

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 772432 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 772432

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07D

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 12.08.1977

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 12.08.1977

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 18.02.1978

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

17.08.1976 GB 7634106

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Beecham Group Limited, Beecham House 4, Burton Road, London S.W.9, ISO-BRITANNIA, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Corbett, David Francis, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

2 • Eglinton, Alfred John, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

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

Antibakteerisia yhdisteitä

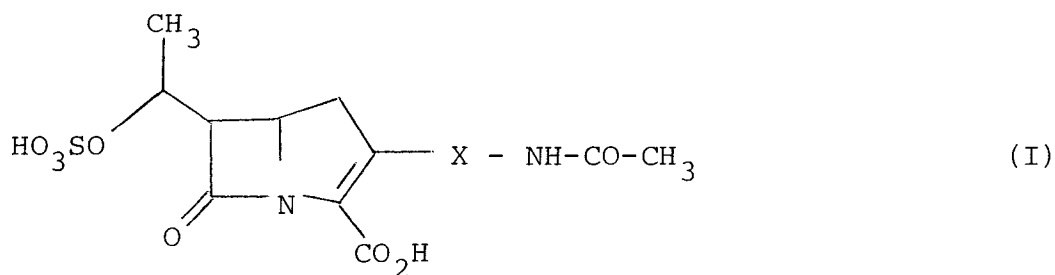
Antibakteriella föreningar

BEECHAM GROUP LIMITED, Beecham House, Great West Road, Brentford,
Middlesex, Yhdistynyt kuningaskunta

Menetelmä uusien antibakteeristen 7-okso-1-atsabisyklo(3,2,0)-
hepteeni-2-karboksyylihappoestereiden valmistamiseksi -
Förfarande för framställning av nya antibakteriska 7-oxo-1-
azabicyklo(3,2,0)hepten-2-karboxylsyraestrar

Esillä oleva keksintö koskee menetelmää uusien antibakteeristen
7-okso-1-atsabisyklo(3,2,0)hepteeni-2-karboksyylihappoestereiden
valmistamiseksi.

Yhdisteet, joilla on kaava (I):

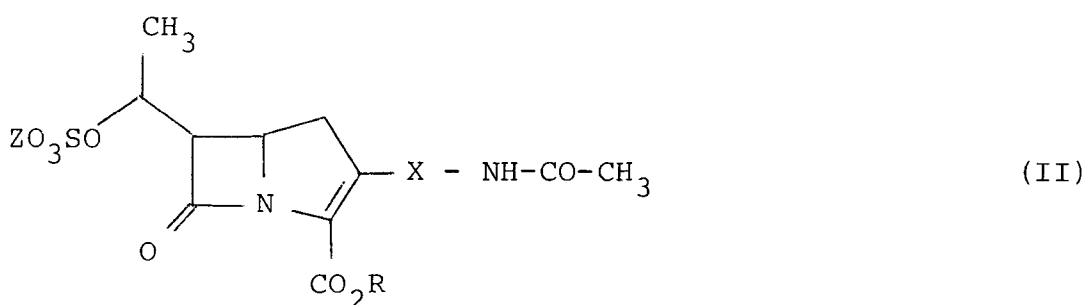


ja niiden suolat, joissa yhdisteissä X on trans-SO-CH=CH-, trans-S-CH=CH- tai -S-CH₂CH₂-ryhmä, on esitetty belgialaisissa patenteissa n:ot 827 331, 827 332 ja 839 324.

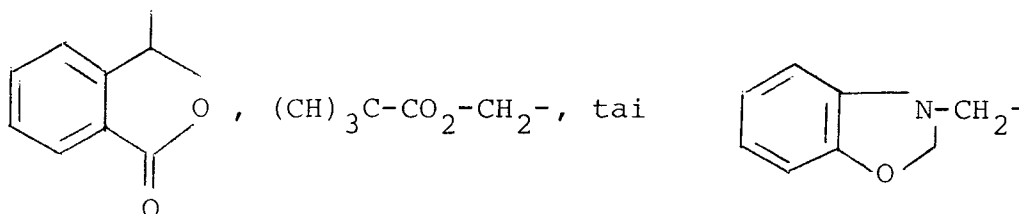
Nyt on todettu, että kaavan (I) mukaisten yhdisteiden esterit ovat bakteereja tappavia aineita. Lisäksi kaavan (I) mukaisten yhdis-

teiden esterit kykenevät myös parantamaan penisilliinien ja kefalosporiinien tehokkuutta erilaisia β -laktamaasia muodostavia gram-positiivisia ja gram-negatiivisia bakteerikantoja vastaan, jollaisia ovat esim. *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* ja muut senkaltaiset organismit.

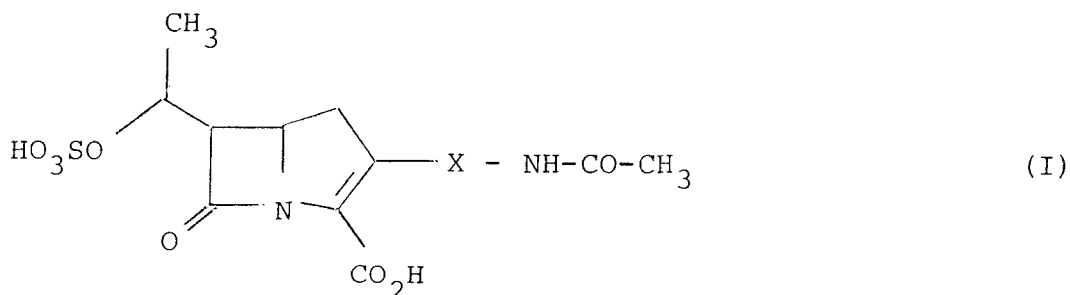
Näin ollen esillä olevan keksinnön avulla aikaansaadaan uusia antibakteerisia yhdisteitä, joilla on kaava (II):



jossa kaavassa R on alempi alkyyli, bentsyyli, joka on mahdollisesti substituoitu halogeenilla, nitrolla tai alemmalla alkyyllillä, fenasetyyli, joka on mahdollisesti substituoitu halogeenilla.



X on trans $\text{SO}-\text{CH}=\text{CH}$, trans ~~X~~^S $-\text{CH}=\text{CH}$ tai SCH_2CH_2 ; ja Z on natrium, kalium, kalsium, magnesium, tetraheksyyliammonium, s-bentsyyliisotiouronium, metyyliatrioktyyliammonium, setyylibutyrylidimetyyliammonium tai bentsyyli-trifenyyli-fosfonium, t u n n e t t u siitä, että kaavan (I) mukainen yhdiste



jossa X tarkoittaa samaa kuin yllä, tai tämän suola, esteröidään ja tämän jälkeen tarvittaessa muutetaan suola toiseksi suolaksi.

Z on sopivasti natrium, kalium tai tetra-n-heksyyliammonium.

Z on edullisimmin natrium- tai kaliumsuola ja erittäin edullisesti natriumsuola.

Sopivia esterinmuodostusmenetelmiä ovat sellaiset, joita tavanomaisesti käytetään β -laktaami-pitoisten yhdisteiden estereiden valmistamiseksi ja tällaisia ovat:

(a) kaavan (I) mukaisen yhdisteen di-suolan reaktio sellaisen yhdisteen kanssa, jolla on kaava (IV):



(IV)

jossa kaavassa R on määritelty kaavan (II) yhteydessä ja Q on helposti korvattavissa oleva ryhmä, ja

(b) kaavan (I) mukaisen yhdisteen monosuolan reaktio diatsoalkaamin kanssa.

Sellaisia sopivia kaavan (I) mukaisten yhdisteiden disuoloja, jotka voidaan saattaa reagoimaan yhdisteiden R-Q kanssa, ovat alkalimetallisuolat, kuten natrium- ja kaliumsuolat, tai muut tavanomaiset suolat, kuten kvaternääriset ammoniumsuolat.

Sopivia ryhmiä Q ovat sellaiset atomit tai ryhmät, joiden tiedetään olevan korvattavissa karboksylaattianioneilla, ja niihin sisältyvät kloori-, bromi- ja jodiatomit, sulfonihappoesterit, kuten OSO_2CH_3 tai $OSO_2C_4H_4CH_3$, ja muut tavanomaiset nukleofiilillä aineilla korvattavissa olevat ryhmät.

Eräs erittäin sopiva kaavan (IV) mukainen yhdiste on ftalidyylibromidi. Muita ftalidyyl johdannaisia voidaan myös edullisesti käyttää.

Tämä korvausreaktio suoritetaan tavallisesti aprottisessa, orgaanisessa liuottimessa, kuten dimetyyliformamidissa, dimetyylisulfoksidissa, heksametyylifosforitriamidissa, asetonissa, dioksaanissa tai asetonitriilissä mahdollisesti jonkun eetterin tai sentapaisen liuottimen läsnäollessa ja kohtuullisessa lämpötilassa, esim. välillä -5 ja $+100^\circ C$. Olemme todenneet, että reaktio voidaan toteuttaa sopivasti vedettömässä dimetyyliformamidissa ympäristön lämpötilassa.

