



Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 21.VII.1960 (P 94 338)

Pierwszeństwo: 04.VIII.1959 dla zastrz. 17, 18
20.I.1960 dla zastrz. 25—27,
29—32
06.VII.1960 dla zastrz. 2—10
Wielka Brytania

Opublikowano: 31.VIII.1964

Kl. 12 o 25

MKP C 07d

99/24

UKD

Właściciel patentu: National Research Development Corporation, Londyn (Wielka Brytania)

Sposób otrzymywania pochodnej cefalosporyny C

1

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania pochodnych cefalosporyny C.

W brytyjskim opisie patentowym nr 810.196 podany jest sposób wydzielania nowego antybiotyku cefalosporyny C z produktów procesu fermentacyjnego, prowadzonego przy użyciu gatunku *Cephalosporium*. Dotychczas budowa cefalosporyny C była nieznana, co zachęcało do prac nad przygotowaniem i identyfikacją pochodnych cefalosporyny C, które mogłyby wykazywać znajdującą zastosowanie aktywność biologiczną.

Przeprowadzono szereg prac nad poddawaniem cefalosporyny C działaniu kwasu. Newton i Abraham podają w *Biochemical Journal*, Vol 62, strony 651—657, że cefalosporyna C jest stosunkowo trwała w obecności kwasów i nie traci wykrywalnej aktywności po pozostawieniu jej w 0,1 n kwasie solnym, w temperaturze pokojowej na okres 4 godzin. Podobnie w *Nature*, Vol 175, strona 548, Newton i Abraham stwierdzają, że cefalosporyna C jest trwała w wodnych roztworach o wartości $pH = 2,5$ w temperaturze pokojowej. W publikacji tej opisano także hydrolizę cefalosporyny C przy użyciu kwasu, w wyniku której tworzy się z cefalosporyny C jeden mol dwutlenku węgla i jeden mol kwasu D- α -aminoadypinowego. To traktowanie kwasem, które prowadzono przy użyciu gorącego, stężonego kwasu solnego w ciągu 18 godzin, spowodowało rozbitcie cząsteczki cefalosporyny C i zniszczenie całej jej aktywności.

2

Na Sympozjum, zorganizowanym przez fundację Ciba, na temat aminokwasów i peptydów odznaczających się antymetaboliczną aktywnością, opisano przygotowanie kilku aktywnych związków z cefalosporyny C. Wykryto, że w wyniku traktowania cefalosporyny C 0,1 n kwasem solnym w temperaturze $20^{\circ}C$ powstają co najmniej dwa kwaśne i trzy obojętne związki, które dają pozytywną reakcję z ninhydryną.

Obojętne związki z łatwością oddziela się od innych na chromatogramach bibulowych rozwijanych, w mieszaninie butanol — kwas octowy — woda (4:1:4). Jeden z tych związków (R_f 0,15), wykazujący antybakteryjną aktywność nazwano cefalosporyną C. Sposób przygotowywania oraz właściwości cefalosporyny C podano bardziej szczegółowo w brytyjskim opisie patentowym nr 912.300. W tabeli na stronie 3 wymienionego opisu podano ilości cefalosporyny C uzyskane w różnych warunkach kwasowych.

Na Sympozjum nie mówiono nic o kwaśnych produktach hydrolizy. Stwierdzono jedynie, że wykazują one dodatnią reakcję z ninhydryną, gdy użyte są w stężeniach uzyskanych podczas traktowania cefalosporyny C 0,1 n kwasem solnym w temperaturze $20^{\circ}C$. W publikacji nie podano czasu działania kwasem przed wydzieleniem produktów hydrolizy. Obecnie stwierdzono, że czas działania kwasu wynosi 6 — 9 dni.

Obecnie ustalono budowę cefalosporyny C i stwierdzono, że w pewnych warunkach pod działaniem kwasu, cząsteczka cefalosporyny C może zostać rozbita na dwie części. Dwie części cząsteczki cefalosporyny C to — złożony układ pierścieniowy i łańcuch boczny, którym jest kwas α -aminoadypinowy połączony z 7 pozycją układu (7 pozycję opisano poniżej). W opisie, związki posiadające budowę tego typu (to jest złożony układ o podstawowej pierścieniowej strukturze cefalosporyny C i boczny łańcuch kwasu α -aminoadypinowego połączony z 7 pozycją układu), zalicza się do grupy związków o tej typowej budowie — układ pierścieniowy z łańcuchem bocznym. Biologiczne właściwości cefalosporyny C zależą w głównej mierze od bardzo złożonej struktury układu pierścieniowego. Przypuszczalnie przez dodanie do układu pierścieniowego metodami chemicznymi znanymi per se, innych bocznych łańcuchów, można sporządzić pochodne układu, wykazujące podobną lecz zmodyfikowaną, a nawet zwiększoną aktywność niż sama cefalosporyna C. Odkrycie budowy cefalosporyny C typu układ pierścieniowy z łańcuchem bocznym oraz metod oddzielania i izolowania tego układu ma bardzo duże znaczenie w dziedzinie antybiotyków.

Niezależnie od cefalosporyny C istnieją pewne jej pochodne już wytworzone i zidentyfikowane, w których także znajduje się strukturę typu układ pierścieniowy z łańcuchem bocznym. Jednym z takich związków jest cefalosporyna C_6 , na którą powoływano się powyżej. Inne takie związki opisane są w brytyjskim opisie patentowym nr 912.541. Są nimi antybiotyki będące przekształconymi produktami cefalosporyny C i zaliczane do związków typu cefalosporyny C_A . Uzyskuje się je przez działanie na wodne roztwory cefalosporyny C słabymi, trzeciorzędowymi zasadami, na przykład pirydyną, kolidyną, chinoliną. Jeżeli używa się pirydyny, to uzyskany antybiotyk zalicza się do związków typu cefalosporyny C_A (pirydyna).

Zatem według wynalazku otrzymuje się pochodne cefalosporyny C przez poddawanie hydrolizie cefalosporynę C, cefalosporyny C_6 , cefalosporyny C_A lub pochodnej któregośkolwiek z tych związków, której boczny łańcuch chroniony jest przez ugrupowanie nie odłączające się podczas hydrolizy. Hydrolizę prowadzi się do momentu, w którym nastąpi odłączenie bocznego łańcucha i otrzymaną pochodną wyosabnia się z mieszaniny reakcyjnej.

Szczególnie odpowiednią ochronną grupę stanowi grupa 2,4-dwunitrofenylowa, inną również stosowaną grupą jest grupa 2-nitro-4-karbometoksyłowa. Te pochodne o chronionym bocznym łańcuchu można otrzymywać i w inny sposób. Na przykład 2,4-dwunitrofenylową pochodną cefalosporyny C można otrzymywać przez reakcję cefalosporyny C z 1-fluoro-2,4-dwunitrobenzenem, a pochodną 2-nitro-4-karbometoksyłową cefalosporyny C otrzymuje się w czasie reakcji cefalosporyny C z 1-fluoro-2-nitro-4-karbometoksybenzenem.

