehalset kolbe, forsynet med en tilbagesvalingskondensator, en ovenfor anbragt omrører og et termometer, anbragtes en grundigt blandet blanding af 8,36 g (0,05 mol) D-(-)-p-hydroxyphenylglycin og 3,02 g (0,075 mol) magnesiumoxid i 120 ml 50% vandig dioxan. Blandingen omrørtes i 1 time og behandledes derpå med 10,74 g (0,075 mol) t-but-

oxycarbonylazid. Blandingen omrørtes og opvarmedes derefter til 45-50°C i 17 timer under N₂. Opløsningen fortyndedes med 400 ml H₂O og ekstraheredes 2 gange med 300 ml ethylacetat. Den vandige fase gjordes sur med 10% citronsyreopløsning indtil pH-værdi 4 og mættedes med NaCl. Den

5 vandige blanding ekstraheredes med 3 x 400 ml ethylacetat. Opløsningen tørredes over Na₂SO₄, og opløsningsmidlet afdampedes. Remanensen tritureredes med "Skellysolve B" til opnåelse af D-α-t-butoxycarbonylamino-α-(p-hydroxyphenyl)eddikesyre som et faststof, der vejede 10,4 g (78,5%).

Til en opslæmning af 7-amino-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-

10 cephem-4-carboxylsyre (6,0 g, 19,0 mmol) i 100 ml tør methylenchlorid sattes 8,5 ml 1,1,1,3,3,3-hexamethyl-(disilazan (40,9 mmol). Blandingen omrørtes og opvarmedes under tilbagesvaling i 4 timer, på hvilket tidspunkt en klar opløsning opnåedes. Opløsningsmidlet afdampedes, og remanens-oilen udsattes for høj-vakuum natten over ved stuetemperatur.

15 Den skumagtige remanens opløstes i 85 ml tør THF (tetrahydrofuran) og afkøledes til omkring -15°C før indføring i den efterfølgende reaktionsblanding.

D-α-t-butoxycarbonylamino-α-(4-hydroxyphenyl)eddikesyre (4,4 g, 16,5 mmol) opløstes i 145 ml tør THF. Opløsningen omrørtes og afkøledes

20 til -20°C. N-methylmorpholin (1,6 g, 16 mmol) og isobutylchlorformiat (2,3 g, 16,8 mmol) tilsattes i rækkefølge med en sådan hastighed, at blandingens temperatur ikke oversteg omkring -10°C. Den resulterende blanding omrørtes derpå i 20 minutter ved -12 til -15°C. Den afkøledes derefter til -20°C, og THF-opløsningen af silyleret 7-amino-3-(1,2,3-

25 triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre tilsattes på én gang. Temperaturen steg til omkring -12°C. Ydre afkøling afbrødes indtil temperaturen steg til 0°C. På dette tidspunkt anbragtes et isbad, og blandingen omrørtes i 3 timer ved 2 til 3°C. Dette efterfulgtes af en periode på 1 time uden ydre afkøling, hvor temperaturen steg til 20° C.

30 En total mængde på 30 ml methanol tilsattes, og omrøringen fortsattes i 15 minutter ved stuetemperatur. Efter afdampning af opløsningsmidlerne under reduceret tryk opslæmmedes remanensen i 300 ml ethylscetat. Det opslæmmede faststof frafiltreredes, (11,8 g). Ethylacetatopløsningen ekstraheredes 3 gange med NaHCO₃ (5%) opløsning. De kombinerede natrium-

35 hydrogencarbonattekstrakter afkøledes i et isbad, fase-adskiltes med ethylacetat og gjordes sure til en pH-værdi på 2,5 med 42,5% H₃PO₄. Faserne omrystedes og adskiltes derefter. Ethylacetatopløsningen tørredes derpå ved at lade den passere gennem natriumsulfat og inddam-

pedes derpå til omkring 15 til 20 ml. Denne opløsning sættes dernæst dråbevis til omrørt, i en Erlenmeyer kolbe indeholdt, cyclohexan (svarende til 400 ml). Efter omrøring i en halv time samledes det udfældede faststof ved filtrering. Den samlede faste 7-[D- α -t-but-

5 oxycarbonylamino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre luft-tørredes. Den vejede 1,75 g.

7-[D- α -t-butoxycarbonylamino- α -(p-hydroxyphenyl)-acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, 3,5 g, opløstes i 80 ml HCOOH, 98-100%, og omrørtes i 2 timer ved stuetemperatur. HCOOH

10 afdampedes under reduceret tryk (aspiratorbad-temperatur ikke over 40°C) og azeotroperedes tilsidst 3 gange med 30 ml toluen. Faststoffet tørredes natten over under højvakuum over P₂O₅. En total mængde på 3,5 g skum opnåedes. Skummet, 2 g, omrørtes med 300 ml H₂O: CH₃OH (8:2). Opløsningsmidlet filtreredes fra noget faststof (0,3 g), trækul-behandlede

15 med 700 mg "Darko KB", filtreredes gennem diatome-jord ("Celite") og frysetørredes til opnåelse af 0,9 g rå 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)-acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre. Til udkrystallisering anvendtes den følgende fremgangsmåde. En opløsning af 0,2 g af det rå materiale i 6 ml 99% methanol opvarmedes i et forsøgsrør

20 til kogning. Opvarmningen afbrødes øjeblikkeligt, og smelten tritureredes med korn. Smelten størknede til en krystallinsk masse. På denne måde opnåedes en totalmængde på 0,211 g 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)-acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre fra 0,400 g rå materiale. Materialet tørredes ved 56°C/0,1 mm over P₂O₅ i

25 20 timer, smeltepunkt >200°C, dekomponering. IR og NMR er konsistente med strukturen. NMR viste tilstedeværelsen af 1/3 mol CH₃OH.

Analyse for C₁₈H₁₈N₆O₅S₂·H₂O, 1/3CH₃OH:

Beregnet: C 44,83; H 4,38; N 17,10; S 13,09

Fundet: C 43,97; H 4,36; N 15,84; S 6,18.

30 En total mængde på 6,5 g (11,55 mmol) 7-[D- α -t-butoxycarbonylamino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre opløstes i 175 ml 98-100% myresyre under vandfri betingelser. Blandingen omrørtes ved stuetemperatur i 2,5 timer. En del af opløsningen, 125 ml, inddampedes under reduceret tryk til en ravgul

35 olie. Olien azeotroperedes derpå 3 gange med 70 ml toluen under reduceret tryk. Remanensen oplømmedes i en 80:20 H₂O-CH₃OH-opløsning (700 ml) og omrørtes i 0,5 time, indtil det mest faststof opløstes, filtreredes derefter. Filtratet behandlede med 1,5 g ("Darko") trækul i omkring 20

minutter. Trækullet frafiltreres gennem et "Celite"-lag. Opløsningen frysetørres dernæst i 9 adskilte 100 ml rundkolber. Det frysetørrede materiale vejede 2,415 g. Det omkrystalliseres i portioner på 0,200 g som beskrevet ovenfor til opnåelse af en total mængde på 0,923 g 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre. NMR var konsistent og viste tilstedeværelsen af 1/3 mol CH₃OH.

Analyse for C₁₈H₁₈N₆O₅S₂·H₂O, 1/3CH₃OH:

Beregnet: C 44,83; H 4,38; N 17,10; S 13,09

10 Fundet: C 45,77; 44,36; H 4,44, 4,34;

N 16,61, 16,52; S 13,01, 13,01.

Fremgangsmåde til fremstilling af krystallinsk methanolsolvat af 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre

- 15 1. 50 g 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)-acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre oplømmes i 250 ml 95% volumen/volumen methanol/vand -(95% methanol)-opløsning ved 22 til 25°C.
2. Koncentreret saltsyre tilsættes under hurtig omrøring indtil en 20 pH-værdi på 1,3 til 1,5. En opløsning eller næsten en opløsning opnås.
3. pH-værdien indstilles til 1,7 med triethylamin.
4. 7,5 g aktiveret trækul ("Darco G-60") tilsættes, og der oplømmes i 0,5 time.
5. Trækullet fjernes ved filtrering og udvaskes med 75 ml 25 methanol, som sættes til filtratet. Trin 2, 3 og 4 bør fuldføres inden for 5 timer.
6. Det kombinerede udvaskningsmiddel og filtrat fra trin 5 omrøres hurtigt. Triethylamin tilsættes over en 5 minutters periode, indtil pH-værdi 4,5. Udkrystallisering begynder efter omkring 1 til 3 minutter.
- 30 Blandingen oplømmes i 1 time.
7. Krystallerne samles ved filtrering, udvaskes med 100 ml methanol og vakuum-tørres ved 56 oC i 24 timer. Bio-udbytte 75 - 90%; bio-prøve = 850-900 μ g/mg; NMR-IR = konsistent for 1 mol methanol; % vand, KF = 2-4,0.

Fremgangsmåde til fremstilling af krystallinsk 1,2-propylenglycolsolvat af 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre

1. 25 g af det ovenfor fremstillede methanolsolvat af 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre oplømmes i 150-200 ml 75% volumen/volumen propylenglycol-vandopløsning ved 20-25°C.

2. Koncentreret saltsyre tilsættes indtil en pH-værdi på 1 til 1,2 til opnåelse af en opløsning eller næsten en opløsning.

3. Triethylamin (TEA) tilsættes langsomt under hurtig omrøring til opnåelse af en pH-værdi på 1,7 til 1,8.

4. 5 g "Darco G-60" tilsættes, og blandingen oplømmes i 0,5 time. Trækullet fjernes ved filtrering (filtrering udføres langsomt, et 18,5 cm SS nr. 576 papir foreslås). Trækulfilterkagen udvaskes med 40 ml 75% volumen/volumen propylenglycol-vandopløsning. Udvaskningsmidlet sættes til filtratet.

Trin 2, 3 og 4 ovenfor bør fuldføres inden for 5 timer.

5. Triethylamin sættes til den hurtigt omrørte filtratudvaskningsmiddel-blanding fra trin 4, indtil pH-værdien = 4,5 over en 10 minutters periode. Krystaller dannes efter omkring 1 til 3 minutter. Blandingens oplømmes i 1 time.

6. Propylenglycolsolvat-krystallerne af 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre samles ved filtrering. Filtrering udføres langsomt (et 12,5-15,0 cm SS nr. 604 papir foreslås). Krystallerne udvaskes i rækkefølge med 50 ml 75% propylenglycol, 50 ml methanol og 50 ml acetone og vakuum-tørres ved 56°C i 24 timer. Biologisk udbytte: 80-95%.

Egenskaber af 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, propylenglycolsolvat

a. Bio-prøve = 850-900 ξ g/mg.

b. IR-NMR = konsistent for en struktur, som indeholder 1,0 - 1,5 mol propylenglycol (14-19% propylenglycol). Øjensynligt intet tab af 3-triazolsidekæden.

c. % vand, K.F. = 1-3,0.

d. Krystal morfologi = 100% krystallinsk (mikrokrystaller, trekantformede).

e. Smeltepunkt = 182-184°C (Dekomponering, varmbord).

f. $[\alpha]_D^{25}$ (C = 1%; 1N-HCl) = +53°.

g. Vandopløselighed = omkring 10 mg/ml i vand ved 23°C.

h. Tab af bioaktivitet ved henstand ved forhøjede temperaturer:
100°C, 24 timer = <6%; 48 timer = <12%; 56°C, 1 måned = <10%.

5

Fremgangsmåde til fremstilling af krystallinsk methanolsolvat ud fra krystallinsk propylenglycolsolvat

Propylenglycolsolvatet af 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (50 g) fremstillet som ovenfor opslættes i 250 ml 95% (volumen/volumen) methanol-vandopløsning ved 22-25°C. Koncentreret HCl tilsættes under hurtig omrøring indtil en pH-værdi på 1,1-1,5, hvorpå en opløsning eller næsten en opløsning opnås. pH-værdien indstilles til 1,7 med triethylamin, og 7,5 g aktiveret trækul tilsættes under opslætning i 0,5 time. Trækullet fjernes ved filtrering og udvaskes med 75 ml methanol. Udvaskningsopløsningen sættes derefter til filtratet. (Trinnene fra tilsætning af HCl indtil dette tidspunkt bør fuldføres inden for 5 timer). Det kombinerede udvaskningsmiddel og filtrat omrøres hurtigt, og triethylamin tilsættes over en 5 minutters periode indtil en pH-værdi på 4,5 nås. Udkrystallisation begynder efter omkring 1-3 minutter. Blandingen opslættes i 1 time, og krystallerne fjernes ved filtrering, udvaskes med 100 ml methanol og vakuum-tørres ved 56°C i 24 timer. Bio-udbytte 75 - 90%; bio-prøve = 850-900 μ g/mg. NMR-IR = konsistent for 1 mol methanol; % H₂O, K.F. = 2-4,0.

25

Fremgangsmåde til fremstilling af krystallinsk 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, sesquihydrat

7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, methanolsolvat (15 g) opslættes i 60 ml vand. pH-værdien hævedes til 6,5 ved tilsætning af 4N NaOH, og blandingen sendtes gennem en sigte med maskevidde på 0,127 mm (200 mesh). Reaktionsblandingen opslættes ved stuetemperatur i 2 timer, i hvilken periode pH-værdien opretholdtes ved 6,5. Krystallerne fjernes ved filtrering, udvaskedes med 20 ml vand og luft-tørredes ved 37°C i 24 timer til dannelse af 11,5 g af det i titlen nævnte krystallinske produkt. Bio-prøve = 924 μ g/mg (middel % H₂O, K.F. = 5,26). NMR og IR var konsistente for den foreslåede struktur og viste, at produktet

indeholdt intet methanol, men faktisk indeholdt et spor propylenglycol.

- Fremgangsmåde til fremstilling af krystallinsk 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, sesquihydrat og dannelse af andre krystallinske hydrater
- 5 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-carboxylsyre, methanolsolvat (0,127 mm (200 mesh), 10,0 g), som i det væsentlige er fri for propylenglycol, opslættes i 30-40 ml deioniseret vand ved den omgivende stuetemperatur (20-25°C) til
- 10 dannelse af en vandig opslætning med pH-værdi 3-4. NaOH (40%) tilsættes langsomt under hurtig omrøring til hævnning af pH-værdien til 6,3-6,7. Blandingen opslættes ved pH-værdi 6,3-6,7 i 2 timer. Krystallerne fjernes ved filtrering, udvaskes med vand og luft-tørres ved stuetemperatur i 24 timer til dannelse af 75-80 vægtprocent udbytte på
- 15 950-1000 $\mu\text{g}/\text{mg}$ krystaller af 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, dihydrat. IR- og NMR-analyser var konsistente for den foreslåede struktur og viste, at produktet indeholdt intet methanol, men faktisk indeholdt et spor af propylenglycol. H_2O , K.F. = 6,56.
- 20 En prøve af det krystallinske dihydrat luft-tørredes ved 37°C i 24 timer til dannelse af det krystallinske sesquihydrat af 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre. H_2O , K.F. = 4,26.
- En anden prøve af dihydratet luft-tørredes ved 45°C i 24 timer til
- 25 dannelse af det krystallinske sesquihydrat. H_2O , K.F. = 5,5.
- En prøve af dihydratet luft-tørredes ved 56°C i 24 timer til dannelse af det krystallinske monohydrat af 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre. H_2O , K.F. = 4,38 (teoretisk % H_2O for monohydrat = 3,75).
- 30 En prøve af dihydratet vakuum-tørredes over P_2O_5 ved stuetemperatur i 24 timer til dannelse af det krystallinske hemihydrat af 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre. H_2O , K.F. = 2,63 (teoretisk % H_2O for hemihydrat = 1,91).
- 35 En prøve af dihydratet vakuum-tørredes ved 56°C i 24 timer til dannelse af det krystallinske hemihydrat. H_2O , K.F. = 1,6 - 2,0.

D-(-)-2-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)glycylchlorid,hydrochlorid

fremstilles i en høj grad af renhed og højt udbytte ved den følgende fremgangsmåde:

- Omkring 0,06 mol D-(-)-2-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)glycin
- 5 opslættes i 100 ml dioxan. Opslætningen omrøres, og COCl_2 (phosgen) sendes ind, medens opslætningstemperaturen holdes ved 50-58°C. COCl_2 sendes ind i en totaltid på 3,5 timer. En gul opløsning opnås. Opløsningen renses med nitrogen til uddrivning af det overskydende COCl_2 . HCl-gas bobles gennem opløsningen i 2,5 timer. Opløsningen omrøres, og en
- 10 lille mængde fortyndes med noget ether til opnåelse af nogle krystaller, som sættes til hele portionen som korn. Opløsningen omrøres ved 20-25°C i 16 timer. Den resulterende opslætning af krystallinsk D-(-)-2-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)glycylchlorid,hydrochlorid filtreres til samling af produktet. Filterkagen udvaskes med dioxan og methylenchlorid og
- 15 tørres derefter i en vakuum-ekssikator over P_2O_5 til opnåelse af omkring 7 g D-(-)-2-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)glycylchlorid,hydrochlorid.

2-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)glycin

- 20 En opløsning af 59,02 g (0,6 mol) 75% glyoxylsyre i 100 ml vand sættes til en opslætning af 54,6 g (0,5 mol) 2-methylphenol og 140 ml koncentreret ammoniumhydroxid i 400 ml vand ved stuetemperatur. Blandningens temperatur steg til 37°C. Blandingen omrørtes ved stuetemperatur i 65 timer. Opløsningen, som i begyndelsen havde en pH-værdi 10,1, ind-
- 25 stilledes til pH-værdi 6,8 med 6N saltsyre, hvad der forårsagede, at produktet udkrystalliserede. Produktet samledes ved filtrering, udvaskedes med vand og tørredes i vakuum over phosphorpentoxid til dannelse af 31,5 g (34,8%) 2-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)glycin; dekomponering 196-199°C. Det infrarøde og det kernemagnetiske resonans-spektrum var
- 30 konsistent for det ønskede produkt. Reference: Belgisk patentskrift nr. 774.029 (Farmdoc 27, 122T), som angiver smeltepunkt 205-207°C.

Analyse for $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$:

Beregnet: C 59,66; H 6,13; N 7,73.

Fundet: C 57,68; H 6,23; N 7,47, H_2O , 2,34

- 35 Fundet, korrigeret for 2,34% vand: C 59,06; H 6,12; N 7,67.

D,L-N-chloracetyl-2-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)glycin

En opløsning af 20,2 g (0,112 mol) D,L-2-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)glycin i 175 ml vand indstilledes til pH-værdi 10,3 med 20% natriumhydroxid, hvad der resulterede i en opløsning. Opløsningen afkøledes i et isbad. Chloreddikesyreanhydrid (38,2 g, 0,224 mol) tilsattes på én gang, og pH-værdien af reaktionsblandingen opretholdtes ved pH-værdi 10 ved tilsætning af 20% natriumhydroxid, indtil ingen yderligere pH-værdi ændring registreredes. Reaktionsblandingen omrørtes i yderligere 10 minutter i kulden. Reaktionsblandingen gjordes derpå sur indtil pH-værdi 2,0 med 6N saltsyre, hvad der forårsagede, at produktet udkrystalliserede. Produktet samledes ved filtrering, udvaskedes med vand og luft-tørredes. Omkrystallisation fra 200 ml varmt vand gav 13,7 g (47,4%) D,L-N-chloracetyl-2-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)glycin. Det infrarøde og det kernemagnetiske resonansspektrum var konsistente for det ønskede produkt.

Analyse for $C_{11}H_{12}NO_4Cl, H_2O$:

Beregnet: C 47,92; H 5,118; N 5,081.

Fundet: C 48,11; H 5,16; N 5,15.

20 D-(-)-N-chloracetyl-2-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)glycin

D,L-N-chloracetyl-2-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)glycin (5,0 g 0,0194 mol) og L-ephenaminacetat (6,1 g, 0,0213 mol) opløstes i 50 ml isopropylalcohol ved opvarmning på et dampbad. Vand (50 ml) tilsattes, og ved afkøling udkrystalliseres L-ephenaminsaltet. Saltet samledes ved filtrering og luft-tørredes.

Saltet oplømmedes i 30 ml vand og 50 ml methylenchlorid, og blandingen indstilledes til pH-værdi 10,0 med 20% natriumhydroxid. Faserne adskiltes, og den vandige fase ekstraheredes to gange mere med methylenchlorid.

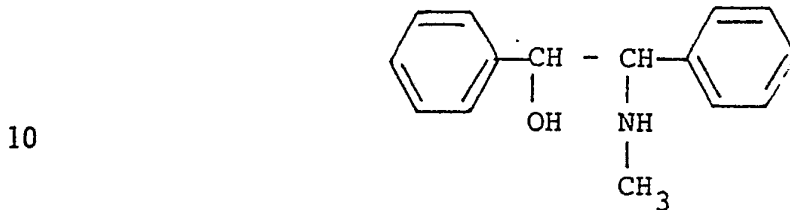
Den vandige opløsning indstilledes derpå til pH-værdi 2,0 med 6N saltsyre, hvad der forårsagede, at produktet udkrystalliserede. Produktet samledes ved filtrering og tørredes i vakuum over phosphorpentoxid, hvad der medførte 0,9 g (36,1%) D-(-)-N-chloracetyl-2-(3-methyl-4'-hydroxyphenyl)glycin; smeltepunkt 170 - 172°C, $[\alpha]_D^{24} = 185,9^\circ$ (C=1, 95% EtOH). Det infrarøde og det kernemagnetiske resonansspektrum var konsistente for det ønskede produkt.

Analyse for $C_{11}H_{12}NO_4Cl$:

Beregnet: C 51,27; H 4,696; N 5,436.

Fundet: C 51,21; H 4,77; N 5,29.

1,2-diphenyl-2-methylaminoethanol, sædvanligvis kaldt ephenamin
5 (ifølge Federal Register, 7. juni 1951) har strukturen



Forbindelsen kaldes også N-methyl-1,2-diphenyl-2-hydroxyethylamin
eller α,β -diphenyl- β -hydroxy-N-methylethylamin eller 1,2-diphenyl-2-
15 methylamino-1-ethanol.

Denne fremgangsmåde udnytter kun den levo-erythrose isomere. Frem-
gangsmåder til dens fremstilling og omsætning med penicillin G er
beskrevet i USA patentskrifterne nr. 2.645.638 (V.V. Young) og 2.768.081
(F.H. Buckwalter). I det sidste patentskrift gennemgås tidligere
20 litteratur, ligesom det gøres i W.B. Wheatley et al., J. Org. Chem.,
18(11), 1564-1571 (1953). Denne forbindelse anvendtes til opspaltning af
racemisk phenoxymethylpenicillin af Sheehan et al., J. Am. Chem. Soc.,
81, 3089-3094 (1959); se især p. 3091.

25 D-(-)-2-(3-methyl-4'-hydroxyphenyl)glycin

D-(-)-N-chloracetyl-2-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)glycin (11,1 g,
0,0431 mol) kombineredes med 100 ml 2N saltsyre, og blandingen opvarme-
des under tilbagesvaling i 1,5 time. Opløsningen afkølede, og pH-værdien
indstilledes til 5,0 med 20% natriumhydroxid, hvad der forårsagede, at
30 produktet udkrystalliserede. Produktet samledes ved filtrering, udvaske-
des med vand og tørredes i vakuum over fosforpentoxid til dannelse af
7,4 g (94,7%) D-(-)-2-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)glycin, dekomponering
205-209°C, $[\alpha]_D^{24} = 152,6^\circ$ (C=1, 1 N HCl). Det infrarøde og det kerne-
magnetiske resonansspektrum var konsistente for det ønskede produkt.

35 Analyse for $C_9H_{11}NO_3$:

Beregnet: C 59,66; H 6,13; N 7,73.

Fundet: C 58,62; H 5,49; N 7,78; H_2O , 1,46.

Fundet, korrigeret for 1,46% vand: C 59,48; H 5,41; N 7,84.

D-(-)-N-t-butoxycarbonyl-2-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)glycin

Til en opløsning i 200 ml H₂O-dioxan (1:1) af 7,2 g (0,0397 mol) D-(-)-2-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)glycin og 3,2 g (0,08 mol) pulveriseret magnesiumoxid, som blev omrørt ved stuetemperatur, sættes dråbevis
 5 9,7 g (0,068 mol) t-butoxycarbonylazid. Reaktionsblandingen opvarmedes derpå til 42-45°C under nitrogenatmosfære i 19 timer. Blandingen fortyndedes derefter med 100 ml isvand. Opløsningen fase-adskiltes med ethylacetat og filtreredes til fjernelse af noget uopløseligt materiale, som var udskilt. Filtratets vandige fase skiltes fra og ekstraheredes 2
 10 gange mere med ethylacetat. Den vandige opløsning indstilledes derefter til pH-værdi 5,0 med 42% phosphorsyre og ekstraheredes 5 gange med ethylacetat. De kombinerede organiske ekstrakter udvaskedes 3 gange med vand, tørredes over natriumsulfat, og opløsningsmidlet fjernedes ved reduceret tryk efterladende en olie. Olien tørredes i vakuum over
 15 phosphorpentoxid resulterende i 10,6 g (95%) D-(-)-N-t-butoxycarbonyl-2-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)glycin. Det infrarøde spektrum var konsistent for den ønskede struktur.

20 7-[D-2-t-butoxycarbonylamino-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre

A. Blandet anhydrid

En opløsning af 2,8 g (0,01 mol) D-(-)-N-t-butoxycarbonyl-2-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)glycin i 100 ml tetrahydrofuran afkøledes til
 25 -15°C i et is-salt-acetone-bad. N-methylmorpholin (1,01 g, 0,01 mol) tilsættes efterfulgt af 1,37 g (0,01 mol) isobutylchlorformiat, og reaktionsblandingen omrørtes ved -15 til -20°C i 8 minutter. Et bundfald af N-methylmorpholin,hydrochlorid udskiltes øjeblikkeligt.

