



**NORGE**

**[NO]**

**STYRET  
FOR DET INDUSTRIELLE  
RETTSVERN**

**[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 143158**

(51) Int' Cl.<sup>3</sup> C 07 D 501/22

(21) Patentsøknad nr. 110/72

(22) Inngitt 19.01.72

(23) Løpedag 19.01.72

(41) Alment tilgjengelig fra 21.07.72  
(44) Søknaden utlagt, utlegningsskrift utgitt 15.09.80  
(30) Prioritet begjært 20.01.71, USA, nr. 108218

(54) Oppfinnelsens benevnelse Fremgangsmåte for fremstilling av cefaleksin med forbedret renhet.

(71)(73) Søker/Patenthaver ELI LILLY AND COMPANY,  
307 Easy McCarty Street,  
Indianapolis, IN,  
USA.

(72) Oppfinner WILLIAM LEE GARBRECHT,  
Indianapolis, IN,  
USA.

(74) Fullmektig Cand. mag. Johan H. Gørbitz,  
Bryn & Aarflot A/S, Oslo.

(56) Anførte publikasjoner Ingen.

Denne oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstilling av cefaleksin med forbedret renhet. Cefaleksin er betegnelsen på 7-[D- $\alpha$ -amino- $\alpha$ -fenylacetamido]-3-metyl- $\Delta^3$ -cefem-4-karboksylysyre.

En metode som for tiden anvendes for fremstilling av cefaleksin, er å acylere en p-nitrobenzylester av 7-amino-desacetoksy-cefalosporansyre (7-ADCA-ester) i acetonitril med et C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl blandet anhydrid av fenylglycin, i hvilket glycin-derivat aminonitrogenet er beskyttet som enaminet med metyl-acetoacetat. For tiden fjernes estergruppen fra karboksylgruppen ved behandling av acetonitril-blandingen av cefaleksinesteren med et reduksjonsmiddel, f.eks. metallisk sinkstøv og syre. Dette syrereduksjonstrinn som også fjerner enaminet, etterfølges derefter av basebehandling for å heve blandingens pH-verdi til ca. pH 4,5 til 5,0, ved hvilken pH et indre salt av cefaleksin i urensset form utfelles.

Selv om denne syrereduksjon effektivt avspalter p-nitrobenzylestergruppen, dannes også visse forurensninger som er vanskelige å fjerne fra cefaleksin indre-salt-produktet. Blant slike forurensninger antas å være små mengder 7-ADCA, fenylglycin, og når p-nitrobenzylester anvendes, en forurensning hvis struktur ennå ikke er fastlagt med sikkerhet. Hva enn dens kjemiske struktur er, inneholder denne sistnevnte forurensning diazoterbart nitrogen som målt ved Bratton-Marshall-metoden beskrevet i det følgende. Fagfolk på cefalosporinområdet ville foretrekke å fjerne eller i det minste senke mengden av forurensningen med diazoterbart nitrogen til ubetydelige verdier i cefaleksinproduktet.

I henhold til oppfinnelsen tilveiebringes en fremgangsmåte for fremstilling av cefaleksin med forbedret renhet, karakterisert ved at

- a) N,N-dimetylformamid blandes med p-nitrobenzylesteren av cefaleksin,
- b) blandingen fra trinn a) behandles på i og for seg kjent måte i et surt medium med et reduksjonsmiddel,
- c) blandingen fra trinn b) innstilles med en base på en pH-verdi på 6,5 til 7,5, og de utfelte krystaller fraskilles,
- d) det i trinn c) erholdte cefaleksin-bis-(N,N-dimetylformamid) oppløses i en blanding av N,N-dimetylformamid og optil

143158

2

40 volum% av et polart, flytende fortynningsmiddel under surgjøring,

e) blandingen fra trinn d) innstilles med en base på en pH-verdi fra 6,5 til 7,5, og de utskilte krystaller fraskilles, idet trinnene d) og e) om nødvendig gjentas, og

f) det i trinn e) erholdte faste stoff oppløses i surgjort vann, oppløsningen oppvarmes til 40-70°C, oppløsningens pH-verdi innstilles på 4,5 til 5 med en base, og det utskilte cefaleksin fraskilles.

I trinn (b) kan reduksjonsmidlet f.eks. være metallisk sink som er findelt for lettvingt håndtering. Alternativt kan reduksjonsmidlet være hydrogen under kjente hydrogenerings-reduksjonsbetingelser i nærvær av en hydrogeneringskatalysator så som palladium eller rhodium på en kull- eller barium-sulfat-bærer, eller en palladium- eller rhodiumforbindelse suspendert i mediet som hydrogeneres. En hvilken som helst ikke-oksyderende syre kan anvendes til å tilveiebringe syremedit, men saltsyre foretrekkes. Omsetningen er tilnærmet fullstendig i løpet av kort tid, mens i praksis omrøres vanligvis blandingen eller får stå i noen få timer for å tillate fullstendig omsetning og for å tillate at eventuelle residuer og uomsatt sink utfelles. Reaksjonsblandingen kan derefter skilles fra residuene ved filtrering, dekantering, sentrifugering eller lignende.

Enhver hensiktsmessig base kan anvendes i trinn c) til behandling av reaksjonsblandingen. Valget vil generelt være avhengig av pris, tilgjengelighet og sikkerhet ved håndteringen. Det foretrekkes å anvende ammoniakk, ammoniumhydroksyd eller et N,N,N-tris(C<sub>1</sub> til C<sub>4</sub> alkyl)amin så som trietylamin. De økonomiske alkalimetallhydroksyder, f.eks. natriumhydroksyd og kaliumhydroksyd, kan imidlertid også anvendes.

Det i trinn c) erholdte kompleks, eller solvat som det betegnes av noen, av cefaleksin med DMF (N,N-dimetylformamid) er et nytt, krystallinsk stoff som har alle karakteristika for en kjemisk forbindelse. Det gir røntgen-mønster som er karakteristisk for et krystallinsk stoff. Komplekset cefaleksin-bis(DMF) viser konsekvent måleresultater på ca. 70 til 72% cefaleksin og 28 til 30% DMF ved den ultraviolette spektralmetode, og er stabilt ved romtemperatur. Det kan tørres ved 30 til 50°C til konstant vekt.

I trinn d) anvendes som polart, flytende fortynningsmiddel fortrinnsvis en blanding av ca. 90% DMF og ca. 10 volum% vann. Andre polare, flytende fortynningsmidler som kan anvendes, omfatter C<sub>1</sub> til C<sub>3</sub> alkanoler så som metanol, etanol og isopropanol, og andre forbindelser så som aceton, acetonitril, nitrometan eller metyletylketon. Generelt tilsettes ikke-oksyderende syrer så som saltsyre, for å fremme oppløsningsgraden. En passende base, så som ammoniumhydroksyd eller trietylamin, tilsettes i trinn e) for å heve pH-verdien til det nivå hvor cefaleksin-solvat-komplekset utfelles effektivt, dvs. ved en pH på 6,5 til 7,5.

For endelig fremstilling av cefaleksin anbringes cefaleksin-bis(N,N-dimetylformamid)-komplekset i trinn f) i vann, syre tilsettes for å senke pH-verdien til 1-2, blandingen oppvarmes til 40 til 70°C, fortrinnsvis 50 til 60°C, for å danne monohydratet, og derefter tilsettes en base, så som ammoniumhydroksyd eller trietylamin, for å heve pH-verdien til det punkt ved hvilket cefaleksin-zwitterion-monohydrat utfelles... Denne pH vil være mellom 4,5 og 5,0, og den nøyaktige, foretrukne verdi vil være avhengig av det anvendte oppløsningsmiddel-system. Cefaleksin-zwitterionet (cefaleksin-indre-saltet) kan gjenvinnes fra reaksjonsblandingen ved vanlige metoder, vaskes med acetonitril, tørres og derefter tilberedes til farmasøytiske preparater for anvendelse ved antibiotisk behandling ved be- kjempelse av forskjellige infeksjonssykdommer. Spesielle preparatformer, kapsler eller tabletter, størrelser og administreringsformer for cefaleksin er kjent innen teknikken.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer forbedringer ved fremgangsmåten for fremstilling av cefaleksin, som tillater at acylering og fjernelse av estergrupper kan utføres separat og optimaliseres uavhengig av hverandre. Ved den nye fremgangsmåte fremstilles et cefaleksinprodukt som er klart overlegent med hensyn til frihet for sink, fenylglycin og 7-ADCA i tidligere mellomprodukttrinn. Mangelen på disse forurensninger er hensiktsmessig, fordi utbyttet og påliteligheten av den endelige, vandige krystallisasjon av cefaleksin-hydrat forbedres. Fremgangsmåte-forbedringen i henhold til oppfinnelsen tilveiebringer dessuten en mer fullstendig gjenvinning av cefaleksininnholdet, idet gjenvinningen fra DMF er i størrelsesorden 95-98% pr.

143158

4

gjenutfelling.

De følgende eksempler skal tjene til å illustrere oppfinnelsen ytterligere.

#### Eksempel 1

##### Spaltning av p-nitrobenzylester

En blanding av 26,0 g av p-toluensulfonat-saltet av cefaleksinesteren, p-nitrobenzyl-3-metyl-7-(D- $\alpha$ -amino- $\alpha$ -fenyl-acetamido)- $\Delta^3$ -cefem-4-karboksylat, 200 ml N,N-dimetylformamid (DMF) og 20,0 ml konsentrert, vandig saltsyre ble omrørt og holdt ved ca. 5°C med utvendig avkjøling mens 10,4 g pulverisert sink ble tilsatt porsjonsvis i løpet av 0,5 time. Blandingen ble derefter omrørt i 1 time uten ytterligere avkjøling, og derefter holdt ved romtemperatur i flere timer. Etter filtrering ble cefaleksininholdet i filtratet utfelt ved gradvis regulering av blandingens pH til 6,5 med trietylamin. Det farveløse, krystallinske produkt, et bis(dimetylformamid)-solvat av cefaleksin, ble oppsamlet, vasket med DMF og derefter etylacetat og tørret. Produktet veide 16,5 g og viste følgende analyse-data:

Cefaleksin (base) innhold, UV (264 m $\mu$ )	72,2%
Diazoterbart nitrogen (metode med optisk tetthet)	ca. 2000 deler/mill. (dpm)
Sink	30 dpm
Fenylglycin	0,01%
7-ADCA	0,13%

##### Rensning av cefaleksin-bis(DMF)solvat i DMF

En 16,0 g porsjon av cefaleksin-2DMF solvatproduktet, fremstilt som beskrevet ovenfor, ble oppløst i 160 ml av en blanding av 95% DMF og 5% vann ved regulering av pH til ca. 2 med konsentrert saltsyre. Den lysegule oppløsning ble filtrert, og filtratet ble behandlet med trietylamin til pH 6,5 for å utfelle cefaleksin-bis(DMF)solvat som produkt. Produktet ble oppsamlet, vasket med DMF og etylacetat og tørret. Det farveløse, krystallinske produkt hadde et smeltepunkt på 183-186°C og veide 15,7 g, hadde et karakteristisk røntgen-diffraksjonsmønster og hadde følgende analysedata:

143158

5

Cefaleksin (base), UV (264 m $\mu$ ) metode	72,0%
Diazoterbart aminonitrogen	ca. 150 dpm
Sink	ikke påvisbart
Fenylglycin	" "
7-ADCA	" "

Komplekset ble oppløst i surgjort vann, oppvarmet til 40-70°C, pH-verdien ble innstilt på ca. 4,5, og det utskilte cefaleksin ble fraskilt.

### Eksempel 2

#### Trinn a) - c)

Til et 280 l glassforet kar ble satt 108 liter N,N-dimetylformamid (DMF) avkjølt til -10°C. Derefter ble halvparten av en porsjon på 7,7 liter saltsyre av reagenskvalitet og 10 kg av paratoluensulfonatsaltet av p-nitrobenzylesteren av cefaleksin tilsatt hver for seg. Den annen halvpart av de 7,7 liter saltsyre ble derefter tilsatt. Til denne blanding ble satt 4,08 kg sinkstøv i løpet av 40 minutter mens blandingen ble holdt avkjølt til under +12°C. Derefter ble 10,8 liter saltsyre tilsatt i løpet av 30 min., og blandingen ble omrørt natten over ved +20°C. Blandingen ble filtrert, ca. 800 g residuum og utfelt sinkstøv ble oppsamlet på en filterhjelp (Hyflo pad) i en Büchner-trakt. Det oppsamlede materiale var hovedsakelig et gult residuum og mindre enn 20 g sinkstøv. Det filtrerte materiale på Büchner-trakten ble vasket med 4 liter DMF. Filtratet som inneholdt produktet, ble behandlet med trietylamin til pH 6,9 for å utfelle cefaleksin·bis(N,N-dimetylformamid). Det utfelte produkt ble filtrert på en Büchner-trakt, vasket 3 ganger (15 liter hver gang) med DMF, fulgt av 2 vaskinger (15 liter hver gang) med etylacetat. De vaskede produkter ble tørret ved 32°C. Man fikk 5,05 kg av cefaleksin·bis(DMF)-komplekset. Teoretisk vekt for rent cefaleksin, basert på vekten av utgangsmaterialet var 4,695 kg. Det faktiske utbytte var 77,5%. Cefaleksininholdet ved analyse med ultraviolet lys (264 m $\mu$ ) var 72,0%. Innholdet av diazoterbart nitrogen var ca. 2000 dpm. 7-aminodesacetoksycefalosporansyre (7-ADCA)-innholdet var 0,07 vekt%. Produktet hadde en grå farve.

Fremgangsmåten beskrevet ovenfor ble gjentatt i en målestokk på 14,6 kg (av para-toluensulfonat-saltet av para-nitrobenzylesteren av cefaleksin), bortsett fra at blandingen ble avkjølt til

143158

6

-5°C og sinkstøvet ble drysset inn i reaksjonsblandingen i løpet av 35 minutter. Temperaturen ble holdt under 12°C. Totalt 5,34 kg sinkstøv ble anvendt. Etter tilsetning av 14,13 liter saltsyre og oppvarming til 22°C ble blandingen omrørt natten over. Den neste dag ble blandingen filtrert. Residuet ble oppsamlet og vasket med DMF (4 liter). Filtratets pH ble regulert til 5,2, og derefter ble 2 g av cefaleksin-bis(DMF)-komplekset tilsatt som pødekim. Blandingen ble omrørt i 30 minutter. Da de utfelte cefaleksin-bis(DMF)-krystaller var av en godt filtrerbar størrelse, ble oppslemningens pH-verdi regulert til 6,0, og blandingen ble omrørt i 15 minutter. pH-verdien ble regulert til 6,9, blandingen ble omrørt i 15 minutter og derefter filtrert. Filtreringstiden var 45 minutter. Medfølgende vasker ble fortrent med tre vaskinger (15 liter hver gang) med DMF og to vaskinger (15 liter hver gang) med etylacetat. Det krystallinske cefaleksin-bis(DMF) ble tørret og veide da 7,568 kg. Produktet hadde hvit farve. Cefaleksin-base-innholdet ved ultraviolet analyse (264 mμ) var 71,7%. Den teoretiske vekt av cefaleksin i dette disolvatprodukt var 6,3 kg. Det faktiske utbytte var 86,1%. Innholdet av diazoterbart nitrogen var ca. 1000 dpm. 7-ADCA-innholdet var 0,14%.

En annen porsjon fremstilt på tilnærmet den samme måte resulterte i et utbytte på 7,87 kg (80,6% utbytte) av det hvite cefaleksin-bis(DMF)-solvat krystallinske produkt, som ved analyse viste seg å inneholde 70,0% cefaleksin, ca. 2000 dpm diazoterbart nitrogen og 0,09% 7-ADCA.

Fra et fjerde forsøk i samme målestokk fikk man 7,38 kg (85% utbytte) av cefaleksin-bis(DMF) krystallinsk produkt, som inneholdt 71,4% cefaleksin, ca. 1500 dpm diazoterbart nitrogen og 0,09% 7-ADCA.

#### Trinn d) - e)

En blanding av de urensede cefaleksin-bis(DMF)-solvater fremstilt som beskrevet ovenfor, totalt 19,4 kg (av cefaleksin-zwitterion-materiale) ble oppløst i en blanding av 247 liter DMF og 28 liter destillert vann. pH-verdien ble regulert til 2,0 med ren saltsyre. pH-verdien ble derefter regulert til pH 6,9 med ammoniumhydroksyd. Blandingen ble derefter filtrert

på to Büchner-trakter og vasket med to porsjoner (18 liter pr. porsjon) 100% DMF. Etter uttagelse av en prøve (0,901 kg) ble resten av det filtrerte, halvrensede cefaleksin·bis(DMF)-kompleks oppløst påny i en blanding av 247 liter DMF og 28 liter vann ved hjelp av saltsyre. pH-verdien ble derefter regulert til pH 6,9 med ammoniumhydroksyd. Blandingen ble derefter filtrert for å oppsamle produktet, cefaleksin·bis(DMF)-kompleks, på Büchner-trakter. Produktet ble vasket to ganger med 15 liter porsjoner DMF og derefter to ganger med etylacetat (15 liter og 12 liter). Det rensede cefaleksin·bis(DMF)-kompleks ble derefter tørret. Den totale vekt var 24,0 kg pluss 115 g for prøver. Cefaleksin-base-innholdet målte 70,0% ved den ultrafiolette spektralmetode (264 m $\mu$ ). Innholdet av diazoterbart nitrogen var ca. 300 ppm. Det faktiske utbytte var 90,0%.

#### Trinn f)

Til et 280 liter åpent, glassforet kar med en rører, ble det satt 92 liter destillert vann, 6 kg saltsyre av reagenskvalitet og 23 kg av cefaleksin·bis(DMF)-komplekset. Denne blanding ble tilsatt 11,5 liter avionisert vann og derefter 0,640 kg natriumetylendiamin-tetracetat i 5,5 liter destillert vann, og 1,67 kg trekull ("Darco G 60") ble tilsatt, og blandingen ble omrørt i én time. Oppløsningen ble derefter filtrert gjennom et glassfilter på en plate og rammepresse, og vasket med 15,3 liter destillert vann. Filtratet og vaskevann ble overført til et 280 liter destillasjonskar og oppvarmet til 55°C. pH-verdien ble regulert til 4,5 med trietylamin. Noe overskudd av trietylamin samlet seg ved røreren. Denne ansamling av aminoverskudd ble nøytralisert med 3,0 liter saltsyre. Den maksimale pH var 5,6 i mindre enn 5 minutter. Blandingen ble filtrert på en Büchner-trakt, vasket med 5 liter vann og to 15-liter vaskinger med avionisert vann. Filtratet (180 liter) ble avkjølt og overført til et 280 liter destillasjonskar. Derefter ble 90 liter acetonitril tilsatt for å utfelle den annen porsjon. Begge produkter ble lufttørret ved 32°C til konstant vekt. Man fikk et produkt på 12,5 kg cefaleksin-monohydrat (93% cefaleksinbase) som målt ved ultrafiolett analyse (264 m $\mu$ ). Innholdet av diazoterbart nitrogen var mindre enn 50 ppm. DMF-innholdet var 0,0602%. Vanninnholdet ved den analytiske metode ifølge Karl Fischer var 6,25%.

143158

8

Den analytiske metode for måling av innhold av diazoterbart amin i cefaleksinproduktet er angitt i det følgende:

Diazoterbart amin i cefaleksin-hydrat

Kjemisk navn: 7-(D- $\alpha$ -amino- $\alpha$ -fenylacetamido)-3-metyl-3-cefem-4-karboksylysyre

Generisk navn: Cefaleksin

Målingstype : Kolorimetrisk

Måling anvendt

for: Påvisning av mengder av diazoterbart amin.

I. Apparat:

Beckman modell DU spektrofotometer eller annet egnet spektrofotometer.

II. Reagenser:

1. Saltsyre, 0,5 N
2. Natriumnitrit, 0,1% i H<sub>2</sub>O
3. Ammoniumsulfamat, 0,5% i H<sub>2</sub>O
4. N-(1-naftyl)-etylendiamin-dihydroklorid, 0,1% i H<sub>2</sub>O.

III Metode:

Vei nøyaktig opp ca. 100 mg cefaleksinprøve i en 50 ml Erlenmeyer-kolbe. Tilsett 3,0 ml H<sub>2</sub>O fulgt av 10,0 ml 0,5 N HCl. Tilsett 2,0 ml 0,1% natriumnitrit, bland sammen og la det hele stå i 3 minutter. Tilsett 2,0 ml 0,5% ammoniumsulfamat, bland sammen og la det hele stå i 3 minutter. Tilsett 2,0 ml 0,1% N-(1-naftyl)-etylendiamin-dihydroklorid. Bland godt sammen og la det hele stå i 20 minutter. Bestem absorpsjonen av denne oppløsning ved 550 millimikron på et egnet spektrofotometer under anvendelse av 1,0 cm celler og H<sub>2</sub>O i referansecellen.

IV. Resultater:

$$\text{Abs.}_{550\text{m}\mu} \times \frac{100}{\text{prøvens vekt}} = \text{Absorpsjon pr. 100 mg cefaleksin}$$

V. Bemerkninger:

Den nedre grense ved denne metode er ca. 50 dpm.

Fotnote: Denne metode er en viss modifikasjon av den som er beskrevet av A.C. Bratton og E.K. Marshall, Jr. i J. Biol. Chem., 128, (1939), s. 537 - 550.

P a t e n t k r a v

Fremgangsmåte for fremstilling av cefaleksin med forbedret renhet, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

a) N,N-dimetylformamid blandes med p-nitrobenzyl-esteren av cefaleksin,

b) blandingen fra trinn a) behandles på i og for seg kjent måte i et surt medium med et reduksjonsmiddel,

c) blandingen fra trinn b) innstilles med en base på en pH-verdi på 6,5 til 7,5, og de utfelte krystaller fraskilles,

d) det i trinn c) erholdte cefaleksin-bis-(N,N-dimetylformamid) oppløses i en blanding av N,N-dimetylformamid og opptil 40 volum% av et polart, flytende fortynningsmiddel under surgjøring,

e) blandingen fra trinn d) innstilles med en base på en pH-verdi fra 6,5 til 7,5, og de utskilte krystaller fraskilles, idet trinnene d) og e) om nødvendig gjentas, og

f) det i trinn e) erholdte faste stoff oppløses i surgjort vann, oppløsningen oppvarmes til 40-70°C, oppløsningens pH-verdi innstilles på 4,5 til 5 med en base, og det utskilte cefaleksin fraskilles.