Według jednej z odmian wynalazku otrzymuje się układ cefalosporyny C o wzorze 1 przez poddawanie hydrolizie 2,4-dwunitrofenylowej pochodnej cefalosporyny C aż do usunięcia chronio-

nego łańcucha bocznego, a układ pierścieniowy cefalosporyny C wyosabnia się z mieszaniny reakcyjnej. We wzorze tym pozycja 7 układu pierścieniowego cefalosporyny C jest odpowiednio oznaczona.

Z układu pierścieniowego cefalosporyny C można następnie uzyskać sole pochodne działając solami sodową, potasową lub amoniową, albo też silnym kwasem. Najczęściej stosowanymi silnymi kwasami są kwasy mineralne, a szczególnie kwas solny ze względu na tworzenie chlorków układu pierścieniowego cefalosporyny C.

Według innej odmiany wynalazku sposób otrzymywania układu pierścieniowego cefalosporyny C_6 o wzorze 2 prowadzi się poddając cefalosporynę C_6 hydrolizie aż do usunięcia z niej bocznego łańcucha, zaś z mieszaniny reakcyjnej wyodrębnia się układ cefalosporyny C.

Układ pierścieniowy cefalosporyny C_6 można następnie przeprowadzić w sole pochodne, działając silnymi kwasami, korzystnie kwasami mineralnymi i zwłaszcza kwasem solnym, którego stosowanie jest szczególnie korzystne ze względu na tworzenie chlorków układu pierścieniowego cefalosporyny C_6 .

Według jednej z dalszych odmian wykonania wynalazku prowadzi się proces otrzymywania układu pierścieniowego cefalosporyny C_A o wzorze 3, w którym R. oznacza słabą, trzeciorzędową zasadę, jak określono w brytyjskim opisie patentowym nr 912.541, charakteryzujący się tym, że cefalosporynę C lub cefalosporynę C_A hydrolizuje się aż do usunięcia z nich bocznego łańcucha, zaś z produktów reakcji wyodrębnia się układ cefalosporyny C_A . Jednym z najważniejszych zastosowań tego sposobu jest otrzymywanie układu pierścieniowego cefalosporyny C_A (pirydyna), przy czym R oznacza wówczas pirydynę.

Należy podkreślić, że proces otrzymywania układu pierścieniowego cefalosporyny C_A można prowadzić co najmniej dwoma sposobami. Można więc hydrolizować cefalosporynę C, aby otrzymać układ pierścieniowy cefalosporyny C i następnie po zadaniu produktów tej reakcji słabą trzeciorzędową zasadą wyosobnia się układ pierścieniowy cefalosporyny C_A . Drugi sposób polega na poddaniu hydrolizie bezpośrednio cefalosporyny C_A aż do otrzymania układu pierścieniowego.

Z układu pierścieniowego cefalosporyny C_A można następnie uzyskać sole pochodne, działając silnymi kwasami, korzystnie kwasami mineralnymi i zwłaszcza kwasem solnym, który daje chlorki z układem pierścieniowym cefalosporyny C_A .

Przez odpowiednie dobranie wartości pH roztworu można uzyskać układ pierścieniowy w postaci wolnej, nie zaś w formie kwaśnych soli. Można na przykład wyodrębnić wolny układ kiedy doprowadzi się roztwór do wartości pH około 4,5. Najczęściej stosowanymi kwasami są rozcieńczony kwas mineralny, przy czym kwas solny uważany jest za najodpowiedniejszy. Innymi dogodnymi kwasami są kwasy sulfonowe i sulfonowane żywice polistyrenowe. Przeprowadzając ten proces, zakwaszony roztwór zawierający cefalosporynę C, cefalosporynę C_6 lub cefalosporynę C_A pozostawia

się aż do momentu uzyskania stosunkowo wysokiej wydajności układu pierścieniowego. Czas zależny jest od sposobu przeprowadzania doświadczenia, normalnie jednak wynosi około kilku dni.

Układ pierścieniowy można wyodrębnić z produktów reakcji metodami znanymi per se, na przykład elektroforezą na bibule i (lub) chromatografią bibulową. Wyodrębniony przy zastosowaniu tych metod układ pierścieniowy identyfikuje się przez brak aktywności antybiotycznej w zastosowanych stężeniach (bibuła, na której przeprowadzono elektroforezę umieszcza się na płytkach, na których znajduje się *Staphylococcus aureus* /Oxford Strain/), przy czym aktywność pojawia się po potraktowaniu chlorkiem fenyloacetylenu i przeprowadzeniu układu pierścieniowego w jego pochodną fenyloacetylową. Proces ten można dogodnie prowadzić spryskując bibułę najpierw roztworem M-pirydyny w 50% acetonie, a następnie chlorkiem fenyloacetylenu (1,25% objętość/objętość) w acetonie. Fenyloacetylową pochodną można wyodrębnić środkami chromatograficznymi i elektroforetycznymi.

W jednym z wariantów wynalazku cefalosporynę C_0 stosowaną do wytwarzania odpowiedniego układu pierścieniowego otrzymuje się in situ z cefalosporyny C. Przy traktowaniu cefalosporyny C kwasem, jak podano w brytyjskim opisie patentowym nr 912.360 otrzymuje się cefalosporynę C_0 , natomiast przy dalszym działaniu kwasem poza warunkami optymalnymi dla wytwarzania cefalosporyny C_0 osiąga się optymalne warunki dla wytwarzania układu pierścieniowego cefalosporyny C_0 . Stwierdzono już w brytyjskim opisie patentowym nr 912.360, że korzystne warunki dla otrzymywania cefalosporyny C_0 stwarza się przez działanie 0,5 — 1 n kwasem solnym w czasie krótszym niż 1 dzień, a najdogodniejsze warunki dla wytwarzania układu pierścieniowego cefalosporyny C_0 polegają na traktowaniu cefalosporyny C 0,5 — 1 n kwasem solnym w ciągu 2 do 4 dni.

Przy użyciu kwasu solnego, zwłaszcza w stężeniu około 0,1 — 0,3 n powstają dogodne warunki reakcji dla otrzymania układu pierścieniowego cefalosporyny C o pochodnych cefalosporyny C o chrońonim bocznym łańcuchu. Reakcję prowadzi się korzystnie w organicznym rozpuszczalniku, mieszającym się z wodą, na przykład w acetonitrylu. Korzystnie jest prowadzić reakcję w ciemności i w obojętnej atmosferze, na przykład azotu.

Warunki reakcji dla otrzymywania układów pierścieniowych cefalosporyny C, cefalosporyny C_0 i cefalosporyny C_A z cefalosporyny C, cefalosporyny C_0 i cefalosporyny C_A mogą różnić się znacznie w każdym przypadku, lecz stwierdzono, że korzystnie stosuje się kwas solny o wartości pH 0—2,5, w temperaturze od około -10°C do $+50^{\circ}\text{C}$, w czasie od 12 godzin do 30 dni, przy czym warunki określone tymi granicami zapewniają uzyskanie wysokiej wydajności produktów hydrolizy. Najkorzystniejsza z metod wymaga stosowania 0,1 n kwasu solnego, w temperaturze około 20°C w ciągu około 3 dni.