30 B. Kobling

7-amino-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (3,1 g, 0,01 mol) opløsnes i 100 ml vand, og 1,01 g (0,01 mol) N-methylmorpholin tilsættes. En fuldstændig opløsning opnåedes ikke. Derpå tilsættes 1,1,3,3-tetramethylguanidin dråbevis til denne omrørte opløsning,
 35 ning, indtil en klar opløsning opnåedes. Opløsningen afkøledes derefter til 4°C i et isbad og sættes til blandet anhydrid-opløsningen ved -15°C. Kølebadet fjernedes, og blandingen omrørtes i 1,5 time. Tetrahydrofuranen fjernedes deraf ved reduceret tryk, og det vandige koncentrat

fase-adskiltes med ethylacetat. Den vandige fase indstilledes til pH-værdi 2,0 med 42% phosphorsyre, hvad der forårsagede, at uopløseligt materiale udskiltes. Faststoffet fjernedes ved filtrering. Filtratets vandige fase fraskiltes og ekstraheredes 2 gange mere med ethylacetat.

5 De kombinerede organiske ekstrakter udvaskedes 2 gange med vand, tørredes over natriumsulfat, og opløsningsmidlet fjernedes ved reduceret tryk efterladende en viskos olie-remanens. Olien tritureredes med "Skellysolve B", som indeholdt en lille mængde diethylether, under frembringelse af et faststof. Dette faste produkt samledes ved filtrering,

10 udvaskedes med "Skellysolve B" og luft-tørredes. En TLC (silica-gel; opløsningsmiddel, 97:3 acetone-eddikesyre) af produktet viste, at materialet var en blanding af det ønskede produkt og af sidekædesyren. Dette materiale omrørtes derefter med 100 ml vandfri diethylether i 1 time. Det uopløselige faststof samledes ved filtrering og luft-tørredes

15 til dannelse af 0,95 g (16,4%) 7-[D-2-t-butoxycarbonylamino-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre. En TLC (silicagel; opløsningsmiddel 97:3 acetone-eddikesyre) viste, at denne prøve kun indeholdt en spormængde af sidekædesyren. Det infrarøde spektrum var konsistent for det ønskede produkt.

20 7-[D-2-t-butocycarbonylamino-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre

A. Blandet anhydrid

25 En opløsning af 14,06 g (0,05 mol) D-(-)-N-t-butoxycarbonyl-2-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)glycin i 500 ml tetrahydrofuran afkøledes til -15°C i et is-salt-acetone-bad. N-methylmorpholin (5,06 g, 0,05 mol) tilsattes efterfulgt af 6,83 g (0,05 mol) isobutylchlorformiat, og reaktionsblandingen omrørtes ved -13 til -17°C i 10 minutter. Et bundfald af

30 N-methylmorpholin,hydrochlorid udskiltes øjeblikkeligt.

B. Silylester

En blanding af 8,0 g (0,025 mol) 7-amino-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, 7,0 ml (0,05 mol) triethylamin, 6,9 ml

35 (0,0545 mol) N,N-dimethylanilin, 9,5 ml (0,075 mol) chlortrimethylsilan og 650 ml methylenchlorid opvarmedes under tilbagesvaling i 3 timer. Yderligere 1,6 ml chlortrimethylsilan tilsattes efter den første times tilbagesvaling. Den uklare opløsning afkøledes, og methylenchloridet

fjernedes ved reduceret tryk. Remanensen optoges i 500 ml tetrahydrofuran. -

C. Kobling

- 5 Silylesteropløsningen afkøledes til 10-15°C i et isbad og sattes på én gang til blandet anhydrid-opløsningen, som holdtes ved -15°C. Kølebadet fjernedes, og reaktionsblandingen omrørtes i 2 timer. Derpå tilsattes 500 ml vand, og tetrahydrofuranen fjernedes ved reduceret tryk, hvad der forårsagede, at en gummiagtig olie udskiltes. Olien
- 10 ekstraheredes i ethylacetat, og faserne adskiltes. Den vandige fase (pH-værdi= 3,8) faseadskiltes med ethylacetat, hvad der forårsagede, at noget faststof udskiltes. Dette bundfald fjernedes ved filtrering, og filtratets vandige fase fraskiltes. Den vandige opløsning indstilledes til pH-værdi 2,3 med 42% phosphorsyre og ekstraheredes igen med ethyl-
- 15 acetat. De kombinerede ethylacetatekstrakter udvaskedes 3 gange med vand, tørredes over natriumsulfat, og opløsningsmidlet fjernedes ved reduceret tryk efterladende en viskos olie. Olien omrørtes med 100 ml vandfri diethylether i 1,5 time tilfrembringelse af et faststof. Produktet filtreredes, udvaskedes sparsomt med vandfri diethylether og
- 20 luft-tørredes. En TLC (silicagel; opløsningsmiddel, 99:1 acetone-eddikesyre) af produktet viste, at materialet var en blanding af det ønskede produkt, sidekæde-syren og en tredje uidentificeret bestanddel.
- Materialet omrørtes igen i 100 ml vandfri diethylether i 1,5 time. Det uopløselige faststof samledes ved filtrering og luft-tørredes til
- 25 opnåelse af 10,7 g (74,4%) 7-[D-2-t-butoxycarbonylamino-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre. En TLC (silicagel; opløsningsmiddel 99:1 acetone-eddikesyre) viste, at denne prøve kun indeholdt en spormængde af sidekæde-syren og en tredje uidentificeret bestanddel. Det infrarøde spektrum var
- 30 konsistent for det ønskede produkt.

7-[D-2-t-butoxycarbonylamino-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre

35 A. Blandet anhydrid

En opløsning af 12,2 g (0,0434 mol) D-(-)-N-t-butoxycarbonyl-2-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)glycin i 425 ml tetrahydrofuran afkøledes til -15°C i et is-salt-acetone-bad. N-methylmorpholin (4,35 g, 0,0434 mol)

tilsattes efterfulgt af 5,87 g (0,0434 mol) isobutylchlorformiat, og reaktionsblandingen omrørtes ved -15°C i 10 minutter. Et bundfald af N-methylmorpholin,hydrochlorid udskiltes øjeblikkeligt.

5 B. Silylester

En blanding af 6,8 g (0,0217 mol) 7-amino-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, 6,02 ml (0,043 mol) triethylamin, 6,0 ml (0,0473 mol) N,N-dimethylanilin, 8,26 ml (0,0651 mol) chlortrimethylsilan og 550 ml methylenchlorid holdtes opvarmet under tilbagesvaling i 2 timer. Den uklare opløsning afkøledes, og methylenchloridet fjernedes ved reduceret tryk. Remanensen optoges i 425 ml tetrahydrofuran.

C. Kobling

15 Silylesteropløsningen afkøledes til 10°C i et isbad og sattes på én gang til blandet anhydrid-opløsningen, som holdtes ved -15°C. Kølebadet fjernedes, og reaktionsblandingen omrørtes i 2 timer. Derpå tilsattes 425 ml vand, og blandingen omrørtes i 5 minutter. Tetrahydrofuranen fjernedes ved reduceret tryk, hvad der forårsagede, at en gummiagtig
20 olie udskiltes. Olien ekstraheredes i ethylacetat, og noget uopløseligt faststof, som udskiltes, fjernedes ved filtrering. Filtratets vandige fase fraskiltes, indstilledes til pH-værdi 2,0 med 42% phosphorsyre og ekstraheredes 2 gange mere med ethylacetat. De kombinerede ethylacetat-ekstrakter udvaskedes 3 gange med vand, tørredes over natriumsulfat, og
25 opløsningsmidlet fjernedes ved reduceret tryk efterladende en viskos olie. Olien opløstes i 30 ml acetone, og denne opløsning sattes dråbevis til et grundigt omrørt 300 ml volumen vandfri diethylether. Blandingen omrørtes ved stuetemperatur i 2,5 timer. Det uopløselige faststof, som udskiltes, samledes ved filtrering og luft-tørredes. En TLC (silicagel,
30 opløsningsmiddel 99:1 acetone-eddikesyre) af produktet viste, at materialet var en blanding af det ønskede produkt, sidekædesyren og en tredje uidentificeret bestanddel. Faststoffet omrørtes igen i 80 ml vandfri diethylether i 1 time. Det uopløselige materiale samledes ved filtrering, udvaskedes sparsomt med vandfri diethylether og luft-
35 tørredes til dannelse af 5,8 g (46,5%) 7-[D-2-t-butoxycarbonylamino-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre. En TLC (silicagel; opløsningsmiddel 99:1 acetone-eddikesyre) viste, at denne prøve kun indeholdt et soor af sidekæde-

syren og en tredje uidentificeret bestanddel. Det infrarøde spektrum var konsistent for det ønskede produkt.

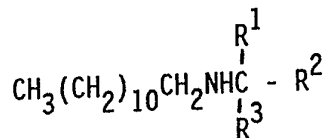
5 7-[D-2-amino-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre

7-[D-2-t-butoxycarbonylamino-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (0,95 g, 0,002 mol) sattes til 15 ml kold trifluoreddikesyre, og opløsningen omrørtes i 15 minutter. Trifluoreddikesyreopløsningen hældtes derpå i 10 200 ml 2:1 "Skellysolve B"vandfri diethylether, og blandingen afkøledes. Det udfældede trifluoreddikesyresalt af produktet, 7-[D-2-amino-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, samledes ved filtrering, udvaskedes med 2:1 "Skellysolve B"-vandfri diethylether og tørredes i vakuum over 15 phosphorpentoxid resulterende i 0,75 g stof.

Saltet (0,75 g) opslæmmedes i 50 ml vand, 25 ml "Amberlite LA-1"-harpiks-acetatform (25% i methylisobutylketon) og 25 ml methylisobutylketon og omrørtes ved stuetemperatur i 2 timer.

Faserne adskiltes, og methylisobutylketonlaget ekstraheredes én 20 gang med vand. De vandige faser kombineredes og ekstraheredes derefter 8 gange med diethylether. Den vandige fase filtreredes, og opløsningsmidlet fjernedes ved reduceret tryk. Remanensen tritureredes med methylisobutylketon til dannelse af et faststof. Stoffet samledes ved 25 ved 65°C i vakuum over phosphorpentoxid til dannelse af 0,36 g (59,0%) 7-[D-2-amino-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre; dekomponering >150°C. Det infrarøde og det kernemagnetiske resonansspektrum var konsistente for 30 det ønskede produkt.

"LA-1"-harpiks er en blanding af sekundære aminer, hvori hver enkelt sekundær amin har den almene formel



35

hvori enhver af R^1 , R^2 og R^3 er et monovalent alifatisk carbonhydridradikal, hvori R^1 , R^2 og R^3 tilsammen indeholder fra 11 til 14 carbon-

atomer. Denne særlige blanding af sekundære aminer, som der undertiden heri henvises til som "Flydende aminblanding nr. II", er en klar ravgul væske med de følgende fysiske egenskaber: Viskositet ved 25°C på 70 centipoise; massefylde ved 20°C på 0,826 g/cm³; brydningsindeks ved 25°C på 1,4554; destillationsinterval ved 10 mm Hg, op til 170°C - 0,5%, 170-220°C - 3%, 220-230°C - 90% og over 230°C - 6,5%.

7-[D-2-amino-(3'-methyl-4'-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre kaldes også BL-S638.

10 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)glycin

En opløsning af 59,2 g (0,6 mol) 75% glyoxylsyre i 100 ml vand sættes til en opløsning af 62,07 g (0,5 mol) 2-methoxyphenol og 140 ml koncentreret ammoniumhydroxid i 400 ml vand ved stuetemperatur. Blandings temperaturen steg til 35°C. Blandingen omrørtes ved stuetemperatur i 15 65 timer. Produktet, som udkrystalliserede, samledes ved filtrering, udvaskedes med vand, derpå acetone og tørredes i vakuum over phosphor-pentoxid til dannelse af 57,4 g (58,2%) 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-glycin; dekomponering 218-220°C (litteratur 240°C). Det infrarøde og det kernemagnetiske resonansspektrum var konsistente for det ønskede 20 produkt.

Analyse for C₉H₁₁NO₄:

Beregnet: C 54,82; H 5,62; N 7,10

Fundet: C 53,77; H 5,91; N 6,97; H₂O, 1,13

Fundet, korrigeret for 1,13% H₂O: C 54,38; H 5,85; N 7,05.

25 Reference: B. Block, Z. Physiol. Chem., **98**, 226 (1917).

Opspaltning af 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)glycin

A. Methyl-2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)glycinat

30 En afkølet opløsning af 94 g (0,476 mol) 2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)glycin i 500 ml absolut methanol gennemstrømmedes med stor hastighed med HCl-damp i 20 minutter. Først opnåedes en klar opløsning, og derpå udskiltes krystallinsk produkt i større mængde. Efter 20 timers forløb filtreredes methylester-hydrochloridet, hvorpå det udvaskedes 35 sparsomt med methanol; 99,6 g efter luft-tørring. En afkølet opløsning af hydrochloridet i 800 ml vand indstilledes til pH-værdi 8 (NaOH) resulterende i et krystallinsk bundfald af esteren som fri base; 81,3 g. IR- og NMR-spektrene var konsistente.

Analyse for $C_{10}H_{13}NO_4$:

Beregnet: C 56,86; H 6,20; N 6,63.

Fundet: C 56,46; H 6,28; N 6,55; H_2O 0,59.

5 B. D-(-)-2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)glycin

En blanding af 50 g (0,237 mol) methyl-2-(3'-methoxy-4'-(hydroxyphenyl)glycinat, 19 ml (0,333 mol) eddikesyre og 1 liter i-PrOH (isopropylalcohol) opvarmedes til kogning resulterende i en delvis opløsning. Dibenzoyl-d-vinsyre, monohydrat (89,2 g, 0,237 mol) tilsattes under god omrøring, og derpå opvarmedes blandingen under tilbagesvaling. Snart begyndte saltet at udkrystallisere. Varmen afbrødes, og kolben henstod til langsom afkøling til stuetemperatur. Efter afkøling i et isbad samledes bundfaldet ved filtrering. Filtratet koncentreredes til omkring 1/3 af dets oprindelige volumen, resulterende i en lille anden portion salt; total udbytte af begge portioner 54,1 g efter luft-tørring (fast A, se herunder).

Filtratet koncentreredes til fjernelse af opløsningsmiddel. Den viskose remanens kombineredes med 300 ml 1N HCl, og blandingen ekstraheredes med 400 ml $CHCl_3$. $CHCl_3$ -fasen ekstraheredes 2 gange med 100 ml portioner af 1N HCl. De kombinerede HCl-ekstrakter koncentreredes kortvarigt til fjernelse af rest- $CHCl_3$ og opvarmedes under tilbagesvaling i 1 time. Opløsningen koncentreredes til et lille volumen, hvad der forårsagede, at aminosyre-HCl-saltet udkrystalliserede. Produktet samledes ved filtrering og omkrystalliseredes fra 50 ml 1N HCl. En opløsning af produktet i 200 ml vand indstilledes til pH-værdi 4,5 (NaOH). Blandingen opvarmedes omtrent til kogning og henstod til afkøling til udfældning af D-(-)-2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)glycin som fnugagtige nålelignende krystaller. Efter afkøling natten over samledes produktet ved filtrering, udvaskedes sparsomt med vand og methanol og tørredes ved 40°C; 8,7 g, $[\alpha]_D^{24} -136,5^\circ$ (C=1, 1N HCl). IR- og NMR-spektrene var fuldt konsistente.

Analyse for $C_9H_{11}NO_4 \cdot H_2O$:

Beregnet: C 50,23; H 6,09; N 6,51; H_2O , 8,37.

Fundet: C 50,43; H 6,23; N 6,51; H_2O , 8,95.

35

C. L-(+)-2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)glycin

Fast A (se ovenfor) (54,1 g) opslæmmedes i 300 ml 1N HCl og 500 ml $CHCl_3$ under god omrystning. Saltet opløstes ikke straks i dette system,

derfor fraskiltes CHCl_3 så godt som muligt, og 300 ml MIBK tilsattes under god omrystning. MIBK-fasen ekstraheredes med yderligere 200 ml 1N HCl i 3 portioner. De kombinerede og filtrerede HCl-ekstrakter koncentreredes kortvarigt til fjernelse af rest-opløsningsmidler og opvarmedes under tilbagesvaling i 1 time til hydrolysering af esteren. Reaktionsblandingen koncentreredes til et lille volumen. Efter afkøling i et isbad samledes det krystallinske aminosyre-HCl-salt ved filtrering. Saltet omkrystalliseredes fra 75 ml 1N HCl og opløstes i 500 ml vand under opvarmning, opløsningen blankfiltreredes og indstilledes til pH-værdi 4,5 (NaOH), hvad der forårsagede, at zwitterionen udkrystalliserede. Blandingen opvarmedes til kogning, filtreredes og henstod i kulden til udfældning af det krystallinske produkt, L-(+)-2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)glycin. Produktet samledes ved filtrering, udvaskedes sparsomt med vand og methanol og tørredes ved 40°C ; 9,6 g, $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +127,2^\circ$ (C=1, 1N HCl). IR- og NMR-spektrene var konsistente.

Analyse for $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_4, \text{H}_2\text{O}$:

Beregnet: C 50,23; H 6,09; N 6,51; H_2O , 8,37.

Fundet: C 50,53; H 6,06; N 6,62; H_2O , 7,46.

20 Natrium-D-N-(2-methoxycarbonyl-1-methylvinyl- α -amino- α -(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)acetat

Til en omrørt opløsning af 3,02 g (0,078 mol) NaOH i 320 ml methanol sættes 0,08 mol D-(-)-2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)glycin, og den resulterende blanding opvarmes under tilbagesvaling, medens en opløsning af 9,6 ml (0,088 mol) methyl-acetoacetat i 80 ml methanol tilsættes i løbet af en 30 minutters periode. Efter yderligere 30 minutters tilbagesvaling afdestilleres methanolen, medens toluen tilsættes med samme hastighed, således at næsten det samme indholdsvolumen opretholdes. Når indholdstemperaturen når 100°C afkøles opslæmningen i isvand i 4 timer, filtreres, udvaskes godt med toluen, luft-tørres og vakuum-tørres over P_2O_5 til konstant vægt til dannelse af fast natrium-D-N-(2-methoxycarbonyl-1-methylvinyl)- α -amino- α -(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)acetat.

35 D-(-)-2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)glycylchlorid, hydrochlorid fremstilles i en høj grad af renhed og højt udbytte ved den følgende fremgangsmåde:

Omkring 0,06 mol D-(-)-2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)glycin

opslættes i 100 ml dioxan. Opslætningen omrøres, og COCl_2 (phosgen) sendes ind, medens opslætningstemperaturen holdes ved 50 - 58°C. COCl_2 sendes ind i en totaltid på 3,5 timer. En gul opløsning opnås. Opløsningen renses med nitrogen til uddrivning af det overskydende COCl_2 .

5 HCl-gas bobles gennem opløsningen i 2,5 timer. Opløsningen omrøres, og en lille mængde fortyndes med noget ether til opnåelse af nogle krystaller, som sættes til hele portionen som korn. Opløsningen omrøres ved 20-25°C i 16 timer. Den resulterende opslætning af krystallinsk D-(-)-2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)glycylchlorid,hydrochlorid filtreres til

10 samling af produktet. Filterkagen udvaskes med dioxan og methylenchlorid, og tørres derefter i en vakuum-exsiccator over P_2O_5 til dannelse af omkring 7 g D-(-)-2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)glycylchlorid,hydrochlorid.

15 D-(-)-N-(t-butoxycarbonyl)-2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)glycin

En blanding af 8,6 g (0,04 mol) D-(-)-2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)glycin, 3,2 g (0,08 mol) magnesiumoxid, 9,7 g (0,068 mol) t-butoxycarbonylazid og 240 ml 1:1 dioxan-vand omrørtes og holdtes opvarmet ved 45-50°C i 20 timer under en nitrogenatmosfære. Den afkølede

20 reaktionsblanding fortyndedes med 240 ml isvand, filtreredes og ekstraheredes én gang med ethylacetat. Den surgjorte (pH-værdi 2) vandige fase ekstraheredes 5 gange med ethylacetat. De kombinerede og tørrede (Na_2SO_4) ethylacetatekstrakter koncentrerades til fjernelse af opløsningsmiddel ved reduceret tryk resulterende i produktet som en viskos

25 olie; 6,3 g.

Opspaltning af 2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)glycin

A. (-)-2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)glycin,d-10-camphorsulfonat

30 En blanding af 5,0 g 2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)glycin, 50 ml iseddikesyre og 2,5 ml H_2O opvarmedes til dannelse af en opløsning. Den varme opløsning blankfiltreredes og henstod ved stuetemperatur i 18 timer til udkrystallisering resulterende i 1,78 g af saltet. Omkrystallisation fra 15 ml eddikesyre efterfulgt af tørring ved 40°C gav

35 1,54 g (-)-2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-glycin,d-10-camphorsulfonat; delvis dekomponering 164-170°C, derpå dekomponering 175-180°C,

$[\alpha]_D^{24} = -35,3^\circ$ (C=1, H_2O).

De kombinerede eddikesyrefiltrater koncentrerades til et lille

volumen ved reduceret tryk. Det krystallinske faststof frafiltreredes og omkrystalliseredes fra 15 ml eddikesyre resulterende i, efter tørring ved 40°C, en anden portion produkt; 2,48 g, dekomponering 164-170°C, $[\alpha]_D^{24} = -32,2^\circ$ (C=1, H₂O).

5

B. (-)-2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)glycin

En 1,2 g portion af den første portion (-)-2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)glycin, d-10-camphorsulfonat opløstes i 12 ml vand, og opløsningen indstillede til pH-værdi 4,5 med fortyndet vandig NH₄OH. Blandingen opvarmedes til dannelse af en opløsning. Opløsningen henstod til afkøling først ved stuetemperatur, derpå ved 5°C til udkrystallisering af aminosyren. Produktet frafiltreredes, udvaskedes sparsomt med nogle få dråber vand og methanol og tørredes ved 40°C resulterende i 0,37 g (-)-2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)glycin; dekomponering 210-212°C, $[\alpha]_D^{24} = -137,6^\circ$ (C=1, 1N HCl).

15

Analyse for C₉H₁₁NO₄:

Beregnet: C 54,82; H 5,62; N 7,10.

Fundet: C 54,37; H 5,90; N 7,21; H₂O, 0,71.

20 C. (-)-2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)glycin

En blanding af 200 g 2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-glycin,hydrat, 260 g d-10-camphorsulfonsyre, 2 l iseddikesyre og 100 ml vand opvarmedes til dannelse af en opløsning og blankfiltreredes. Opløsningen podedes med krystalkorn og henstod ved stuetemperatur i 3 dage til udkrystallisering af saltet; 76 g. Saltet omkrystalliseredes fra 400 ml eddikesyre; 71,0 g.

25

Filtratet fra den første portion salt koncentreredes til omkring halvdelen af dets oprindelige volumen, og produktet henstod til udkrystallisering; 118,5 g. Produktet omkrystalliseredes fra 500 ml eddikesyre resulterende i, efter luft-tørring, 105,2 g (-)-2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)glycin, d-10-camphorsulfonat.

30

Koncentreret NH₄OH sattes dråbevis under god omrøring til en opløsning af 71,0 g af camphorsulfonatsaltet i 150 ml vand plus 150 ml methanol. Blandingen, som snart blev meget tyktflydende, opvarmedes til 50°C, og den dråbevis tilsætning af NH₄OH fortsattes til pH-værdi 4,5. Efter isafkøling frafiltreredes produktet, udvaskedes sparsomt med kold 1:1 MeOH-vand og kold methanol resulterende i, efter tørring i en vakuumovn ved 40°C, 34,5 g (-)-2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)glycin;

35

dekomponering 204-206°C, $[\alpha]_D^{22} = -132,4^\circ$ (C=1, 1N HCl).

Analyse for $C_9H_{11}NO_4, H_2O$:

Beregnet: C 50,23; H 6,09; N 6,51.

Fundet: C 49,96; H 6,12; N 6,61.

5

(-)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)glycin

En blanding af 9,2 g (-)-2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)glycin og 50 ml 48% hydrogenbromidsyre opvarmedes under tilbagesvaling i 4 timer.

Opløsningen afkøledes i is resulterende i et krystallinsk bundfald, som

10 samledes ved filtrering og tørredes ved 40°C; udbytte 1,8 g, smeltepunkt 248-250°C dekomponering med forudgående mørkfarvning over ca. 200°C,

$[\alpha]_D^{22} = -42,1^\circ$ (C=1, H_2O).

Analyse for $C_8H_9NO_4, HBr, 1/2 H_2O$:

Beregnet: C 35,18; H 4,06; N 5,13; H_2O , 3,30

15 Fundet: C 35,26; H 4,01; N 5,32; H_2O , 3,20.

Det konkluderedes, at dette stof var en 3:1 sammensætning af (-)- og (+)-isomere af 2-(3,4-dihydroxyphenyl)glycin, HBr.

Filtratet koncentreredes til et lille volumen. Den krystallinske masse, som udskiltes, samledes ved filtrering (filtratet tilbage-

20 holdtes). Råproduktet omkrystalliseredes fra 20 ml eddikesyre. Produktet

udvaskedes på filteret med methylisobutylketon og vandfri ether til dannelsen af 3,0 g hvidt krystallinsk (-)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-glycin, hydrobromid; smeltepunkt 106-109°C, $[\alpha]_D^{22} = -85,0^\circ$ (C=1, H_2O).

Analyse for $C_8H_9NO_4, HBr, H_2O$:

25 Beregnet: C 34,06; H 4,29; N 4,97; H_2O , 6,37.

Fundet: C 43,07; H 4,17; N 4,99; H_2O , 6,80.