Sellaiset yhdisteet, joissa ryhmä R sisältää epäsymmetriakeskuksen,

muodostetaan tavallisesti aluksi R,S-muotoon. R- ja S-isomeerien erottaminen toisistaan voidaan toteuttaa tavanomaisilla menetelmillä, esim. kromatograafisesti tai kiteyttämällä yms.

Kaavan (I) mukaisen yhdisteen monosuolan reaktio diatsoyhdisteen kanssa on hellävarainen menetelmä valmistettaessa alkyyli-, aralkyyli- tai substituoituja alkyyli- tai aralkyyliestereitä. Diatsotomisreaktio voidaan toteuttaa tavanomaisissa reaktio-olosuhteissa, esim. kohtuullisessa lämpötilassa, ja jotain tavanomaista liuotinta käyttäen. Tällaiset reaktiot toteutetaan tavallisesti lämpötilassa välillä -5 ja $+100^{\circ}\text{C}$ ja yleensä ympäristön lämpötilassa. Sopivia tässä reaktiossa käytettäviä liuottimia ovat mm. alemmat alkanolit, kuten metanoli ja etanoli, ja sellaiset liuottimet, kuten tetrahydrofuraani, dioksaani yms. Tällaiset liuottimet ovat yleensä läsnä yhdessä pienten vesimäärien kanssa, jotka edistävät kaavan (I) mukaisten yhdisteiden liukoisuutta liuottimeen.

Vesipitoinen etanoli on todettu erittäin käyttökelpoiseksi liuottimeksi tässä reaktiossa.

Kaavan (II) mukaisia monoesteri-monokvaternäärisiä ammoniumsuoloja voidaan myös sopivasti valmistaa liuottamalla kaavan (II) mukaisen yhdisteen vesiliukoinen suola veteen, jota seuraa tämän liuoksen sekoittaminen kvaternäärisen ammoniumhalid^{ogen}in liuoksen kanssa veteen sekoittumattomassa inertisessä, orgaanisessa liuottimessa. Tämä orgaaninen liuotin erotetaan sitten ja haihdutetaan, jolloin saadaan kvaternäärinen ammoniumsuola. Tämä orgaaninen liuotin on sopivasti halogeenisubstituoitu hiilivety, kuten metyleenidikloridi tai kloroformi, ja näiden kahden liuoksen sekoittaminen tapahtuu lämpötilassa välillä ^{$1-100^{\circ}\text{C}$} 1 ja 100°C , esim. lämpötilassa välillä ^{$1-30^{\circ}$} 1 ja 30°C . Liuokset sekoitetaan tavallisesti keskenään ravistamalla tai sekoituslaitetta käyttäen.

Kaavan (II) mukaiset suolat voidaan vaihtaa toisiksi tavanomaisella tavalla käyttäen esim. ioninvaihtohartsia. Tähän tarkoitukseen sopivia metalli-ionisuoloja ovat mm. natrium- ja kaliumsuolat.

Keksinnön mukaisella menetelmällä valmistettujen yhdisteiden farmaseuttiset seokset voivat olla sopivassa muodossa oraalista, pinnallista tai parenteraalista käyttöä varten. Niinpä voidaan käyttää esim. tabletteja, kapseleja, siirappia, liukenevia jauheita ja kaikkein sopivimmin injektioon tai infuusioon sopivia steriilejä annostusmuotoja. Tällaiset seokset voivat sisältää tavanomaisia farmaseuttisesti sopivia aineita kuten laimennusaineita, sideaineita, väriaineita, makuaineita, säilöntäaineita, desintegroimisaineita yms. tavanomaisen farmaseuttisen käytännön mukaisesti, siten kuin alan asiantuntijalle on tunnettua, antibiootteja, kuten penisilliinejä ja kefalosporiineja, annosteltaessa. Kaikkein edullisimmin nämä seokset tehdään injektoitaviksi, esim. steriilin vesiliuoksen muotoon.

Kaavan (II) mukainen yhdiste voi olla keksinnön mukaisessa seoksessa ainoa terapeutti aine tai se voi olla yhdessä β -laktaami-antibiootin kanssa. Sopivia β -laktaami-antibiootteja ovat sellaiset, joiden tiedetään olevan alttiita β -laktamaaseille, ja myös sellaiset, joilla on jonkin verran ominaiskestävyyttä β -laktamaasien suhteen. Tällaisia β -laktaami-antibiootteja ovat mm. ampisilliini, amoksisilliini, bentsyylipenisilliini, fenoksimetyyli-penisilliini, propisilliini, kefaloridiini, kefoksitiini, kefalotiini, kefaleksiini, karbenisilliini, tikarsilliini ja tällaisten yhdisteiden in vivo hydrolysoituvat yhdisteet, kuten karbenisilliinin tai tikarsilliinin fenyyli-, tolyyli- ja indanyyliesterit, tai ampisilliinin, bentsyylipenisilliinin, amoksisilliinin, kefaloridiinin, kefaloglysiinin yms. asetoksimetyyli-, pivaloyylioksime-tyyli- tai ftalidyyliesterit.

Kaavan (II) mukaisen yhdisteen suhde β -laktaami-antibioottiin on tavallisesti välillä 20:1 ja 1:20 ja tavallisimmin välillä 10:1 ja 1:10, esim. välillä 3:1 ja 1:3.

Keksinnön mukaisen yhdisteen se kokonaismäärä, joka esiintyy annosyksikkömuodossa, on tavallisesti välillä 50 ja 1500 mg, yleensä välillä 100 ja 1000 mg.

Edullisimpia keksinnön mukaisten seosten annosyksikkömuotoja voidaan antaa kerran tai useammin vuorokaudessa, esim. 2-4 kertaa vuorokaudessa, käsiteltäessä virtsatiehyiden, hengitystiehyiden,

pehmeiden kudosten yms. sairauksia. Täten näitä seoksia voidaan käyttää sellaista sairauksien kuten bronchitis, gonorrhea, otitis media, mastitis yms. käsittelyyn.

Esimerkkeinä 12 pu 3 on

hinta, ehdotetaan otiskoon.

Seuraavat esimerkit kuvaavat keksintöä: *Muutkin esimerkit voidaan otiskoon koota samalla tavalla. Otiskoon tulevan yhdisteen nimi täytyy yllä.*

Esimerkeissä mainitut yhdisteet a, b ja c ovat: *esimerkin lopusta.*

a) (5R,6R)-3-(2-asetamidoetenyyliisulfinyyli)-6-(1S)-1-sulfonaattioksietyyli-7-okso-1-atsabisyklo[3.2.0]hept-2-eeni-2-karboksyyliahappo.

b) (5R,6R)-3-(2-asetamidoetyylitio)-6-(1S)-1-sulfonaattioksietyyli-7-okso-1-atsabisyklo[3.2.0]hept-2-eeni-2-karboksyyliahappo.

c) (5R,6R)-3-(2-asetamidoetenyyliitio)-6-(1S)-1-sulfonaattioksietyyli-7-okso-1-atsabisyklo[3.2.0]hept-2-eeni-2-karboksyyliahappo.

Esimerkki 1 *yhdisteen a monometyyliesterin mononatriumsuola*

Yhdisteen a natriumsuolaa (0,60 g; 1,37 mmoolia) käsiteltiin metyylijodidilla (0,53 g; 4,17 mmoolia) dimetyyliformamidissa (10 ml) huoneen lämpötilassa 2 tuntia. Liuotin poistettiin tyhjöissä ja tuotetta käsiteltiin kromatograafisesti piioksidigeelillä käyttäen elutoimisaineena kloroformi-etanoliseoksia. Yhdisteen a monometyyliesterimononatriumsuola saatiin valkoisena kiinteänä aineena (0,36 g; 61 %);

maks (H₂O) 323 ja 228 nm

maks (KBr) 1760, 1685, 1620 ja 1220-1280 br cm⁻¹

n.m.r. (DMSO-d₆) 1,33 (3H, d, J, 6 Hz, CH₃.CH), 1,92 (3H, s, CH₃), 2,92 (1H, dd, J 19, J' 10 Hz, Ha ABX-järjestelmässä), ca. 3,5 (1H, m, Hb ABX-järjestelmässä), 3,75 (4H, s + m, CH₃O₂C ja CH.CH.CH), 4,20 (1H, m, Hx ABX-järjestelmässä), 4,38 (1H, dg, J 10, J' 6Hz, CH₃CH.CH), 5,82 (1H, d, J 14 Hz, CH:CHNH), 7,07 (1H, dd, J 14, J' 11 Hz, CH:CHNH), ja 10,45 δ br (1H, d, J 11 Hz, NH.CH:).

Tämä yhdiste valmistettiin myös seuraavalla tavalla:

Yhdisteen a natriumsuolaa (1,1 g; 2,52 mmoolia) sekoitettiin huoneen lämpötilassa metyylijodidin (1,5 g; 10,56 mmoolia) kanssa NN-dimetyyliformamidissa (20 ml) 2 tuntia. Liuotin poistettiin tyhjöissä ja jäännöstä käsiteltiin kromatograafisesti piioksidigeelillä (30 g) käyttäen asteittaista eluutiota kloroformista kloroformi:etanoliiin (1:1). Fraktiot, jotka sisälsivät tuotetta, yhdistettiin ja haihdutettiin tyhjöissä. Jäännökseen lisättiin etyyliasettaattia ja se poistettiin sitten tyhjöissä, jolloin saatiin yhdisteen a monometyyliesterin mononatriumsuola valkoisena, kiinteänä aineena (0,68 g; 63 %).