W czasie działania na cefalosporynę C kwasu o stężeniu określonym powyżej rozpoczynają się co

najmniej dwie reakcje: 1) hydroliza cefalosporyny C rozczepiająca wiązanie łączące układ pierścieniowy z łańcuchem bocznym, 2) reakcja kwasu z cząsteczką cefalosporyny C w wyniku której powstaje cefalosporyna C_0 . Ponadto, kiedy utworzy się w mieszaninie reakcyjnej cefalosporyna C_0 , rozpoczyna się trzecia reakcja, to znaczy hydroliza cefalosporyny C_0 , w czasie której ulega rozbić wiązanie pomiędzy układem pierścieniowym cefalosporyny C_0 i łańcuchem bocznym. Tworzy się również pewna ilość układu pierścieniowego cefalosporyny C_0 w wyniku działania kwasu na układ cefalosporyny C. Jeżeli na przykład traktowanie cefalosporyny C kwasem ma na celu uzyskanie układu pierścieniowego cefalosporyny C, dobiera się tak warunki reakcji, aby zapewnić utworzenie stosunkowo dużych ilości układu pierścieniowego cefalosporyny C, a małych — układu pierścieniowego cefalosporyny C_0 . Natomiast gdy reakcję prowadzi się w celu uzyskania układu pierścieniowego cefalosporyny C_0 , to warunki reakcji dobiera się w taki sposób, aby zapewnić utworzenie stosunkowo dużych ilości układu pierścieniowego cefalosporyny C_0 . Najdogodniejsze warunki dla reakcji ustala się eksperymentalnie. Stwierdzono, że działanie na cefalosporynę C 0,1 n HCl w temperaturze 20°C w ciągu około 3 dni zapewnia dużą wydajność układu pierścieniowego cefalosporyny C, natomiast duże ilości układu pierścieniowego cefalosporyny C_0 uzyskuje się w wyniku działania 0,5 — 1,0 n kwasu solnego w temperaturze 20°C w ciągu około 3 dni.

Warunki powyższe są sprzeczne z danymi z tabeli 3 brytyjskiego opisu patentowego nr 912.360 według którego najlepszą wydajność cefalosporyny C_0 uzyskuje się przy użyciu 0,1 n kwasu solnego w temperaturze 20°C w ciągu około 5 dni. W tym także czasie utworzony we wcześniejszym stadium układ pierścieniowy cefalosporyny C zanika.

Należy podkreślić, że układ pierścieniowy cefalosporyny C był nie jednym z wykrytych kwaśnych związków, lecz nie zdefiniowanych na Sympozjum organizowanym przez Cibę, z następujących przyczyn:

Po pierwsze — można uważać, że po działaniu na cefalosporynę C 1 n kwasem solnym w temperaturze 20°C w ciągu ponad 5 dni właściwie układ pierścieniowy cefalosporyny C przestaje istnieć. Wiadomo, że optymalne warunki dla uzyskania układu pierścieniowego cefalosporyny C powstają w wyniku działania 0,1 n kwasu solnego w ciągu 3 dni, oraz, że okres czasu, w którym otrzymuje się znaczną wydajność układu pierścieniowego jest ograniczony. A więc po okresie ponad 5 dni układ pierścieniowy cefalosporyny C zasadniczo nie pozostanie w roztworze.

Po drugie następne doświadczenia wykazały, że ilości układu pierścieniowego cefalosporyny C powstałe w wyniku reakcji prowadzonej nawet w optymalnym czasie 3 dni są niewystarczające, aby dać pozytywną reakcję z ninhydryną. W optymalnych warunkach układ pierścieniowy wykryto później przez fenyloacetylację i przez następną powyżej opisaną próbę aktywności. W danym przypadku, nawet wtedy kiedy roztwór zawierają-

cy układ pierścieniowy cefalosporyny C zateża się do tego stopnia, że powinna występować w wykrywalnym stopniu pozytywna reakcja z ninhydryną nie uzyskuje się typowego niebieskiego lub purpurowego zabarwienia. Otrzymuje się natomiast kolor żółtawo-brązowy. Tak więc układ pierścieniowy cefalosporyny C nie jest ninhydryno-pozytywny w ścisłym znaczeniu tego słowa.

Układ pierścieniowy cefalosporyny C, który został nazwany kwasem 7-aminocefalosporanowym ma podobną budowę przestrzenną do odpowiedniej części cefalosporyny C, uzyskanej przez fermentację za pomocą *Cephalosporium*. Można go zidentyfikować przez fenylodacetylację, dzięki następującym właściwościom:

1. Otrzymana frakcja układu pierścieniowego cefalosporyny C wędruje w czasie elektroforezy przy wartości pH 7 (jako rozpuszczalnik — stosuje się wodny octan kolidyny) w kierunku anody nieco szybciej niż cefalosporyna C.
2. Frakcja układu pierścieniowego cefalosporyny C wędruje w kierunku anody przy wartości pH 4,5 z szybkością równą mniej więcej połowie szybkości cefalosporyny C (jako rozpuszczalnik — stosuje się wodny octan pirydyny).
3. Frakcja układu pierścieniowego cefalosporyny C pozostaje w czasie elektroforezy przy wartości pH 4,0 (w wodnym octanie pirydyny) blisko punktu początkowego, wykazując stosunkowo małe przesunięcie w kierunku anody. W tych warunkach cefalosporyna C wędruje jeszcze w kierunku anody prawie tak szybko, jak przy wartości pH 7.
4. Po elektroforezie w 10%-owym kwasie octowym, wyeluwowaniu z bibuły i hydrolizie w n HCl w temperaturze 105°C w ciągu 16 godzin, tworzy się pewna ilość glicyny (50 µg daje plamę o podobnej intensywności do intensywności plamy powstałej po hydrolizie 50 µg cefalosporyny C), lecz nie tworzy się kwas α-aminoadypinowy. Częsteczka cefalosporyny C nie posiada bocznego łańcucha.
5. Frakcja układu pierścieniowego cefalosporyny C wykazuje podobne wartości R_F co n-fenylodacetyl cefalosporyna C (0,08—0,15) w układzie butanol-etanol-woda (4:1:5 objętość).
6. Po chromatografii w układzie butanol-etanol-woda lub po elektroforezie i następnie skropieniu bibuły penicylinazą w roztworze 0,1% żelazyny (stężenie enzymu 10-krotnie wyższe niż wymagane do odaktywnienia plamy 50 µg benzylopenicyliny) otrzymuje się plamę o widocznie niezmnieszonej aktywności w porównaniu z aktywnością uzyskaną po skropieniu chlorkiem fenylodacetyl i pirydyną.
7. Gdy plamę z cefalosporyny C na bibule spryska się następnie octanem pirydyny o wartości pH 7, zawiesi nad parami roztworu 2 moli octanu pirydyny w 1 litrze w ciągu 16 godzin i wysuszy, to po elektroforezie przy wartości pH 7 i fenylodacetylacji pojawi się aktywna plama (w związku z fenylodacetylową pochodną układu pierścieniowego cefalosporyny C_A /pirydyna/) w położeniu neutralnym oraz plama w miejscu

nieco bliżej anody niż zajmowana przez cefalosporynę C.

8. Po elektroforezie na bibule układ pierścieniowy daje żółtawo-brązowe zabarwienie z ninhydryną, które następnie zmienia się na szaro-niebieskie (stwierdzono, że kwas 6-aminopenicylanowy nie daje normalnego zabarwienia z ninhydryną). Po elektroforezie bibulowej lub po chromatografii układ pierścieniowy cefalosporyny C można z łatwością wykryć (podobnie jak cefalosporynę C) przez umieszczenie bibuły przed źródłem światła ultrafioletowego, jako ciemną plamę powstałą w wyniku absorpcji światła.