Eddikesyre-filtratet koncentreredes til fjernelse af opløsningsmiddel. Til den olieagtige remanens sættes 75 ml methylisobutylketon, og

30 produktet henstod til udkrystallisering først ved stuetemperatur og

derpå i et isbad. Produktet frafiltreredes, udvaskedes med methylisobutylketon og vandfri ether til dannelsen af yderligere 1,5 g hvidt

krystallinsk (-)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)glycin, hydrobromid; smeltepunkt 106-108°C, $[\alpha]_D^{22} = -84,5^\circ$ (C=1, H_2O).

Analyse for $C_8H_9NO_4, HBr, H_2O$:

35 Beregnet: C 34,06; H 4,29; N 4,97; H_2O , 6,39.

Fundet: C 33,79; H 4,31; N 4,94; H_2O , 7,08.

Filtratet fra det rå HBr-salt koncentreredes til fjernelse af opløsningsmiddel. Den krystallinske remanens opløstes i 8 ml vand, og

opløsningen indstilledes til pH-værdi 4,5 med koncentreret vandig NH_4OH , hvad der forårsagede, at zwitterionen udkrystalliserede. Blandingen fortyndedes med en lige mængde methanol og afkøledes i is i 1 1/2 time. Produktet, (-)-2-(3,4-dihydrophenyl)glycin, frafiltreredes, udvaskedes
 5 sparsomt med 1:1 MeOH-H₂O og MeOH, og tørredes i 2 timer ved 40°C; udbytte 0,536 g, utydelig dekomponering 234-238°C med forudgående mørkfarvning over ca. 220°C, $[\alpha]_D^{22} = -158,2^\circ$ (C=1, 1N HCl).

Analyse for $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_4$:

Beregnet: C 52,46; H 4,95; N 7,65.

10 Fundet: C 51,82; H 5,03; N 7,75.

7-[D- α -amino-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-4-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre

En blanding af 4,27 g (0,01365 mol) 7-amino-3-(1,2,3-triazol-4-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, 6,64 g (0,041 mol) 1,1,1,3,3,3-hexamethylidisilazan og 200 ml methylenchlorid opvarmedes under tilbagesvaling i 4 timer til dannelse af en klar opløsning. Efter henstand natten over ved stuetemperatur fjernedes opløsningsmidlet ved reduceret tryk. Remanensen opløstes i 150 ml tetrahydrofuran, opløsningen afkøle-
 15 des til 0 til 5°C før anvendelse.

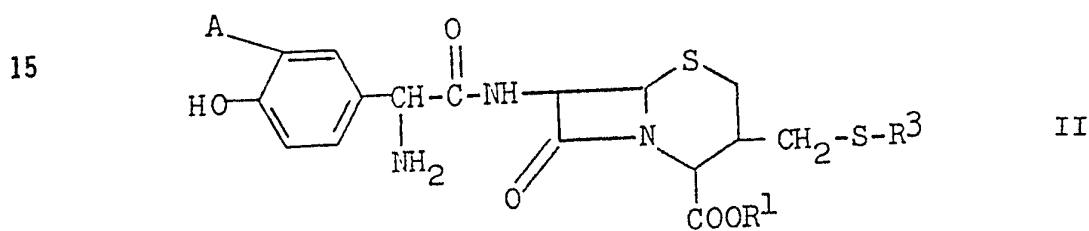
N-methylmorpholin (3,06 ml, 0,0273 mol) og 3,48 ml (0,0273 mol) isobutylchlorformiat sættes til en opløsning af 8,1 g (0,0273 mol) D-(-)-N-(t-butoxycarbonyl)-2-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)glycin i 300 ml tetrahydrofuran ved -15°C. Blandingen omrørtes ved -15°C i 6 minutter
 25 til dannelse af det blandede anhydrid.

Tetrahydrofuranopløsningen af silylesteren ved 0 til 5°C sættes til det blandede anhydrid ved -15°C. Efter 10 minutters forløb fjernedes kølebadet, og blandingen omrørtes endnu 2,5 timer. Vand (250 ml) sættes til reaktionsblandingen, og blandingen koncentrerades ved reduceret tryk
 30 til fjernelse af det meste af tetrahydrofuranen. Det vandige koncentrat gjordes sur med 42% phosphorsyre og ekstraheredes 3 gange med ethylacetat. Blandingen filtreredes i løbet af den første ekstraktion til fjernelse af en lille mængde uopløselig stof. De kombinerede ethylacetatekstrakter udvaskedes én gang med vand, tørredes (Na_2SO_4) og
 35 koncentrerades til tørhed. Remanensen tritureredes med vandfri ether til dannelse af 2,8 g faststof.

En opløsning af faststoffet (2,8 g) og 50 ml 97% myresyre omrørtes ved stuetemperatur i 2 timer. Myresyren afdestilleredes ved reduceret

tryk. Remanensen azeotroperedes med toluen til fuldstændig fjernelse af myresyre. Remanensen triturededes med vådt ethylacetat resulterende i (efter tørring i 2 timer i vakuum ved 65°C over phosphorpentoxid) 1,42 g 7-[D- α -amino-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-4-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre; dekomponering gradvist over omkring 165°C. IR- og NMR-spektrene var konsistente. 7-[D- α -amino-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-4-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre kaldes også BL-S689.

10 Forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse fremstilles ved omsætning af et aldehyd, som har strukturen R^2 -CHO (hvor R^2 har den tidligere anførte betydning) med en cephalosporin, som har den almene formel



20 hvori A, R^1 og R^3 har de tidligere anførte betydninger. I de foretrukne udførelsesformer har carbonatomet, som er forbundet til α -aminogruppen, D-konfiguration. De sidstnævnte forbindelser med formel II fremstilles ved de sædvanlige, og ofte specifikke, fremgangsmåder, som er anført i

25 de følgende patentskrifter USA patentskrifter nr. 3.641.021, 3.899.394, 3.855.213 og 3.867.380, sydafrikansk patentskrift nr. 73/4055, belgiske patentskrifter nr. 776.222 (Farmdoc 38983T) og 810.477 (Farmdoc 57268V), vesttyske patentskrifter nr. 2.364.192 (Farmdoc 49048V) og 2.500.386 (Farmdoc 49692W), belgisk patentskrift nr. 814.727 (Farmdoc 82562V) og

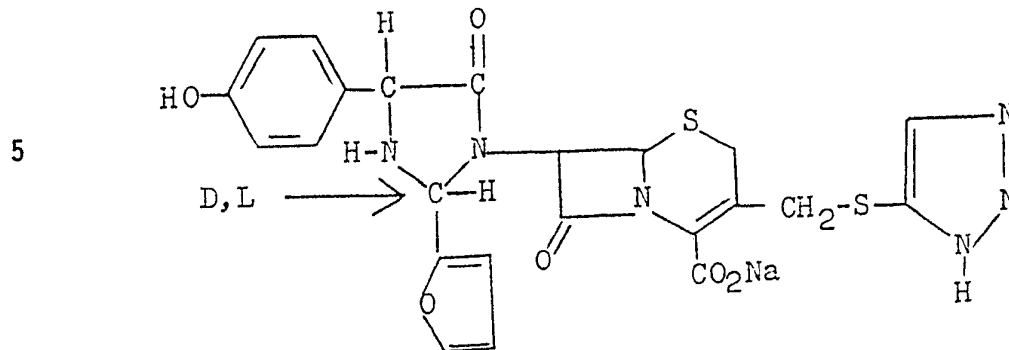
30 vesttysk patentskrift nr. 2.404.592 (Farmdoc 57268V).

En alternativ fremgangsmåde til fremstilling af de som udgangsmaterialer heri anvendte amfotere cephalosporiner består i anvendelse af den passende p-hydroxy-2-phenylglycin (som kan indeholde en yderligere substituent, og hvori α -aminogruppen er passende beskyttet gennem acylering på en konventionel måde) i stedet for sidekæde-syren, f.eks. 2-phenylglycin eller tetrazol-eddikesyre, som hidtil er blevet anvendt som i USA patentskrifterne nr. 3.813.388, 3.759.904 og 3.850.916 til fremstilling af enten 3-thiolerede cephalosporiner eller 7-substituerede cephalo-

sporansyrer, i hvilke 3-acetoxygruppen derpå erstattes af den ønskede thiol.-Se f.eks. USA patentskrifterne nr. 3.757.012 og 3.757.015.

Reference herunder til BL-S640 henviser til 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)3-cephem-4-carboxylsyre, som også kaldes cefatrizin. Reference til propylen-
5 glycolatet deraf henviser til det ovenfor beskrevne 1,2-propylenglycol-solvat. Reference til BL-S643 henviser til 7-[D- α -amino- α -(p'-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(2-methyl-1,3,4-thiadiazol-5-yl-thiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, som også kendes som cefaparol.

10 De følgende eksempler er anført til belysning af, men ikke til begrænsning af den foreliggende opfindelse, idet de foretrukne udførelsesformer er beskrevet.

Eksempel 1

Til 0,34 ml furfural (2-furfuraldehyd), opløst i 10 ml vand, sættes under omrøring 2 g (1 ækvivalent) af methanolsolvatet af 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre. 4N natriumhydroxid tilsættes under hurtig omrøring til opretholdelse af pH-værdien på 6,2 til 6,5. Den dannede opløsning henstod ved stuetemperatur i 1 time og lyofiliseredes til dannelse af produktetsnatriumsalt som et faststof.

Stoffets egenskaber:

IR-NMR konsistent for produkt.

20 β -lactam intakt.

Triazol intakt.

Eksempel 2

Fremgangsmåden i eksempel 1 gentages med den undtagelse, at det deri anvendte methanolsolvat-udgangsmateriale erstattes med en ækvimolær mængde 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-cephem-4-carboxylsyre, sesquihydrat. Der fremstilles natriumsalt, som er identisk med det i eksempel 1 opnåede.

30

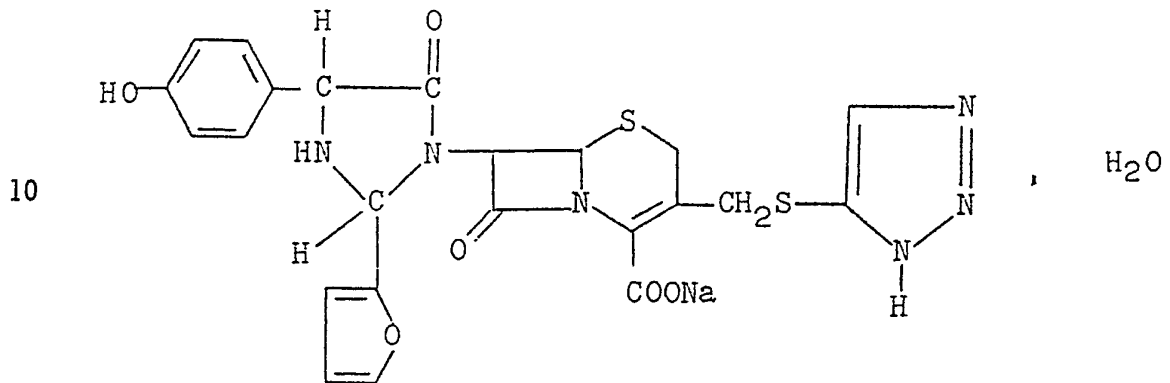
35

Eksempel 3

Fremstilling af BL-S1052, natriumsaltet af reaktionsproduktet af 2-furfuraldehyd og BL-S640

Formel, BL-S1052

5



15

Fremgangsmåde

1) 2 7/10 ml (3,13 g, 1,1 ækvivalent) 2-furfuraldehyd opløses i 50 ml vand ved 20 til 30°C under hurtig omrøring.

2) 15 g BL-S640-methanoladdukt tilsættes over et 10 minutters interval med samtidig tilsætning af 40% natriumhydroxid indtil pH-værdi 5,5-6,0 (pH-værdien må ikke stige over 6,5). En lysorange farvet opløsning eller næsten opløsning opnås.

3) Opløsningen filtreres gennem passende filtre til fjernelse af partikler, pyrogener og bakterier. Trinnene 1 og 2 tilsammen bør fuldføres inden for 2 timer.

4) Der lyofiliseres i 48 timer, hvorpå faststofferne henstår under vakuum ved 50-56°C i 24 timer. Det resulterende faststof er BL-S1052 (BL-S-1052 kan også opnås fra opløsningen i trin 3 ved udfældning fra 15 til 20 volumina steril isopropanol).

30

Egenskaber af BL-S1052

1) Bio-prøve = 775-800 µg/mg.

2) IR-NMR = a) Veldefineret, konsistent.

b) Ved omtrent 60 mg/ml i D2O fremtræder 2 produkter, 40% cyclisk addukt, 60% ikke-cyclisk addukt.

35

c) β-lactam og 3-triazol er intakte.

3) Opløselighed = større end 400 mg/ml.

- 4) Papirstrimmel-chromatografi = en enkelt zone ved R_f for BL-S640.
(Koncentration = 0,2 mg/ml).
- 5) Væske-chromatografi (koncentration = 1 mg/ml).

	Tid i timer	% fri BL-S640 tilstede
	-----	-----
5	0	69,2
	1	74,2
10	2	94,5

6) Analytiske data

	<u>Fundet</u>	<u>På tør basis</u>	<u>Teoretisk</u>
	5,35	--	--
15	47,45	50,2	49,2
	3,72	3,4	3,39
	14,45	15,29	14,95
	10,34	10,92	11,4
	2,18	2,51	4,1

20

Antibiotisk spektrum i næringssubstrat

Organisme	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	BL-S640	BL-S1052 (1)
<i>S. pneumoniae</i> ⁺ (10 ⁻³)** A9585	0,06	0,06
<i>Str. pyogenes</i> ⁺ (10 ⁻³)** A9604	0,03	0,03
<i>S. aureus</i> Smith (10 ⁻⁴) A9537	0,13	0,13
<i>S. aureus</i> +50% serum (10 ⁻⁴) A9537	2	2
<i>S. aureus</i> BX1533 (10 ⁻³) A9606	0,25	0,25
<i>S. aureus</i> BX1533 (10 ⁻²) A9606	4	2
<i>S. aureus</i> Meth.-Res (10 ⁻³) A15097	8	4
<i>Sal. enteritidis</i> (10 ⁻⁴) A9531	0,25	0,13
<i>E. coli</i> Juhl (10 ⁻⁴) A15119	0,5	1
<i>E. coli</i> (10 ⁻⁴) A9675	2	2
<i>K. pneumoniae</i> (10 ⁻⁴) A9977	0,5	0,5
<i>K. pneumoniae</i> (10 ⁻⁴) A15130	1	1
<i>Pr. mirabilis</i> (10 ⁻⁴) A9900	0,5	0,5
<i>Pr. morganii</i> (10 ⁻⁴) A15153	32	32
<i>Ps. Aeruginosa</i> (10 ⁻⁴) A9843A	>125	>125
<i>Ser. marcescens</i> (10 ⁻⁴) A20019	>125	>125
<i>Ent. cloacae</i> (10 ⁻⁴) A9656	>125	>125
<i>Ent. cloacae</i> (10 ⁻⁴) A9657	0,5	0,5
<i>Ent. cloacae</i> (10 ⁻⁴) A9659	32	32

* 45% AAB + 5% serum + 50% substrat, anført ovenfor.

** Fortynding af substratkulturen efter henstand natten over.

- 5 1) Justeret for 79,5% indhold af BL-S640. Med andre ord er de numeriske værdier sænkede, dvs. forbedrede. Denne justering gjordes også i de nedenfor anførte testforsøg, eller som alternativ anvendtes en større vægtmængde til tilvejebringelse af ækvivalent dosering.

Museblod-koncentrationer efter IM-administrering af 10 mg/kg legemsvægt

10	Forbindelse	Antal mus	Blod-koncentrationer $\mu\text{g/ml}$)			
			timer efter administrering			
			0,25	0,5	1	1,5
	BL-S1052	16	15,1	15,1	11,5	7,8
15	BL-S640	32	15,7	13,2	9,5	6,8

Forbindelserne fremstilledes i 0,01% phosphatpuffer. BL-S640 anvendtes som standard for alle forbindelser.

20

Museblod-koncentrationer efter PO-administrering af 100 mg/kg legemsvægt

25	Forbindelse	Antal mus	Blod-koncentrationer ($\mu\text{g/ml}$)			
			timer efter administrering			
			0,5	1	2	3,5
	BL-S1052	16	45,2	48,1	31,9	14,4
	BL-S640	32	53,4	45,4	27,2	10,7

30

Forbindelserne fremstilledes i Tween[®]-CMC. BL-S640 anvendtes som standard for alle forbindelser.

35

Uriner udvinding efter IM-administrering af 50 og 10 mg/kg til rotter

5	Forbindelse	Dosis (mg/kg)	Antal rotter	Procentdel af administreret dosis udvundet timer efter administrering		
				0-6	6-24	0-24
	BL-S1052	50	4	40,3	2,1	42,4
		10	3	21,7	2,4	24,1
10	BL-S640	50	7	44,5	2,7	47,2
		10	7	24,3	1,4	25,7

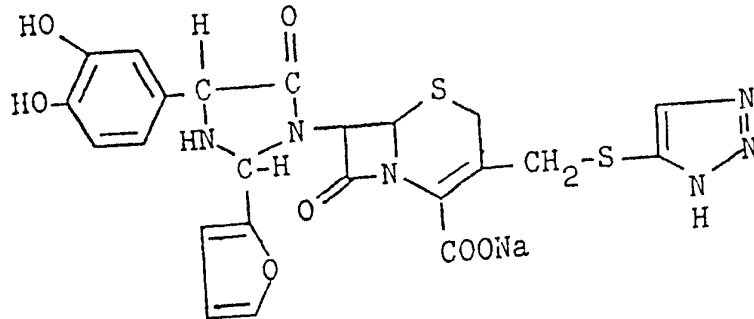
15 Forbindelserne fremstilledes i 0,01% fosfatpuffer. BL-S640
 anvendtes som standard for alle forbindelser.

20 Papirchromatogrammer opnåedes ved chromatografering på rotteurin,
 som var samlet mellem 0 og 2 og mellem 2 og 4 timer efter IM-administre-
 ring af BL-S1052 og BL-S640, til påvisning af antibiotisk aktive meta-
 25 boliter, idet der anvendtes "faldende" chromatografi med "system nr. 9"
 (butylacetat:n-butanol:iseddikesyre:vand = 80:15:40:24). 2 identisk
 beliggende pletter observeredes i alle tilfælde, undtagen i tilfældet
 med standarden (som ikke var blevet administreret til rotten og gav en
 enkelt identisk plet for hver af BL-S640 og BL-S1052). Dette indicerede
 fuldstændig hydrolyse af derivatet til den oprindelige forbindelse BL-
 S640 og dens formodede metabolit.

Eksempel 4

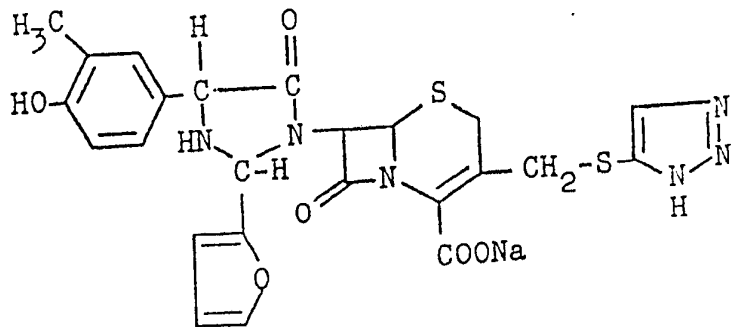
Forbindelserne med formlerne

5



10

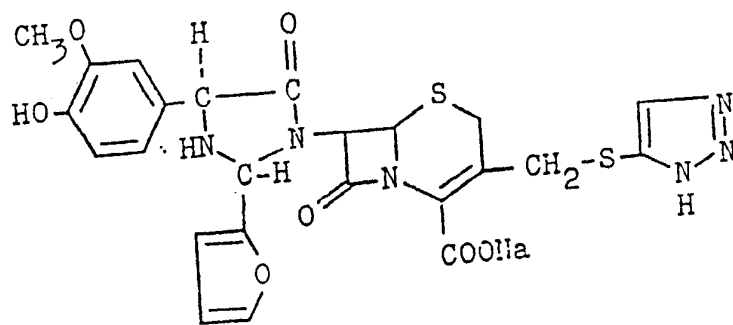
15



og

20

25



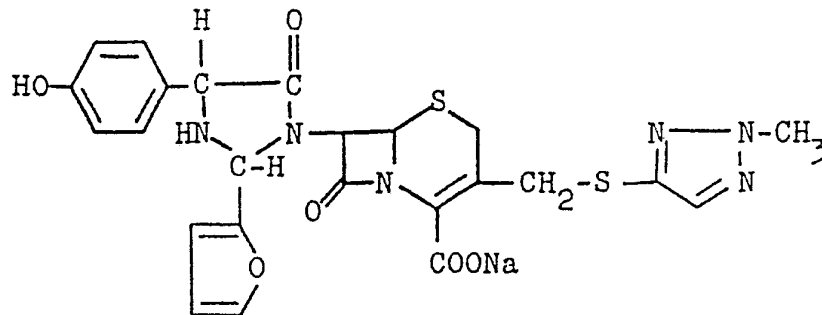
30

35 fremstilles ved udskiftning af cefatrizinen i fremgangsmåden i eksempel 3 med en ækvimolær vægtmængde af den tilsvarende amfotere cephalosporin.

Eksempel 5

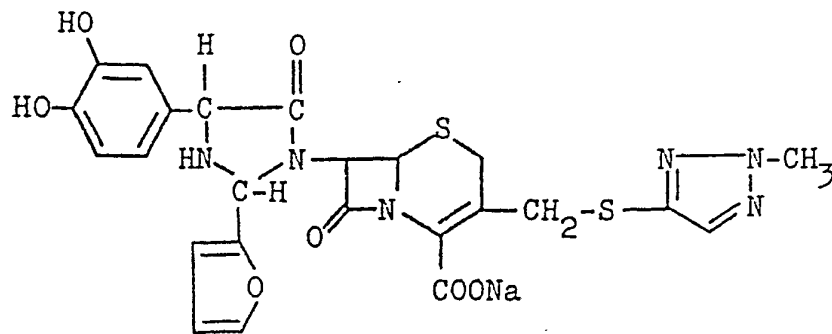
Forbindelserne med formlerne

5

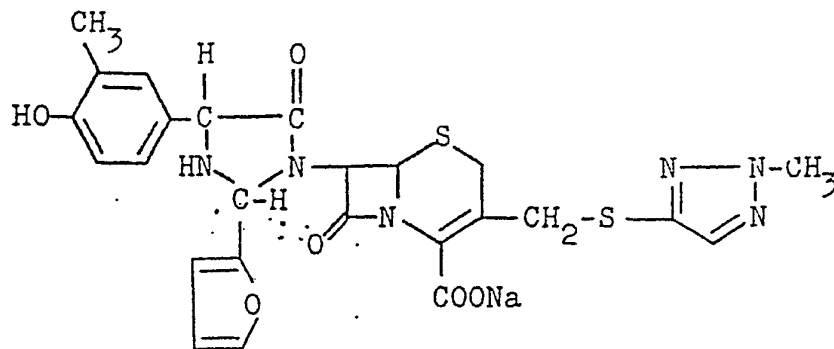


10

15

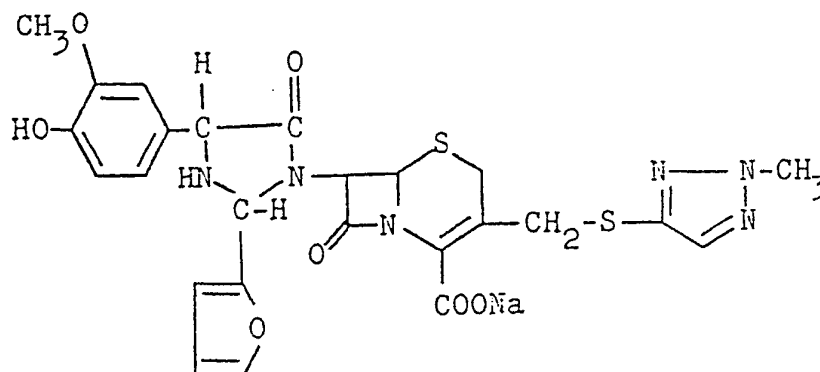


20



25

30



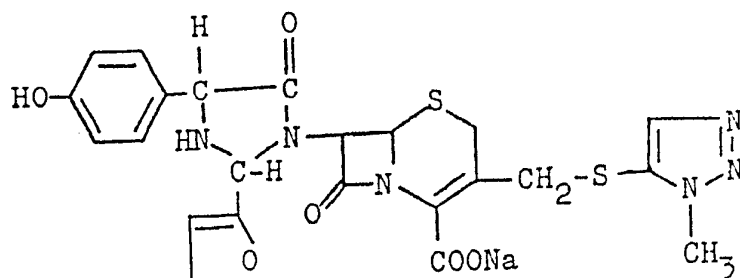
35

fremstilles ved udskiftning af cefatrizinen i fremgangsmåden i eksempel 3 med en ækvimolær vægtmængde af den tilsvarende amfotere cephalosporin.

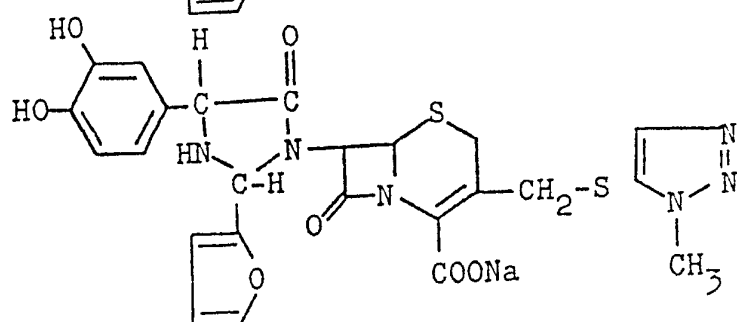
Eksempel 6

Forbindelserne med formlerne

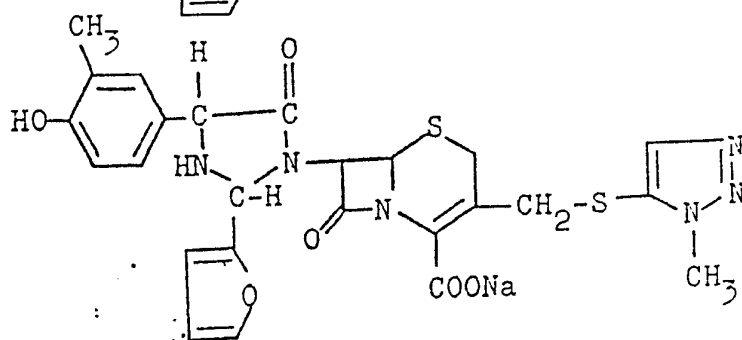
5



10

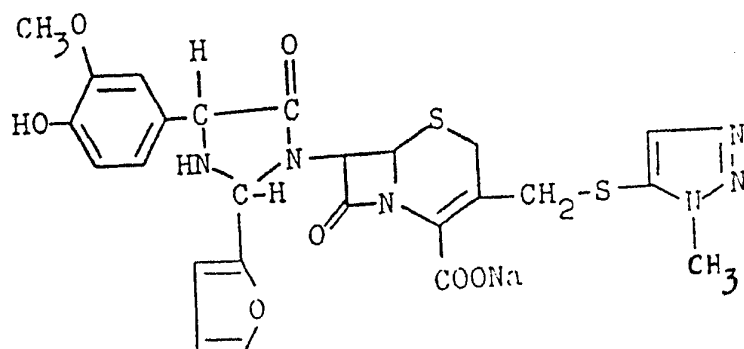


15



20

25



30

35

fremstilles ved udskiftning af cefatrizinen i fremgangsmåden i eksempel 3 med en ækvimolær vægtmængde af den tilsvarende amfotere cephalosporin.

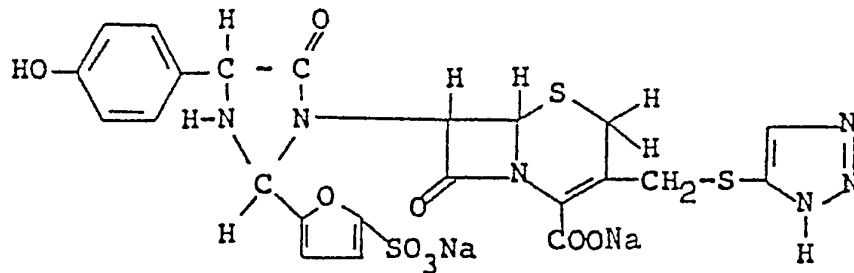
Eksempel 7

Reaktionsprodukt af BL-S640 og 5-formyl-2-furansulfonsyre-natriumsalt
(BL-S1027)

Formel, BL-S1027

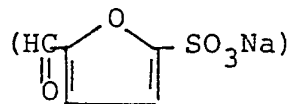
5

10

Fremgangsmåde til fremstilling

15

1) 9,0 g 5-formyl-2-furansulfonsyre-natriumsalt



20 opslættes i 75 ml vand ved 60°C.

2) 20 g (1 ækvivalent) BL-S640-1,2-propylenglycoladdukt drysses i under hurtig omrøring over en 10 minutters periode med samtidig justering af pH-værdien til 6-7,0. En opløsning eller næsten opløsning dannes.

25 3) Opløsningen omrøres ved 55-60°C, pH-værdi 6-7,0 i 10 minutter og afkøles derefter til 4-8°C. En lille mængde bundfald dannes.

4) Blandingen omrøres i 15 minutter ved 4-8°C og filtreres derefter.

30 5) Filtratet sættes over et 5 minutters interval til 1 liter isopropanol under hurtig omrøring. Et tungt bundfald dannes. Blandingen opslættes i 5 minutter.

6) Faststofferne fjernes ved filtrering, udvaskes med 200 ml isopropanol og vakuum-tørres ved 56°C i 24 timer.

35 7) Faststofferne opløses i 60 ml 4-6°C vand (en lille mængde uopløselige stoffer fjernes ved filtrering). Filtratet lyofiliseres i 24 timer.

Udbytte: 23 g, bio-udbytte = 89%.

Egenskaber af BL-S1027

- 1) Bio-prøve som BL-S640 = 724 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (teoretisk = 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$).
- 2) Opløselighed = >500 mg/ml.
- 3) IR-NMR: Konsistent for struktur. Ved 70 mg/ml eksisterer
- 5 forbindelsen som 80% cyclisk, 20% ikke-cyclisk derivat.
- 4) Papirstrimmel- og væske-chromatografi indikerer, at produktet ved 0,2 og 1,0 mg/ml vandopløsning eksisterer som fri BL-S640.
- 5) MIC-bakterielt spektrum er lig med spektret af BL-S640.
- 6) Orale og intramuskulære rotteblod-koncentrationer er lig med
- 10 koncentrationen af BL-S640.
- 7) En opløsning af dette produkt i vand ved en koncentration på 25.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ var stabil (opretholdt fuld bioaktivitet) i mindst 3 dage ved stuetemperatur og i 14 dage ved 6°C (køleskab), hvilket således tilvejebragte en opløsning, som er velegnet for oral brug.

15

Analytiske data

		Fundet	På tør basis	Teoretisk
20	% H ₂ O	5,14	--	--
	C	40,15	42,1	43,0
	H	3,10	2,9	2,96
	N	12,39	13,05	13,1
	S	13,6	14,35	14,95
25	Aske som Na	5,86	6,16	6,8 for di-Na

Antibiotisk aktivitet i næringssubstratMIC ($\mu\text{g/ml}$)

5	Organisme	-----		
		Natriumsalt ¹ forb. f. eks. 7	BL-S640 ²	Cepha- lotin

	Str. pneumoniae* (10^{-3})**			
	A9585	0,03	0,13	0,03
10	Str. pyogenes (10^{-3})**			
	A9604	0,03	0,06	0,03
	S. aureus Smith (10^{-4})			
	A9537	0,27	0,5	0,13
15	S. aureus + 50% serum (10^{-4})			
	A9537	2	4	0,5
	S. aureus (10^{-3})			
20	BX1633 A9606	0,5	0,5	0,13
	S. aureus BX1633 (10^{-2})			
	A9606	4	4	0,25
25	S. aureus Meth-Res (10^{-3})			
	A15097	4-8	8-16	1-16
	Sal. enteritidis (10^{-4})			
	A9531	0,25	0,25	0,25
30	E. coli Juhl (10^{-4})			
	A15119	1	1	16
	E. coli (10^{-4})			
35	A9675	4	4	32

Antibiotisk aktivitet i næringssubstrat
MIC ($\mu\text{g/ml}$)

5	Organisme		MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
			Natriumsalt ¹ forb. f. eks.7	BL-S640 ²	Cepha- lotin
	K. pneumoniae	(10^{-4}) A9977	0,5	0,5	1
10	K. pneumoniae	(10^{-4}) A15130	1	2	32
	Pr. mirabilis	(10^{-4}) A9900	0,5	0,5	1
15	Pr. morganii	(10^{-4}) A15153	32	63	>125
20	Ps. aeruginosa	(10^{-4}) A9843A	>125	>125	>125
	Ser. marcescens	(10^{-4}) A20019	>125	>125	>125
25	Ent. cloacae	(10^{-4}) A9656	>125	>125	>125
	Ent. cloacae	(10^{-4}) A9657	1	1	8
30	Ent. cloacae	(10^{-4}) A9659	32	63	>125

35

* 45% AAB + 5% serum + 50% substrat, anført ovenfor.

** Fortynding af substratkulturen efter henstand natten over.

¹ Disse angivelser omregnedes på basis af, at der kun var 65% BL-S640 i prøven; med andre ord sænkedes de numeriske værdier, dvs. forbedrede.

5 ² BL-S640 = 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre.

Museblod-koncentrationer efter oral administrering af 100 mg/kg

10	Forbindelse	<u>legemsvægt</u>			
		Blod-koncentration ($\mu\text{g/ml}$)			
		timer efter administrering			
		0,5	1	2	3,5

15	Forbindelse				
	fra eks. 7	45	36,6	20,4	10,4
	BL-S640 ¹	50,5	39	24,5	9,6
	Forbindelse				
20	fra eks. 7	54,6	53,5	27,6	8,2
	BL-S640 ¹	57,4	47	29,5	10,9

Forbindelserne fremstilledes Tween® - carboxymethylcellulose, og 8 mus
25 anvendtes til hver forbindelse.

¹ BL-S640, 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre anvendtes som en standard.

30 BL-S1027 er det vandopløselige derivat, som dannes når BL-S640 omsættes med furfural-natriumsulfonat. Bio-styrken er 724 $\mu\text{g/mg}$ af BL-S640-aktivitet.

Vandige opløsninger, som indeholder 250, 25 og 10 mg BL-S640-aktivitet/ml som BL-S1027 kan opbevares under afkøling (4°C) eller ved
35 stuetemperatur i mindst 24 timer uden noget betydningsfuldt tab i aktivitet.

Museblod-koncentrationer efter intramuskulær administrering af 10 mg/kg

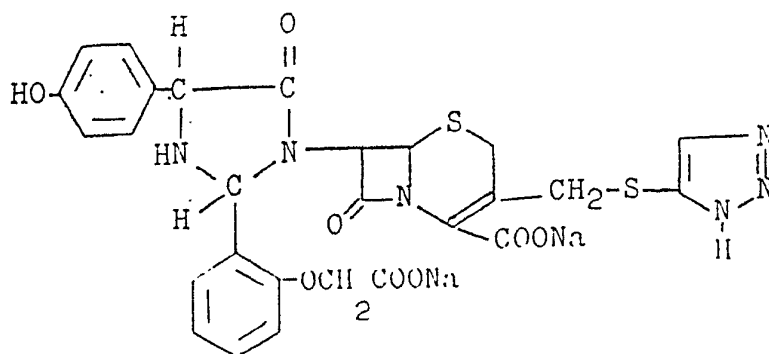
Forbindelse	legemsvægt			
	Timer efter administrering			
	0,25	0,5	1	1,5
5 -----				
Forbindelse fra				
eks. 7	16,1	14,8	11,9	8
	14,6	15,4	11,7	8,3
10 BL-S640 ¹	16,3	13,5	9,4	6,3

¹ BL-S640, 7-[D- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetaminodo]-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre anvendtes som en standard.

Forbindelserne opløstes i 0,01% fosfatpuffer.

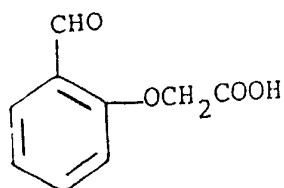
Eksempel 8

20 Reaktionsprodukt af BL-S640 og o-formylphenoxyeddikesyre (BL-S1048)



Fremgangsmåde til fremstilling

1) 375 mg o-formylphenoxyeddikesyre



opslømmes i 10 ml vand og 4N NaOH tilsættes under hurtig omrøring indtil pH-værdi 7,0. En opløsning opnås.

2) 2 g (1 ækvivalent) BL-S640, methanoladdukt tilsættes under hurtig omrøring over et 10 minutters interval med samtidig tilsætning af 4N NaOH indtil en pH-værdi på 6-6,5. En opløsning eller næsten opløsning opnås.

3) Opløsningen filtreres og henstilles ved omgivende stuetemperatur i 0,5 time.

4) Opløsningen lyofiliseres i 24 timer til dannelse af produktet som et faststof.

Egenskaber af faststof-produkt

1) IR-NMR (70 mg/ml) konsistent for struktur, triazol og β -lactam intakt.

2) Papirstrimmel- og væske-chromatografi ved 0,2 og 1 mg/ml viser, at BL-S640 er fuldstændig fri for aldehydet.

		<u>Analytiske data</u>		
		<u>Fundet</u>	<u>På tør basis</u>	<u>Teoretisk</u>
20	% vand	4,06	-	-
	C	47,15	49,2	50,1
	H	3,79	3,5	3,86
	N	11,44	11,93	13,0
	S	8,87	9,27	9,91
25	Aske			
	som Na	5,55	5,78	6,47

3) Opløselighed i vand = >400 mg/ml.

Antibiotisk spektrum i næringssubstrat

Organisme	MIC (µg/ml)		
	BL-S640	BL-S1027 (1)	BL-S1048 (2)
<i>S. pneumoniae</i> * (10 ⁻³) **A9585	0,06	0,03	0,06
<i>Str. pyogenes</i> * (10 ⁻³) **A9604	0,03	0,03	0,03
<i>S. aureus</i> Smith (10 ⁻⁴) A9537	0,13	0,25	0,13
<i>S. aureus</i> +50% serum (10 ⁻⁴) A9537	2	2	2
<i>S. aureus</i> BX1633 (10 ⁻³) A9606	0,25	0,5	0,25
<i>S. aureus</i> BX1633 (10 ⁻²) A9606	4	4	2
<i>S. aureus</i> Meth-Res (10 ⁻³) A15097	8	4	4
<i>Sal. enteritidis</i> (10 ⁻⁴) A9531	0,25	0,25	0,13
<i>E. coli</i> Juhl (10 ⁻⁴) A15119	0,5	1	0,5
<i>E. coli</i> (10 ⁻⁴) A9675	2	4	2
<i>K. pneumoniae</i> (10 ⁻⁴) A9977	0,5	0,5	0,5
<i>K. pneumoniae</i> (10 ⁻⁴) A15130	1	1	1
<i>Pr. mirabilis</i> (10 ⁻⁴) A9900	0,5	0,5	0,5
<i>Pr. morgani</i> (10 ⁻⁴) A15153	32	32	32
<i>Ps. aeruginosa</i> (10 ⁻⁴) A9843A	>125	>125	>125
<i>Ser. marcescens</i> (10 ⁻⁴) A20019	>125	125	>125
<i>Ent. cloacae</i> (10 ⁻⁴) A9656	>125	>125	>125
<i>Ent. cloacae</i> (10 ⁻⁴) A9657	0,5	1	0,5
<i>Ent. cloacae</i> (10 ⁻⁴) A9659	32	32	32

* 45% AAB + 5% serum + 50% substrat, anført ovenfor.

** Fortynding af substratkulturen efter henstand natten over.

1) Justeret for 68% indhold af BL-S640.

- 2) Justeret for 67% indhold af BL-S640. Med andre ord er de numeriske værdier sænkede, dvs. forbedrede. Denne justering gjordes også i de nedenfor anførte testforsøg, eller som alternativ anvendtes en større vægtmængde til tilvejebringelse af ækvivalent dosering.

Museblod-koncentrationer efter IM-administrering af 10 mg/kg legemsvægt

10	Forbindelse	Antal mus	Blod-koncentrationer $\mu\text{g/ml}$)			
			timer efter administrering			
			0,25	0,5	1	1,5
	BL-S1027	16	15,4	15,1	11,8	8,2
15	BL-S1048	16	14,8	14,1	10,3	7
	BL-S640	32	15,7	13,2	9,5	6,8

Forbindelserne fremstilledes i 0,01% phosphatpuffer. BL-S640
20 anvendtes som standard for alle forbindelser.

Museblod-koncentrationer efter IM-administrering af 10 mg/kg legemsvægt

25	Forbindelse	Antal mus	Blod-koncentrationer $\mu\text{g/ml}$)			
			timer efter administrering			
			0,5	1	2	3,5
	BL-S1027	16	49,8	45,1	24	9,3
	BL-S1048	16	46,5	44,6	28,1	12,8
	BL-S640	32	53,4	45,4	27,2	10,7

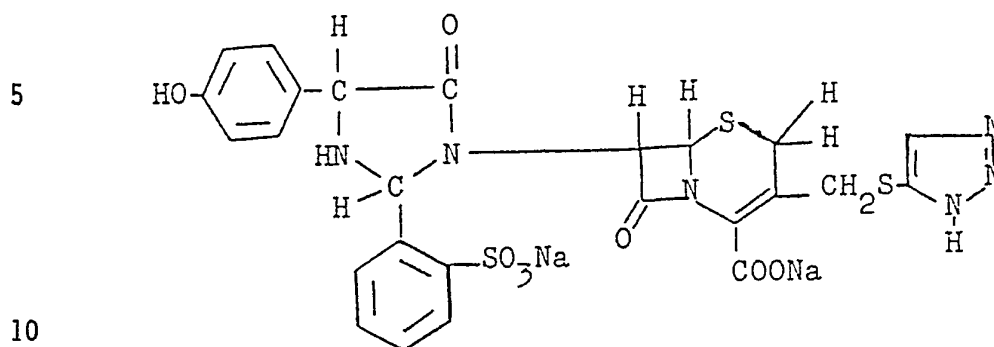
30 -----
Forbindelserne fremstilledes i Tween[®]-CMC. BL-S640 anvendtes som standard for alle forbindelser.

Urinær udvinding efter IM-administrering af 50 og 10 mg/kg til rotter

5	Forbindelse	Dosis (mg/kg)	Antal rotter	Procentdel af administreret dosis udvundet timer efter administrering		
				0-6	6-24	0-24
	BL-S1027	50	4	39,6	2,6	42,2
		10	4	30,1	1,7	31,8
10	BL-S1048	50	4	32,3	2,4	34,7
		10	4	21,7	2	23,7
	BL-S640	50	7	44,5	2,7	47,2
		10	7	24,3	1,4	25,7
15	-----					

Forbindelserne fremstilledes i 0,01% fosfatpuffer. BL-S640 anvendtes som standard for alle forbindelser.

- 20 Papirchromatogrammer opnåedes efter chromatografering på rotteurin, som var samlet mellem 0 og 2 og mellem 2 og 4 timer efter IM administrering (ved 10 mg/kg og ved 50 mg/kg) af BL-S1027, 1048 og 640 til påvisningen af antibiotisk aktive metaboliter, idet der anvendtes "faldende" chromatografi med system nr. 9 (butylacetat:n-butanol:iseddikesyre:H₂O=80:15:40:24). To identiske pletter observeredes i alle tilfælde undtagen tilfældet med standarden (ikke fra dyret), som viste en enkelt identisk plet. Dette indikerer fuldstændig hydrolyse af de 2 derivater til den oprindelige forbindelse (BL-S640).
- 25

Eksempel 9Reaktionsprodukt af BL-S640 og o-benzaldehydsulfonsyreFremgangsmåde til fremstilling

1) 870 mg o-benzaldehyd-sulfonsyre-natriumsalt opløstes i 10 ml vand.

15 2) 2 g BL-S640-methanoladdukt (1 ækvivalent) tilsættes under hurtig omrøring over et 10 minutters interval med den samtidige tilsætning af 4N NaOH indtil en pH-værdi på 6,5. En opløsning opnåedes.

3) Opløsningen filtreredes, henstod ved stuetemperatur i 1 time og lyofiliseredes i 24 timer til dannelse af det ønskede produkt som et
20 faststof.

Egenskaber af produkt

1) IR-NMR = veldefineret, konsistent for struktur.

2) Opløselighed i vand = >400 mg/ml.

25 3) Analytiske data

	<u>Fundet</u>	<u>På tør basis</u>	<u>Teoretisk</u>
% vand	3,49	--	--
C	41,88	43,4	43,3
30 H	3,41	3,3	3,25
N	11,53	12,1	12,35
S	13,74	14,25	14,24
aske			
som Na	5,45	5,63	6,77

35 -----

- 4) Bio-prøve = 700 $\mu\text{g}/\text{mg}$.
- 5) IR - NMR = a) Intakt β -lactam- og triazol-del.
b) Forbindelse fremtræder ikke som om det er et cyclisk addukt.
- 5 6) Papirstrimmel-chromatografi: Der forekommer at være en dobbeltzone ved R_f for BL-S640.
- 7) Væske-chromatografi

	<u>Tid i timer</u>	<u>%fri BL-S640</u>
10	0	64,0
	1	70,5
	2	88,0

- 8) Opløselighed i vand = større end 400 mg/ml.
- 15 9) Nummer, dette produkt kaldes BL-S1055.

Antibiotisk spektrum i næringssubstrat

Organisme	MIC (µg/ml)	
	BL-S1055 (1)	BL-S640
S. pneumoniae* (10 ⁻³) **A9585	0,06	0,03
Str. pyogenes* (10 ⁻³) **A9604	0,016	0,03
S. aureus Smith (10 ⁻⁴) A9537	0,13	0,13
S. aureus +50% serum (10 ⁻⁴) A9537	2	2
S. aureus E11533 (10 ⁻³) A9606	0,5	0,13
S. aureus E11533 (10 ⁻²) A9606	2	2
S. aureus Meth-Res (10 ⁻³) A15097	4	2
Sal. enteritidis (10 ⁻⁴) A9531	0,35	0,13
E. coli Juhl (10 ⁻⁴) A15119	1	0,5
E. coli (10 ⁻⁴) A9675	4	2
K. pneumoniae (10 ⁻⁴) A9977	0,5	0,5
K. pneumoniae (10 ⁻⁴) A15130	1	1
Pr. mirabilis (10 ⁻⁴) A9900	0,5	0,5
Pr. morgani (10 ⁻⁴) A15153	32	16
Ps. aeruginosa (10 ⁻⁴) A9843A	>125	>125
Ser. marcescens (10 ⁻⁴) A20019	125	63
Ent. cloacae (10 ⁻⁴) A9656	125	63
Ent. cloacae (10 ⁻⁴) A9657	0,5	0,5
Ent. cloacae (10 ⁻⁴) A9659	63	63

* 45% AAB + 5% serum + 50% substrat, anført ovenfor.

** Fortynding af substratkulturen efter henstand natten over.

1) Justeret for 65% indhold af BL-640.

Med andre ord er de numeriske værdier sænkede, dvs. forbedrede.

5 Denne justering gjordes også i de nedenfor anførte testforsøg, eller som alternativ anvendtes en større vægtmængde til tilvejebringelse af ækvivalent dosering.

Museblod-koncentrationer efter IM-administrering af 10 mg/kg legemsvægt

10	Forbindelse	Blod-koncentrationer $\mu\text{g/ml}$)			
		timer efter administrering			
		0,25	0,5	1	1,5
	BL-S1055 ¹	10,3	9,9	7,6	6,5
15	BL-S640	12,7	11,5	8	5,7

Forbindelserne fremstilledes i 0,01% fosfatpuffer. Værdier er middeltallet af 3 eksperimenter.

20

¹BL-S640 anvendtes som standard.

Museblod-koncentrationer efter PO-administrering af 100 mg/kg legemsvægt

25	Forbindelse	Blod-koncentrationer $\mu\text{g/ml}$)			
		timer efter administrering			
		0,5	1	2	3,5
	BL-S1055 ¹	38,2	35,7	22,0	11,3
30	BL-S640	48,7	42,4	24,0	10,1

Forbindelserne fremstilledes i Tween®-CMC. Værdier er middeltallet af 2 eksperimenter.

35 ¹BL-S640 anvendtes som standard.

Urinær udvinding efter IM-administrering af 50 og 10 mg/kg til rotter

5	Forbindelse	Antal rotter	Procentdel af administreret dosis udvundet timer efter administrering		
			0-6	6-24	0-24
	BL-S1055 ¹	3	36,6	2,4	39
	BL-S640	4	44,2	3,3	47,5

10

Forbindelserne fremstilledes i 0,01% fosfatpuffer.

¹BL-S640 anvendtes som standard.

Papirchromatogrammer opnåedes ved chromatografering på rotteurin, som samledes mellem 0 og 2 og mellem 2 og 4 timer efter IM
15 administrering af BL-S1055 og 640 til påvisningen af antibiotisk aktive metaboliter, idet der anvendtes "faldende" chromatografi med system nr. 9 (butylacetat:n-butanol:iseddikesyre:H₂O = 80:15:40:24). En enkelt identisk plet observeredes i alle tilfælde. Dette indicerer fuldstændig hydrolyse af derivatet til den oprindelige forbindelse (BL-S640).

20

Komparative orale PD₅₀-værdier af BL-S640-derivater i mus
PD50 (mg/kg/behandling)*

5	Organisme	BL-S 640	BL-S 1027	BL-S 1048	BL-S 1055	cepha- lexin
	E. coli A15119	1,4	--	3,1	1,8	13
		4,1	--	1,6	1,6	13
10	P. mirabilis A9900	7,2	6,3	4,7	8,2	66
		9,6	2,7	3,6	8,2	55
15	P. mirabilis A9707	2,4	1,8	2,4	1	50
	K. pneumoniae A9977	1,6	--	0,7	1,6	43
20	S. pyogenes A9604	0,4	--	0,2	0,4	11

*Mus behandledes ved 1 og 3,5 timer efter påvirkning.

25

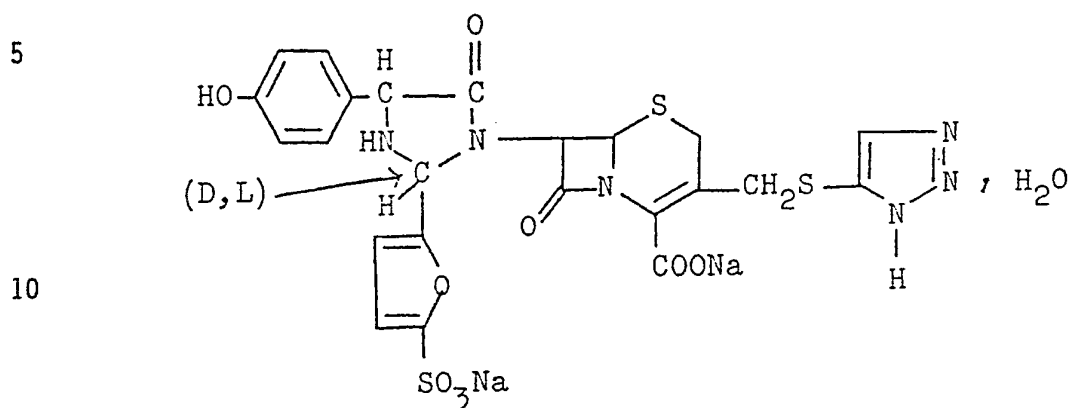
Komparative IM PD₅₀-værdier af BL-S640-derivater i mus
PD50 (mg/kg/behandling)*

30	Organisme	BL-S 640	BL-S 1027	BL-S 1048	BL-S 1055	cepha- lexin
	P. mirabilis A9900	--	--	--	--	--
		1,6	1,6	1,6	1,6	50

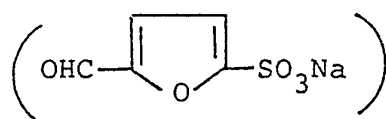
35

Eksempel 10

BL-S1027, reaktionsproduktet af BL-S640 og 5-formyl-2-furansulfonnsyre

Struktur BL-S1027Fremstilling af BL-S1027

15 1) 9 g 5-formyl-2-furansulfonnsyre-natriumsalt



20

omrøres hurtigt i 75 ml vand ved 60-65°C. Det meste af faststofferne opløses.

2) 20 g BL-S640-propylenglycoladdukt drysses i under hurtig omrøring over et 10 minutters interval med samtidig justering af pH-værdien til 6,5-7,0 med 40% NaOH (pH-værdien må ikke stige over 7,2). En opløsning eller næsten opløsning dannes.

3) Opløsningen med pH-værdi 6,5-7,0 omrøres ved 55-60°C i 15 minutter og afkøles til 4-8°C. Der omrøres ved 4-8°C i 10 minutter.

4) Der filtreres til fjernelse af en lille mængde uopløselige stoffer.

5) Filtratet + (se note 1) sættes under hurtig omrøring til 1 liter isopropanol. Et amorft bundfald dannes. Der omrøres i 5 minutter.

6) Faststofferne fjernes ved filtrering, udvaskes med 100 ml isopropanol og vakuum-tørres ved 50-56°C i 18 timer.

7) Faststofferne opløses i 60 ml vand og afkøles til 4-6°C. En meget lille mængde bundfald kan dannes og fjernes ved grovfiltrering.

8) Filtratet filtreres ved omgivelsestemperatur gennem passende filtre til fjernelse af partikler, pyrogener og bakterier.

Trinnene 7 og 8 bør fuldføres inden for 4 timer.

9) Der lyofiliseres sterilt i 48 timer og derpå opvarmes ved 50-56°C under vakuum i 18-24 timer. Udbytte af BL-S1027 er omtrent 22-44 g.

- 5 + **Note 1, trin 5:** Hvis 18,7 g BL-S640-methanoladdukt anvendes i stedet for de 20 g BL-S640-propylenglycol-addukt, kan filtratet afkøles til 4-6°C, grovfiltreres og lyofiliseres direkte som beskrevet i trin 8 til 9.

10

Egenskaber af BL-S1027

- 1) Bio-prøve = 724 µg/mg.
 2) Bio-udbytte = 85 - 95%
 3) IR - NMR = a) konsistent for struktur,
 15 b) omtrent 80% cyclisk, 20% ikke-cyclisk i D₂O ved 70 mg/ml,
 c) omtrent 0,05 mol isopropanol.
 4) Papirstrimmelchromatografi (0,2 mg/ml) = 100% BL-S640, intet tegn på derivat.
 20 5) Væske-chromatografi (1 mg/ml i phosphatpuffer med pH-værdi= 7)
 0 time = 85% fri BL-S640
 0,5 time = 94% fri BL-S640
 1,0 time = 100% fri BL-S640.
 6) Vandopløselighed = >400 mg/ml.
 25 7) Analytiske data

	<u>Fundet</u>	<u>På tør basis</u>	<u>Teoretisk</u>
% H ₂ O KF	5,14	-	-
% C	40,15	42,1	43,0
% H	3,10	2,9	2,96
30 % N	12,39	13,05	13,1
% S	13,6	14,33	14,95
% aske som Na	5,86	6,16	6,5

8) Museblod-koncentrationer = orale og intramuskulære koncentrationer omtrent lig med koncentrationerne for BL-S640propylenglycol-addukt. BL-S640 fremkom i urin med intet tegn på derivatet.

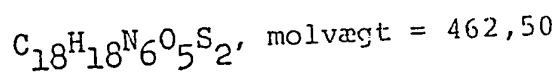
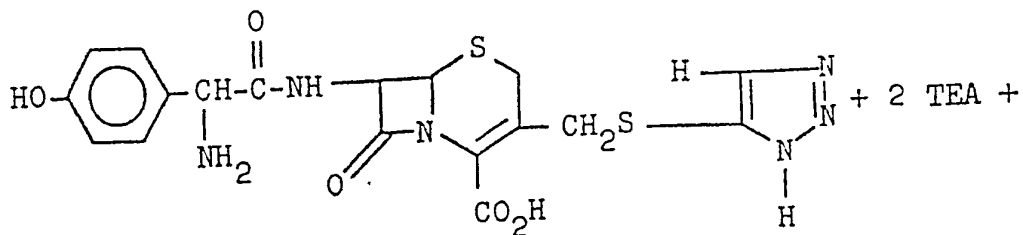
9) a) Stabilitet af faststoffer: mindre end 10% tab i 1 måned ved 56°C.

b) Stabilitet af opløsninger: mindre end 10% tab ved 250, 25 og 10 mg/ml af BL-S640-aktivitet i mindst 24 timer ved stuetemperatur.

Eksempel 11

5

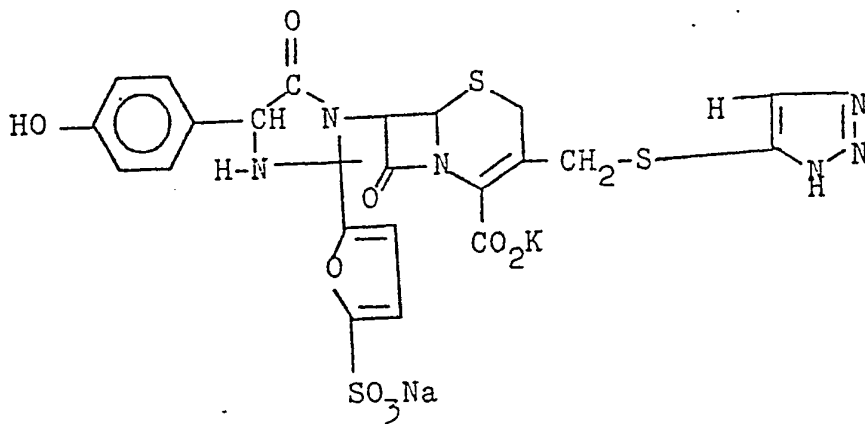
10



15

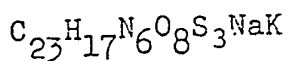


20



25

30



35

Materialer

- 1-g (0,00217 mol) BL-S640
 429 mg (0,00217 mol) 5-furfural-sulfonsyre-Na-salt
 217 mg (0,00434 mol) triethylamin
 5 1,2 g (0,00659 mol) kalium-2-ethylhexanoat (KEH).

Fremgangsmåde

- Til en opslæmning af 1 g BL-S640 i 8 ml methanol sættes 217 mg triethylamin (TEA) og 429 mg 5-furfural-sulfonsyre. Blandingen
 10 opvarmedes til tilbagesvaling og snart opløstes alle faststoffer. Opløsningen opvarmedes i 3 minutter, og 1,2 g KEH tilsattes. Et gult salt udskiltes og samledes og vaskedes med methanol. Saltet tørredes over P_2O_5 i en exsiccator. Udbytte 800 mg.

Analyse for $C_{23}H_{17}N_6O_8S_3NaK, 4H_2O$:

- 15 Beregnet: C 37,54; H 3,41; N 11,42

Fundet: C 37,30; H 3,31; N 10,18

Smeltepunkt >140 og dekomponering.

- Den samme omsætning udførtes som ovenfor med undtagelse af, at natrium-2-ethylhexanoat anvendtes i stedet for KEH. Saltet udfældedes
 20 ikke af methanol, hvorfor opløsningen filtreredes, og filtratet fortyndedes med isopropylalkohol. Det faste bundfald samledes og udvaskedes med isopropylalkohol. Saltet var hygroskopisk, hvorfor det tørredes i vakuum over P_2O_5 . Udbytte: 800 mg, smeltepunkt $>140^\circ C$ dekomponering.

- 25 Analyse for $C_{23}H_{17}N_6O_8S_3Na_2$:

Beregnet: C 42,65; H 2,78; N 13,65

Fundet: C 41,03; H 3,94; N 10,54.

Prøven var opløselig i vand. Opløsningen viste en pH-værdi på 6,5.

- Papirstrimmelprøve i puffer og menneskeserum udførtes. Prøven viste
 30 sig at udvise kun én plet svarende til BL-S640. Begge prøver udviste en opløselighed på >100 mg/ml ved pH-værdi på 6,5.

- Papirstrimmel-chromatografi viste, at ovennævnte forbindelse hydrolyseredes fuldstændigt til BL-S640 i blandet menneskeserum ved pH-værdi 7 og 0,1 M fosfatpuffer ved pH-værdi 7. Papirstrimmel-
 35 bioautografer opnåedes på følgende måde. Prøver opløstes i en koncentration på 500 γ/ml i 0,1 M fosfatpuffer med pH-værdi 7 og i en koncentration på 500 γ/ml i blandet menneskeserum ved pH-værdi 7. En 10 μl prøve af BL-S640 og af det ovennævnte produkt påførtes pletvis på en

12,7 mm (1/2 inch) strimmel "What nr. 1"-papir og udvikledes ved 27°C i 16 timer i et system af butylacetat:N-butanol:eddikesyre:vand (80:15:40:24). Strimlerne lufttørredes og anbragtes på en agarplade, som var podet med *B. subtilis* A.T.C.C. 6633. Med intervaller på 30 minutter, 5 1 time, 3 timer og 6 timer påvistes en enkelt zone med Rf-værdi 0,3 for alle prøver.

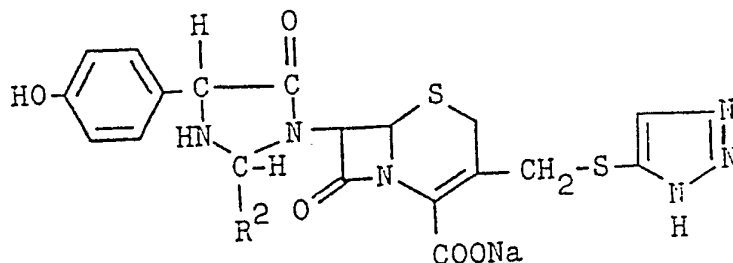
Højtryks-væskechromatografi ved en koncentration på 1 mg/ml viste fuldstændig hydrolyse til det oprindelige BL-S640 efter 1/2 time. Prøver chromatograferedes på en μ Bondapak C18 (Waters Associates)"-søjle, idet 10 der anvendtes en 0,01 M natriumacetat pH-værdi 4/methanol 8/2 bevægelig fase ved en strømningshastighed på 0,52 ml/minut. Påvisning foregik ved hjælp af UV ved 354 μ . Prøver opløstes i koncentration på 1 mg/ml i den bevæglige fase, 2 μ l indsprøjtedes, og BL-S640 elueredes ved 18 15 minutter og aldehydet ved 6 minutter. Mængdebestemmelsen af BL-S640 og 5-formylfuransulfonsyre udførtes under anvendelse af p-toluensulfonsyre som en indre standard.

Eksempel 12

Forbindelser med den almene formel

20

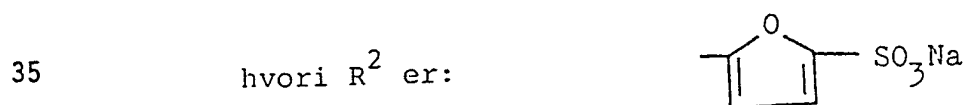
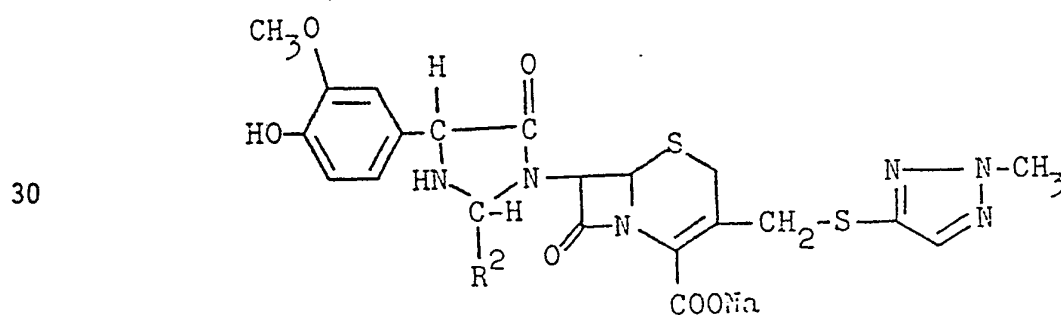
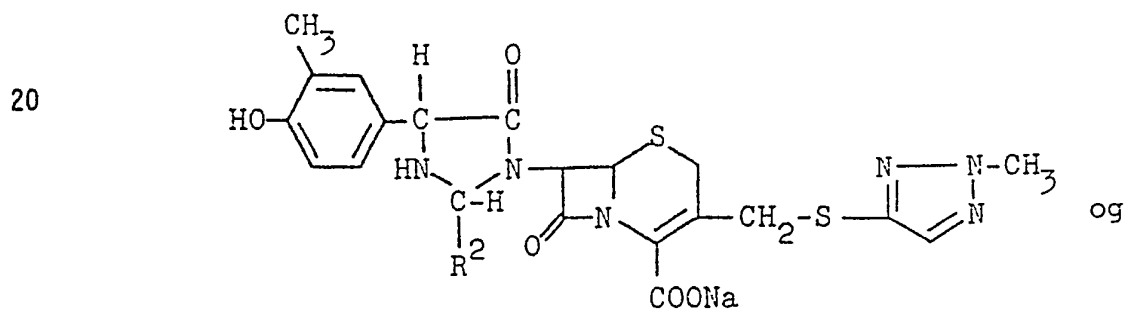
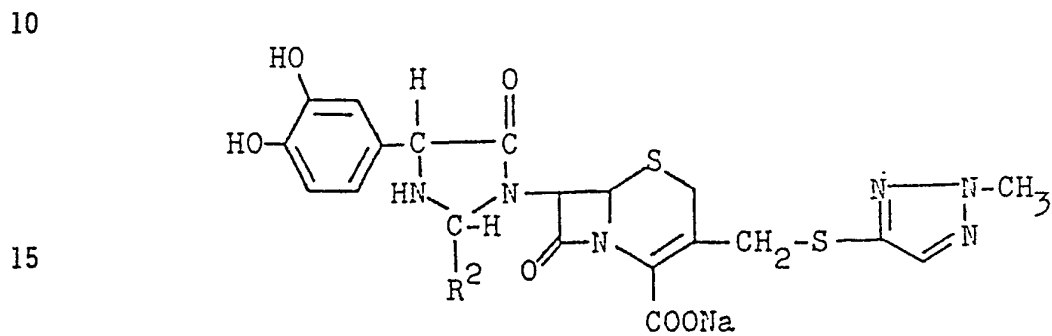
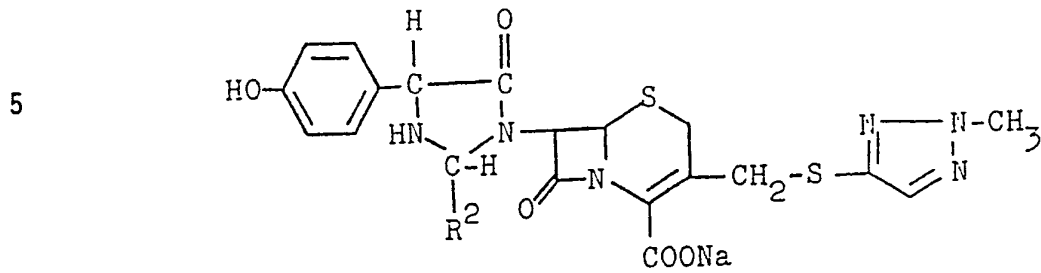
25



hvor R^2 er henholdsvis phenyl-2-sulfonsyre, 4-methoxyphenyl-3- 30 sulfonsyre, 4-hydroxyphenyl-3-sulfonsyre, 2-carboxymethoxyphenyl, 4-carboxymethoxyphenyl, 3-hydroxy-4-carboxyphenyl, 4-(2'-carboxy)vinyl-phenyl, carboxyl, 2-carboxyphenyl, 3-carboxyphenyl, methansulfonsyre eller methandisulfonsyre fremstilles ved erstatning af 5-formyl-2- 35 furansulfonsyren i fremgangsmåden i eksempel 7 med en ækvimolær vægtmængde af det tilsvarende aldehyd, som har den almene formel R^2 -CHO.

Eksempel 14

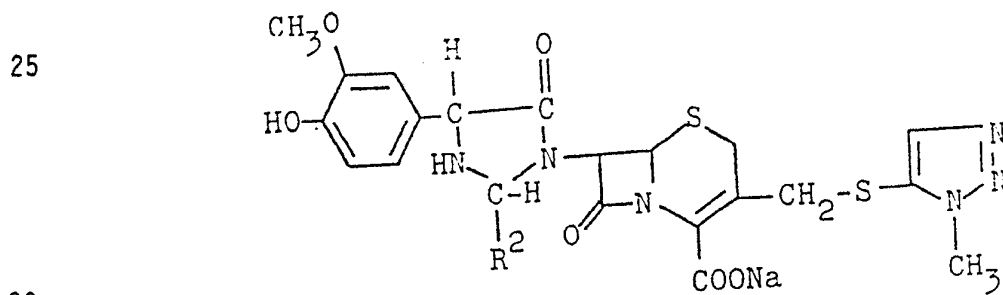
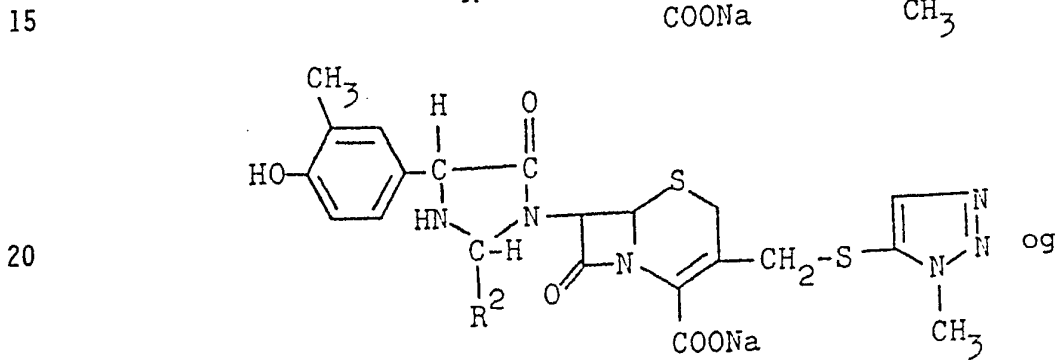
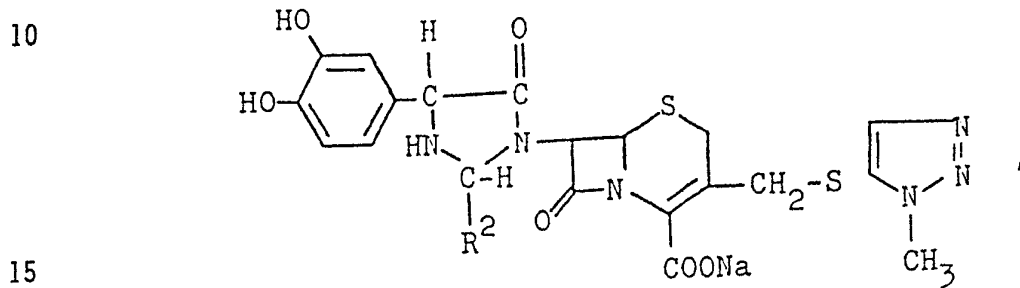
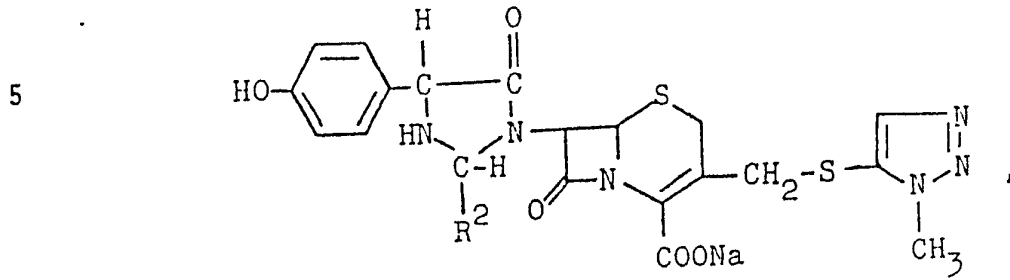
Førbindingerne med de almene formler



fremstilles ved udskiftning af cefatrizinen i fremgangsmåden i eksempel 7 med en ækvimolær vægtmængde af den tilsvarende amfotere cephalosporin.

Eksempel 15

Førbindingerne med de almene formler

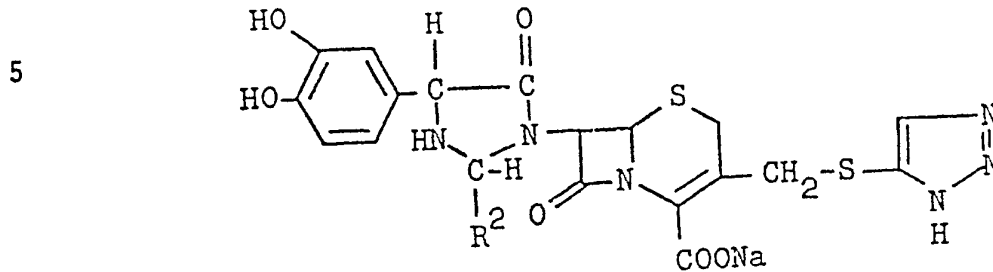
hvori R² er

35

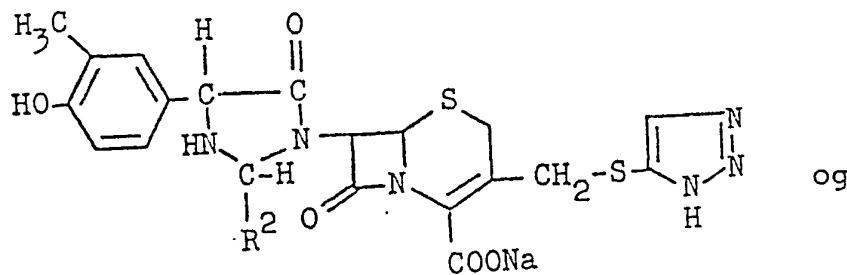
fremstilles ved udskiftning af cefatrizinen i fremgangsmåden i eksempel 7 med en ækvimolær vægtmængde af den tilsvarende amfotere cephalosporin.

Eksempel 16

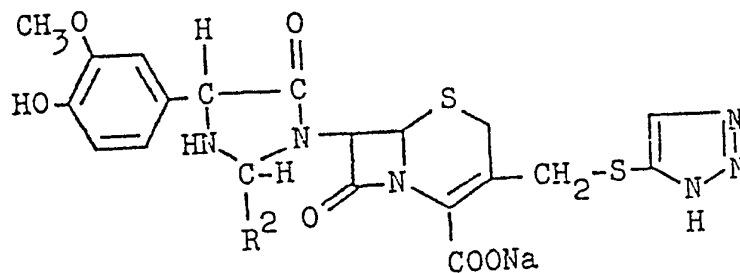
Forbindelserne med formlerne



10



20



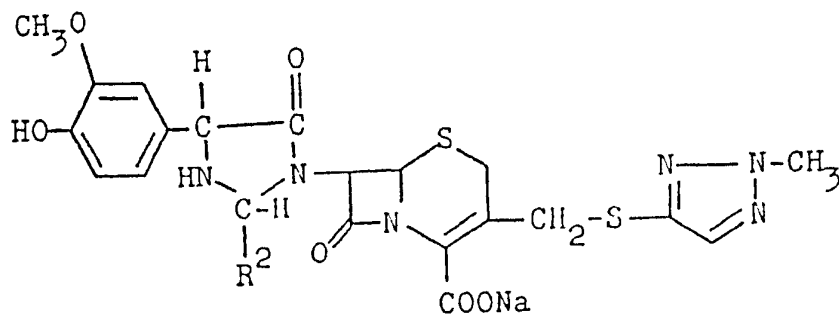
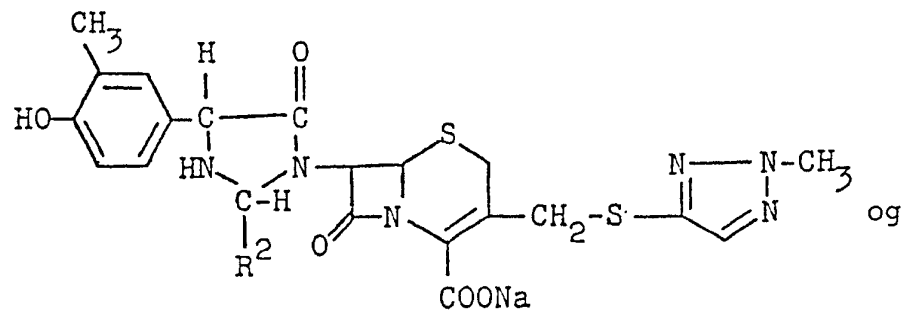
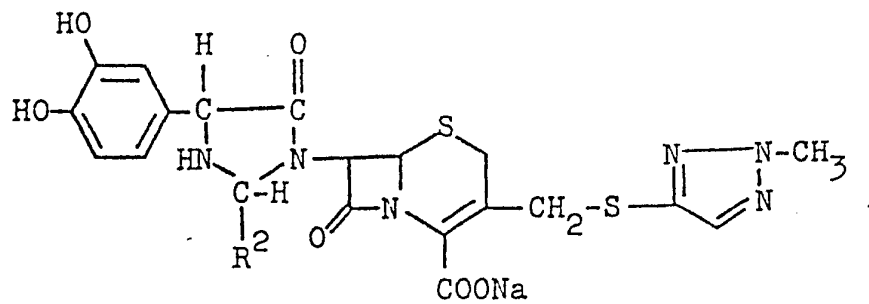
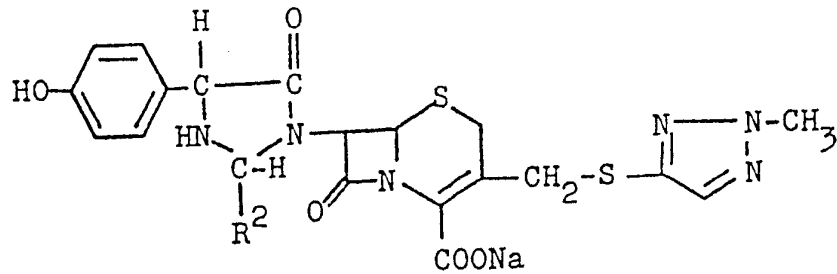
25

hvor R^2 er henholdsvis phenyl-2-sulfonsyre, 4-methoxyphenyl-3-sulfonsyre, 4-hydroxyphenyl-3-sulfonsyre, 2-carboxymethoxyphenyl, 4-carboxymethoxyphenyl, 3-hydroxy-4-carboxyphenyl, 4-(2'-carboxy)vinylphenyl, carboxyl, 2-carboxyphenyl, 3-carboxyphenyl, methansulfonsyre og methan-

30 disulfonsyre, fremstilles ved erstatning af 5-formyl-2-furansulfonsyren i fremgangsmåden i eksempel 7 med en ækvimolær vægtmængde af det tilsvarende aldehyd, som har formlen R^2 -CHO.

Eksempel 17

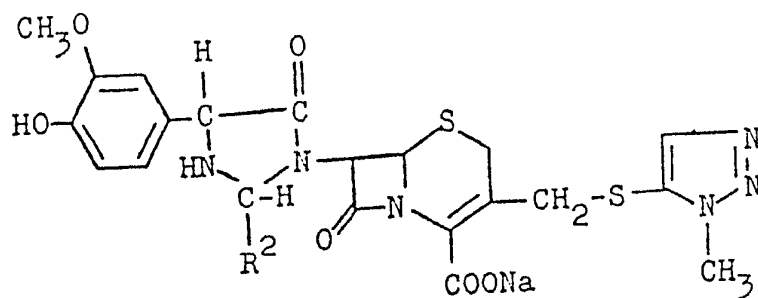
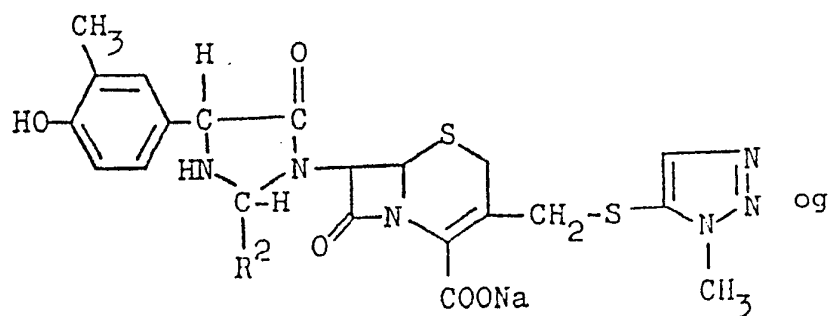
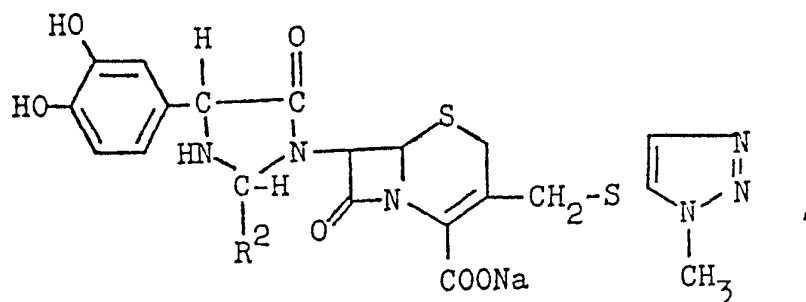
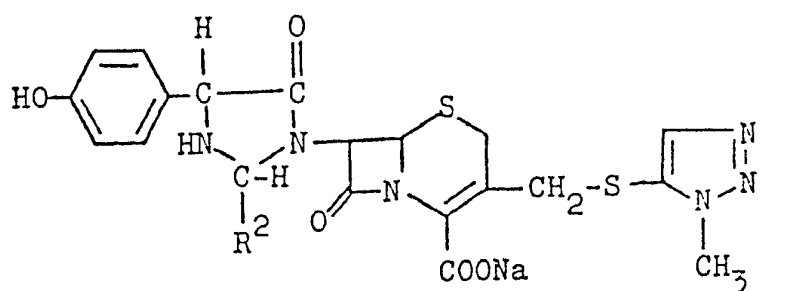
Forbindelserne med formlerne



5 hvori R^2 er henholdsvis phenyl-2-sulfonsyre, 4-methoxyphenyl-3-sulfonsyre, 4-hydroxyphenyl-3-sulfonsyre, 2-carboxymethoxyphenyl, 4-carboxymethoxyphenyl, 3-hydroxy-4-carboxyphenyl, 4-(2'-carboxy)vinylphenyl, carboxyl, 2-carboxyphenyl, 3-carboxyphenyl, methansulfonsyre og methan-disulfonsyre, fremstilles ved erstatning af 5-formyl-2-furansulfonsyren i fremgangsmåden i eksempel 7 med en ækvimolær vægtmængde af det tilsvarende aldehyd, som har formelen R^2 -CHO.

Eksempel 18

Förbindelserne med formlerne



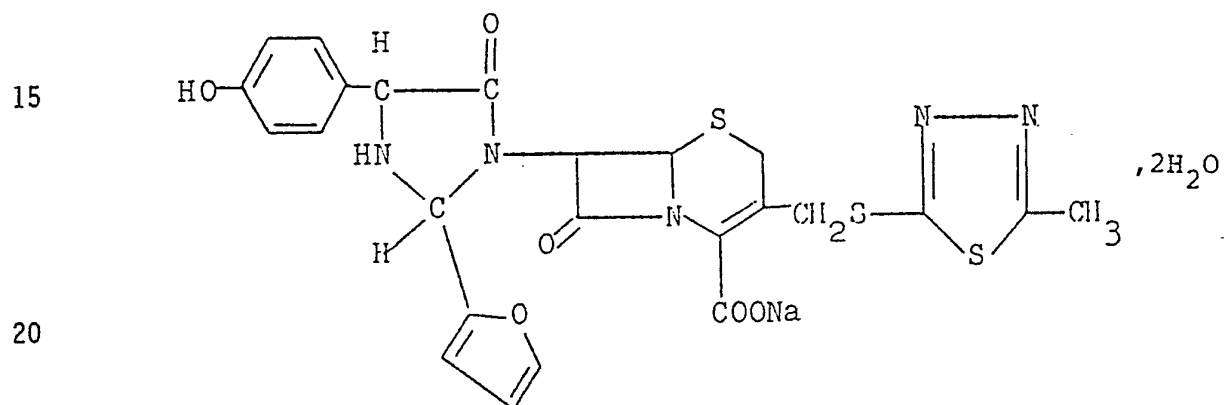
hvor R^2 er henholdsvis phenyl-2-sulfonsyre, 4-methoxyphenyl-3-sulfonsyre, 4-hydroxyphenyl-3-sulfonsyre, 2-carboxymethoxyphenyl, 4-carboxymethoxyphenyl, 3-hydroxy-4-carboxyphenyl, 4-(2'-carboxy)vinylphenyl, carboxyl, 2-carboxyphenyl, 3-carboxyphenyl, methansulfonsyre og methan-

5 disulfonsyre, fremstilles ved erstatning af 5-formyl-2-furansulfonsyren i fremgangsmåden i eksempel 7 med en ækvimolær vægtmængde af det tilsvarende aldehyd, som har formlen $R^2\text{-CHO}$.

Eksempel 19

10 Fremstilling af BL-S1057, natriumsaltet af reaktionsproduktet BL-S643 og 2-furaldehyd

Formel, BL-S1057



Fremgangsmåde

- 1) 1 g BL-S643, 3H₂O oplømmes i 10 ml vand ved 40-45°C.
- 2) 0,25 g (1,25 ækvivalenter) 2-furaldehyd tilsættes.
- 25 3) 1N natriumhydroxid tilsættes under hurtig omrøring indtil pH-værdi 7-7,5. En opløsning eller næsten opløsning opnås i løbet af mindre end 5 minutter.
- 4) Opløsningen afkøles til 22-24°C og filtreres på passende måde til fjernelse af partikler, bakterier og pyrogener.
- 30 5) Der lyofiliseres under sterile betingelser i 48 timer til opnåelse af BL-S1057-pulver (BL-S1057 kan også opnås ved udfældning fra den sterile opløsning i trin 4 med 15 til 20 volumina steril isopropanol).

35 Egenskaber af BL-S1057

- 1) Bio-prøve (anvendelse af cefatrizin som standarden) = 759 µg/mg.
- 2) IR = intakt β-lactam; veldefineret.
- 3) NMR = a) veldefineret; konsistent

b) omtrent 75% cyclisk addukt (60 mg/ml i D₂O).

4) Opløselighed = >400 mg/ml i vand.

5) Papirstrimmel-chromatografi = hovedsageligt 1 zone ved R_f-værdi for BL-S643 ved 37°C ved 0 og 1 time (koncentration = 0,2 mg/ml).

5 6) Væske-chromatografi = 100% hydrolyseret i puffer med pH-værdi 6,1 inden for 1 time ved stuetemperatur (koncentration = 1 mg/ml).

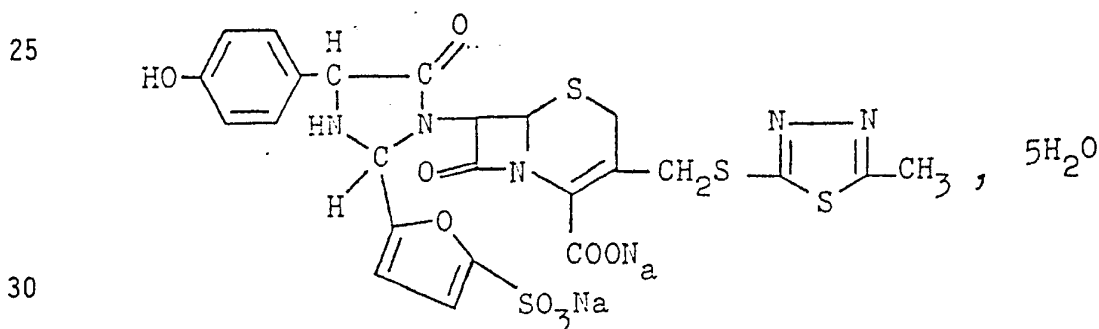
7) Smeltepunkt = 180°C (indskrumpning) - 200°C dekomponering.

Analytiske data

	Fundet	På tør basis	Teoretisk
10 % H ₂ O KF	5,18	-	-
% C	45,91	48,4	48,4
% H	4,05	3,7	3,37
% N	10,81	11,4	11,8
15 % S	14,92	15,73	16,48
% aske som			
Na	3,84	4,03	3,88

Eksempel 20

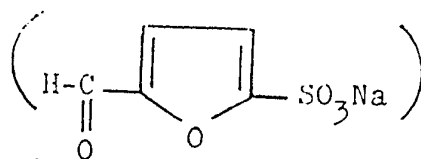
20 BL-S1058, reaktionsproduktet af BL-S643 og natrium-5-formyl-2-furansulfonsyre
Formel, BL-S1058



Fremstilling af BL-S1058

1) 0,45 g 5-formyl-2-furansulfonsyre-natriumsalt

35



opslæmmes i 10 ml vand ved 40-45°C. En opløsning eller næsten opløsning opnås.-

2) 1 g BL-S643,3H₂O drysses i over en 10 minutters oerioder under hurtig omrøring og samtidig tilsætning af 1N natriumhydroxid indtil en pH-værdi 7-7,5. En opløsning eller næsten opløsning opnås inden for 5 minutter.

3) Der afkøles til 20-23°C, og opløsningen filtreres gennem passende filtre til fjernelse af partikler, bakterier og pyrogener.

4) Der lyofiliseres i 48 timer. Det resulterende pulver er BL-S1058 (steril BL-S-1058 kan også opnås fra opløsningen i trin 3 ved udfældning fra 15-20 volumina steril isopropanol).

Egenskaber af BL-S1058

- 1) Bio-prøve (anvendelse af cefatrizin som standarden) = 685 µg/mg.
- 2) IR - NMR = a) veldefineret; konsistent
b) β-lactam og 3-sidekæde intakt
c) 90% cyclisk addukt (ved omtrent 60 mg/ml i D₂O).
- 3) Papirstrimmel-chromatografi = hovedsageligt 1 zone ved R_f-værdi for BL-S643 ved 0 og 1 time ved 37°C (koncentration er 0,2 mg/ml). Der er tegn på en anden zone.
- 4) Væske-chromatografi (1 mg/ml i puffer med pH-værdi 6.

	<u>Tid i timer</u>	<u>% hydrolyseret</u>
	0	25,4
25	1	46,5
	2	59,0

<u>Analytiske data</u>				
		<u>Fundet</u>	<u>På tør basis</u>	<u>Teoretisk</u>
30	% H ₂ O KF	10,17	--	--
	% C	36,5	40,5	41,6
	% H	2,89	2,4	2,74
	% N	8,52	9,49	10,01
	% S	17,09	18,98	18,6
35	% Aske som Na	7,04	7,93	6,63

Antibiotisk spektrum af BL-S643 derivater i næringssubstrat

Organisme	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	BL-S1057 (1)	BL-S1058 (2)	BL-S643
<i>S. pneumoniae</i> * (10^{-3})** A9585	0,016	0,016	0,03
<i>Str. pyogenes</i> * (10^{-3})** A9604	0,008	0,008	0,016
<i>S. aureus</i> Smith (10^{-4}) A9537	0,5	0,25	0,5
<i>S. aureus</i> +50% serum (10^{-4}) A9537	8	8	8
<i>S. aureus</i> BX1633 (10^{-3}) A9606	1	0,5	1
<i>S. aureus</i> BX1633 (10^{-2}) A9606	4	4	4
<i>S. aureus</i> Meth-Res (10^{-3}) A15097	2	2	4
<i>Sal. enteritidis</i> (10^{-4}) A9531	0,25	0,13	0,25
<i>E. coli</i> Juhl (10^{-4}) A15119	1	1	1
<i>E. coli</i> (10^{-4}) A9675	4	2	4
<i>K. pneumoniae</i> (10^{-4}) A9977	0,5	0,5	0,5
<i>K. pneumoniae</i> (10^{-4}) A15130	4	2	4
<i>Pr. mirabilis</i> (10^{-4}) A9900	0,5	0,5	0,5
<i>Pr. morgani</i> (10^{-4}) A15153	16	16	16
<i>Ps. aeruginosa</i> (10^{-4}) A9843A	> 125	> 125	> 125

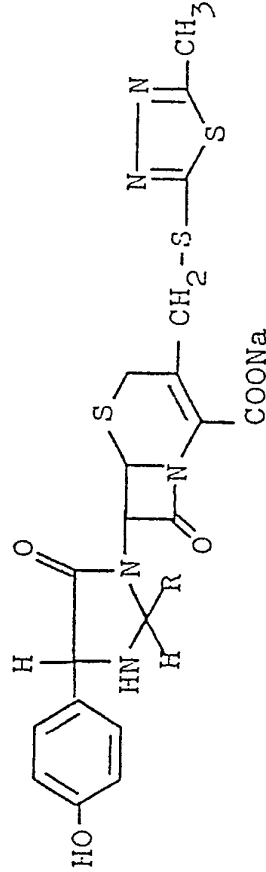
Antibiotisk spektrum af BL-S643 derivater i næringssubstrat (fortsat)

Organisme	MIC (µg/ml)	
	BL-S1057 (1)	BL-S1058 (2)
Ser. marcescens (10 ⁻⁴) A20019	125	125
Ent. cloacae (10 ⁻⁴) A9656	>125	>125
Ent. cloacae (10 ⁻⁴) A9657	0,5	4
Ent. cloacae (10 ⁻⁴) A9659	16	32

--	--

* 45% AAB + 5% serum + 50% substrat, R = anført ovenfor

** Fortynding af substratkulturen efter henstand natten over



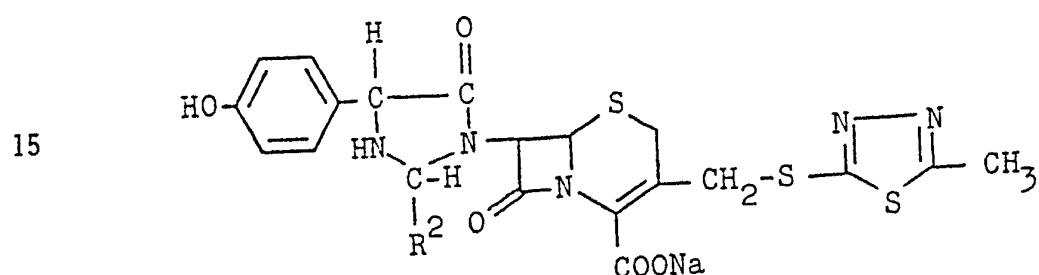
- 1) Justeret for 20% indhold af BL-S643
- 2) Justeret for 5% indhold af BL-S643,

Med andre ord er de numeriske værdier sænkede, dvs. forbedrede. Denne justering gjordes også i de nedenfor anførte testforsøg, eller som alternativ anvendtes en større vægtmængde til tilvejebringelse af ækivalent dosering.

Papirchromatogrammer opnåedes efter chromatografering på rotteurin, som var samlet mellem 0 og 2 og mellem 2 og 4 timer efter IM administrering af BL-S1057, 1058 og 643 til påvisningen af antibiotisk aktive metaboliter, idet der anvendtes "faldende" chromatografi med systym nr. 9 (butylacetat:n-butanol:iseddikesyre:H₂O=80:15:40:24). En enkelt identisk plet observeredes i alle tilfælde. Dette indikerer fuldstændig hydrolyse af de 2 derivater til den oprindelige forbindelse (BL-S643).

Eksempel 21

10 Forbindelser med formelen

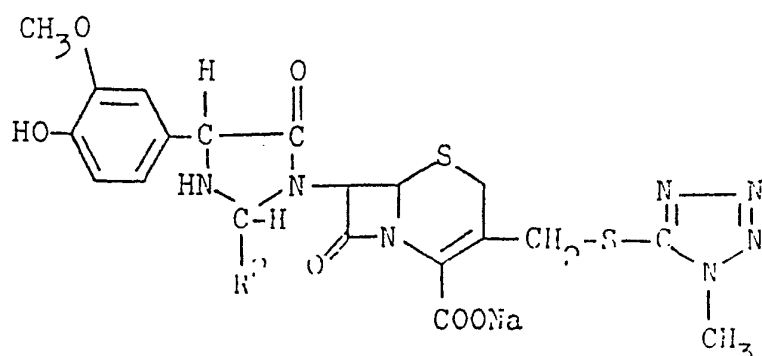
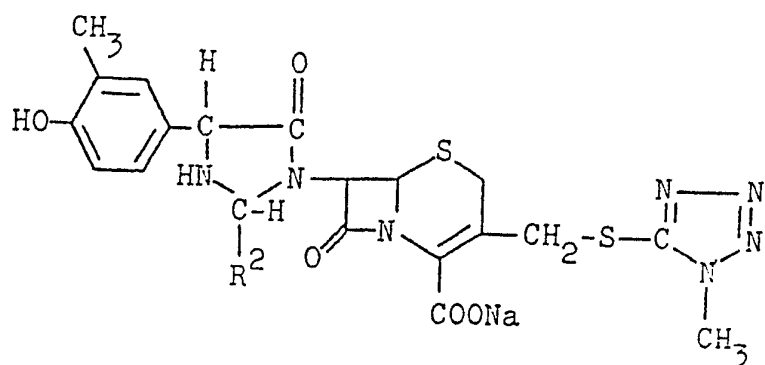
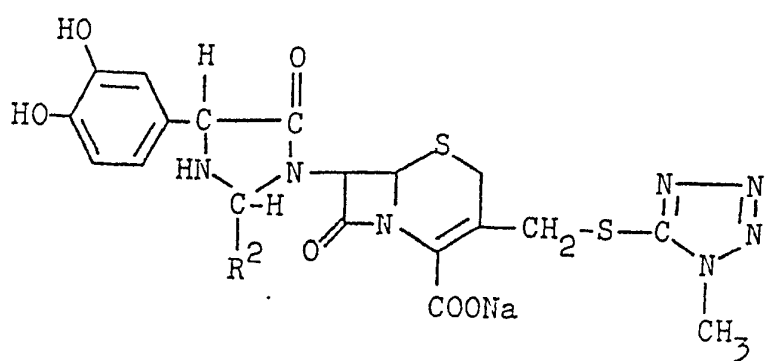
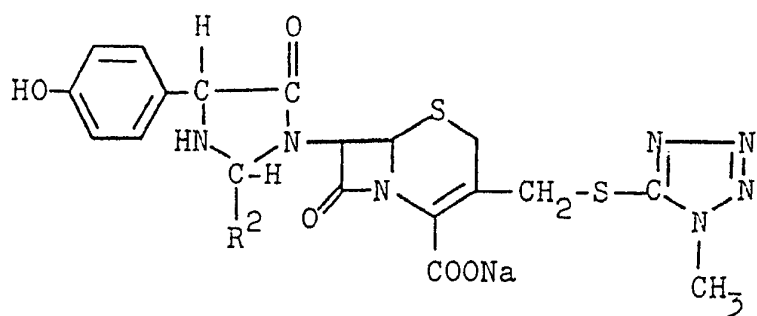


25 hvori R² er henholdsvis phenyl-2-sulfonsyre, 4-methoxyphenyl-3-sulfonsyre, 4-hydroxyphenyl-3-sulfonsyre, 2-carboxymethoxyphenyl, 4-carboxymethoxyphenyl, 3-hydroxy-4-carboxyphenyl, 4-(2'-carboxy)vinylphenyl, carboxyl, 2-carboxyphenyl, 3-carboxyphenyl, methansulfonsyre og methan-

disulfonsyre, fremstilles ved erstatning af 5-formyl-2-furansulfonsyren i fremgangsmåden i eksempel 20 med en ækvimolær vægtmængde af det tilsvarende aldehyd, som har formelen R²-CHO.

Eksempel 23

Førbindingerne med formlerne

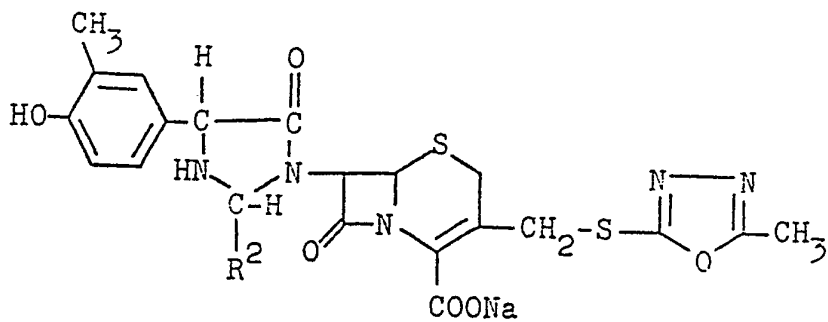
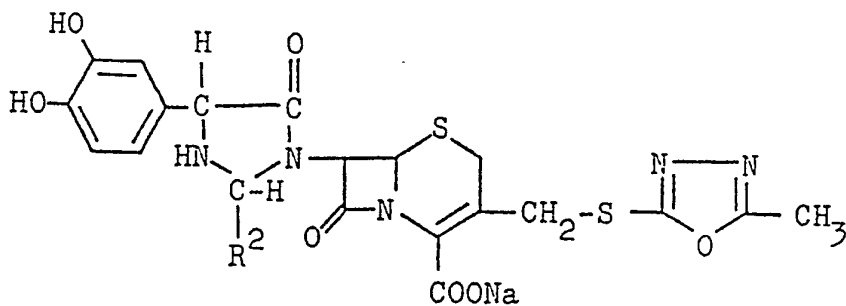
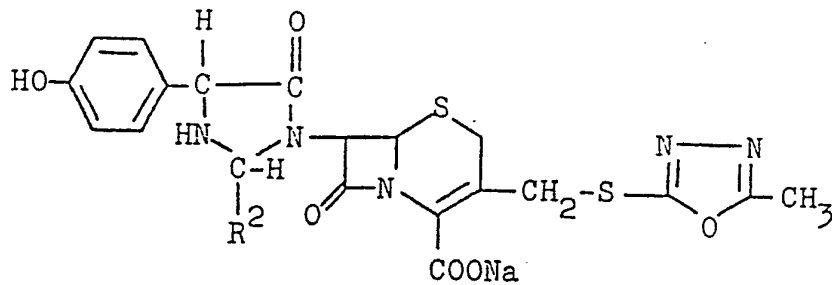


hvor R^2 er  eller  SO_3Na

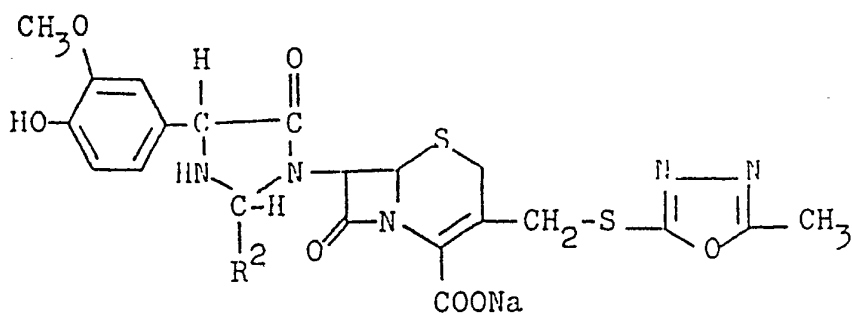
fremstilles ved udskiftning af cefaparolen i fremgangsmåderne i eksemplerne 19 og 20 med en ækvimolær vægtmængde af den tilsvarende amfotere cephalosporin.

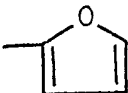

5 Eksempel 24

Forbindelserne med formlerne



og



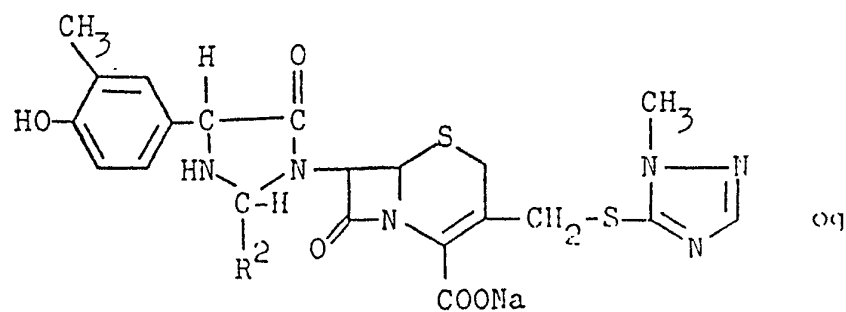
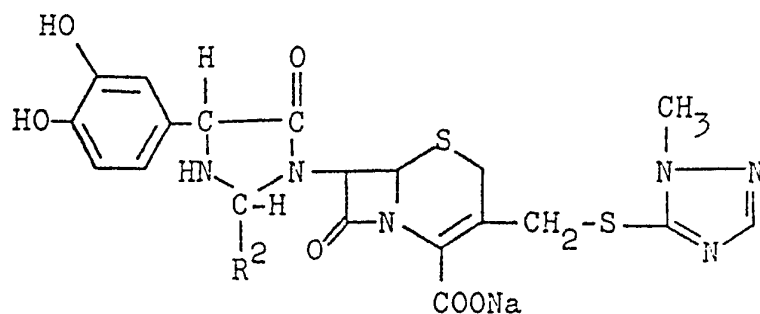
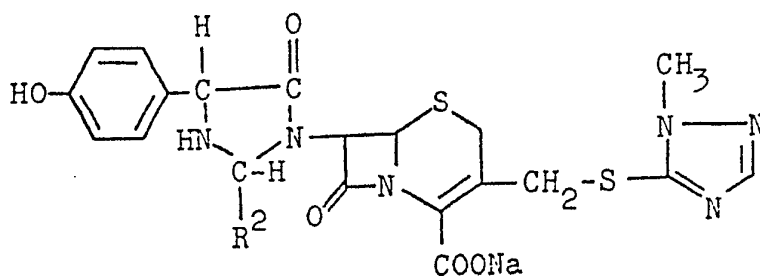
hvor R^2 er  eller  SO_3Na

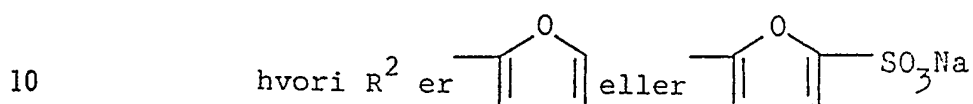
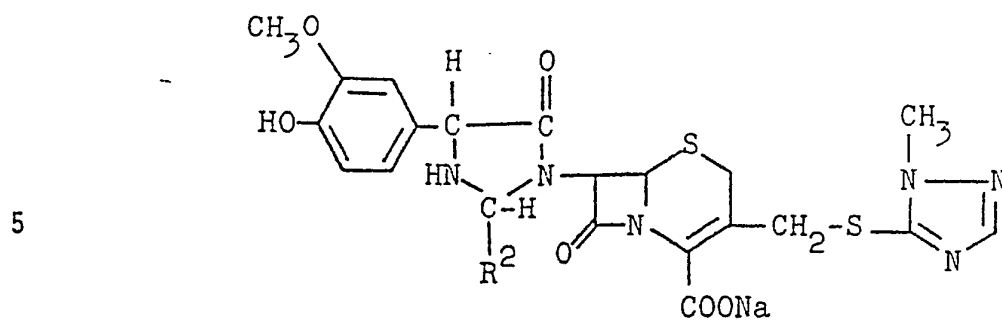
5

fremstilles ved udskiftning af cefaparolen i fremgangsmåderne i eksemplerne 19 og 20 med en ækvimolær vægtmængde af den tilsvarende amfotere cephalosporin.

10 Eksempel 25

Forbindelserne med formlerne

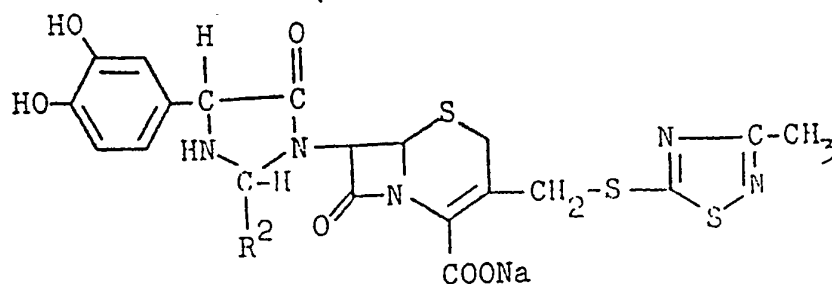
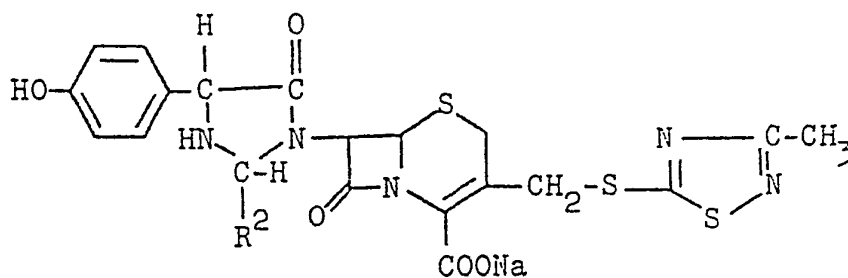


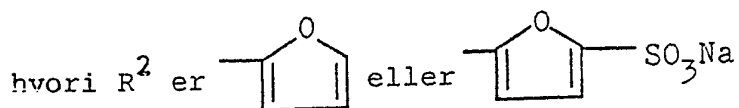
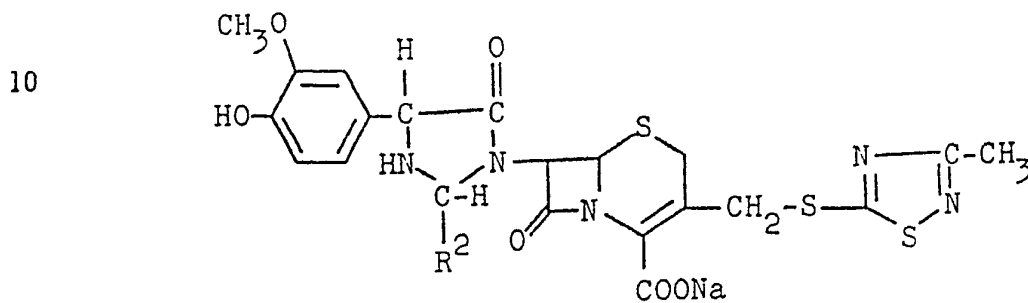
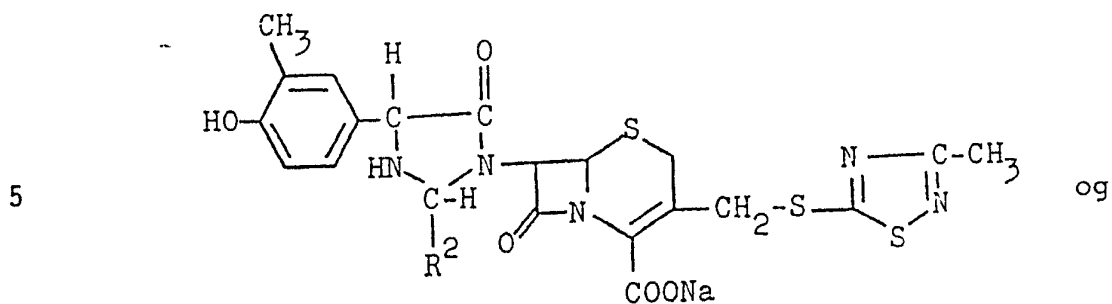


fremstilles ved erstatning af cefaparolen i fremgangsmåderne i eksemplerne 19 og 20 med en ækvimolær vægtmængde af den tilsvarende amfotere cephalosporin.

Eksempel 26

Forbindelserne med formlerne



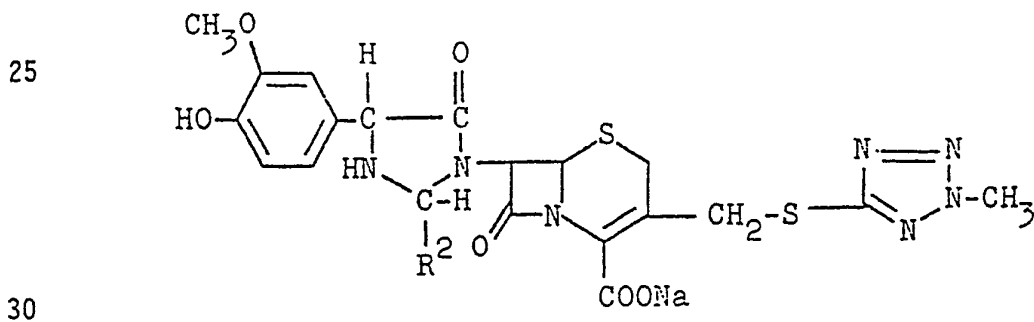
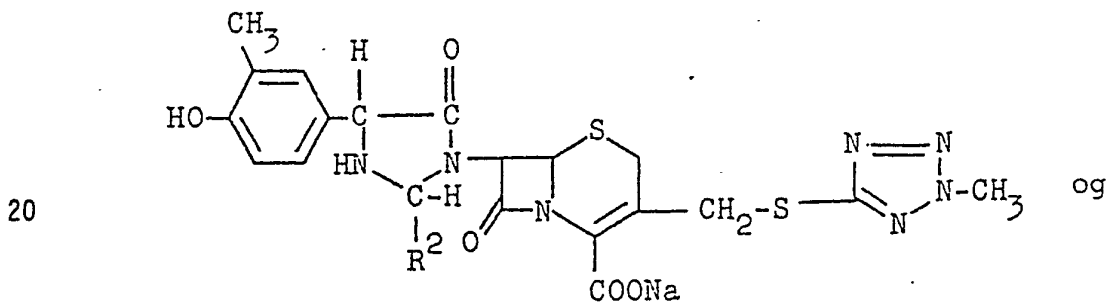
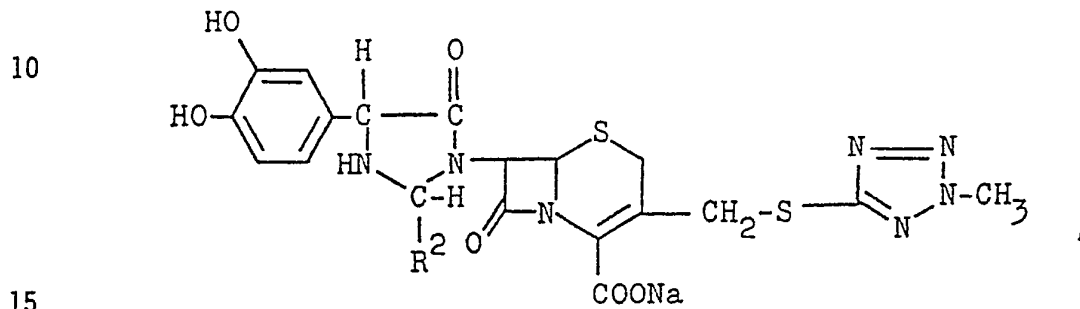
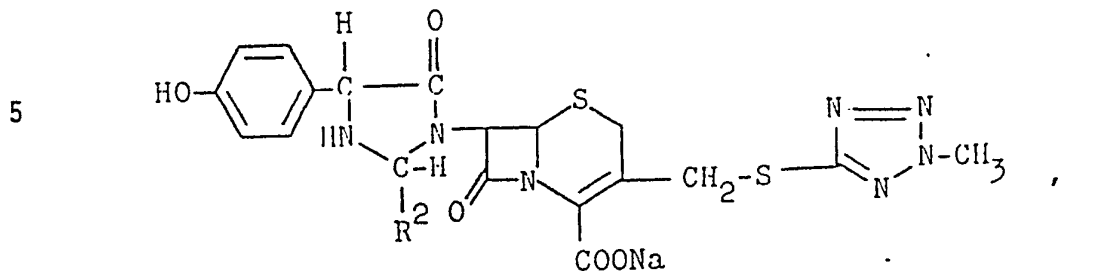


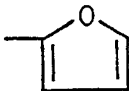

20

fremstilles ved udskiftning af cefaparolen i fremgangsmåderne i eksemplerne 19 og 20 med en ækvimolær vægtmængde af den tilsvarende amfotere cephalosporin.

Eksempel 27

Förbindelserne med formlerne



hvor R^2 er  eller 

35

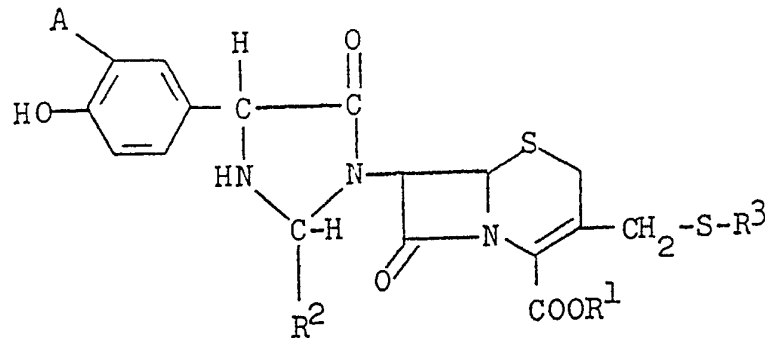
fremstilles ved udskiftning af cefaparolen i fremgangsmåderne i eksemplerne 19 og 20 med en ækvimolær vægtmængde af den tilsvarende amfotere cephalosporin.

Patentkrav

1. Cephalosporinforbindelser til anvendelse som ernæringsmæssige tilskud i dyrefoder, **KENDETEGNET** ved, at de har den almene formel

5

10



I

15

hvor

A er hydrogen, hydroxy, methyl eller methoxy,

R^1 er hydrogen, natrium eller kalium,

20 R^2 er 2-furyl, 2-furan-5-sulfonsyre, phenyl-2-sulfonsyre, 4-methoxyphenyl-3-sulfonsyre, 4-hydroxyphenyl-3-sulfonsyre, 2-carboxymethoxyphenyl, 4-carboxymethoxyphenyl, 3-hydroxy-4-carboxyphenyl, 4-(2'-carboxy)vinylphenyl, carboxyl, 2-carboxyphenyl, 3-carboxyphenyl, methansulfonsyre eller methandisulfonsyre, og

25 R^3 er 1,2,3-triazol-5-yl, tetrazol-5-yl, 1,2,4-thiadiazol-5-yl, 1,3,4-thiadiazol-2-yl, 1,3,4-oxadiazol-2-yl eller 1,2,4-triazol-5-yl, hvor enhver af disse grupper er usubstitueret eller substitueret med 1 eller 2 alkylgrupper med 1 til 4 carbonatomer.

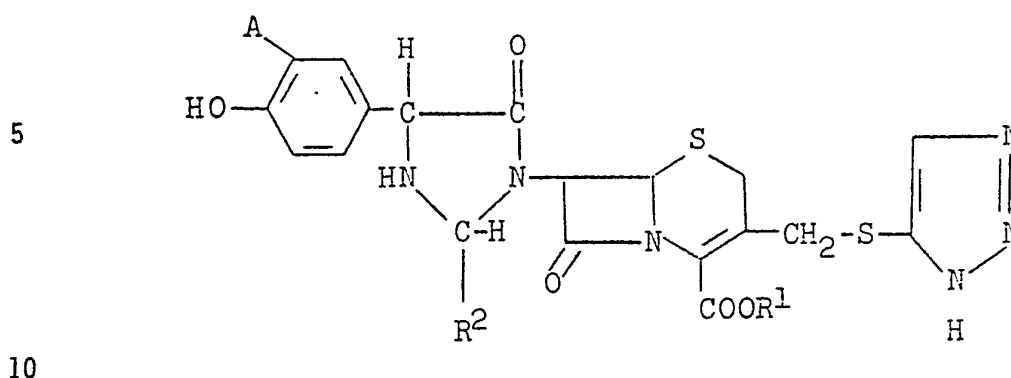
2. Forbindelse ifølge krav 1, **KENDETEGNET** ved, at R^2 er 2-furyl.

30 3. Forbindelse ifølge krav 1, **KENDETEGNET** ved, at R^2 er 2-furan-5-sulfonsyre.

4. Forbindelse ifølge et eller flere af kravene 1-3, **KENDETEGNET** ved, at R^1 er natrium.

35 5. Forbindelse ifølge et eller flere af kravene 1-3, **KENDETEGNET** ved, at R^1 er kalium.

6. Forbindelse ifølge krav 1, **KENDETEGNET** ved, at den har den almene formel



hvor

A, R¹ og R² har de i krav 1 angivne betydninger.

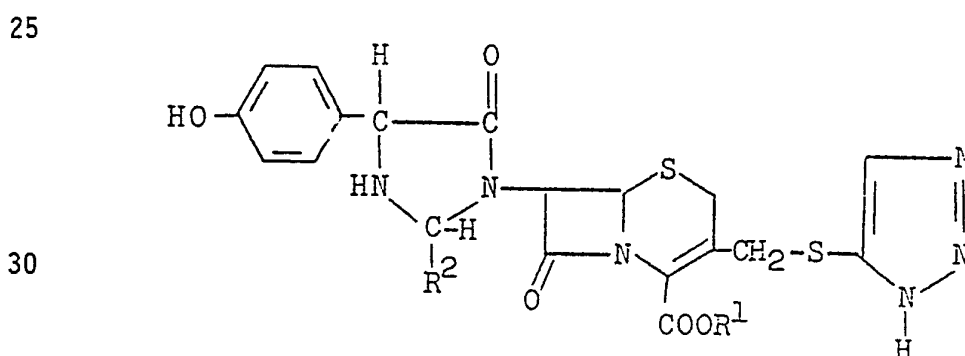
15 7. Forbindelse ifølge krav 6, **KENDETEGNET** ved, at R² er 2-furyl.

8. Forbindelse ifølge krav 6, **KENDETEGNET** ved, at R² er 2-furan-5-sulfonsyre.

9. Forbindelse ifølge et eller flere af kravene 6-8, **KENDETEGNET** ved, at R¹ er natrium.

20 10. Forbindelse ifølge et eller flere af kravene 6-8, **KENDETEGNET** ved, at R¹ er kalium.

11. Forbindelse ifølge krav 6, **KENDETEGNET** ved, at den har den almene formel



35

hvor

R¹ og R² har de i krav 1 angivne betydninger.

12. Forbindelse ifølge krav 11, **KENDETEGNET** ved, at R² er 2-furyl.

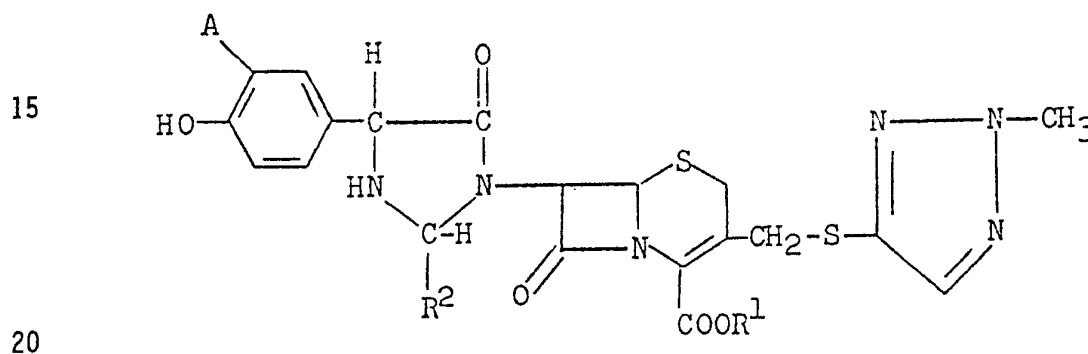
13. Forbindelse ifølge krav 11, **KENDETEGNET** ved, at R^2 er 2-furan-5-sulfonsyre.

14. Forbindelse ifølge krav 12 eller 13, **KENDETEGNET** ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er natrium.

5 15. Forbindelse ifølge krav 12 eller 13, **KENDETEGNET** ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er kalium.

16. Forbindelse ifølge krav 12 eller 13, **KENDETEGNET** ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er hydrogen.

10 17. Forbindelse ifølge krav 1, **KENDETEGNET** ved, at den har den almene formel



hvor

A, R^1 og R^2 har de i krav 1 angivne betydninger.

25 18. Forbindelse ifølge krav 17, **KENDETEGNET** ved, at R^2 er 2-furyl.

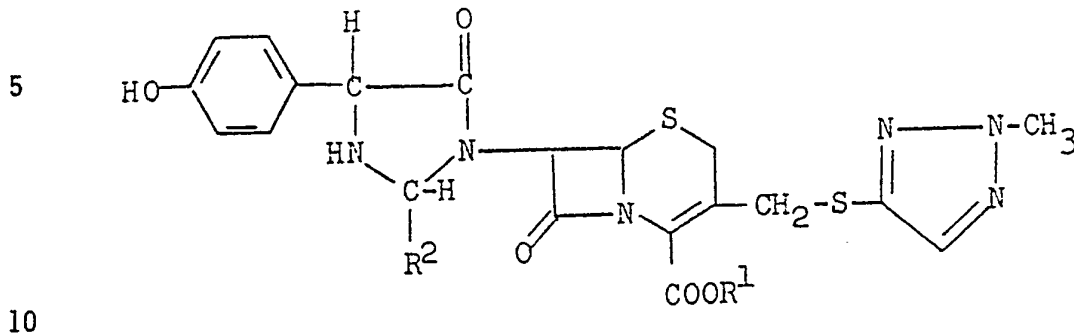
19. Forbindelse ifølge krav 17, **KENDETEGNET** ved, at R^2 er 2-furan-5-sulfonsyre.

20. Forbindelse ifølge et eller flere af kravene 17-19, **KENDETEGNET** ved, at R^1 er natrium.

30 21. Forbindelse ifølge et eller flere af kravene 17-19, **KENDETEGNET** ved, at R^1 er kalium.

22. Forbindelse ifølge krav 17, **KENDETEGNET** ved, at den har den almene formel

35



hvor

R^1 og R^2 har de i krav 1 angivne betydninger.

23. Forbindelse ifølge krav 22, KENDETEGNET ved, at R^2 er 2-furyl.

15 24. Forbindelse ifølge krav 22, KENDETEGNET ved, at R^2 er 2-furan-5-sulfonsyre.

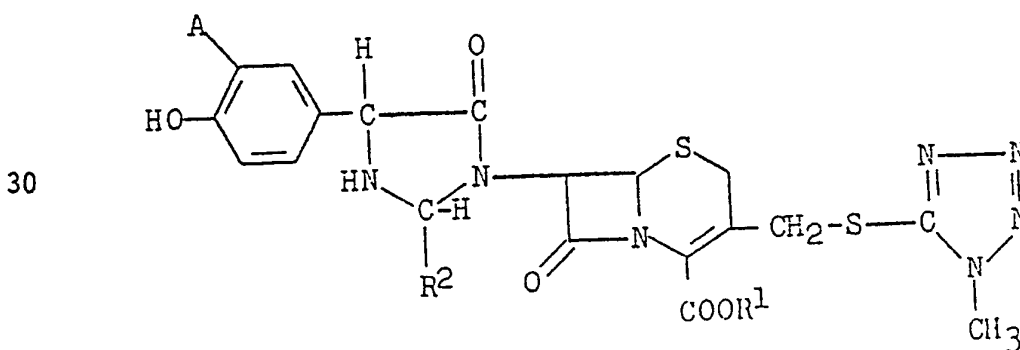
25. Forbindelse ifølge krav 22, KENDETEGNET ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er natrium.

20 26. Forbindelse ifølge krav 22, KENDETEGNET ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er kalium.

27. Forbindelse ifølge krav 22, KENDETEGNET ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er hydrogen.

28. Forbindelse ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at den har den almene formel

25



hvor

A, R^1 og R^2 har de i krav 1 angivne betydninger.

29. Forbindelse ifølge krav 28, **KENDETEGNET** ved, at R^2 er 2-furyl.

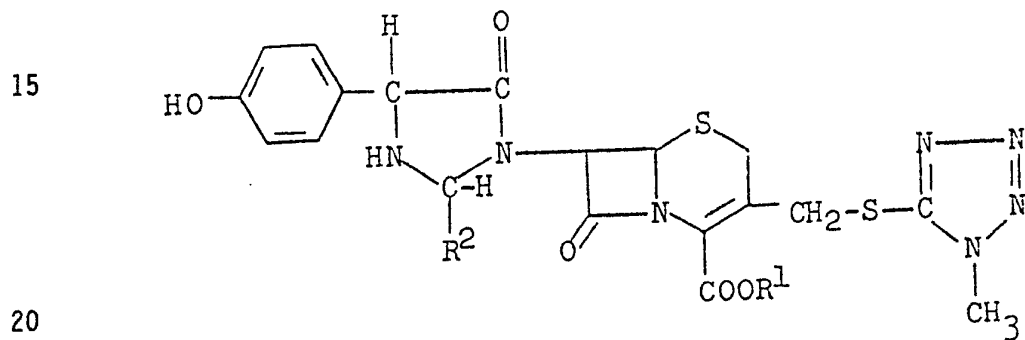
30. Forbindelse ifølge krav 28, **KENDETEGNET** ved, at R^2 er 2-furan-

5-sulfonsyre.

31. Forbindelse ifølge et eller flere af kravene 28-30, **KENDETEGNET** ved, at R^1 er natrium.

32. Forbindelse ifølge et eller flere af kravene 28-30, **KENDETEGNET** ved, at R^1 er kalium.

33. Forbindelse ifølge krav 28, **KENDETEGNET** ved, at den har den almene formel



hvor

R^1 og R^2 har de i krav 1 angivne betydninger.

34. Forbindelse ifølge krav 33, **KENDETEGNET** ved, at R^2 er 2-furyl.

35. Forbindelse ifølge krav 33, **KENDETEGNET** ved, at R^2 er 2-furan-

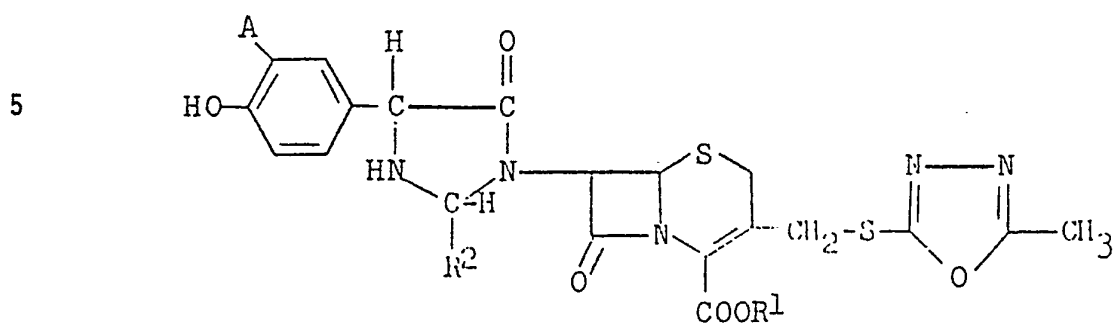
5-sulfonsyre.

36. Forbindelse ifølge krav 34 eller 35, **KENDETEGNET** ved, at den har D-konfiguration, og R^1 er natrium.

37. Forbindelse ifølge krav 34 eller 35, **KENDETEGNET** ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er kalium.

38. Forbindelse ifølge krav 34 eller 35, **KENDETEGNET** ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er hydrogen.

39. Forbindelse ifølge krav 1, **KENDETEGNET** ved, at den har den almene formel



hvor

A, R¹ og R² har de i krav 1 angivne betydninger.

40. Forbindelse ifølge krav 39, KENDETEGNET ved, at R² er 2-furyl.

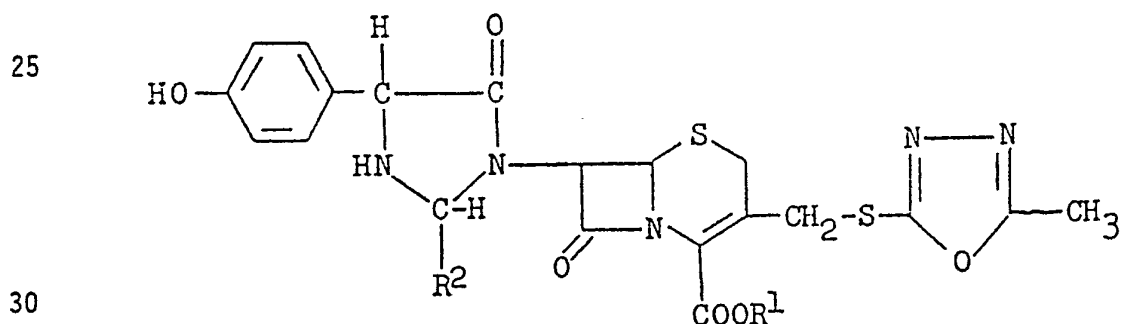
41. Forbindelse ifølge krav 39, KENDETEGNET ved, at R² er 2-furan-

15 5-sulfonsyre.

42. Forbindelse ifølge et eller flere af kravene 39-41, KENDETEGNET ved, at R¹ er natrium.

43. Forbindelse ifølge et eller flere af kravene 39-41, KENDETEGNET ved, at R¹ er kalium.

20 44. Forbindelse ifølge krav 39, KENDETEGNET ved, at den har den almene formel



hvor

R¹ og R² har de i krav 1 angivne betydninger.

35 45. Forbindelse ifølge krav 44, KENDETEGNET ved, at R² er 2-furyl.

46. Forbindelse ifølge krav 44, KENDETEGNET ved, at R² er 2-furan-5-sulfonsyre.

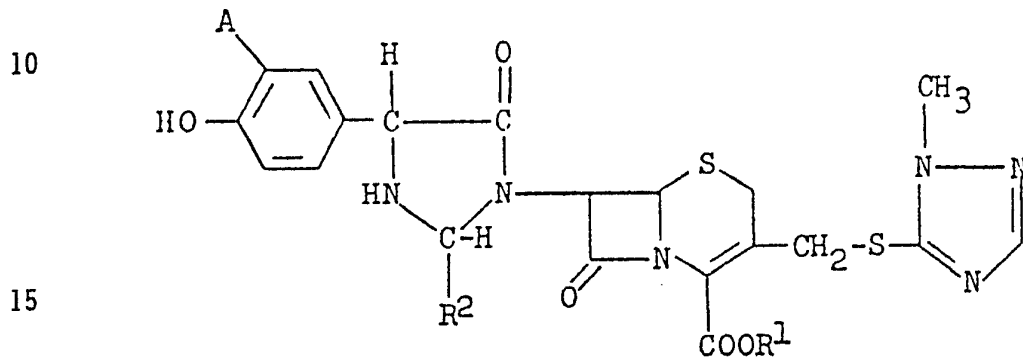
47. Forbindelse ifølge krav 45 eller 46, KENDETEGNET ved, at den

har D-konfiguration, og R^1 er natrium.

48. Forbindelse ifølge krav 45 eller 46, KENDETEGNET ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er kalium.

49. Forbindelse ifølge krav 45 eller 46, KENDETEGNET ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er hydrogen.

50. Forbindelse ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at den har den almene formel



hvor

A, R^1 og R^2 har de i krav 1 angivne betydninger.

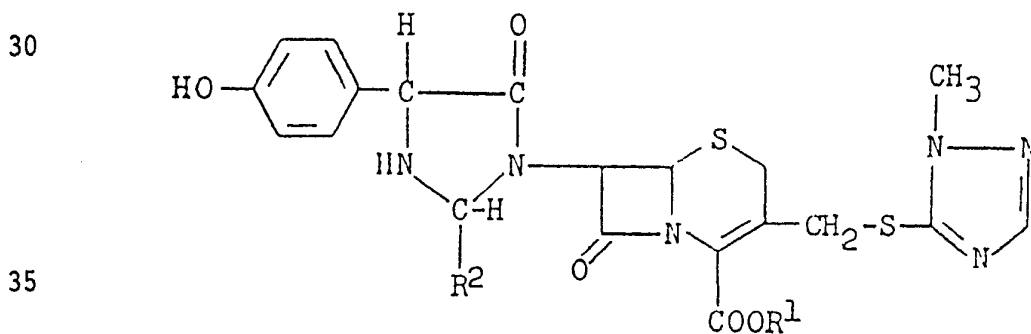
51. Forbindelse ifølge krav 50, KENDETEGNET ved, at R^2 er 2-furyl.

52. Forbindelse ifølge krav 50, KENDETEGNET ved, at R^2 er 2-furan-5-sulfonyl.

53. Forbindelse ifølge et eller flere af kravene 50-52, KENDETEGNET ved, at R^1 er natrium.

54. Forbindelse ifølge et eller flere af kravene 50-52, KENDETEGNET ved, at R^1 er kalium.

55. Forbindelse ifølge krav 50, KENDETEGNET ved, at den har den almene formel



hvor

R^1 og R^2 har de i krav 1 angivne betydninger.

56. Forbindelse ifølge krav 55, **KENDETEGNET** ved, at R^2 er 2-furyl.

57. Forbindelse ifølge krav 55, **KENDETEGNET** ved, at R^2 er 2-furan-

5 5-sulfonsyre.

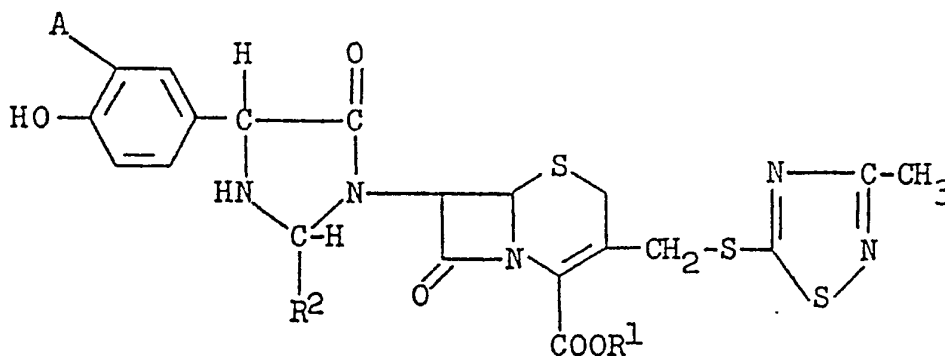
58. Forbindelse ifølge krav 56 eller 57, **KENDETEGNET** ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er natrium.

59. Forbindelse ifølge krav 56 eller 57, **KENDETEGNET** ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er kalium.

10 60. Forbindelse ifølge krav 56 eller 57, **KENDETEGNET** ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er hydrogen.

61. Forbindelse ifølge krav 1, **KENDETEGNET** ved, at den har den almene formel

15



20

25

hvor

A, R^1 og R^2 har de i krav 1 angivne betydninger.

62. Forbindelse ifølge krav 61, **KENDETEGNET** ved, at R^2 er 2-furyl.

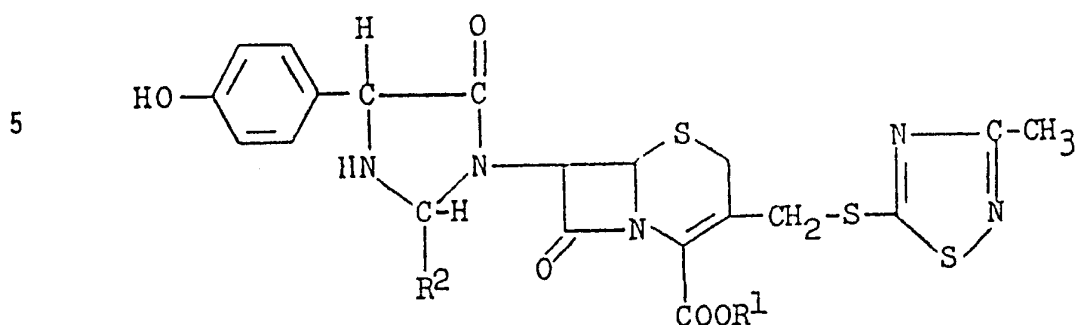
63. Forbindelse ifølge krav 61, **KENDETEGNET** ved, at R^2 er 2-furan-

30 5-sulfonsyre.

64. Forbindelse ifølge et eller flere af kravene 61-63, **KENDETEGNET** ved, at R^1 natrium.

65. Forbindelse ifølge et eller flere af kravene 61-63, **KENDETEGNET** ved, at R^1 er kalium.

35 66. Forbindelse ifølge krav 61, **KENDETEGNET** ved, at den har den almene formel



10

hvor

R^1 og R^2 har de i krav 1 angivne betydninger.

67. Forbindelse ifølge krav 66, **KENDETEGNET** ved, at R^2 er 2-furyl.

68. Forbindelse ifølge krav 66, **KENDETEGNET** ved, at R^2 er 2-furan-

15 5-sulfonsyre.

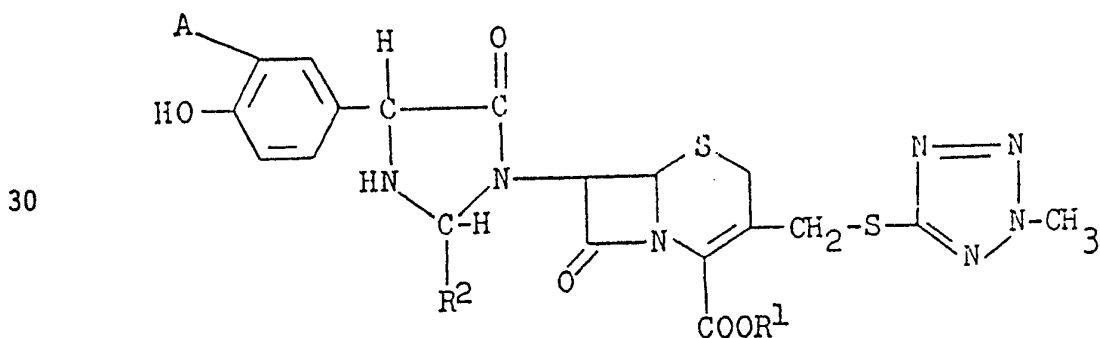
69. Forbindelse ifølge krav 67 eller 68, **KENDETEGNET** ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er natrium.

70. Forbindelse ifølge krav 67 eller 68, **KENDETEGNET** ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er kalium.

20 71. Forbindelse ifølge krav 67 eller 68, **KENDETEGNET** ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er hydrogen.

72. Forbindelse ifølge krav 1, **KENDETEGNET** ved, at den har den almene formel

25



35

hvor

A, R^1 og R^2 har de i krav 1 angivne betydninger.

73. Forbindelse ifølge krav 72, **KENDETEGNET** ved, at R^2 er 2-furyl.

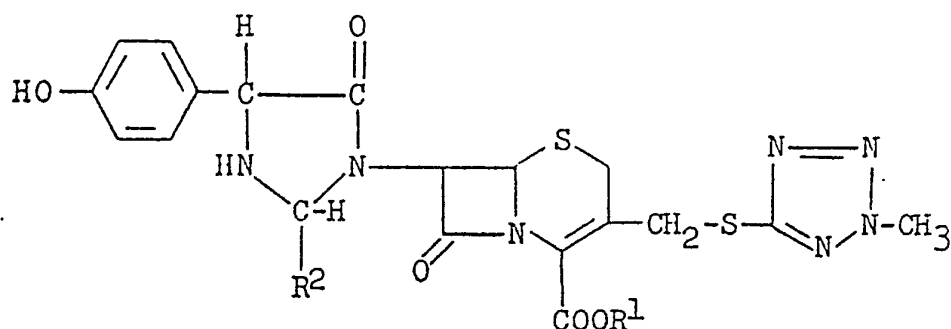
74. Forbindelse ifølge krav 72, **KENDETEGNET** ved, at R^2 er 2-furan-5-sulfonsyre.

75. Forbindelse ifølge et eller flere af kravene 72-74, **KENDETEGNET** ved, at R^1 er natrium.

76. Forbindelse ifølge et eller flere af kravene 72-74, **KENDETEGNET** ved, at R^1 er kalium.

77. Forbindelse ifølge krav 72, **KENDETEGNET** ved, at den har den almene formel

10



20

hvor

R^1 og R^2 har de i krav 1 angivne betydninger.

78. Forbindelse ifølge krav 77, **KENDETEGNET** ved, at R^2 er 2-furyl.

79. Forbindelse ifølge krav 77, **KENDETEGNET** ved, at R^2 er 2-furan-5-sulfonsyre.

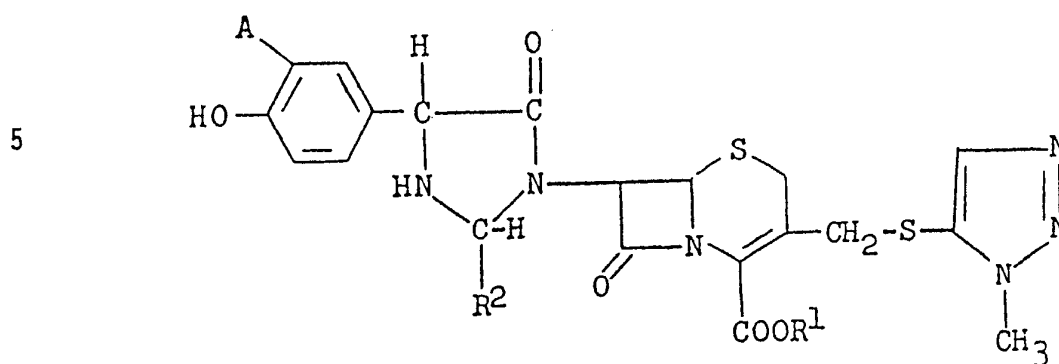
80. Forbindelse ifølge krav 78 eller 79, **KENDETEGNET** ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er natrium.

81. Forbindelse ifølge krav 78 eller 79, **KENDETEGNET** ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er kalium.

82. Forbindelse ifølge krav 78 eller 79, **KENDETEGNET** ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er hydrogen.

83. Forbindelse ifølge krav 1, **KENDETEGNET** ved, at den har den almene formel

35



hvor

A, R¹ og R² har de i krav 1 angivne betydningr.

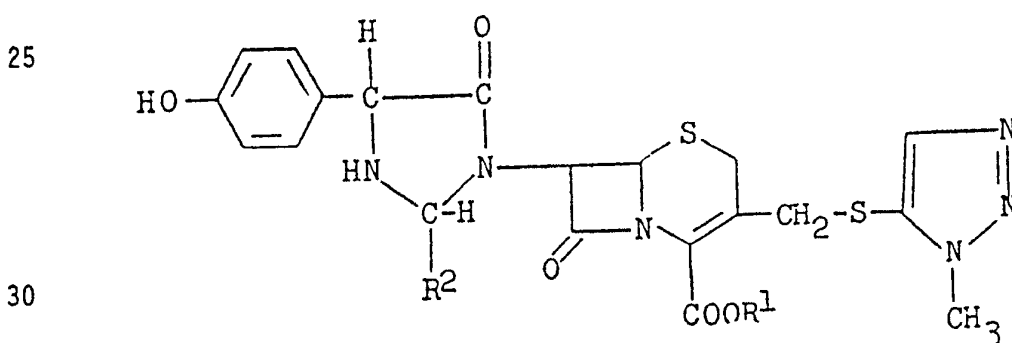
84. Forbindelse ifølge krav 83, KENDETEGNET ved, at R² er 2-furyl.

15 85. Forbindelse ifølge krav 83, KENDETEGNET ved, at R² er 2-furan-5-sulfonsyre.

86. Forbindelse ifølge et eller flere af kravene 83-85, KENDETEGNET ved, at R¹ er natrium.

20 87. Forbindelse ifølge et eller flere af kravene 83-85, KENDETEGNET ved, at R¹ er kalium.

88. Forbindelse ifølge krav 83, KENDETEGNET ved, at den har den almene formel



35 hvor

R¹ og R² har de i krav 1 angivne betydninger.

89. Forbindelse ifølge krav 88, KENDETEGNET ved, at R² er 2-furyl.

90. Forbindelse ifølge krav 88, KENDETEGNET ved, at R² er 2-furan-

5-sulfonsyre.

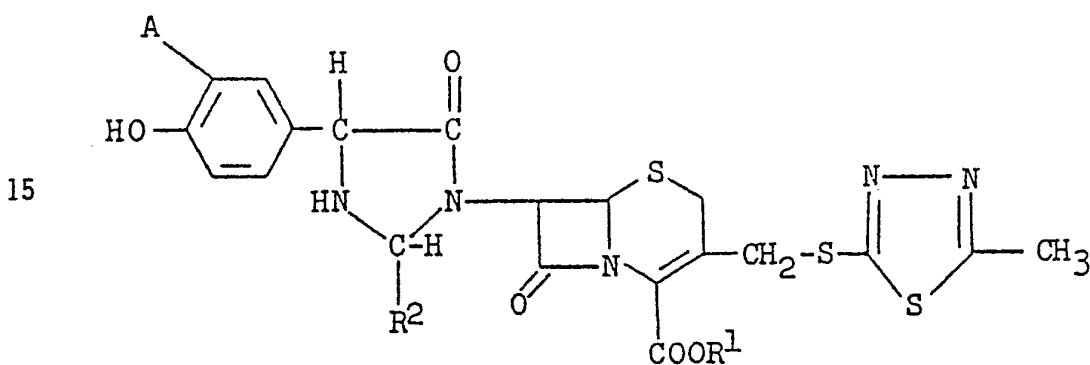
91. Forbindelse ifølge krav 89 eller 90, KENDETEGNET ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er natrium.

92. Forbindelse ifølge krav 89 eller 90, KENDETEGNET ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er kalium.

93. Forbindelse ifølge krav 89 eller 90, KENDETEGNET ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er hydrogen.

94. Forbindelse ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at den har den almene formel

10



hvor

A, R^1 og R^2 har de i krav 1 angivne betydninger.

95. Forbindelse ifølge krav 94, KENDETEGNET ved, at R^2 er 2-furyl.

96. Forbindelse ifølge krav 94, KENDETEGNET ved, at R^2 er 2-furan-

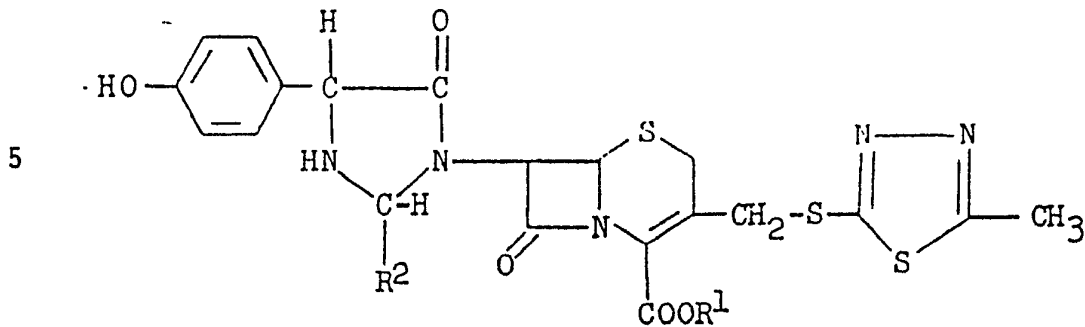
25 5-sulfonsyre.

97. Forbindelse ifølge et eller flere af kravene 94-96, KENDETEGNET ved, at R^1 er natrium.

98. Forbindelse ifølge et eller flere af kravene 94-96, KENDETEGNET ved, at R^1 er kalium.

30 99. Forbindelse ifølge krav 94, KENDETEGNET ved, at den har den almene formel

35



10 hvori

R^1 og R^2 har de i krav 1 angivne betydninger.

100. Forbindelse ifølge krav 99, **KENDETEGNET** ved, at R^2 er 2-furyl.

101. Forbindelse ifølge krav 99, **KENDETEGNET** ved, at R^2 er 2-furan-5-sulfonsyre.

15 102. Forbindelse ifølge krav 100 eller 101, **KENDETEGNET** ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er natrium.

103. Forbindelse ifølge krav 100 eller 101, **KENDETEGNET** ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er kalium.

20 104. Forbindelse ifølge krav 100 eller 101, **KENDETEGNET** ved, at den har D-konfiguration, og at R^1 er hydrogen.

105. Natrium- eller kaliumsalt af forbindelsen ifølge krav 1, **KENDETEGNET** ved, at det er saltet af det ækvimolære kondensationsprodukt af a) et aldehyd, som er forskelligt fra formaldehyd eller acetaldehyd, med b) en amfoter 3-thioleret cephalosporin, som i 3-stillingen har
25 gruppen $-CH_2-S-R^3$, hvori R^3 er 1,2,3-triazol-5-yl, der er usubstitueret eller substitueret med 1 eller 2 alkylgrupper med 1-4 carbonatomer, og hvilken 3-thioleret cephalosporin indeholder en α -substitueret α -aminoacetamidogruppe i 7-stillingen og i sin zwitterionform har en vandopløselighed på mindre end 125 mg/ml.

30 106. Natrium- eller kaliumsalt af forbindelsen ifølge krav 1, **KENDETEGNET** ved, at det er saltet af det ækvimolære kondensationsprodukt af a) et aldehyd, som har den almene formel R^2-CHO , hvori R^2 har den i krav 1 angivne betydning, med b) en amfoter 3-thioleret cephalosporin, som i 3-stillingen har gruppen $-CH_2-S-R^3$, hvori R^3 er 1,2,3-triazol-5-yl, der er usubstitueret eller substitueret med 1 eller 2 alkylgrupper
35 med 1-4 carbonatomer, og hvilken 3-thioleret cephalosporin indeholder en α -substitueret α -aminoacetamidogruppe i 7-stillingen og i sin zwitterionform har en vandopløselighed på mindre end 125 mg/ml.

107. Forbindelse ifølge krav 106, **KENDETEGNET** ved, at R² er 2-furan-5-sulfonsyre.

5

10

15

20