* Tässä vaiheessa voidaan käyttää myös muita liuottimia, jotka poistavat aseotrooppisesti etanolin (esim. CH_3CN , tolueenia).

Esimerkki 2 *yhdisteen a monobentsyyliesterin mononatriumsuola*

Yhdisteen a natriumsuolaa (0,50 g; 1,15 mmoolia) käsiteltiin bentsyylibromidilla (1,00 g; 5,85 mmoolia) dimetyyliformamidissa (10 ml) 2 tuntia huoneen lämpötilassa. Suoritettaessa edelleen käsittely ja kromatograafinen käsittely esimerkin 1 mukaisesti saatiin yhdisteen a monobentsyyliesterin mononatriumsuola, (0,29 g; 50 %); λ_{maks} (H_2O) 325 ja 226 nm. ν_{maks} (KBr) 1765, 1685, 1620 ja 1210 - 1280 br cm^{-1} .

Esimerkki 3 *yhdisteen a - p-monobentsyyliesterin mononatriumsuola*

Yhdisteen a dinatriumsuolaa (0,970 g; 2,22 mmoolia) käsiteltiin p-bromibentsyylibromidilla (1,7 g; 6,80 mmoolia) dimetyyliformamidissa (17 ml) 2,5 tuntia huoneen lämpötilassa. Suoritettaessa edelleen käsittely ja kromatograafinen käsittely esimerkissä 1 kuvatulla tavalla saatiin yhdisteen a mono p-bromibentsyyliesterin mononatriumsuola valkoisena, kiinteänä aineena (0,73 g; 56 %). λ_{maks} (H_2O) 325 ja 226 nm. ν_{maks} (KBr) 1760, 1675, 1620 ja 1210 - 1280 br cm^{-1} .

Esimerkki 4

Yhdisteen a dinatriumsuolaa (1,67 g; 3,83 mmoolia) sekoitettiin huoneen lämpötilassa p-nitrobentsyylibromidin (2,48 g; 11,6 mmoolia) kanssa dimetyyliformamidissa (30 ml). Suoritettaessa edelleen käsittely ja kromatograafinen käsittely 2 tunnin kuluttua esimerkissä 1 kuvatulla tavalla saatiin yhdisteen a p-nitrobentsyyliesterin mononatriumsuola vaaleankeltaisena, kiinteänä aineena (1,27 g; 60 %);

λ_{maks} (EtOH) 325, 266, 225 sh ja 220 nm;

ν_{maks} (KBr) 1760, 1680, 1620, 1210-1280 br cm^{-1} ;

δ ($\text{DMSO} - d_6$) 1,36 (3H, d, $\underline{J}$ 6 Hz, CH_3CH), 1,92 (3H, s, CH_3CO), 2,96 (1H, dd, $\underline{J}$ 19 ja 10 Hz, CH_A ABX:ssä), 3,52 (1H, dd, $\underline{J}$ 19 ja 9 Hz, CH_B ABX:ssä), 3,67 (1H, dd, $\underline{J}$ 10,5 ja 6 Hz, $\text{CH}.\text{CH}.\text{CH}$), ca 4,20 (1H, m, CH_X ABX:ssä), 4,42 (1H, dq, $\underline{J}$ 10,5 ja 6 Hz, $\text{CH}.\text{CH}_3$), 5,22 ja 5,42 (kukin 1H, d, $\underline{J}$ 14 Hz, CH_2Ar), 5,80 (1H, d, $\underline{J}$ 14 Hz, $\text{CH}:\text{CH}.\text{S}$), 7,04 (1H, dd, $\underline{J}$ 14 ja 10,5 Hz, $\text{CH}:\text{CH}.\text{NH}$), 7,63 ja 8,17 (kukin 2H, d, $\underline{J}$ 8 Hz, aromaattiset protonit) ja 10,38 (1H, d, $\underline{J}$ 10,5 Hz, NH).

Todettu: C 42,94; H 3,77; N 7,21; S 11,54; Na 4,41 %;

$C_{20}H_{20}N_3S_2O_{10}Na \cdot 1/2H_2O$ vastaa:

C 43,01; H 3,76; N 7,54; S 11,47; Na 4,12 %.

Esimerkki 5

Yhdisteen a dinatriumsuolaa (0,30 g; 0,69 mmoolia) käsiteltiin p-jodibentsyylibromidilla (0,90 g; 3,03 mmoolia) dimetyyliformamidissa (9 ml) huoneen lämpötilassa. Suoritettaessa edelleenkäsitely ja kromatograafinen käsittely 5 tunnin kuluttua esimerkissä 1 kuvatulla tavalla saatiin yhdisteen a mono-p-jodibentsyyliesterin mononatriumsuola valkoisena, kiinteänä aineena (0,15 g; 34%).
 λ_{maks} (H_2O) 325 ja 232 nm
 ν_{maks} (KBr) 1765, 1675, 1620 ja 1210-1280 $br\ cm^{-1}$.

Esimerkki 6

Yhdisteen a dinatriumsuolaa (0,18 g; 0,41 mmoolia) käsiteltiin o-jodibentsyylibromidilla (0,55 g; 1,85 mmoolia) dimetyyliformamidissa (5 ml) 6 tuntia huoneen lämpötilassa. Edelleenkäsitely ja kromatograafinen käsittely suoritettiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla, jolloin saatiin yhdisteen a mono-o-jodibentsyyliesterin mononatriumsuola kellertävänä kiinteänä aineena (0,07 g; 26 %);
 ν_{maks} (KBr) 1760, 1680, 1620 ja 1210-1280 $br\ cm^{-1}$.

Esimerkki 7

Yhdisteen a dinatriumsuolaa (0,25 g; 0,57 mmoolia) sekoitettiin huoneen lämpötilassa p-bromifenasylibromidin (0,80 g; 2,88 mmoolia) kanssa dimetyyliformamidissa (5 ml). 1,5 tunnin pituisen seisottamisen, edelleenkäsitelyn ja kromatograafisen käsittelyn jälkeen esimerkissä 1 kuvatulla tavalla saatiin yhdisteen a mono-p-bromifenasyliesterin mononatriumsuola kermanvärisenä kiinteänä aineena (0,21 g; 60 %).
 λ_{maks} (EtOH) 327 ja 257 nm;
 ν_{maks} (KBr) 1765, 1690, 1620 ja 1210-1280 cm^{-1} ;
 Todettu: C 39,90; H 3,64; N 4,09; S 10,10; Br 12,55 %
 $C_{21}H_{20}N_2BrO_9S_2Na \cdot H_2O$ vastaa:
 C 40,06; H 3,50; N 4,45; S 10,17; Br 12,72 %.

Esimerkki 8

Yhdisteen a dinatriumsuolaa (0,30 g; 0,69 mmoolia) käsiteltiin bromiftalidilla (0,50 g; 2,35 mmoolia) dimetyyliformamidissa

(5 ml). Suoritettaessa edelleen käsittely ja kromatograafinen käsittely 1,5 tunnin kuluttua esimerkissä 1 kuvatulla tavalla saatiin yhdisteen a ftalidiesterin mononatriumsuola kellertävänä kiinteänä aineena (0,08 g; 21 %).

λ_{maks} (H_2O) 333 ja 233 nm

ν_{maks} (KBr) 1775, 1680 br., 1620, 1210 ja 1275 cm^{-1} .

Esimerkki 9

Yhdisteen a dinatriumsuolaa (0,30 g; 0,69 mmoolia) käsiteltiin N-kloorimetyyli-bentsoksatsolonilla (0,50 g; 2,72 mmoolia) dimetyyli-formamidissa (6 ml) huoneen lämpötilassa 2 tuntia. Suoritettaessa edelleen käsittely ja kromatograafinen käsittely esimerkissä 1 kuvatulla tavalla saatiin yhdisteen a mono-N-bentsoksatsolonyylimetyyliesterin mononatriumsuola (0,155 g; 40 %)

λ_{maks} (H_2O) 330, 267 ja 225 nm

ν_{maks} (KBr) 1775 br., 1690, 1620 ja 1220-1280 br cm^{-1} .

Esimerkki 10

Yhdisteen b dinatriumsuolaa (0,3 g; 0,68 mmoolia) N,N-dimetyyli-formamidissa (4 ml) käsiteltiin p-bromibentsyylibromidilla (0,75 g; 3 mmoolia) ja seosta sekoitettiin 2,5 tuntia. Liuotin poistettiin pyörivässä haihduttajassa ja jäännöstä käsiteltiin kromatografisesti piioksidigeelillä, elutoitiin kloroformi/etanoli-seoksilla (aina arvoon 3:2). Haihdutettaessa esteripitoiset fraktiot (jota seurasi jäännöksen haihduttaminen tolueenista) saatiin yhdisteen b mono-p-bromibentsyyliesterin mononatriumsuola (0,195 g; 48 %);

ν_{maks} (KBr) 1765, 1690, 1635, 1220 cm^{-1} ;

λ_{maks} (H_2O) 320 nm;

δ (DMSO - d_6) 1,37 (3H, d, J 6 Hz, CH_3CH), 1,81 (3H, s, CH_3CO), 2,8-3,6 (6H, m, $\text{CH}_2\text{C.SCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3,69 (1H, dd, J 11 ja 6 Hz, CH.CH.CH), 4,05 - 4,6 (2H, m, CH.CH.CH), 5,08 ja 5,26 (kukin 1H, d, J 14 Hz, CH_2Ar), 7,36 ja 7,57 (kukin 2H, d, J 8,5 Hz, aromaattiset protonit) ja 8,10 (1H, leveä, NH).

Esimerkki 11

Yhdisteen c dinatriumsuolaa (816 mg) N,N-dimetyyli-formamidissa (10 ml) käsiteltiin jodimetaanilla (0,9 ml). Seosta sekoitettiin 2 tuntia. Liuotin haihdutettiin sitten pyörivässä haihduttajassa ja jäännös käsiteltiin kromatografisesti piioksidigeelillä (40 g),

elutoitiin aluksi kloroformilla ja sitten kloroformi/etanolilla (3:2). Yhdisteen c monometyyliesterin mononatriumsuola erotettiin kiinteänä aineena (260 mg) fraktioiden yhdistämisen jälkeen ja haihduttamalla tyhjöissä esteripitoiset fraktiot, jota seurasi jäännöksen haihduttaminen tolueenista tyhjöissä.

ν maks (KBr) 1775, 1710, 1620 ja 1260 cm^{-1} ;

λ maks 297 ja 245 nm;

N.m.r. spektrissä $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$:ssa oli mm. signaalit arvoissa δ 1,36 (3H, d, $J = 6$ Hz), 2,0 (3H, s), 3,77 (3H, s), 6,22 (1H, d, $J = 15$ Hz), 7,38 (1H, dd, $J_1 = 15$ Hz, $J_2 = 10$ Hz).

Esimerkki 12

Yhdisteen c dinatriumsuolaa (500 mg) dimetyyliformamidissa (5 ml) käsiteltiin p-bromibentsyylibromidilla (1,5 g) ja seosta sekoitettiin 3 tuntia. Suoritettaessa edelleen käsittely esimerkissä 11 esitetyllä tavalla saatiin yhdisteen c mono-p-bromibentsyyliesterin mononatriumsuolaa (350 mg).

ν maks (KBr) 1780, 1710, 1620, 1260 - 1220 cm^{-1} ;

λ maks (H_2O) 305, 244 (sh), 228 nm. N.m.r. spektrissä D_2O :ssa oli mm. signaalit arvoissa δ 1,43 (3H, d, $J = 6$ Hz), 2,00 (3H, s), 6,23 (1H, d, $J = 15$ Hz), 6,96 (2H, d, $J = 8$ Hz), 7,14 (2H, d, $J = 8$ Hz), 7,32 (1H, d, $J = 15$ Hz).

Esimerkki 13

Yhdisteen c dinatriumsuolaa (800 mg) N,N-dimetyyliformamidissa (8 ml) käsiteltiin bentsyylibromidilla (1,0 ml). Seosta sekoitettiin 3 tuntia ja sitä käsiteltiin sitten esimerkissä 11 kuvatulla tavalla. Yhdisteen c monobentsyyliesterin mononatriumsuola saatiin kiinteänä aineena (420 mg).

ν maks (KBr) 1780, 1705, 1620, 1220 - 1260 cm^{-1} ;

λ maks (H_2O) 306, 246 nm;

δ $\overline{(\text{CD}_3)_2\text{SO}}$ mm. 1,36 (3H, d, J 6 Hz, CH_3CH), 2,01 (3H, s, CH_3CO), 5,26 (2H, leveä s, OCH_2Ph), 6,24 (1H, d, J 14 Hz, $\text{CH}=\text{CH}$).

Esimerkki 14

Yhdisteen c dinatriumsuolaa (400 mg) N,N-dimetyyliformamidissa (4ml) käsiteltiin p-nitrobentsyylibromidilla (1,2 g). Seosta sekoitettiin 2,25 tuntia ja sitä käsiteltiin edelleen esimerkissä 11 kuvatulla tavalla, jolloin saatiin yhdisteen c mono-p-nitrobentsyyliesterin mononatriumsuolaa (234 mg).

ν maks (KBr) 1780, 1710, 1620, 1260-1220 cm^{-1} ;

λ maks 250, 296 (sh) nm. N.m.r. spektrissä D_2O :ssa oli mm. signaalit arvoissa δ 1,53 (3H, d, $J = 6$ Hz), 2,1 (3H, s), 6,4 (1H, d, $J = 15$ Hz), 7,33 (1H, d, $J = 15$ Hz), 7,38 (2H, d, $J = 8$ Hz), 8,03 (2H, d, $J = 8$ Hz).

Esimerkki 15

Yhdisteen c dinatriumsuolaa (670 mg) ja p-metoksibentsyylibromidia (1,58 g) sekoitettiin yhdessä N,N-dimetyyliformamidissa (10 ml) 3 tuntia. Suoritettaessa edelleen käsittely esimerkissä 11 kuvatulla tavalla saatiin yhdisteen c mono-p-metoksibentsyyliesterin mononatriumsuolaa.

Esimerkki 16

Yhdisteen c dinatriumsuolaa (50 mg) ja o-jodibentsyylibromidia (90 mg) sekoitettiin yhdessä N,N-dimetyyliformamidissa (2 ml) 6 tuntia. Liuotin haihdutettiin pois ja jäännöstä hangattiin tolueenin kanssa. Sentrifugoimisen jälkeen jäännös (92 mg) otettiin talteen ja käsiteltiin sitten kromatograafisesti selluloosan avulla ja elutoitiin isopropanoli/vedellä (9:1). Saadut fraktiot yhdistettiin ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin yhdisteen c mono-o-jodibentsyyliesterin mononatriumsuolaa. ν maks (CHCl_3) 1785, 1710, 1620-1220 cm^{-1} .

Esimerkki 17

Yhdisteen c dinatriumsuolaa (185 mg) N,N-dimetyyliformamidissa (2 ml) käsiteltiin pivaloyylioksimetyylibromidilla (80 mg) N,N-dimetyyliformamidissa (1 ml). Seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 4 ja 3/4 tuntia ja sitten jäädyttäjässä 2 vuorokautta. Liuotin haihdutettiin pois ja tämän jälkeen jäännös johdettiin erittäin lyhyeseen piioksidigeeli-kromatograafiseen patsaaseen ja elutoitiin etanoli/kloroformilla (3:2). Yhdisteen c mono-pivaloyylioksimetyyliesterin mononatriumsuola saatiin eluaatista kiinteänä aineena, ν maks (KBr) 1780, 1705, 1610, 1260 cm^{-1} . Ultra-aaltospektrin maksimi oli arvossa 296 nm (H_2O :ssa).

Esimerkki 18

Yhdisteen c dinatriumsuolaa (300 mg) ja N-kloorimetyylibentsoksatsolonia (360 mg) sekoitettiin yhdessä dimetyyliformamidissa (5 ml) 3 tuntia. Liuotin haihdutettiin sitten pois ja seosta käsi-

telttiin esimerkissä 11 kuvatulla tavalla, jolloin saatiin yhdisteen c mono-N-bentsoksatsolonyylimetyyliesterin mononatriumsuolaa, ν maks (KBr) 1780, 1720-1710, 1620, 1260 cm^{-1} . λ maks (H_2O) 306, 247 ja 226 nm. δ (D_2O , HOD sisäinen standardi arvossa δ 4,6) mm. 1,40 (3H, d, $\underline{\text{J}}$ 6 Hz, CH_3CH), 2,00 (3H, s, CH_3CO) 5,90 (2H, leveä s, OCH_2N), 6,25 (1H, d, $\underline{\text{J}}$ 14 Hz, $\text{CH} = \text{CH}$), 7,0 - 7,25 (4H, m, ArH), 7,36 (1H, d, $\underline{\text{J}}$ 14 Hz, $\text{CH} = \text{CH}$).

Esimerkki 19

Yhdisteen a dinatriumsuolaa (60 mg) suspendoitiin etanoliin (5 ml) ja lisättiin vettä siksi, kunnes liukeneminen oli tapahtunut täydellisesti. Liuos jäädytettiin lämpötilaan 0° (jäähylpy) ja kuumentettiin yhdessä p-tolueenisulfonihapon (90 mg) jäädytetyn (0°) liuoksen kanssa etanolissa (6 ml). Saatua liuosta sekoitettiin noin 5 sek ja käsiteltiin ylimäärin käytetyllä diatsometaanin eetteriliuoksella. 20 minuutin pituisen seisomisen jälkeen huoneen lämpötilassa poistettiin liuottimet tyhjössä. Jäännökseksi jäänyt puolikiinteä aine hangattiin eetterin kanssa, suodatettiin ja pestiin eetterillä.

Suoritettaessa kiinteän aineen kromatograafinen käsittely piioksidigeelillä ja elutoitaessa butanoli-etanoli-vedellä (16:4:7) saatiin monometyyliesterin mononatriumsuola amorfisena, kiinteänä aineena.

Esimerkki 20

Yhdisteen c (500 mg) dinatriumsuola liuotettiin veteen ja johdettiin alaspäin ioninvaihtohartsia DOWEX 50W-X8 sisältävässä patsaassa, joka hartsi oli muutettu kalsiummuotoon käsittelemällä kalsimkarbonaatin vesiliätteellä. Haihdutettaessa saadut fraktiot tyhjössä saatiin c kalsiumsuola, ν maks (KBr) 1755, 1690, 1620, 1260-1220 cm^{-1} .

Täten saatu kalsiumsuola liuotettiin N,N-dimetyyliformamidiin (9 ml) ja lisättiin p-bromibentsyylibromidia (1,4 g). Seosta sekoitettiin 3 tuntia ja liuotin haihdutettiin sitten. Jäännöstä käsiteltiin kromatograafisesti piioksidigeelillä ja elutoitiin kloroformi/etanoli-seoksella, jolloin saatiin yhdisteen c mono-p-bromibentsyyliesterin kalsiumsuola (180 mg), ν maks ($\text{CHCl}_3/\text{Me}_2\text{NCHO}$) 1790, 1720, 1620, 1260 cm^{-1} .

Esimerkki 21

Yhdisteen a mono-p-bromibentsyyliesterin mononatriumsuolaa (191 g) vedessä (6 ml) ravistettiin yhdessä tetraheksyyliammoniumbromidin (138 mg; 0,95 ekvivalenttia) liuoksen kanssa metyleenikloridissa (10 ml). Orgaaninen kerros erotettiin, suodatettiin puuvillan lävitse ja haihdutettiin, jolloin tuote saatiin vaahtona melkein kvantitatiivisella saannolla. ν (CH_2Cl_2) 3200-3400 (leveä), 1775 (β -laktaami $\text{C}=\text{O}$), 1695 (leveä, esteri- ja amidikarbonyylit), 1260 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$); n.m.r. (CDCl_3 aiheutti juovan mm. arvossa 6,20 (1H, d, $\underline{\text{J}}$ 14 Hz, $-\text{S}-\underline{\text{CH}}=\underline{\text{CH}}-\text{NH}$), 7,55 (5H, m, $-\text{S}-\text{CH}=\underline{\text{CH}}-\text{NH}-$ ja aromaattiset protonit), 10,06 δ (1H, d, $\underline{\text{J}}$ 10 Hz, $\text{SCH}=\text{CHNH}$).

Esimerkki 22

Yhdisteen a monometyyliesterin mononatriumsuolaa (0,05 g) liuotettiin veteen ja liuosta sekoitettiin voimakkaasti tetrabutyyliammoniumvetysulfaatin (0,04 g) liuoksen kanssa CH_2Cl_2 :ssa (5 ml). 5 minuutin kuluttua orgaaninen kerros erotettiin ja kuivattiin (MgSO_4). Haihdutettaessa liuotin saatiin raakaa tetrabutyyliammoniumsuolaa (II, $\text{R}=(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{N}$, $\text{R}^1=\text{CH}_3$) (0,61 g). Suoritettaessa nopea kromatograafinen käsittely piidioksidin avulla (elutoimisaineena CHCl_3 -EtOH) saatiin yhdisteen a monotetrabutyyliammoniumsuolan monometyyliesterin puhdas näyte (0,04 g); ν maks (CHCl_3) 1775 (β -laktaami $\text{C}=\text{O}$), 1695 (tyydyttämätön esteri ja enamidi $\text{C}=\text{O}$), 1625 ja 1200-1280 br cm^{-1} (sulfaatti).

Esimerkki 23

Yhdisteen a mono-p-nitrobentsyyliesterin mononatriumsuolaa (0,05 g) käsiteltiin tetrabutyyliammoniumvetysulfaatilla esimerkissä 22 kuvatulla tavalla. Yhdisteen a mono-p-nitrobentsyyliesterin monotetrabutyyliammoniumsuola saatiin hartsimaisena (0,05 g) ν maks (CHCl_3) 1775 (β -laktaami $\text{C}=\text{O}$), 1690 (tyydyttämätön esteri ja enamidi $\text{C}=\text{O}$), 1625 ja 1200-1280 cm^{-1} (sulfaatti).

Esimerkki 24

Yhdisteen a mono-p-jodibentsyyliesterin mononatriumsuolaa (0,22 g) liuotettiin veteen (2 ml) ja tätä liuosta käsiteltiin S-bentsyyli-iso-tiouroniumkloridin (0,100 g) vesiliuoksella lämpötilassa 5° . Muodostui välittömästi valkoinen sakka. Sitten lisättiin kloroformia ja tuote uutettiin orgaaniseen kerrokseen, joka kuivattiin (MgSO_4) ja haihdutettiin, jolloin saatiin yhdisteen a

mono-p-jodibentsyyliesterin mono-S-bentsyyli-isotiouroniumsuolaa (0,15 g); ν maks (CHCl_3) 1780, 1690, 1670 ja 1625 cm^{-1} .

Esimerkki 25

Yhdisteen a mono-p-bromifenasyyliesterin mononatriumsuolaa (0,055 g) käsiteltiin S-bentsyyli-iso-tiouroniumkloridilla (0,04 g) esimerkissä 24 kuvatulla tavalla. Yhdisteen a mono-p-bromifenasyyliesterin mono-S-bentsyyli-iso-tiouroniumsuola saatiin hartsimaisena (0,047 g); ν maks (CHCl_3) 1780, 1695, 1670 ja 1626 cm^{-1} .

Esimerkki 26

Yhdisteen a mono-p-nitrobentsyyliesterin mononatriumsuolaa (0,11 g) käsiteltiin S-bentsyyli-iso-tiouroniumkloridilla (0,075 g) esimerkissä 24 kuvatulla tavalla. Yhdisteen a p-nitrobentsyyliesterin S-bentsyyli-iso-tiouroniumsuola saatiin hartsina (0,080 g); ν maks (CHCl_3) 1775, 1690 br, ja 1620 cm^{-1} .

Esimerkki 27

Yhdisteen c monobentsyyliesterin mononatriumsuolaa liuotettiin veteen ja tähän lisättiin kloroformiliuos, joka sisälsi tuotetta "Aliquat 336" (metyylitrioktyyliammoniumkloridi, jota valmistaa General Mills Chemical Inc., Kanakee, Illinois, USA) ja seosta sekoitettiin huolellisesti ja kerrokset erotettiin ja kloroformikerros haihdutettiin, jolloin saatiin yhdisteen c monobentsyyliesterin monometyylitrioktyyliammoniumsuola. ν maks (CH_2Cl_2) 1785, 1720, 1620, $1240\text{--}1220\text{ cm}^{-1}$.

Esimerkki 28

c dinatriumsuolaa (1,05 g) ja bromiftalidia (625 mg) sekoitettiin yhdessä N,N-dimetyyliformamidin kanssa (19 ml) 2 tuntia ympäristön lämpötilassa. Liuotin poistettiin sitten pyörivässä haihduttajassa ja jäännöstä käsiteltiin kromatograafisesti piioksidigeelillä (50 g) ja elutoitiin kloroformin ja etanolin 1:1 seoksella. Esteriä sisältävät fraktiot yhdistettiin ja haihdutettiin pyörivässä haihduttajassa, jäännökseen lisättiin tolueenia ja se haihdutettiin pois haihdutuslaitteessa, jolloin saatiin yhdisteen c monoftalidiesterin mononatriumsuola kiinteänä aineena maks (H_2O) 306 ja $230\text{--}235\text{ nm}$. ν maks (KBr) 1785, $1720\text{--}1700$ (br.), 1620, 1260 ja 980 cm^{-1} .

δ $\text{[}(\text{CD}_3)_2\text{SO]}$ (muun muassa) 1,33 (3H, d, J ca 6 Hz), 1,98 (s) ja 2,01 (s) (3H, COCH_3 kummastakin epimeeristä), 6,20 (d, $J = 14\text{ Hz}$) ja 6,26 (d, $J = 14\text{ Hz}$) (1H, $\text{S-CH} = \text{C}$, kummastakin epimeeristä).

Esimerkki 29

Yhdisteen c dinatriumsuolaa (200 mg) vedessä (2 ml) ravistettiin se-
tyylibentsyylidimetyyliammoniumkloridin (350 mg; 2 ekvivalenttia)
kanssa dikloorimetaanissa (2 ml). Dikloorimetaanikerros kuivattiin
(MgSO_4) ja haihdutettiin, jolloin jäljelle jäi yhdisteen c dikvater-

näärinen ammoniumsuola hartsimaisena aineena (397 mg).

ν maks (CH_2Cl_2) 1765, 1690, 1620 cm^{-1} .

Metyyli-kloroformaattia (33 mg) dikloorimetaanissa (5 ml) jäädytettiin lämpötilaan -30° ja tähän lisättiin tipottain dikvaternääristä c ammoniumsuolaa dikloorimetaanissa (8 ml), joka sisälsi yhden tipan dimetyyli-bentsyyliamiinia. Seosta sekoitettiin lämpötilassa välillä -30 ja -10° 45 min lisäämisen suorittamisen jälkeen, jolloin infrapunaspektri osoitti, että oli muodostunut anhydridi $\sqrt{\nu}$ maks (CH_2Cl_2) 1820, 1790, 1620 cm^{-1} . Lämpötilassa -30° lisättiin etanolia (1 ml) ja seosta sekoitettiin lämpötilassa -10° 15 min, sitten lämpötilassa 0° noin 10 min ja lämpötilassa 10° 45 min ja lopuksi huoneen lämpötilassa 1 tunti.

Seos haihdutettiin sitten tyhjössä ja jäännös liuotettiin veden (pH 7,0) ja etanolin seokseen ja johdettiin ioninvaihtohartsin "Amberlite 120 (Na)" lävitse.* Haihdutettaessa eluaatti ja käsiteltäessä jäännöstä kromatograafisesti piioksidigeelillä (10 g) elutoimalla kloroformi/etanolilla (3:2) saatiin yhdisteen c monoetyyli-esterin mononatriumsuola.

δ (D_2O) (eräänä esimerkkinä) (HOD-sisäinen standardi δ 4,6 mo) 1,26 (3H, t, $\underline{J}$ 8 Hz, CH_3CH_2), 1,44 (3H, d, $\underline{J}$ 6 Hz, CH_3CH), 2,04 (3H, s, CH_3CO), 6,34 (1H, d, $\underline{J}$ 14 Hz, $\text{CH}=\text{CH}$), 7,62 (1H, d, $\underline{J}$ 14 Hz, $\text{CH}=\text{CH}$).

*Eräs vaihtoehtoinen menetelmä monoesteri-monokvaternäärisen ammoniumsuolan muuttamiseksi monoesteri-mononatriumsuolaksi on ravistaa esterin dikloorimetaaniliuosta veden kanssa, joka sisältää natriumsuolaa, kuten natriumtetrafluoriboraattia tai natriumjodidia. Erotettaessa nämä kaksi kerrosta ja haihdutettaessa vesikerrokset saadaan yhdisteen c monoesteri-mononatriumsuola. Tällöin saatiin kvaternäärinen ammoniumjodidi tai tetrafluoriboraatti, joka oli suhteellisen liukenematon veteen.

Esimerkki 30

Yhdisteen c monometyyli-esterin mononatriumsuolaa (30 g) vedessä (2 ml) käsiteltiin kloroformilla (3 ml), joka sisälsi setyyli-bentsyyli-dimetyyliammoniumkloridia (27 mg). Ravistamisen jälkeen kloroformikerrokset erotettiin, kuivattiin (MgSO_4) ja haihdutettiin tyhjössä, jolloin saatiin yhdisteen c monometyyli-esterimonosetyyli-bentsyyli-dimetyyliammoniumsuola (noin 80 %:n saanto).

ν maks (CHCl_3) 1785, 1705 (leveä), 1620 cm^{-1} .

Esimerkki 31

Yhdisteen c dinatriumsuolaa (105 mg) vedessä (2 ml) käsiteltiin setyyli-bentsyyli-dimetyyliammoniumkloridilla (184 mg) dikloori-

metaanissa (2 ml). Ravistamisen jälkeen dikloorimetaanikerros erotettiin, kuivattiin (MgSO_4) ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin jäljelle jäi yhdisteen $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$ di(setyylibentsyyliidimetyyliammonium)-suola. ν maks 1775, 1695, 1625 cm^{-1} .

Yhdisteen $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$ dikvaternäärinen ammoniumsuola liuotettiin uudelleen dikloorimetaaniin (2 ml) ja tähän lisättiin metyylijodidia (0,5 ml). Kun seosta oli sekoitettu noin 2 tuntia poistettiin liuotin ja ylimääräinen metyylijodidi tyhjöissä. Käsiteltäessä jäännöstä kromatograafisesti piioksidigeelissä (10 g) ja elutoitaessa kloroformi/etanoli-seoksilla (eluutiogradientti CHCl_3 :sta $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$:hon 3:2) saatiin yhdisteen $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$ monometyyliesterin monosetyyli-bentsyyliidimetyyliammoniumsuola (saanto noin 30 % yhdisteestä MM 4550 laskettuna).

Vaihtoehtoisesti voidaan yhdisteen $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$ di(setyylibentsyyliidimetyyliammonium)-suolan esteröiminen toteuttaa liuoksena kuivassa 1,2-dimetoksietaanissa. Haihduttamisen jälkeen alhaiseen tilavuuteen erottuu setyylibentsyyliidimetyyliammoniumjodidi kiteisenä, jolloin emäliuokseen jää yhdisteen $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$ monometyyliesterin monosetyyli-bentsyyliidimetyyliammoniumsuola.

Esterin rakenteen vahvistaminen voidaan aikaansaada muuttamalla mononatriumsuola kahden menetelmän avulla:

a) natriumjodidia (1 ekvivalentti) lisätään yhdisteen $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$ monometyyliesterimonosetyyli-bentsyyliidimetyyliammoniumsuolan väkevään liuokseen 1,2-dimetoksietaanissa. Setyylibentsyyliidimetyyliammoniumjodidi erottuu kiteisenä, jolloin emälioksiin jää jäljelle natriumsuola. Kromatograafisen puhdistamisen jälkeen saadaan yhdisteen $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$ monometyyliesterimononatriumsuola, joka on identtistä esimerkissä 11 kuvatun tuotteen kanssa;

b) yhdisteen $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$ monometyyliesterimonosetyyli-bentsyyliidimetyyliammoniumsuolan liuosta dikloorimetaanissa ravistetaan veden kanssa, joka sisältää natriumtetrafluoriboraattia (1 ekvivalentin) ja vesipiteinen kerros erotetaan ja haihdutetaan ja tätä seuraa jäännöksen kromatograafinen käsittely piioksidigeelillä, jolloin saadaan yhdisteen $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$ monometyyliesterimononatriumsuola.

Esimerkki 32

Yhdisteen c mono-p-nitrobentsyyliesterimononatriumsuolaa (100mg) ja setyylibentsyylidimetyyliammoniumkloridia (70 mg) liuotettiin veteen (5 ml) ja kloroformiin (5 ml). Ravistamisen jälkeen kerrokset erotettiin ja kloroformikerros kuivattiin (MgSO_4) ja haihdutettiin tyhjössä, jolloin saatiin yhdisteen c mono-p-nitrobentsyyliesterimonosetyyli-bentsyylidimetyyliammoniumsuola (saanto noin 80 %). ν maks (CHCl_3) 1785, 1710 (leveä), 1620 cm^{-1} .

Esimerkki 33

Yhdisteen c monometyyliesterimononatriumsuolaa (52 mg) ja bentsyyli-trifenyylifosfoniumkloridia (44 mg) ravistettiin yhdessä vedessä (5 ml) ja dikloorimetaanissa (5 ml). Erottamisen jälkeen dikloorimetaanikerros kuivattiin (MgSO_4) ja haihdutettiin tyhjössä, jolloin jäljelle jäi yhdisteen c monometyyliesterin monobentsyyli-trifenyylifosfoniumsuola puolikiinteänä vaahtona (76 mg). ν maks (CH_2Cl_2) 1790, 1710 (leveä), 1610 cm^{-1} .

Esimerkki 34

Yhdisteen b dinatriumsuolaa (492 mg) dimetyyli-formamidissa (5 ml) käsiteltiin p-nitrobentsyylibromidilla (1,0 g) ja seosta sekoitettiin 1 1/2 tuntia. Suoritettaessa edelleen käsittely esimerkissä 1 kuvatulla tavalla saatiin yhdisteen b mono-p-nitrobentsyyliesterin mononatriumsuolaa (200 mg).

Esimerkki 35

Yhdisteen a dinatriumsuolaa (0,2 g; 0,46 mmoolia) käsiteltiin metyyli-tosylaattilla (0,25 g; 1,47 mmoolia) dimetyyli-formamidissa (5 ml) 3 tuntia huoneen lämpötilassa. Suoritettaessa edelleen käsittely ja kromatograafinen käsittely esimerkissä 1 kuvatulla tavalla saatiin yhdisteen a monometyyliesterin mononatriumsuola valkoisena kiinteänä aineena (0,06 g; 30 %).

Esimerkki 36

Suspensioon, jossa oli yhdisteen a dinatriumsuolaa (0,3 g; 0,69 mmoolia) asetonitriilissä (10 ml) lisättiin yhdistettä "15-crown-5" (3 tippaa) ja bentsyylibromidia (0,35 g; 2,05 mmoolia). Kun oli sekoitettu huoneen lämpötilassa 3 tuntia käsiteltiin seosta esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Yhdisteen a monobentsyyliesterin mononatriumsuola saatiin vaaleana kiinteänä aineena (0,145 g; 42 %).

Esimerkki 37

Näyte raakaa yhdisteen **b** dinatriumsuolaa (1 g; puhtaus noin 60 %) käsiteltiin metyylijodidilla (1 ml) dimetyyliformamidissa (15 ml). 2 tunnin kuluttua poistettiin liuotin tyhjössä ja jäännöstä käsiteltiin kromatograafisesti piioksidigeelillä (30 g) käyttäen asteettaista eluutiota kloroformista kloroformi/etanoliin (2:3). Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja haihdutettiin tyhjössä. Jäännökseen lisättiin etyyliasetaattia ja se poistettiin sitten tyhjössä, jolloin saatiin yhdisteen **b** monometyyliesterin mononatriumsuolaa vaaleankeltaisena, kiinteänä aineena (0,25 g); λ maks (H_2O) 314 nm, ν maks (KBr) 1765, 1700, 1660 cm^{-1} ja 1220-1270 cm^{-1} . δ (DMSO- d_6) 1,35 (3H, d, J 6 Hz, CH_3CH), 1,80 (3H, s, CH_3CO), 2,8-3,8 (7H, m, $CH.CH.CH.CH_2$ C.SCH $_2$ CH $_2$ N), 3,65 (3H, s, CO_2CH_3), 3,95-4,6 (2H, m, $CH.CH.CH$ ja 8,0 (1H, br NH).

Esimerkki 38

Yhdisteen **a** mono-p-bromibentsyyliesterimononatriumsuolaa (0,05 g; 0,086 mmoolia) liuotettiin veteen (5 ml) ja liuosta ravistettiin setyylibentsyylidimetyyliammoniumkloridin (0,032 g; 0,08 mmoolia) kanssa dikloorimetaanissa (5 ml). Orgaaninen kerros erotettiin, kuivattiin ($MgSO_4$) ja haihdutettiin tyhjössä, jolloin saatiin yhdisteen **a** mono-p-bromibentsyyliesterin monosetyyli-bentsyyli-dimetyyliammoniumsuola vaahtona (0,074 g; 93 %). ν maks (CH_2Cl_2) 1780, 1700, 1685 cm^{-1} ja 1625 cm^{-1} .

Esimerkki 39

Yhdisteen **a** monometyyliesterin mononatriumsuolan (0,10 g; 0,23 mmoolia) liuosta vedessä (5 ml) käsiteltiin setyylibentsyyli-dimetyyliammoniumkloridin (0,09 g; 0,23 mmoolia) liuoksella CH_2Cl_2 :ssa (5 ml) esimerkissä 40 kuvatulla tavalla. Yhdisteen **a** monometyyliesterin monosetyylidimetyyliammoniumsuola saatiin hartsina (0,156 g; 87 %). ν maks ($CHCl_3$) 1780, 1695 ja 1630 cm^{-1} .

Esimerkki 40

Yhdisteen **a** dinatriumsuolaa (1,0 g; 2,29 mmoolia) käsiteltiin bromiftalidilla (0,60 g; 2,82 mmoolia) dimetyyliformamidissa (15 ml) huoneen lämpötilassa. 1,5 tunnin kuluttua poistettiin dimetyyliformamidi tyhjössä ja jäännöstä käsiteltiin kromatograafisesti piioksidigeelillä (30 g) käyttäen asteettaista eluutiota ($CHCl_3$ - $CHCl_3$:EtOH, 1:1).

Muutamasta ensimmäisestä fraktiosta, jotka sisälsivät yhdisteen a monoftalidiesteriä (ohutkerroskromatografian avulla määrättynä) saostui hitaasti valkoisia kiteitä. Nämä otettiin talteen suodattamalla (0,03 g). Emäliuokset ja jäljelle jääneet fraktiot yhdistettiin ja haihdutettiin tyhjössä. Lisättiin etyyliasetaattia ja liuottimet poistettiin jälleen tyhjössä, jolloin saatiin yhdisteen a monoftalidiesterin mononatriumsuolaa kermanvärisenä, amorfisena, kiinteänä aineena (0,62 g; 50 %).

ν maks (H_2O) 333 ja 233 nm;

ν maks (KBr) 1775, 1680 br, 1620, 1210 ja 1275 cm^{-1} .

Nämä valkoiset kiteet muodosti yhdisteen a haluttu monoftalidiesteri, δ (DMSO- d_6) 1,32 (3H, d, J 6 Hz, CH_3CH), 1,92 (3H, s, CH_3CO), 2,98 (1H, dd, J 20 ja 10 Hz, H_A ABX:ssä), 3,45-3,75 (2H, m, H_B ABX:ssä ja $CHCHCH$:ssa), 4,05-4,55 (2H, m, $CHCHCH$), 5,80 (1H, d, J 14 Hz, $CH=CH.S$), 7,05 (1H, dd, J 14 ja 11 Hz, $NH.CH=CH$), 7,49 (1H, s, CO_2CHO), 7,55-8,0 (4H, m, aromaattiset protonit).

Farmakologiset kokeet

Yhdisteen c mono-pivaloyylioksimetyyliesterin mononatriumsuolan ja yhdisteen a monoftalidiesterin mononatriumsuolan (e2) bakteereja tappava ja synergistinen aktiivisuus

Molemmat edellä mainitut esterit (e1) ja (e2) kokeiltiin yhdessä yhdisteiden a ja c kanssa käyttäen 5 β -laktamaasia muodostavia organismeja sekä yksin että yhdessä ampisilliinin kanssa käyttäen kolmea tällaista organismia. Tulokset on esitetty taulukoissa 1 ja 2.

Taulukko 1

Yhdisteiden (e1) ja (e2) bakteereja tappava aktiivisuus esitettynä minimiestoväkevyytenä (MIC), $\mu g/ml$

Yhdiste	β -laktamaasi				
	Staphylococcus aureus Russell	Klebsiella aerogenes E 70	Proteus mirabilis C 889	E. coli JT 39	E. coli JT 10
Di-natrium c	12,5	6,25	25	12,5	25
Di-natrium a	0,2	0,8	0,2	0,8	0,4
e1	125	125	125	8,0	250
e2	31	15,6	15,6	31	62

Taulukko 2

Yhdisteiden (e1) ja (e2) synergistinen aktiivisuus ampisilliinin ja kefaloridiinin kanssa esitettynä minimiestoväkevyytenä (MIC), $\mu\text{g/ml}$

Yhdiste	Yhdisteen väkevyys $\mu\text{g/ml}$	Staphylococcus aureus Russell	Proteus mirabilis C 889	Kelbsiella aerogenes E 70
Ampisilliini	-	250	>2000	1000
e1	1,0	250	> 500	> 500
	10	4	15,6	500
e2	1,0	4	15,6	> 500
	5	< 0,5	1,0	250

Yhdisteen a monoftalidiesterin mononatriumsuolan (e2) ja yhdisteen c monoftaalihappoesterin mononatriumsuolan (e3) in vivo aktiivisuus
Molemmat mainitut esterit (e2) ja (e3) kokeiltiin rinnakkain yhdisteiden a ja c kanssa annostelemalla subkutaanisena injektiona vesipitoisessa fosfaattipuskuriliuoksessa, pH 6,6. Tässä kokeessa annettiin neljä annosta 1, 2, 3 ja 4 tuntia intraperitoneaalisen infektion jälkeen käyttäen kantaa E. coli 8.

Tulokset olivat seuraavat:

Kokeiltava yhdiste	CD ₅₀
c di-natrium	3,9 mg/kg x 4
(e3)	22,0 mg/kg x 4
a di-natrium	10,5 mg/kg x 4
(e2)	4,4 mg/kg x 4

Suoritettaessa koe samalla tavoin käyttäen kantaa Staphylococcus aureus Smith saatiin seuraavat tulokset

Kokeiltava yhdiste	CD ₅₀
a di-natrium	23,5 mg/kg x 4
(e2)	7,8 mg/kg x 4

Käyttäen belgialaisessa patenttijulkaisussa n:o 827 926 kuvattua I₅₀-määräysmenetelmää todettiin keksinnön mukaisten esterien natriumsuoloilla olevan seuraavat I₅₀-arvot:

Yhdisteen a esterit

Esteri	Enterobacter cloacae P 99	Ps. aeruginosa A	Proteus mirabilis C 889	Kleb. aerogenes E 70	E. coli JT 4	Ps. aeruginosa Dalglish	Staph. aureus Russell
Bentsyyli	0,022	> 2,5	0,009	4,0	> 0,5	0,312	0,563
Bentsoksatsolo- nyylimetyyli	0,04	1,8	< 0,008	1,0	0,03	< 0,008	0,24
p-NO ₂ -bentsyyli	0,016	19,2	0,022	0,09	1,9	0,198	2,2
Metyyli	0,002	0,16	0,006	> 40	> 40	0,37	23
p-Br-bentsyyli	0,014	31	0,012	0,4	0,4	0,049	0,2
p-I-bentsyyli	0,003 [*]	0,8	0,01	0,8	0,4	0,06	0,22
o-I-bentsyyli	0,0002 [*]	0,06	0,002	0,025	0,03	0,06	0,2
p-Br-fenasyyli	0,008 [*]	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	1,6
Ftalidyli	< 0,004	0,015	0,06	0,235	0,5	0,18	0,68

^{*}Saatu käyttäen β-laktamaasia, joka on peräisin kannasta Citrobacter freundii Mantis, joka on joko sama entsyymi, joka on peräisin kannasta Enterobacter cloacae tai on erittäin samankaltainen luokkaan IA kuuluva entsyymi.

Yhdisteen b esterit

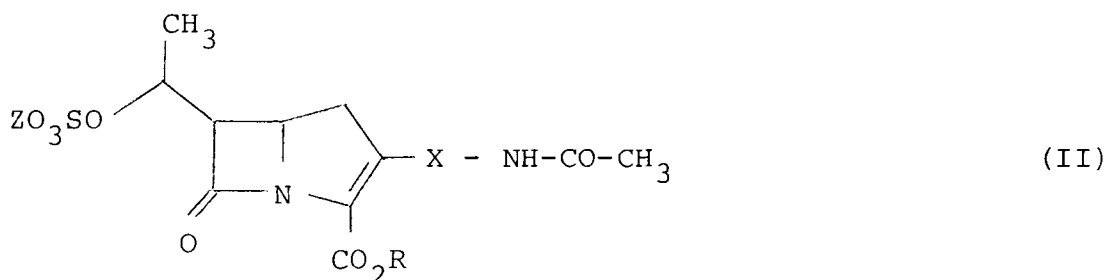
Esteri	Enterobacter cloacae P 99	Ps. aeruginosa A	Proteus mirabilis C 889	Kleb. aerogenes E 70	E. coli JT 4	Ps. aeruginosa Dalglish	Staph. aureus Russell
Metyyli	0,116	0,6	0,004	-	19,5	2,32	-
p-Br-bromobent- syli	0,022	> 40	0,007	0,6	0,4	0,057	1,4

Yhdisteen c esterit

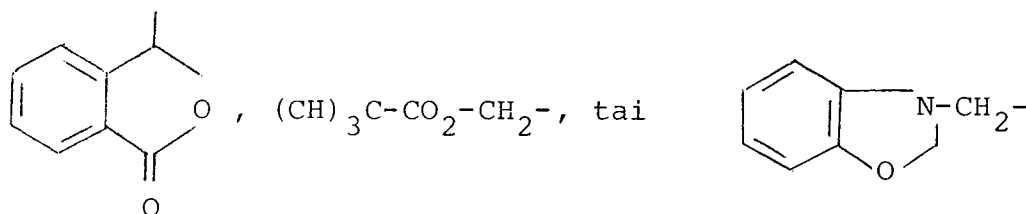
Esteri	Enterobacter cloacae P 99	Ps. aeruginosa A	Proteus mirabilis C 889	Kleb. aerogenes E 70	E. coli JT 4	Ps. aeruginosa Dalglish	Staph. aureus Russell
Bentsoksatsolo- nyylimetyyli	< 0,008	1,84	0,02	> 4	0	< 0,008	0,82
Pivaloyylioksi- metyyli	0,015	> 4	0,4	> 1	> 1	0,85	-
Metyyli	> 40	>> 40	0,01	1,2	0,35	0,14	23,0
Bentsyyli	> 40	>> 40	0,002	1,9	0,38	0,14	2,8

Patenttivaatimus

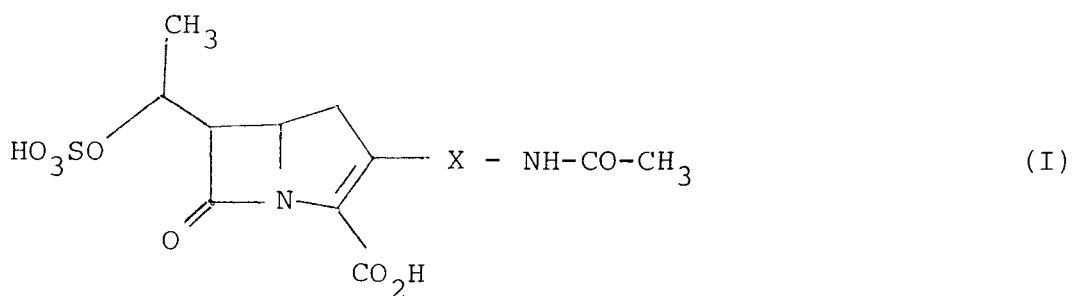
Menetelmä antibakteerisen 7-okso-1-atsabisyklo(3,2,0)hepteeni-2-karboksyylihappoesterin valmistamiseksi, jolla on kaava (II):



jossa R on alempi alkyyli; bentsyyli, joka on mahdollisesti substituoitu halogeenilla, nitrolla tai alemmalla alkyyylillä; fenasetyyli, joka on mahdollisesti substituoitu halogeenilla



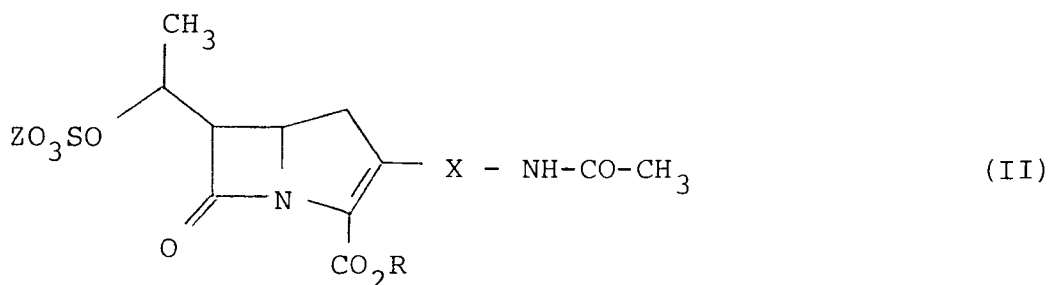
X on trans SO-CH=CH, trans S-CH=CH tai SCH₂CH₂; ja Z on natrium, kalium, kalsium, magnesium, tetraheksyyliammonium, s-bentsyyliisotiouronium, metyyliatrioktyyliammonium, setyylibutyylidimetyyliammonium tai bentsyyli-trifenyylifosfonium, t u n n e t t u siitä, että kaavan (I) mukainen yhdiste



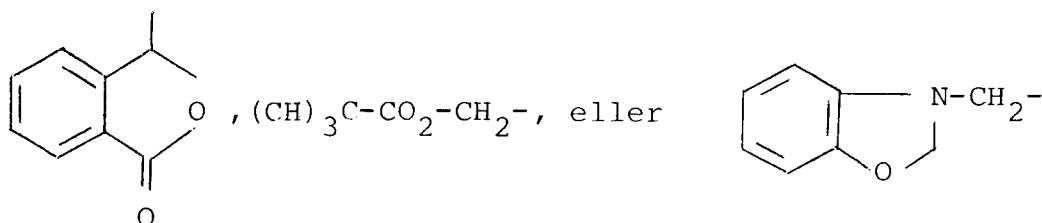
jossa X tarkoittaa samaa kuin yllä, tai tämän suola, esteröidään, ja tämän jälkeen tarvittaessa muutetaan suola toiseksi suolaksi.

Patentkrav

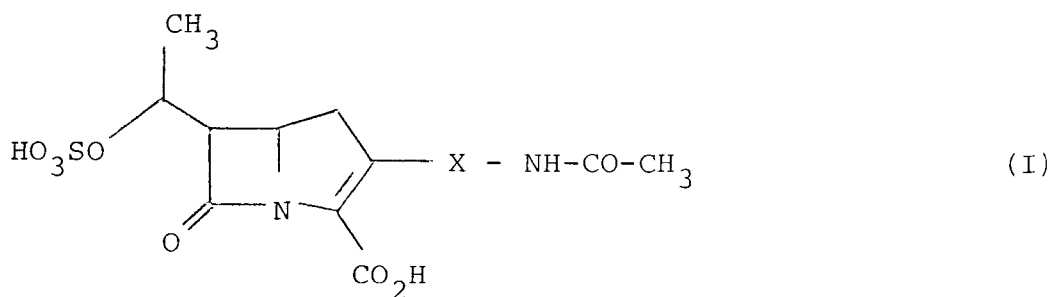
Förfarande för framställning av en antibakterisk 7-oxo-1-azabicyklo(3,2,0)hepten-2-karboxylsyraester med formeln (II):



där R är lägre alkyl; bensyl, som eventuellt är substituerad med halogen, nitro eller läge alkyl; fenacetyl, som eventuellt är substituerad med halogen,



X är trans SO-CH=CH, trans S-CH=CH eller SCH₂CH₂; och Z är natrium, kalium, kalcium, magnesium, tetrahexylammonium, s-bensylisotiouronium, metyltrioktylammonium, cetylbutyldimetylammmonium eller bensyltrifenylfosfonium, k ä n n e t e c k n a t av att en förening med formeln (I)



där X betecknar detsamma som ovan, eller ett salt av detta förestras och efter detta saltet vid behov omvandlas till ett annat salt.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar:

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utlägg-
 nings- och patentskrifter:

Suomi - Finland 55216, 55357, 55352 602 D 487/04 58332 602 D 498/04

Iso-Britannia - Storbritannien _____

Norja - Norge _____

Ranska - Frankrike _____

Ruotsi - Sverige _____

Saksa - BRD - Tyskland 2559410 602 D 498/04

Sveitsi - Schweiz _____

Tanska - Danmark _____

USA _____

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

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

Olli Parkkinen

Allekirjoitus