Układ pierścieniowy cefalosporyny C₀, będący laktonem odacetylowanego kwasu 7-aminocefalosporanowego, posiada również budowę przestrzenną podobną do odpowiedniej części cefalosporyny C uzyskanej przez fermentację za pomocą *Cephalosporium*. Związek ten można identyfikować po fenylodacetylacji, dzięki następującym właściwościom:

1. W czasie elektroforezy na bibule w buforze z octanu pirydyny (pH 4,5) układ pierścieniowy cefalosporyny C₀ przesuwa się w przybliżeniu o tę samą odległość w kierunku katody co układ pierścieniowy cefalosporyny C w kierunku anody.
2. W czasie elektroforezy na bibule w 10%-owym buforze z kwasu octowego układ pierścieniowy cefalosporyny C₀ wędruje ku katodzie z szybkością 2 $\frac{1}{2}$ -razy większą niż układ pierścieniowy cefalosporyny C.
3. W wyniku chromatografii prowadzonej w układzie butanol-etanol-woda (4:1:5 objętość) wartość R_F pochodnej układu pierścieniowego cefalosporyny C₀ wynosi 0,33 w porównaniu z wartością 0,08—0,15 dla układu pierścieniowego cefalosporyny C i 0,08 dla układu pierścieniowego cefalosporyny C_A.

Układ pierścieniowy cefalosporyny C_A posiada również budowę przestrzenną podobną do odpowiedniej części cefalosporyny C uzyskanej w czasie fermentacji, za pomocą *Cephalosporium*. Cefalosporyna C_A (pirydyna) może być identyfikowana na podstawie następujących właściwości:

1. W czasie elektroforezy na bibule w buforze z octanu pirydyny o wartości pH 4,0 układ pierścieniowy cefalosporyny C_A przesuwa się o taką samą w przybliżeniu odległość w kierunku katody, jak cefalosporyna C w kierunku anody. O ile elektroforezę prowadzi się w 10%-owym kwasie octowym, układ pierścieniowy cefalosporyny C_A (pirydyna) wędruje dwukrotnie szybciej w kierunku katody niż czyni to cefalosporyna C_A (pirydyna).
2. Układ pierścieniowy cefalosporyny C_A (pirydyna) nie ulega zniszczeniu na skutek działania penicylinazy w warunkach, w których zostaje całkowicie zniszczone 50 µg penicyliny G.
3. Układ pierścieniowy cefalosporyny C_A (pirydyna) różni się na chromatogramach rozwijanych

w układzie n-butanol-etanol-woda (4:1:5 objętość) od układu pierścieniowego cefalosporyny C_6 .

Związki zdefiniowane powyżej jako układy pierścieniowe cefalosporyny C , C_6 i C_A są szczególnie ważnymi związkami, z których jako z półproduktów można otrzymywać dalsze pochodne cefalosporyny C , charakteryzujące się aktywnością biologiczną.

Dalszym przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania acetylowanych pochodnych układów pierścieniowych cefalosporyny C , C_6 i C_A o wzorze ogólnym 4, w którym X oznacza układ pierścieniowy cefalosporyny C , cefalosporyny C_6 lub cefalosporyny C_A związany z grupą $R_1R_2CH.CO$ w położeniu 7, a R_1 i R_2 oznaczają wodór, grupę alkilową, fenyłową, podstawioną grupę fenyłową lub grupę o budowie R_3-O- , w której R_3 oznacza grupę alkilową, fenyłową lub podstawioną grupę fenyłową i mogą być takie same lub różne. Sposób ten polega na traktowaniu układu pierścieniowego cefalosporyny C , cefalosporyny C_6 lub cefalosporyny C_A chlorkiem acetylu o wzorze 5, w którym R_1 i R_2 oznaczają grupy opisane powyżej.

Związki wytworzone powyższym sposobem posiadają znaczną aktywność biologiczną. Na przykład fenyloacetylowa pochodna układu pierścieniowego cefalosporyny C posiada aktywność około 1000 jednostek/mg, przy uzyskanym dotychczas stopniu czystości. Widmo biologiczne tego związku podano w przykładzie II. Stwierdzono, że fenoksyacetylowa pochodna układu pierścieniowego cefalosporyny C posiada podobną aktywność, co pochodna fenyloacetylowa, a pochodna benzoilowa, n-propionylowa, izobutyryloacetylowa i pochodna acetylowa również wykazują aktywność biologiczną.

Nie określono jeszcze aktywności biologicznej fenyloacetylowej pochodnej układu pierścieniowego cefalosporyny C_A (pirydyna), lecz ze względu na to, że cefalosporyna C_A (pirydyna) jest bardziej aktywna niż cefalosporyna C przypuszcza się, że aktywność biologiczna fenyloacetylowej pochodnej układu pierścieniowego cefalosporyny C_A będzie wysoka.

Innymi ważnymi acylowymi pochodnymi są pochodne: benzyloksykarbonylowa, heksanoilowa, heksahydrobenzoilowa, p-nitrofenyloacetylowa i p-nitrofenoksyacetylowa.

Szczególnie duże znaczenie ma sposób otrzymywania fenyloacetylowej pochodnej układu pierścieniowego cefalosporyny C , która jest związkiem o wzorze 6, w którym to sposobie układ pierścieniowy cefalosporyny C traktuje się chlorkiem fenyloacetylu.

Sposób otrzymywania fenyloacetylowej pochodnej układu pierścieniowego cefalosporyny C_6 o wzorze 7, polega również na traktowaniu układu pierścieniowego cefalosporyny C_6 chlorkiem fenyloacetylu.

Duże znaczenie ma również sposób otrzymywania pochodnej fenyloacetylowej układu pierścieniowego cefalosporyny C_A o wzorze 8, w którym R oznacza słabą trzeciorzędową zasadę, podany w brytyjskim opisie patentowym nr 912.541 polegający na traktowaniu układu pierścieniowego ce-

falosporyny C_A chlorkiem fenyloacetylu: Najkończystniejszym związkiem układu pierścieniowego cefalosporyny C_A jest układ pierścieniowy cefalosporyny C_A (pirydyna).

W przypadku wytwarzania fenyloacetylowej pochodnej układu pierścieniowego cefalosporyny C_A (pirydyna) o wzorze 9, układ pierścieniowy cefalosporyny C_A (pirydyna) traktuje się chlorkiem fenyloacetylu.

Następujące przykłady służą dla wyjaśnienia wynalazku.

Przykład I. Wytwarzanie kwasu 7-aminocefalosporanowego.

a) Wytwarzanie 1-fluoro-2,4-dwunitrobenzenowej (FDNB) pochodnej cefalosporyny C .

31,7 g soli sodowej cefalosporyny C (85 — 90% czystości) rozpuszcza się w 635 ml wody, zawierającej 25,5 g bezwodnego kwaśnego węgla sodu. Do tego roztworu w trakcie mieszania dodaje się 25,5 ml FDNB rozpuszczonego w 635 ml alkoholu etylowego. Mieszaninę wytrząsa się w ciemności, w temperaturze pokojowej w ciągu dalszych 2 1/2 godziny. Stężonym kwasem solnym doprowadza się roztwór do wartości $pH = 5$ i alkohol oddestylowuje w próżni. W tym stadium zostaje oddzielony nadmiar FDNB. Po doprowadzeniu wartości pH mieszaniny do 7, przy użyciu kwaśnego węgla sodowego, mieszaninę ekstrahuje się 3 x 1/2 ml eteru, aby usunąć nadmiar FDNB i uzyskać klarowny, wodny roztwór. Następnie doprowadza się wartość pH do 2,5 stosując stężony kwas solny. W tym stadium tworzy się lepki osad, który następnie rozpuszcza się podczas ekstrahowania mieszaniny 3 x 1/2 objętości octanu etylowego. Zebrane wyciągi octanu etylowego przemycza się następnie wodą, suszy nad bezwodnym siarczanem sodowym i doprowadza do suchości. W wyniku pozostaje 40,3 g żółtej substancji stałej.

Próba biologiczna, przeprowadzona na czystej próbce dwunitrofenylowej pochodnej cefalosporyny C wykazuje, że otrzymana substancja jest czysta w 88%.

b) Hydroliza kwasowa 2,4-dwunitrofenylowej pochodnej cefalosporyny C .

Surowa 2,4-dwunitrofenylowa pochodna cefalosporyny C , otrzymana jak opisano powyżej, zawiera niewielkie ilości barwnych, zasadowych zanieczyszczeń, które usuwa się przez rozpuszczenie substancji stałej w octanie etylu i przemycie 0,2 n HCl . Następnie octan etylu suszy się i usuwa w próżni. W wyniku tego postępowania ilość produktu stałego zmniejsza się z 10,1 g do 9,7 g.

9,7 g DNP pochodnej cefalosporyny C rozpuszcza się w mieszaninie 100 ml acetonitrylu, 65 ml wody i 34 ml n kwasu solnego. Roztwór pozostawia się w ciemności, w temperaturze pokojowej, w atmosferze azotu w ciągu 64 godzin. Następnie do roztworu dodaje się 200 ml wody i całość ekstrahuje 5 x 100 ml octanu etylu. Pozostały uwodniony (270 ml) kwas 7-aminocefalosporanowy doprowadza się następnie do wartości $pH = 7,2$ nasyconym

roztworem kwaśnego węgla sodowego i oziębia do temperatury 0°C.

c) Wydzielenie kwasu 7-aminocefalosporynowego III (7-ACA).

Po hydrolizie i ekstrakcji octanem etylu, tak jak podano w punkcie b), pozostaje kwaśny roztwór zawierający głównie 7-ACA i 7-ACA (lakton). Roztwór ten doprowadza się do wartości pH 6,7 i wprowadza do kolumny Dowex 1 (Cl⁻). Lakton 7-ACA przepływa przez kolumnę i pojawia się w przesączu z kolumny. Po przemyciu wodą 7-ACA można wyeluować używając 0,05 n kwasu solnego. Frakcje zawierające 7-ACA tworzą krystaliczny osad, który wydaje się być amfoteryczną formą tego związku, podczas gdy większość 7-ACA pozostaje w roztworze, jako chlorowodorek. Widmo ciała stałego w podczerwieni podane zostało na wykresie fig. 1. Roztwory chlorowodoru można fenyloacetylować, w celu otrzymania benzylocefalosporyny.

d) Przekształcenie rozpuszczonego kwasu 7-aminocefalosporynowego w jego fenyloacetylową pochodną (benzylocefalosporyna).

Do ochłodzonego wodnego roztworu otrzymanego w punkcie b) dodaje się 300 ml acetonu, zawierającego 3 ml chlorku fenyloacetylu. Wartość pH roztworu, która uległa obniżeniu, ponownie doprowadza się do 7. Roztwór pozostawia się na 1 godzinę, aby temperatura jego osiągnęła wysokość temperatury pokojowej. Następnie aceton usuwa się przez destylację w próżni. Objętość wodnej pozostałości wynosi obecnie 325 ml, wartość pH = 5,9. Pozostałość tę ekstrahuje się jeszcze 2 x 150 ml benzenu, aby usunąć resztki nie oddestylowanego acetonu. Po doprowadzeniu wartości pH do 3,3, przy użyciu syropu kwasu fosforowego, roztwór jeszcze dwukrotnie ekstrahuje się benzenem (2 x 150 ml benzenu). Przy tej wartości pH nadmiar kwasu fenylooctowego zostaje wyekstrahowany, zaś w roztworze, pozostaje benzylocefalosporyna. W celu zakończenia ekstrakcji wartość pH roztworu, która podniosła się do 3,8 obniża się do 3,3 i przeprowadza jeszcze trzykrotnie ekstrakcję benzenem (3 x 150 ml). Następnie powoduje się obniżenie wartości pH roztworu do 2,5 używając kwasu fosforowego i roztwór ekstrahuje się 3 x 150 ml octanem etylu. Połączone wyciągi przemywa się 2 x 30 ml wody i po wysuszeniu nad bezwodnym siarczanem sodowym odparowuje w próżni do 2—3 ml. Dodanie 10—15 objętości eteru naftowego 60—80°C powoduje wytrącenie się żółtawego ciała stałego (97 mg), które odwirowuje się, przemywa kilkakrotnie eterem naftowym (40—60°C), a następnie suszy w eksykatorze próżniowym. Następnie ciało stałe rozpuszcza się ponownie w 2 ml octanu etylu i dodaje do niego 10—15 objętości eteru. Powoduje to wytrącenie małej ilości ciała stałego, które się usuwa.

Po odparowaniu mieszaniny eteru i octanu etylu odzyskuje się 72 mg ciała stałego. Następnie miesza się otrzymany produkt z 20 ml wody, w której nie bardzo się on rozpuszcza i miareczkuje n/10 roztworem wodorotlenku sodowego do wartości pH 6; podczas miareczkowania roztwór należy

energicznie mieszać. Niewielkie ilości nierozpuszczalnych substancji usuwa się przez sączenie, zaś z wodnego roztworu po wysuszeniu w suszarce sublimacyjnej pozostaje dość lepkie ciało stałe. Substancję tę rozpuszcza się w minimalnych ilościach mieszaniny acetonu z wodą 9:1 (~ 1 ml). Wytrąca się kłaczkowaty osad w postaci drobnych bezbarwnych igiełek (31,2 mg). Dalsze oczyszczanie przeprowadza się ponownie rozpuszczając uzyskany związek w uwodnionym acetonie i wytrącając go w postaci osadu po dodaniu bezwodnego acetonu.

Właściwości fizyczne krystalicznej soli sodowej benzylocefalosporyny.

Przy ogrzewaniu sól sodowa ciemnieje i rozkłada się począwszy od temperatury 160°C (α) D²⁸ + 122° (c 1,2 w wodzie) U. V. w wodzie:

$$\lambda_{\text{max.}} 259 \text{ m}\mu \text{ E}_1^{1\%} \text{ cm } 190$$

$$\lambda_{\text{max.}} 234 \text{ m}\mu \text{ E}_1^{1\%} \text{ cm } 138,5$$

Widmo w podczerwieni w zawiesinie ciekłej parafiny o nazwie handlowej „nujol”, przedstawia fig. 2. Chromatografia na bibule: Zastosowany układ rozpuszczalników butanol-etanol-woda (4:1:5). Górna faza tej mieszaniny została przeniesiona na bibulę Whatman'a nr 1 buforowaną do wartości pH 6,0.

$$R_F 0,65 - 0,67$$

Elektroforeza: Sól sodowa benzylo-cefalosporyny wędruje w kierunku anody w przybliżeniu z tą samą szybkością co penicylina G w buforze octanu kolidyny o wartości pH 7.

Aktywność kwasu 7-fenyloacetoamidocefalosporynowego w stosunku do różnych bakterii podano przy zastosowaniu techniki „rozcieńczeń probówkowych”. Organizmy rosnące na bulionie odżywczym z wyjątkiem, gdy podano inaczej zaszczepiano w probówkach zawierających 2 ml środowiska. Zaszczepione ilości — to 0,1 ml z 1/100 rozcieńczonej całonocnej kultury na bulionie. Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C w ciągu 48 godzin.

Wyniki wyrażono jako minimum stężenia inhibitora w µg/ml.

Organizm	Szczep	Środowisko	Minimum stężenia inhibitora w µg/ml
Staph. aureus	1	Bulion odżywczy	0,28
	2	" "	0,07
	3	" "	0,28
	4	" "	0,14
Staph. aureus	5	Bulion odżywczy	0,38
	6	" "	0,38
	7X	" "	1,14
	8X	" "	0,57
	9	" "	0,57
	10	" "	1,14
	11	" "	0,28
	12X	" "	1,14

Organizm	Szczep	Środowisko	Minimum stężenia inhibitora w $\mu\text{g/ml}$
	13	" "	0,57
	14	" "	2,28
	15	" "	0,28
	16X	" "	0,56
	17	" "	0,28
	18X	" "	1,14
	19X	" "	0,57
	20	" "	0,75
	21X	" "	3,0
	22X	" "	3,0
	23	" "	3,0
<i>Micrococcus flavus</i>	1	" "	0,56
<i>Sarcina lutea</i>	—	" "	2,2
<i>Streptococcus</i>		Napar z mózgu i serca	
<i>haemolyticus</i>	2	+ 10% surowicy	0,14
	3	" "	0,28
	4	" "	0,14
<i>Streptococcus</i>	—	" "	0,14
<i>agalactiae</i>	—	" "	0,07
<i>Streptococcus</i>	—	" "	0,07
<i>dysgalactiae</i>	—	" "	0,07
<i>Corynebacterium</i>	—	Bulion odżywczy	0,07
<i>pyogenes</i>	—	+ 10% surowicy	0,07
<i>Corynebacterium</i>	—	" "	0,14
<i>coryzae</i>	—	" "	0,07
<i>Bacillus subtilis</i>	—	Bulion odżywczy	0,07
<i>Bacillus</i>	—	" "	0,56
<i>megatherium</i>	—	" "	0,56
<i>Neisseria</i>	—	Bulion odżywczy	0,28
<i>catarrhalis</i>	1	+ 10% surowicy	0,28
	2	" "	0,28
<i>Haemophilus</i>		"Bordet gengou" agar + 10%	
<i>pertussis</i>	1	krwi owcy	>15
	2	" "	>15
	3	" "	>15
<i>Escherichia coli</i>	1	Bulion odżywczy	61
<i>Aerobacter</i>		" "	>122
<i>aerogenes</i>	2	" "	15
<i>Klebsiella</i>	—	" "	7,5
<i>pneumoniae</i>	—	" "	61
<i>Salmonella typhi</i>	—	" "	122
<i>Samonella</i>	—	" "	>122
<i>typhimurium</i>	—	" "	>122
<i>Samonella</i>	—	" "	1,5
<i>meloagidis</i>	—	" "	
<i>Samonella</i>	—	" "	
<i>heidelberg</i>	—	" "	
<i>Shigella flexneri</i>	—	" "	
<i>Proteus vulgaris</i>	—	" "	
<i>Vibrio cholerae</i>	—	" "	
<i>Saccharomyces</i>		Bulion odżywczy	
<i>cerevisiae</i>	—	+ 2% glukoza Korthof'a + 10% surowicy	>122
<i>Leptospira pomona</i>	—	" "	20
<i>Leptospira ictero-</i>	—	" "	10
<i>haemorrhagiae</i>	—	" "	

Szczepy *Staphylococcus aureus* oznaczone X są odporne na więcej niż 200 $\mu\text{g/ml}$ benzylopenicyliny.

Przykład II. Otrzymywanie układu pierścieniowego cefalosporyny C z cefalosporyny C.

2 g soli sodowej cefalosporyny C rozpuszcza się w 30 ml wody, doprowadza do wartości $\text{pH} = 2,5$ przez dodanie Dowex 50 x 8 (H^+), żywicę odsącza się i przemywa 10 ml wody i do połączonych przesączy i wody z przemycia dodaje się 10,2 ml n HCl. Roztwór przechowuje się w ciągu 3 dni w temperaturze 20°C i następnie wprowadza na kolumnę Dowex 1 (forma octanowa) o wymiarach 2,1 cm średnicy x 7 cm wysokości. Perkolat zbiera się w formie 5 ml frakcji (1 — 12), a kolumnę eluuje się wodą aż do momentu zebrania 34 frakcji. Następnie rozpoczyna się eluowanie 0,5 n kwasem octowym i zbiera dalsze 66 frakcji. Dla każdej frakcji mierzy się ekstynkcję przy 260 m μ .

Frakcje 2 — 16 zbiera się razem i zateża w próbnik do chwili oddzielenia w formie krystalicznej cefalosporyny C₆ (312 mg). Frakcje 36 — 45 zawierają najwięcej układu pierścieniowego cefalosporyny C, który tworzy aktywną fenyloacetylową pochodną. Wymienione frakcje zbiera się razem i suszy w suszarce sublimacyjnej. Otrzymuje się 40 mg. Po fenyloacetylacji substancja ta wykazuje w stosunku do *Staph. aureus* 250 jednostek aktywności na mg produktu początkowego.

Ten nowy związek następnie oczyszczono przez zastosowanie do odpowiednich frakcji z kolumny Dowex 1 (octan) metody elektroforezy. Elektroforezę przeprowadzano w przyrządzie „Beckman/Spinco Model OP” do ciągłej elektroforezy bibulowej. Stosowany bufor otrzymano dodając pirydynę do 0,05 n kwasu octowego do momentu, gdy wartość pH buforu wzrosła do 4,0. Urządzenie zasilano stałym prądem o natężeniu 40 mA i napięciu 880 V. Próbkę w 20 ml buforu doprowadzano na bibułę podczas 24 godzin i zbierano 32 frakcje, numerując od katody (1) do anody (32). Objętość każdej frakcji wynosiła około 12 ml. Na końcu doświadczenia bibułę spryskiwano ninhydryną. Po spryskaniu pojawiało się wyraźne pasmo substancji, charakteryzujące się bardzo małą ruchliwością, spływające z bibuły w 13 — 15 frakcjach, pasmo silnie kwaśnej substancji, wypływające blisko anody i niewyraźne dość pasmo produktu (odpowiadającego kwasowi α -aminoadypinowemu), które poruszało się w kierunku anody i spłynęło z bibuły we frakcji 24.

W celu określenia pozycji nowego związku nakropiono go na bibułę w postaci plam (10 x 10 μl), a następnie bibułę spryskano *M-pirydyną* w 50%-owym acetonie, a po tym 2%-owym chlorem fenyloacetylu w acetonie. Po zetknięciu bibuły z płytkami, na których obecny jest *Staph. aureus* i po dalszej inkubacji, znaleziono wyraźną strefę zahamowania wzrostu mikroorganizmu w pozycji odpowiadającej frakcji 22 i mniejszą strefę zahamowania w pozycji odpowiadającej frakcji 23.

Po wysuszeniu przez wymrożenie frakcji 22 pozostaje reszta, która jednakże jak okazuje się jest zbyt mała, aby można ją dokładnie zważyć. W ultrafiolecie, obserwuje się spłaszczenie wykresu „plateau” przy 260 m μ w widmie absorbcyjnym wodnego roztworu produktu. Całkowitą wagę (43 μ g) produktu oszacowano na podstawie ekstynkcji przy tej długości fali, przy założeniu, że ciężar cząsteczkowy substancji badanej jest taki jak kwasu 7-aminocefalosporanowego, zaś ekstynkcja molowa taka sama jak cefalosporyny C. Produkt fenyloacetylowano w wodnym acetonie, zawierającym bufor fosforanowy o wartości pH 6,5. Aktywność fenyloacetylowej pochodnej w stosunku do *Staph. aureus* odpowiada 1450 jednostkom na mg pierwotnego produktu. Cefalosporyna C wykazuje w stosunku do tego samego organizmu aktywność równą 8 — 10 jednostkom na mg.

Grupa aminowa kwasu 6-aminopenicylanowego (układ pierścieniowy penicyliny) wykazuje stosunkowo słabą zasadowość, punkt izoelektryczny tego związku jest przy wartości pH 4,3 (Batchelor, Doyle, Naylor i Rolinson, 1959). Jest to zrozumiałe, ponieważ grupa aminowa znajduje się w pozycji β do łańcucha ugrupowań CON i CH-S-. Z podobnych względów grupa aminowa kwasu 7-aminocefalosporanowego powinna być słabo zasadowa i związek ten powinien wędrować w kierunku anody, przy wartości pH 7. Właściwości nowego związku otrzymanego z cefalosporyny C (opisane na szpaltach 3 i 4) wskazują, że jest to istotnie kwas 7-aminocefalosporanowy.

Przykład III. Otrzymywanie kwasu 7-fenyloacetamidocefalosporanowego.

Sól sodową cefalosporyny C traktuje się rozcieńczonym kwasem solnym, w temperaturze pokojowej w sposób powyżej opisany. Powstały roztwór, zawierający kwas 7-aminocefalosporanowy i inne produkty uzyskane przy łagodnym kwasowym rozpadzie cefalosporyny C, zobojętnia się i buforuje przy wartości pH = 7,0, używając roztworu kwasnego węglanu sodowego w atmosferze CO₂. Powoli dodaje się chlorku fenyloacetylu w acetonie (1,2 równoważnika w stosunku do ilości użytej cefalosporyny C) do zobojętnionego roztworu, który uprzednio oziębiono do temperatury 0°C i zmieszano z odpowiednią ilością acetonu, aby po dodaniu roztworu chlorku fenyloacetylu końcowe stężenie acetonu wynosiło 50%. Następnie po upływie 1 godziny wartość pH mieszaniny sprowadza się do 5,0 (elektroda szklana), aceton zaś usuwa w próżni. Po obniżeniu wartości pH do 2,0 ekstrahuje się octanem butylowym kwas 7-fenyloacetamidocefalosporanowy razem z N-fenacetylocefalosporyną C₆ i N-fenyloacetylocefalosporyną C. Octan butylowy oddziela się i ponownie ekstrahuje wodą, po doprowadzeniu wartości pH do 5,0 przez dodanie zasady. Wodny ekstrakt suszy się przez wymrożenie. Po przeprowadzeniu chromatografii na bibule w roztworze n-butanol-etanol-woda (4:1:5 objętości) 150 μ g otrzymanego produktu stwierdzono, że zawiera on trzy aktywne wobec *Staph. aureus* składniki (patrz fig. 1). Głównym aktywnym składnikiem był kwas 7-fenyloacetamidocefalosporanowy.

Pozostałymi aktywnymi składnikami tylko częściowo wyekstrahowanymi octanem butylowym były N-fenyloacetylocefalosporyna C₆ i N-fenyloacetylocefalosporyna C.

Kwas 7-fenyloacetamidocefalosporanowy oddziela się od innych aktywnych składników surowej mieszaniny (17 jednostek/mg wobec *Staph. aureus*) stosując metodę chromatografii na kolumnie z rolki bibuły Grycksbo (LKB — Produkter — Sweden) i rozdzielenie w przeciwnym kierunku.

Eluowanie tego związku z kolumny bibulowej przeprowadza się przy użyciu n-butanolu nasyconego wodą. We wstępnym doświadczeniu uzyskano z kolumny sól sodową kwasu 7-fenyloacetamidocefalosporanowego w postaci proszku wykazującego aktywność 167 jednostek/mg. Związek ten nie był jednak czystym produktem.

Wstępne rozdzielanie w przeciwnym kierunku przeprowadzono w dwóch układach rozpuszczalników. Pierwszy układ składał się z równych objętości octanu butylowego i 1% kwasu octowego (rozpuszczalnik I), drugi zaś z n-butanolu i buforu z 0,05 M fosforanu sodowego o wartości pH 6,0 (rozpuszczalnik II). Po ośmiu przeniesieniach w rozpuszczalniku I (10 ml górna warstwa i 20 ml dolna warstwa) stężenie kwasu 7-fenyloacetamidocefalosporanowego osiąga maksimum pomiędzy probówką 6 i 7, podczas gdy inne aktywne składniki znajdowano w probówce 0 i 1. Materiał odzyskany z probówki 5, 6 i 7 wykazuje aktywność około 50 jednostek/mg. Po przeprowadzeniu chromatografii bibulowej tego materiału w układzie n-butanol-etanol-woda (4:5:1 objętościowo) stwierdzono, że jedyną obecną aktywną substancją jest kwas 7-fenyloacetamidocefalosporanowy.

Po 8 przeniesieniach w rozpuszczalniku II (objętość każdej warstwy 20 ml) zawartość fenyloacetamidocefalosporanianu sodu jest największa pomiędzy 3 i 4 probówką, lecz większość pozostałego aktywnego materiału pozostała w probówce 0.

Kwas 7-fenyloacetamidocefalosporanowy wędruje w kierunku anody z prawie taką samą szybkością jak penicylina G, podczas przeprowadzania elektroforezy na bibule w buforze octanu kolidyny o wartości pH 7,0. W wyniku inkubacji z uwodnioną pirydyną w temperaturze 37°C, kwas fenyloacetamidocefalosporanowy przekształca się częściowo w aktywną pochodną typu cefalosporyny C_A (pirydyna). Podczas elektroforezy przy wartości pH 7,0 pochodna ta zachowuje się jak substancja obojętna.

Kwas 7-fenyloacetamidocefalosporanowy (około 10 μ g) nie jest odaktywniony w znacznym stopniu na skutek działania roztworu penicylinazy, zawierającego 10 krotnie większą ilość enzymu niż ta, którą należy użyć, aby całkowicie dezaktywować w podobnych warunkach 50 μ g penicyliny G.

Przykład IV. Otrzymywanie układu pierścieniowego cefalosporyny C_A (pirydyna) z cefalosporyny C_A (pirydyna).

Cefalosporynę C_A (pirydyna) przechowuje się w 0,1 n lub n HCl w temperaturze pokojowej

w ciągu 3 lub więcej dni. Po przeprowadzeniu analizy produktów reakcji za pomocą elektroforezy na bibule w buforze z octanu pirydyny o wartości pH 4,0 i następnym przyłożeniu bibuły do płytek agarowych, na których zaszczerpiony jest *Staph. aureus*, pojawia się pojedyncza aktywna strefa, dzięki obecności niezmienionej cefalosporyny C_A (pirydyna). Cefalosporyna C_A (pirydyna) zachowuje się tak, jak gdyby nie posiadała ładunku przy wartości pH 4,0. Jednakże, gdy podwójne pasma bibuły spryska się roztworem M-pirydyny w 50%-owym uwodnionym acetonie i 0,125% chlorkiem fenyloacetylu w suchym acetonie, to pojawi się na zaszczerpionych *Staph. aureus* szlakach dodatkowa aktywna strefa, dzięki obecności produktu fenyloacetylacji układu pierścieniowego cefalosporyny C_A (pirydyna). Przy wartości pH 4,0 układ pierścieniowy cefalosporyny C_A zachowuje się jak zasada. Układ pierścieniowy cefalosporyny C_A przesuwają się w kierunku katody o nieco większą odległość niż cefalosporyna C w kierunku anody (w tym samym doświadczeniu). Układ pierścieniowy cefalosporyny C_A , podczas elektroforezy przy wartości pH 7 pozostaje w pozycji neutralnej. To zachowanie jest zgodne z oczekiwanymi właściwościami układu pierścieniowego cefalosporyny C_A (pirydyna). Związek o podobnych właściwościach tworzy się przy inkubacji układu pierścieniowego cefalosporyny C z 2 M-octanem pirydyny przy wartości pH 7 w ciągu 16 godzin i po fenyloacetylacji daje aktywną fenyloacetylową pochodną. Po przebadaniu właściwości układu pierścieniowego cefalosporyny C_A otrzymanego według powyższej metody stwierdzono, że zgadzają się one z właściwościami opisanymi powyżej.

Przykład V. Otrzymywanie układu pierścieniowego cefalosporyny C_0 z cefalosporyny C_0 .

Cefalosporynę C (50 mg) pozostawia się w 1 n lub 0,5 n HCl (1,33 ml) w temperaturze 20°C na okres 2 — 3 dni. W tych warunkach kwas 7-aminocefalosporanowy pojawiający się po 24 godzinach w roztworze n HCl zanika po trzech dniach. Po czterech dniach aktywna strefa ujawniająca się w wyniku fenyloacetylacji układu pierścieniowego cefalosporyny C jest jeszcze blisko wartości maksymalnej, przy czym pozostają tylko ślady cefalosporyny C_0 . Okazuje się, że układ pierścieniowy cefalosporyny C_0 jest stosunkowo kwasoodpornym końcowym produktem serii aktywnych lub potencjalnie aktywnych pochodnych, utworzonych w wyniku traktowania cefalosporyny C kwasem w łagodnych warunkach.

Układ pierścieniowy cefalosporyny C_0 tworzy się także gdy cefalosporynę C pozostawia się w obecności równej wagowo ilości zwilżonego wymieniaacza jonowego żywicy Dowex 50 x 8 ($-H^+$), w temperaturze 20°C, w ciągu 15 — 48 godzin. Podwójne pasma z jonogramów rozwiniętych w buforze z octanu pirydyny o wartości pH 4,5, które bądź spryskano chlorkiem fenyloacetylu, i następnie przeprowadzono test biologiczny lub spryskano ninhydryną, wykazały, że położenie układu pierścieniowego cefalosporyny C_0 odpowiada żółtej strefie na pasmach spryskanych ninhydryną.

Aktywność układu pierścieniowego cefalosporyny C_0 utworzonego w wyniku działania n HCl na 400 μ g cefalosporyny C_0 nie jest wyraźnie naruszana działaniem penicyliny w warunkach, w których całkowicie rozkłada się 50 μ g penicyliny G.

Przykład VI.

a) Acylowanie kwasu 7-aminocefalosporanowego na bibule.

Próbki (każda 200 μ g) surowego produktu układu pierścieniowego cefalosporyny C poddaje się elektroforezie na bibule w buforze z octanu pirydyny o wartości pH 4,5, przy napięciu 14 volt/cm, w ciągu 2 godzin.

Pasma bibuły, wzdłuż których wędrowała każda próbka wycina się i spryskuje najpierw M-pirydyną w 50%-owym (objętość/objętość) acetonie, następnie zaś roztworem określonego chlorku kwasowego (0,1 ml) w acetonie (8 ml). Pasma bibuły umieszcza się na szalkach zaszczerpionych *Staph. aureus* i przeprowadza bioautograf w sposób opisany w przykładzie I. W każdym przypadku, strefy zahamowania pojawiają się w tej samej odległości od punktu początkowego (1,6 cm w kierunku anody), przy czym ich położenia zgadzają się z położeniami uzyskanymi przy wędrówce układu pierścieniowego cefalosporyny C. W ten sposób otrzymuje się pochodne fenyloacetylowe, fenoksyacetylowe, n-propionylowe, acetylowe i izobutyrylowe układu pierścieniowego cefalosporyny C. Strefy zajmowane przez fenyloacetylowe i fenoksyacetylowe pochodne układu pierścieniowego posiadają średnicę około 3,5 cm, natomiast strefa zajmowana przez pochodną propionylową ma średnicę około 2 cm. Strefy zajmowane przez pochodne acetylowe i izobutyrylowe są określone, chociaż są bardzo małe.

b) Acylowanie kwasu 7-aminocefalosporanowego w roztworze.

Próbkę (4 mg) surowego układu pierścieniowego cefalosporyny C rozpuszcza się w 50 μ l roztworu sporządzonego przez dodanie 1 ml pirydyny do 5 ml wody. Do próbek (10 μ l) roztworu układu pierścieniowego dodaje się 10 μ l roztworu określonego chlorku kwasowego w acetonie. (Roztwory chlorku kwasowego sporządza się dodając do 10 ml acetonu odpowiednio 0,68 ml chlorku fenoksyacetylowego, 0,62 ml chlorku fenyloacetylowego, 0,56 ml chlorku benzoilowego i 0,37 ml chlorku n-propionylowego). Mieszaniny umieszcza się na 15 minut w temperaturze pokojowej, w razie potrzeby rozcieńcza i 5 μ l próbki nakrapla na bibułę w celu przeprowadzenia elektroforezy lub chromatografii.

Chromatogramy bibułowe rozwijają się w temperaturze pokojowej w octanie etylu, nasyconym buforem o wodnego octanu sodu (0,1 M w stosunku do sodu) o wartości pH 5,4. