



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 29.11.74 (P. 176070)

Pierwszeństwo: 23.09.74 Stany Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 03.11.75

Opis patentowy opublikowano: 15.08.1979

CZYTELNIA

Urząd Patentowy
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Int. Cl.²

C07D 501/34
A61K 31/545

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Merck and Co. Inc., Rahway (Stany Zjednoczone
Ameryki)

Sposób wytwarzania pochodnych cefalosporyny

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania pochodnych cefalosporyny.

Znana metoda wytwarzania cefalosporyn zawierających grupę 7-acyloamidową, stosowanych w terapii jako antybiotyki, polega na wytworzeniu pochodnej 7-aminocefalosporyny, a następnie acylowaniu z wytworzeniem pożądanego produktu. Mankamentem tego sposobu jest konieczność wydzielania i oczyszczenia pośredniej pochodnej 7-aminocefalosporyny. W związku z tym szukano metod pozwalających uniknąć potrzeby wytwarzania kwasu 7-aminocefalosporynowego.

Stwierdzono, że cefalosporyny zawierające w pozycji 7 w miejsce atomu wodoru grupę metoksyłową, wytwarzane są przez różne drobnoustroje. Cefalosporyny te zawierają jako łańcuch boczny grupę aminoadypoilową. Grupę tę korzystnie jest usunąć w celu uzyskania nowych 7- α -metoksycefalosporyn wykazujących działanie antybiotyczne.

Sposobem według wynalazku wytwarza się związki o wzorze ogólnym 1, w którym R¹ oznacza atom wodoru lub łatwą do usunięcia grupę blokującą stosowaną w chemii cefalosporyny taką, jak grupa metoksymetylowa lub benzhydrilowa, A oznacza grupę karbamyllooksyłową lub acetoksyłową.

Sposób według wynalazku polega na tym, że związek o wzorze ogólnym 2, w którym A oznacza grupę karbamyllooksyłową lub metoksyłową, a każde R² ma niezależnie od siebie wyżej podane zna-

2

czenie miesza się z chlorkiem tienyloacetylu w obecności syntetycznego zeolitu typu 3A, 4A, 5A lub 13X, użytego w stosunku wagowym około 0,5—2:1 w odniesieniu do ilości związku o wzorze 2, przy czym zeolit zawiera od około 0 do 30% wagowych wody hydratacyjnej, w temperaturze pomiędzy około 50°C—90°C w obojętnym rozpuszczalniku w ciągu od około 30 minut do 30 godzin, a następnie ewentualnie dodaje się środek rozszczepiający taki jak np. woda, alkohol benzylowy, alkohol o 1—6 atomach węgla lub alkokotiole 1—6 atomach C albo kwas chlorowodorowy po czym wydziela pożądaný produkt. Temperatura w jakiej prowadzi się tę reakcję, nie jest wielkością decydującą i ogólnie uzyskuje się pożądané wyniki stosując temperaturę od —20°C do 100°C, jednak korzystniej jest prowadzić proces w temperaturze od 50°C do 90°C. Odpowiednimi rozpuszczalnikami do przeprowadzenia tej reakcji są takie, które nie zawierają aktywnego atomu wodoru, na przykład chloroform, acetonitryl, chlorek metylenu, dioksan, benzen, chlorowcobenzen, czterochlorek węgla, eter dwuetylowy i tym podobne.

W sposobie według wynalazku jako sita molekularne stosuje się zeolity glinianowo-krzemianowe. Mówiąc ogólnie, jako występujące w naturze zeolity określa się całą grupę krystalicznych, uwodnionych glinokrzemianów jedno lub dwuwartościowych zasad, z których można częściowo lub całkowicie usunąć wodę hydratacyjną bez naruszenia

struktury krystalicznej i w miejsce wody mogą być adsorbowane inne związki oraz te, które mogą podlegać wymianie zasadowej.

Syntetyczne zeolity wytwarza się z mieszaniny zasadowych tlenków (Al_2O_3 , SiO_2 , Na_2O , K_2O i tak dalej) w roztworze wodnym, uzyskując uwodnione lub półwodne substancje krystaliczne. Następnie, w wyniku obróbki cieplnej, można przeprowadzić zeolity w postać bezwodną. Syntetyczne zeolity charakteryzuje się i klasyfikuje na podstawie pomiarów dyfrakcji metodą rentgenografii proszkowej. Jakkolwiek brak jest syntetycznych metod nazewnictwa chemicznego syntetycznych glino-krzemianów, historycznie każdy nowy, syntetyczny zeolit oznacza się umownie literą lub grupą liter i liczb. Znaczenie tych umownie przyjętych symboli jest dobrze zrozumiałe dla znających zagadnienie.

Stwierdzono, że syntetyczne zeolity należące do klas A i X są szczególnie odpowiednie do stosowania w opisanym powyżej procesie acylacji. Wielkość porów w tych zeolitach wynosi od 3 do około 15 μ . Zeolity te są zasadniczo bezwodne lub zawierają pewną ilość wody hydratacyjnej. Ilość wody zawartej w zeolicie wynosi od 0 do 30% wagowych.

Reakcja transacylowania, która zachodzi w sposobie według wynalazku, przebiega dwuetapowo, przy czym w pierwszym etapie powstaje związek pośredni, a mianowicie 7-dwuacyloimidowa pochodna cefalosporyny, która ulega następnie rozszczepieniu z wytworzeniem pożądanego nowego produktu czyli nowej pochodnej 7-acyloamidowej cefalosporyny o wzorze 1.

Rozszczepienia takie można przeprowadzić wieloma sposobami. Po pierwsze, przedłużając jedynie czas reakcji w obecności nadmiaru środka acylującego. Po drugie, związek końcowy uzyskuje się, gdy w sicie molekularnym znajduje się woda, która powoduje hydrolizę związku pośredniego i uzyskuje się produkt końcowy z wysoką wydajnością. Obie te metody można określić jako metody „pasywne” w tym znaczeniu, że nie wymagają dodawania osobno „środka rozszczepiającego” do mieszaniny reakcyjnej.

Trzecia metoda polega na tym, że dodaje się alkohol benzynowy, alkanol lub niższy alkanol o 1–6 atomach węgla. Jako czwarty sposób można stosować również dodatek kwasu chlorowodorowego jako środka rozszczepiającego produkt pośredni.

Istotną korzyścią wynikającą ze sposobu według niniejszego wynalazku jest stwierdzony fakt, że wytwarzane na drodze fermentacji przez różne gatunki *Streptomyces cefalosporyny* można przekształcić w pochodne zawierające inne grupy acylowe w miejsce grupy aminoadypilowej, bez konieczności uprzedniego usunięcia tej grupy i dopiero następnie powtórnego acylowania pośredniego związku 7-aminowego.

Stosowane sита molekularne są dostępne w handlu. Korzystnie jest stosować syntetyczne zeolity o regularnej strukturze krystalicznej i jednolitych wymiarach porów. W sposobie według wynalazku znajdują zastosowanie najczęściej spotykane sита

typu 3A, 4A, 5A i 13X. Własności tych sit przedstawiono w poniższej tablicy.

Typ	Wzór	Średnica porów
3A	$\text{K}_9\text{Na}_3(\text{AlO}_2)_{12} \cdot 27\text{H}_2\text{O}$	3Å
4A	$\text{Na}_{12}(\text{AlO}_2)_{12}(\text{SiO}_2)_{27}\text{H}_2\text{O}$	4Å
5A	$\text{Ca}_{45}\text{Na}_3(\text{AlO}_2)_{12} \cdot 3\text{CH}_2\text{O}$	5Å
13X	$\text{Na}_{26}(\text{AlO}_2)_{86}(\text{SiO}_2)_{106} \cdot x\text{H}_2\text{O}$	10Å

Sita stosuje się w formie zasadniczo bezwodnej. Można je użyć w takiej postaci lub odwodnionej przed użyciem do zawartości wody $0\% \pm 2\%$ na drodze ogrzewania w temperaturze około 500°C lub wyższej. Mogą być także użyte przy zawartości wody hydratacyjnej wynoszącej do około 30% wagowych w stosunku do podłoża sita. Uwodnione sита wytwarza się umieszczając je w komorze o wysokiej wilgotności lub w otoczeniu o dużej wilgotności lub zamieszczając je w wodzie, a następnie suszy się je do pożądanego zawartości wilgoci pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze pokojowej lub zwiększonej.

Zwykle czas suszenia wynosi około 2–5 godzin, chociaż nie jest wielkością decydującą.

Poziom nawilgocenia oznacza się metodą Karla Fischera lub innym stosowanym sposobem.

Potrzebna ilość sita może być różna w zależności od wybranych warunków prowadzenia procesu. Zwykle, korzystnie jest użyć sito w ilości w przybliżeniu równej wagowo ilości użytego związku o wzorze 2, to jest w stosunku 0,5–2:1 wagowo, w odniesieniu do ilości związku o wzorze 2.

Jak już wspomniano uprzednio, pierwotna grupa acylowa ulega odszczepieniu w różny sposób. W niektórych przypadkach wystarczające jest po prostu pozostawienie mieszaniny reakcyjnej na pewien okres czasu. Na przykład, gdy sito zawiera 10% – 30% wody, mieszaninę pozostawia się w ciągu od 30 minut do 30 godzin. Alkanol, niższy alkanol lub alkohol benzylowy można dodawać stosując wówczas krótszy okres w ciągu jakiego pozostawia się mieszaninę reakcyjną w celu odszczepienia pierwotnej grupy acylowej. Jako alkanol lub niższy alkanol można stosować te, które zawierają 1–6 atomów węgla, a korzystnie metanol, etanol, izopropanol lub III rz. butanol. Jako środek do odszczepiania grupy acylowej można również stosować kwas solny. Samorzutne odszczepianie się grupy aminoadypilowej zachodzące podczas reakcji acylowania, spowodowane jest równowagowym charakterem tej reakcji, zależnym od warunków prowadzenia procesu acylacji. Przedłużenie czasu ogrzewania mieszaniny reakcyjnej powoduje odszczepienie grupy aminoadypilowej i wytworzenie pożądanego pochodnej 7-cylocefalosporyny, zwłaszcza, gdy sito zawiera więcej niż 10% wody.

Odszczepianie grupy ochraniającej lub blokującej grupę karboksylową przeprowadza się, stosując

ogólnie znane sposoby postępowania. Tak więc, na przykład, grupę metoksymetylową usuwa się, stosując kwas solny w temperaturze 0°C–10°C, grupę tróchloroetoksykarbonylową usuwa się na drodze reakcji z cynkiem w kwasie octowym, a grupy IIIr-butoksykarbonylową i benzhydriolową usuwa się na drodze reakcji z kwasem trójfluorooctowym. Inne sposoby usuwania tych grup przeprowadza się w podobnie dogodny sposób.

Przykład I. Kwas 3-karbamylooksymetylo-7-metoksy-7-β-tienyloacetamido-3 - cefemokarboksylowy-4

A. Kwas 7-β-(D-5-tosyloamino-5-karboksywaleramido)-3-karbamylooksymetylo-7-metoksy - 3-cefemokarboksylowy-4.

45,0 ml wodnego roztworu o stężeniu 49,5 mg/ml soli jednosodowej kwasu 7-β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido) - 3-karbamylooksymetylo-7-metoksy-3-cefemokarboksylowego-4 miesza się z 450 ml acetonu i 450 ml wody i doprowadza się pH mieszaniny do 9,5–9,6 za pomocą 50% roztworu wodorotlenku sodu. Do mieszaniny dodaje się porcjami 19 g chlorku tosyłu w 100 ml acetonu. Za pomocą roztworu wodorotlenku sodu utrzymuje się pH mieszaniny w granicach 9,5–9,6. Po upływie 15–20 minut pH ustabilizowuje się. Reakcję sulfonowania prowadzi się w ciągu 1 godziny w temperaturze 20–23°C.

Po tym czasie roztwór ochładza się na łaźni lodowej i pH obniża się do 7 dodatkiem ochłodzonego lodem roztworu 1:1 kwasu solnego. Roztwór ekstrahuje się octanem etylu. Fazę octanową przemycia się 100 ml 5% roztworu chlorku sodu. Fazę organiczną odrzuca się, a do fazy wodnej dodaje się 500 ml octanu etylu i doprowadza się pH do 2,5. Po rozdzieleniu faz, fazę wodną ekstrahuje się jeszcze 3 razy po 500 ml octanu etylu. Ekstrakty octowe przemycia się 100 ml nasyconego roztworu chlorku sodu, suszy nad siarczanem sodu i zateża do niewielkiej objętości w temperaturze 30°C.

Zateżony roztwór rozcieńcza się następnie w 200 ml izopropanolu, ogrzewa do temperatury 40–45°C i dodaje się 5,8 ml kwasu octowego i 21,6 ml dwucykloheksyloaminy.

Zawiesinę tę powoli się ochładza i pozostawia w temperaturze pokojowej w ciągu nocy. Produkt odsącza się, przemycia 100 ml izopropanolu i suszy w ciągu nocy w temperaturze pokojowej pod znacznym obniżonym ciśnieniem.

Uzyskuje się 44,5 g soli dwucykloheksyloaminowej kwasu 7-β-(D-5-tosyloamino-5-karboksywaleramido) - 3 - karbamylooksymetylo - 7-metoksy-3-cefemokarboksylowego-4.

Analiza w nadfiolecie (bufor o pH 7,0):

$\lambda_{\max}$ 2620 E% 94,7

Równoważnik wagowy (miareczkowanie HClO_4) — 481,5 (teoretycznie — 481,5)

Analiza elementarna dla $\text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{N}_6\text{O}_{11}\text{S}_2$:

Obliczono: C—58,60%, H—7,74%, N—8,72%

Oznaczono: C—58,29%, H—7,29%, N—8,73%

B. Ester dwumetoksymetylowy kwasu 7-β-(D-5-tosyloamino-5-karboksywaleramido) - 3 - karbamylooksymetylo-7-metoksy-3-cefemokarboksylowego-4.

20 g soli tosyłowej z etapu A umieszcza się w trójszyjnej kolbie. Do kolby dodaje się 200 ml

chlorku metylenu i zawiesinę ochładza się do temperatury 0°C na łaźni lodowej w atmosferze azotu. Do mieszaniny reakcyjnej dodaje się przy mieszanii w ciągu 90 minut 4,1 ml eteru chlorometylometylowego w 30 ml chloru metylenu, chłodząc mieszaninę lodem. Po upływie dalszej godziny dodaje się dodatkowo 1,58 ml w 5 ml chlorku metylenu.

Po zakończeniu dodawania, roztwór miesza się w ciągu dalszych 2 godzin, sączy i osad przemycia się suchym chlorkiem metylenu. Po ekstrakcji za pomocą wodnych roztworów kwasu fosforowego, chlorku sodu, wodorowęglanu sodu i chlorku sodu, osad przemycia się chlorkiem metylenu. Fazę organiczną suszy się, sączy, zateża do niewielkiej objętości i poddaje krystalizacji. Uzyskuje się 9,6 g (83,5% wydajności) estru dwumetoksymetylowego kwasu 7-β-(D-5-tosyloamino-5-karboksywaleramido) - 3-karbamylooksymetylo-7-metoksy - 3 - cefemokarboksylowego-4. Na podstawie analizy widma w nadfiolecie i chromatografii cienkowarstwowej stwierdzono, że produkt zawiera tylko jedną substancję.

C. Kwas 3-karbamylooksymetylo-7-metoksy-7-β-tienyloacetamido-3-cefemokarboksylowy-4.

Do mieszaniny zawiesiny 6,9 g estru metoksymetylowego z etapu B i 7,5g sproszkowanego sita molekularnego typu 4A (wielkość ziarna 25 mikronów, uwodnienie do 17%±2% wody) w 85 ml 1,2-dwuchloroetanu dodaje się 5 ml destylowanego chlorku 2-tienyloacetylu. Zawiesinę ogrzewa się w atmosferze azotu przy mieszanii w temperaturze 65°C w ciągu 16 godzin.

Przebieg reakcji śledzi się za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Po upływie zalecanego czasu głównym składnikiem mieszaniny reakcyjnej jest pożądaną związek pośredni. Następnie dodaje się 0,8 ml metanolu i mieszaninę pozostawia się w ciągu dalszych 2 godzin. Po tym czasie głównym składnikiem mieszaniny jest ester metoksymetylowy-4 pożądanego produktu.

Ester hydrolizuje się ochładzając roztwór do temperatury 25°C, sączy i przemycia się zimnym metanolem. Przesącz i ługi z przemycia łączy się i ochładza do temperatury 0°C. Do roztworu dodaje się ochłodzony do temperatury 0°C roztwór 20,8 ml stężonego kwasu solnego i 20,8 ml stężonego kwasu solnego i 23,6 ml metanolu i ogrzewa się mieszaninę do temperatury 15°C oraz miesza w tej temperaturze w ciągu 2 godzin i 40 minut. W tym momencie wykonuje się chromatografię cienkowarstwową. Przepuszczając tlenek etylenu doprowadza się w razie potrzeby pH mieszaniny do wartości pomiędzy 2–2,5, a następnie dodatkiem stałego wodorotlenku sodu doprowadza się pH do wartości pomiędzy 5 a 6. Mieszaninę sączy się i oddziela fazę dwuchloroetanową. Ochłodzona faza wodna zawiera sól sodową produktu. Fazę tę oczyszcza się na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żywicą IRA-68 w formie azotanowej, stosując jako eluent 0,02 molarny bufor fosforanowy o pH 7,0. Uzyskuje się 1,74 g produktu wykazującego jednorodność na podstawie chromatografii cienkowarstwowej. Kąt skręcania wynosi 192°. Produkt badano za pomocą analizy widma magnetycznego rezonansu protonowego i stwierdzono, że jest to kwas 3-

-karbamyllooksymetylo-7-metoksy-7- β -tienyloacetamido-3-cefemokarboksylowy-4. Temperatura topnienia wynosi 165—167°C.

Wyjściową sól jednosodową kwasu 7- β -(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-karbamyllooksymetylo-7-metoksy-3-cefemokarboksylowego-4 stosowaną w omówionym przykładzie wytwarza się w następujący sposób:

Wytwarzanie soli jednosodowej kwasu 7- β -(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-cefemo-7-metoksy-3-karbamyllooksymetylokarboksylowego-4.

Zmodyfikowany proces fermentacji:

Etap 1 — skosy

Próbkówkę zawierającą zliofilizowaną hodowlę szczepu *Streptomyces lactamdurans* NRRL 3802 otwiera się w warunkach jałowych i drobnoustroj przynosi się do pożywki o następującym składzie:

Pożywka XI: 1% melasa z trzciny cukrowej, 1% krajowe drożdże browarnicze, 2,5% agar Difco o pH 7,0, woda do uzupełnienia.

Skosy inkubuje się w ciągu 7 dni w temperaturze 28°C. Podczas przechowywania w niskiej temperaturze skosy są trwałe w ciągu więcej niż 13 tygodni.

Etap 2 — fazy posiewania: metoda dwuetapowa.

Posiewanie pierwsze: Pierwszy posiew wykonuje się inokulując 40 ml 1% roztworu umieszczonego w zaopatrzonej w łamacz piany kolbie Erlenmeyera o pojemności 250 ml za pomocą drobnoustroju ze skosu z etapu 1. Kolby wytrząsa się na obrotowej trzęsawce o 220 obrotach na minutę o skoku 51 mm w temperaturze 28°C w ciągu od 2 do 3 dni.

Posiewanie drugie: 2,5% inokulum z pierwszego etapu posiewania dodaje się do kolby zawierającej 2% autolizat drożdżowy Fleischmana S-150 o pH 7,0. W tym etapie hodowla charakteryzuje się jasną barwą, a inkubacji, prowadzonej tak jak w etapie 1, nie prowadzi się dłużej niż w ciągu 48 godzin.

Etap 3: Pożywka produkcyjna

Pożywka produkcyjna zawiera w jednym litrze wody destylowanej 30 g rozpuszczalnych pozostałości gorzelnianych 7,5 g suszonych drożdży górnej destylacji N.F. i 0,25% (objętość/objętość) środka przeciwpennego jakim jest produkt naftowy Mobilpar-S. Za pomocą niewielkiej ilości stężonego roztworu wodorotlenku sodu doprowadza się pH pożywki do wartości 7,0. Pożywkę dozuje się następnie do kolb Erlenmeyera i pozostawia w autoklawie w temperaturze 121°C w ciągu 15 lub 20 minut. Po ochłodzeniu do pożywki dodaje się 2,5% otrzymanego w etapie 2 inokulum. Czas inkubacji może być różny i może wynosić od 50 do 100 godzin, ale najkorzystniejsze jest inkubowanie w ciągu 72 godzin. Objętość pożywki w każdej z kolb może być różna i może wynosić od 30 ml do 50 ml, ale w doświadczeniach rutynowych korzystnie jest stosować objętość 40 ml. Inokulum można stosować różnych, wynoszących od 1% do 5% ilościach, ale praktycznie korzystnie jest stosować zwykle inokulum w ilości 2,5%.

Etap 4: Oznaczenie

Po zakończeniu fermentacji komórki usuwa się na drodze odwirowania i brzeczkę rozcieńcza się buforem fosforanowym o pH 7,0. Stężenie kwasu

7- β -(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-karbamyllooksymetylo-7-metoksy-3-cefemokarboksylowego-4 w brzeczkę fermentacyjnej oznacza się stosując standardową biologiczną metodę krążkową. Jako drobnoustroj testowy stosuje się szczep *Vibrio percolans* ATCC 8461. Krążki bibułowe zanurza się w rozcieńczonej brzeczkę i umieszcza na powierzchni agarowej na płytkach Petriego. Płytki zaszczepia się drobnoustrojem testowym *Vibrio percolans* ATCC 8461. Na płytce umieszcza się również krążek zanurzony uprzednio w standardowym roztworze zawierającym znane stężenie kwasu 7- β -(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-karbamyllooksymetylo-7-metoksy-3-cefemokarboksylowego-4. Płytki inkubuje się w ciągu nocy w temperaturze 28°C, a następnie mierzy się średnice stref zahamowania. Stężenie produktu w brzeczkę oblicza się interpolując stężenie produktu ze standardowej krzywej odpowiadającej średnicom stref ze znanych stężeń roztworu standardowego. W ten sposób obliczono, że *Streptomyces lactamdurans* NRRL-3802 wytwarza przy zastosowaniu zmodyfikowanego procesu fermentacji 78,6 μ g/ml kwasu 7- β -(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-karbamyllooksymetylo-7-metoksy-3-cefemokarboksylowego-4.

Etap 5: Wydzielanie produktu

Przesączoną brzeczkę zakwasza się do pH 7,0 za pomocą rozcieńczonego kwasu solnego, a następnie 2900 ml tej brzeczeki przepuszcza się przez kolumnę wypełnioną silnie zasadowym anionitem w ilości 100 g. Jako anionit stosuje się żywicę zawierającą jako matrycę kopolimer styrenu i dwuwinylobenzenu (Dowex 1 $\times$ 2 w formie chlorkowej). Brzeczkę przepuszcza się przez kolumnę z prędkością 10 ml/minutę. Odciek zbiera się jako frakcje o objętości 500 ml. Kolumnę przemywa się wodą i eluuje następnie 3% roztworem chlorku amonu w 90% metanolu. Oznacza się aktywność zbieranych frakcji i najbardziej aktywne łączy się. Połączone frakcje doprowadza się do pH od 7,2 do 8,0 za pomocą rozcieńczonego roztworu wodorotlenku sodu i adsorbuje na kolumnie wypełnionej silnie zasadowym anionitem w ilości 100 g zawierającym jako matrycę kopolimer styrenu i dwuwinylobenzenu (Dowex 1 $\times$ 2 w formie chlorkowej). Roztwór przepuszcza się przez kolumnę z prędkością 14 ml/minutę. Kolumnę przemywa się wodą i eluuje 5% wodnym roztworem chlorku sodu. Koncentrat rozcieńcza się do objętości 500 ml i pH doprowadza się do wartości 8,8 do 2,0 za pomocą rozcieńczonego kwasu solnego. Roztwór ten adsorbuje się na 25 ml silnie kwaśnego kationitu zawierającego grupy sulfonowe i jako matrycę kopolimer styrenu i dwuwinylobenzenu. Stosuje się Dowex 50 $\times$ 2 w formie wodorowej. Roztwór przepuszcza się przez kolumnę z prędkością 2,5 ml/minutę. Kolumnę przemywa się 25 ml wody i eluuje 2% roztworem pirydyny do chwili uzyskania wycieku o pH 7,0 (54 ml). Użyty eluat alkalizuje się do pH 8,0 za pomocą rozcieńczonego roztworu wodorotlenku sodu i zateża pod zmniejszonym ciśnieniem do usunięcia pirydyny i wydzielania soli jednosodowej kwasu 7- β -(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-karbamyllooksymetylo-7-metoksy-3-cefemokarboksylowego-4.

Analiza elementarna dla $C_{16}H_{21}N_4SO_6Na$
 Obliczono: C—41,0%, H—4,5%, N—12,0%, S—6,8%
 Oznaczono: C—39,31%, H—4,76%, N—11,16%,
 S—6,46%

Przykład II. Kwas 3-karbamylooksymetylo-7-metoksy-7-β-fenylacetamido-3-cefemokarboksylowy-4.

Etap A — Ester dwumetoksymetylowy kwasu 7-β-[(D-5-tosyloamino-5-karboksywalerylo)-fenylacetamido]-3-karbamylooksymetylo-7-metoksy-3-cefemokarboksylowego-4.

Mieszaninę 9,3 g (10 milimoli) kwasu 7-β-(D-5-tosyloamino-5-karboksywaleramido)-3-karbamylooksymetylo-7-metoksy-3-cefemokarboksylowego-4, 10,8 g sproszkowanego sita molekularnego typu 12A (uwodnionego do zawartości wody 20%±2%) i 5,3 ml (40 mmoli) chlorku fenylacetanu w 50 ml acetonitrylu ogrzewa się w temperaturze 40°C w ciągu 20 godzin. Po tym czasie mieszaninę ochładza się do temperatury pokojowej i sączy. Przesącz odprowadza się do sucha i pozostałość uciera się z heksanem. Nierozpuszczalną pozostałość, która stanowi ester dwumetoksymetylowy kwasu 7-β-[(D-5-tosyloamino-5-karboksywalerylo)-fenylacetamino]-3-karbamylooksymetylo-7-metoksy-3-cefemokarboksylowego-4 stosuje się bez oczyszczania do dalszego etapu.

Etap B — Kwas 3-karbamylooksymetylo-7-metoksy-7-β-fenylacetamido-3-cefemokarboksylowy-4.

Surowy produkt z etapu A rozpuszcza się w 50 ml 1,2-dwuchloroetanu. Do roztworu dodaje się 1,0 ml metanolu i roztwór miesza się w ciągu 1 godziny. Ester metoksymetylowy hydrolizuje się dodając ochłodzony do temperatury 0°C roztwór 20 ml stężonego kwasu solnego w 25 ml metanolu i mieszając roztwór w temperaturze 15°C w ciągu 3 godzin. Produkt wydziela się i oczyszcza stosując ogólny sposób postępowania opisany w przykładzie I. Uzyskuje się kwas 3-karbamylooksymetylo-7-metoksy-7-β-fenylacetamido-3-cefemokarboksylowy-4 o temperaturze topnienia 159–161°C i widmie w nadfiolecie i widmie magnetycznego rezonansu protonowego, które odpowiadają zakładanej strukturze.

Przykład III. Kwas 3-karbamylooksymetylo-7-metoksy-7-β-(2-furyloacetamido)-3-cefemokarboksylowy-4.

Ester dwumetoksymetylowy kwasu 7-β-(D-5-tosyloamino-5-karboksywaleramido)-3-karbamylooksymetylo-7-metoksy-3-cefemokarboksylowy-4 poddaje się reakcji z chlorkiem 2-furyloacetanu w obecności 12 g uwodnionego sita molekularnego typu 4A (uwodnionego do zawartości wody do 15%±2%) w sposób uprzednio opisany. Łańcuch boczny i blokującą grupę estrową usuwa się również w opisany uprzednio sposób. Uzyskuje się kwas 3-karbamylooksymetylo-7-metoksy-7-β-(2-furyloacetamido)-3-cefemokarboksylowy-4 o temperaturze topnienia 156–161°C. Widmo w nadfiolecie wykonane w buforze o pH 7,0 wykazuje λ_{max} 265 nm $\epsilon=7200$, a widmo w podczerwieni i widmo magnetycznego rezonansu protonowego są zgodne ze strukturą związku.

W taki sam sposób, stosując w miejsce chlorku 2-furyloacetanu chlorek tiofenoacetanu, wytwarza

się kwas 3-karbamylooksymetylo-7-metoksy-7-β-tiofenoaksyacetamido-3-cefemokarboksylowy-4 o temperaturze topnienia 119°C–123°C. Widmo w nadfiolecie wykonane w buforze o pH 7,0 wykazuje λ_{max} 247 nm $\epsilon=10400$, a widmo magnetycznego rezonansu protonowego jest zgodne ze strukturą związku.

Przykład IV. Kwas 3-acetoksymetylo-7-β-(2-tienyloacetamido)-3-cefenokarboksylowy-4.

Etap A — Kwas 7-β-(D-5-trójchloroetoksykarbonyloamino-5-karboksywaleramido)-3-acetoksymetylo-3-cefemokarboksylowy-4.

Do roztworu 2,5 g (5,3 milimola) kwasu 7-β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-cefemokarboksylowego-4 w 13 ml acetonu i 40 ml 10% wodnego roztworu wodorofosforanu dwupotasowego wkrapla się 3,35 g (15,9 milimola) chlorku trójchloroetoksykarbonylu. Podczas dodawania chlorku pH roztworu utrzymuje się w granicach 8,5–9,0 dodając stopniowo 17% wodny roztwór wodorotlenku sodu. Po czasie 30 minut mieszaninę przemywa się octanem etylu i następnie fazę wodną zakwasza się stężonym kwasem solnym do pH 2,5. Wydzielony w postaci osadu produkt ekstrahuje się do octanu etylu. Roztwór octanowy suszy się nad siarczanem sodu, sączy i usuwa rozpuszczalnik uzyskując 2,7 g kwasu 7-β-(D-5-trójchloroetoksykarbonyloamino-5-karboksywaleramido)-3-cefemokarboksylowego-4.

Etap B — ester dwubenzhydrylowy kwasu 7-(D-5-trójchloroetoksykarbonyloamino-5-karboksywaleramido)-3-cefemokarboksylowego-4.

Do roztworu kwasu 7-β-(D-5-trójchloroetoksykarbonyloamino-5-karboksywaleramido)-3-acetoksymetylo-3-cefemokarboksylowego-4 w 30 ml octanu etylu dodaje się roztwór 2,0 g dwuazometanu w 30 ml eteru. Mieszaninę reakcyjną miesza się w ciągu nocy, a następnie usuwa się rozpuszczalnik uzyskując 4,0 g surowego produktu. Surowy produkt oczyszcza się metodą chromatografii na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent chloroform. Uzyskuje się 2,3 g czystego esteru dwubenzhydrylowego kwasu 7-(D-5-trójchloroetoksykarbonyloamino-5-karboksywaleramido)-3-acetoksymetylo-3-cefemokarboksylowego-4. Analiza widma magnetycznego rezonansu protonowego (rozpuszczalnik — $CDCl_3$) $\delta=2,0$ (metyl, s); 4,9 (10 — H_2 , kwartet), 4,95 (6—H,d); 5,92 (7—H); 7,0 (protony benzhydrylowe, 2s).

Etap C — ester dwubenzhydrylowy kwasu 7-(D-5-trójchloroetoksykarbonyloamino-5-karboksywalerylo)-2-tienyloacetamino]-3-acetoksymetylo-3-cefemokarboksylowego-4.

Mieszaninę 2,0 g (0,02 mola) estru dwubenzhydrylowego kwasu 7-β-(D-5-trójchloroetoksykarbonyloamino-5-karboksywaleramido)-3-acetoksymetylo-3-cefemokarboksylowego-4, 11,0 g sita molekularnego typu 5A (uwodnienie do 23%±2% wody), 1,31 g (0,0815 mola) chlorku 2-tienyloacetanu i 6 ml chlorku metylenu ogrzewa się w temperaturze 40–45°C na łaźni olejowej w atmosferze azotu w ciągu 20 godzin. Mieszaninę reakcyjną wlewa się do 100 ml heksanu i sączy. Po usunięciu rozpuszczalnika uzyskuje się ester dwubenzhydrylowy kwasu 7-[(D-5-trójchloroetoksykarbonyloamino-5-kar-

boksywalerylo)-2-tienyloacetyloamino]-3-acetoksymetylo-3-cefemokarboksylowego-4.

Etap D — ester benzhydrylowy kwasu 3-acetoksymetylo-7-(2-tienyloacetamido)-3-cefemokarboksylowego-4.

Ester dwubenzhydrylowy kwasu 7-[(D-5-trójkloroetoksykarbonyloamino-5-karboksywalerylo)-3-tienyloacetyloamino]-3-acetoksymetylo-3-cefemokarboksylowego-4 rozpuszcza się w 10 ml octanu etylu i dodaje do mieszaniny 10 ml 90% wodnego roztworu kwasu octowego i 1,0 g pyłu cynkowego. Mieszaninę reakcyjną miesza się i sączy w celu usunięcia cynku. Przesąc przemywa się kolejno 2 porcjami po 15,0 ml wody, 15,0 ml zimnego roztworu wodorowęglanu sodu i następnie 15,0 ml nasyconego roztworu chlorku sodu. Roztwór octanowy suszy się nad siarczanem sodu, sączy i usuwa rozpuszczalnik uzyskując 1,9 g surowego produktu, który poddaje się chromatografii na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent mieszaninę chloroformu i octanu etylu (50:1). Uzyskuje się 0,380 g produktu, który po rekrystalizacji z octanu etylu wykazuje temperaturę topnienia 141,5°C—143°C. Analiza widma w nadfiolecie: (metanol) $\lambda_{\max}$ 263 ϵ =7580.

Analiza elementarna dla $C_{29}H_{26}O_6N_2S_2$

Obliczono: C—61,91%; H—4,66%; N—4,98%

Oznaczono: C—62,14%; H—4,84%; N—4,91%

Etap E — kwas 3-acetoksymetylo-7-(2-tienyloacetamido)-3-cefemokarboksylowego-4.

Zimny roztwór 100 mg estru benzhydrylowego kwasu 3-acetoksymetylo-7-(2-tienyloacetamido)-3-cefemokarboksylowego-4 w 1 ml anizolu i 0,5 ml kwasu trójklorooctowego miesza się w temperaturze 0°C w ciągu 35 minut. Dodaje się 50 ml czterochlorku węgla i mieszaninę reakcyjną odparowuje się do sucha. Pozostałość uciera się z heksanem. Heksan usuwa się na drodze dekantacji, a pozostałość rozpuszcza się w 10 ml octanu etylu. Roztwór zateża się do objętości 1 ml i dodaje się eter dwuetylowy w celu wydzielenia produktu w postaci osadu. Osad ten rekrystalizuje się z mieszaniny eteru dwuetylowego i octanu etylu uzyskując 0,025 g kwasu 3-acetoksymetylo 7-(2-tienyloacetamido)-3-cefemokarboksylowego-4 o temperaturze topnienia 164°C. Temperatura topnienia wzorcowej próbki wynosi 163°C.

Przykład V. Sól sodowa kwasu 7-(2-tienyloacetamido)-7-metoksy-3-karbamylooksymetylo-3-cefemokarboksylowego-4.

Etap A — sól dwusodowa kwasu 7-β-(D-5-benzoiloamino-5-karboksywaleramido)-3-karbamoilooksymetylo-7-metoksy-3-cefemokarboksylowego-4.

Do 500 ml wodnego roztworu zawierającego 48,5 milimola soli jednosodowej kwasu 7-β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-karbamylooksymetylo-7-metoksy-3-cefemokarboksylowego-4 dodaje się 50% roztwór wodorotlenku sodu w ilości takiej, aby uzyskać pH 9,5. Do roztworu tego dodaje się, przy intensywnym mieszaniu, 15 ml (128 milimoli) chlorku benzoulu. W ciągu 30 minut mieszaninę utrzymuje się w pH 9,5, dodając w miarę potrzeby sodę kaustyczną.

Następnie pH mieszaniny doprowadza się do 4,0

za pomocą stężonego kwasu solnego i przemywa się ją dwukrotnie octanem etylu.

Fazę wodną ochładza się do temperatury 0°C i dodaje się 200 ml izopropanolu i 300 ml octanu etylu przy mieszaniu. Za pomocą kwasu solnego doprowadza się pH mieszaniny do 2,0. Fazę organiczną oddziela się, a fazę wodną ekstrahuje się jeszcze trzykrotnie octanem etylu. Połączone ekstrakty przemywa się roztworem chlorku sodu, suszy nad siarczanem sodu i zateża pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskując 43,0 g ciemnego oleju.

Olej rozpuszcza się w 200 ml etanolu i dodaje się roztwór 30 g soli sodowej kwasu 2-etyloheksanowego. Zawiesinę ochładza się do temperatury 0°C, sączy, przemywa etanolem i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskując 28,8 g (102%) soli dwusodowej kwasu 7-β-(D-5-benzoiloamino-5-karboksywaleramido)-3-karbamoilooksymetylo-7-metoksy-3-cefemokarboksylowego-4 o czystości oznaczonej metodą chromatograficzną przez porównanie z czystym standardem, wynoszącej 67%.

Etap B — ester dwumetoksymetylowy kwasu 7-β-(D-5-benzoiloamino-5-karboksywaleramido)-3-karbamylooksymetylo-7-metoksy-3-cefemokarboksylowego-4.

Do zawiesiny 20 g soli dwusodowej kwasu 7-β-(D-5-benzoiloamino-5-karboksywaleramido)-3-karbamylooksymetylo-7-metoksy-3-cefemokarboksylowego-4 w 200 ml acetonitrylu wkrapla się w temperaturze 0°C, 16 ml 6 molarnego roztworu eteru chlorometylometylowego w ciągu 90 minut. Zawiesinę miesza się w ciągu dalszych 2 godzin w temperaturze 0°C. Mieszaninę rozcieńcza się 500 ml chlorku metylenu i przemywa dwukrotnie rozcieńczonym kwasem fosforowym, jeden raz rozcieńczonym roztworem wodorowęglanu sodu i jeden raz 5% roztworem chlorku sodu. Fazy wodne przemywa się 50 ml chlorku metylenu. Fazy organiczne łączy się, suszy nad siarczanem sodu i zateża pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości około 100 ml.

Roztwór przepuszcza się przez 200 ml żelu krzemionkowego G, przemywa 200 ml chlorku metylenu, a następnie eluuje za pomocą 800 ml octanu etylu. Wycieki octanu etylu zateża się pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskując 18,5 g żółtego oleju.

Surowy produkt rekrystalizuje się z 50 ml octanu etylu uzyskując 10,0 g (67%) estru dwumetoksymetylowego kwasu 7-β-(D-5-benzoiloamino-5-karboksywaleramido)-3-karbamylooksymetylo-7-metoksy-3-cefemokarboksylowego-4.

Etap C — sól sodowa kwasu 7-(2-tienyloacetamido)-7-metoksy-3-karbamylooksymetylo-3-cefemokarboksylowego-4.

Zawiesinę 192 mg (0,3 milimola) estru dwumetoksymetylowego kwasu 7-β-(D-5-benzoiloamino-5-karboksywaleramido)-3-karbamylooksymetylo-7-metoksy-3-cefemokarboksylowego-4, 225 mg sproszkowanego sita molekularnego typu Linde 4A zawierającego 10%±2% wody, 0,3 ml chlorku 2-tienyloacetylu i 4 ml dwuchloroetanu ogrzewa się w temperaturze wrzenia w ciągu 4 godzin przy intensywnym mieszaniu. Mieszaninę ochładza się do temperatury 65°C i dodaje się w ciągu 2 godzin 10 ml 0,05 molarnego roztworu IIIr. — butanolu w dwuchloroetanie, a następnie ogrzewa się w

ciągu dalszej godziny w temperaturze 65°C. Mieszaninę reakcyjną ochładza się do 0°C, sączy i przemywa 5 ml metanolu. Przesącz ochładza się mieszając do temperatury 0°C i dodaje się 1,4 ml mieszaniny 1:1 kwasu solnego i metanolu. Otrzymaną mieszaninę miesza się w temperaturze około 15°C w ciągu 3 godzin i wlewa do 10 ml wody zawierającej 1,6 g wodorowęglanu sodu. Fazę organiczną oddziela się. W fazie wodnej oznaczono 65% wydajności soli sodowej kwasu 7-(2-tienyloacetamido) - 7-metoksy-3-karbamylooksymetylo - 3 - cefemokarboksylowego-4.

Etap D — W analogiczny sposób w etapie D stosuje się, podobnie jak w etapie A, chlorek p-chlorobenzoilu, p-nitrobenzoilu lub toluilu. W tych przypadkach uzyskuje się sól sodową kwasu 7-(2-

-tienyloacetamido)-7-metoksy-3-karbamylooksymetylo-3-cefemokarboksylowego-4 z wydajnością odpowiednio 70%, 68% i 72%.

Przykład VI. Sól sodowa kwasu 7-(2-tienyloacetamido)-7-metoksy-3-karbamylooksymetylo-3-cefemokarboksylowego-4.

Mieszaninę 2,76 g (4 milimole) estru dwumetoksymetylowego kwasu 7-β-(D-5-tosyloamino-5-karboksywaleramido)-3-karbamylooksymetylo-7-α - metoksy -3-cefemokarboksylowego-4, 3 g suchego siła molekularnego typu Linde 4A, zawierającego mniej niż 2% wody, 2 ml (16 milimoli) chlorku tienyloacetylu w 34 ml dwuchloroetanu miesza się we wrzeniu w ciągu 5 godzin. Następnie dodaje się 0,38 ml (4 milimole) IIIr. — butanolu i mieszanie kontynuuje się w ciągu 2 godzin. Po tym czasie

Tablica 1

Przykład	Ilość siła 4A g	Chlorek tienyloace- tylu milimole	Wskaźnik rozczepiania			produkt końcowy % wydaj- ności	związek wyjściowy % wydaj- ności
			związek	ilość milimole	czas ^{a)} godziny		
VII	3	16	HCL	0,4 0,8 0,8	3 1	69	4,5
VIII	"	"	izopropanol	3 1 1	3 1 1	68	6,2
IX	"	16	"	2,4	3	67	3,1
		4b)	"	2 2	1 1		
X	"	16	"	5 1	3 2	62	10,7
XI	"	"	"	5 5	2 2	48	6,2
XII	"	"	III-rz.-butanol	5 5	3 2	70	5,8
XIII	1,5 ^{e)}	"	"	5 5	2 1	69,5	3,6
XIV	0 ^{d)}	"	—	—	—	5,2	0,4
XV	3	"	III-rz.-butanol	10	1,5	64	4,1
XVI	3	"	"	10	1,5	58	0,5
XVII	"	"	"	"	"	28	1,1
XVIII	"	"	"	5	"	64,5	5,2
XIX	2 ^{e)}	12	"	5 5	2 5	67	8,2
XX	2 ^{e)}	24	"	5 5	2 1	68,5	3,1

^a Czas pomiędzy dodawaniem poszczególnych porcji środka rozszczepiającego imidu.

^b Dodanie po 3 godzinach rozszczepiania izopropanolem i reakcja prowadzona w ciągu dalszych 16 godzin przed końcowym rozszczepieniem imidu.

^c Dodano następną ilość 1,5 g siła pod koniec procesu transacylowania, a przed dodaniem alkoholu.

^d Okres transacylowania wynosi 1,5 godziny.

^e Dodano dalszą ilość 1 g siła pod koniec transacylowania.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania pochodnych cefalosporyny o wzorze ogólnym 1, w którym R" oznacza atom wodoru lub łatwą do usunięcia grupę blokującą, taką jak grupa metoksymetylowa lub benzhydrylowa, A oznacza grupę karbamyloksylową lub acetyloksylową, **znamienny tym**, że związek o wzorze ogólnym 2, w którym A ma wyżej podane znaczenie oraz każde R" niezależnie od siebie ma wyżej podane znaczenie, miesza się z chlorkiem tlenoacetylu w obecności syntetycznego zeolitu typu 3A, 4A, 5A lub 13X, użytego w stosunku wagowym 0,5÷2:1 w stosunku do ilości związku o wzorze 2, przy czym zeolit zawiera od około 0 do 30% wagowych wody hydratacyjnej, w temperaturze około 50–90°C, w obojętnym rozpuszczalniku, takim jak np. chloroform, acetonitryl, chlorek metylenu, dioksan, benzen, chlorowcobenzen, 1,2-dwuchloroetan lub eter etylowy, w ciągu od około 30 minut do 30 godzin, a następnie ewentualnie dodaje się środek rozszczepiający taki, jak np. woda, alkohol benzylowy, alkanol o 1–6 atomach C, alkilotiol o 1–6 atomach C lub kwas chlorowodorowy, po czym

wydziela się żądany związek o wzorze ogólnym 1.

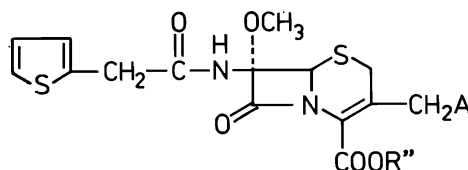
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że środek rozszczepiający dodaje się w ilości wynoszącej od około 0,5 równoważnika molowego do około 3 równoważników molowych, w przeliczeniu na ilość związku wyjściowego o wzorze ogólnym 2.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że reakcję z czynnikiem rozszczepiającym prowadzi się w ciągu od 1 do 15 godzin.

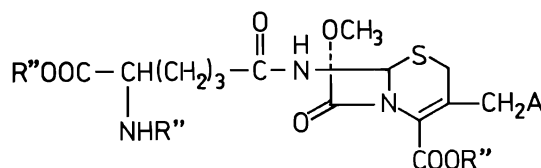
4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że środek rozszczepiający dodaje się porcjami w ciągu czasu reakcji.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako środek rozszczepiający stosuje się izopropanol lub IIIrz.-butanol, korzystnie w ilości i w granicach od około równoważnikowej do około 3 równoważników molowych, w przeliczeniu na ilość związku wyjściowego.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako środek rozszczepiający stosuje się kwas chlorowodorowy, korzystnie w ilości w granicach od 0,5 równoważnika molowego do około 1 równoważnika w przeliczeniu na ilość związku wyjściowego.



WZÓR 1



WZÓR 2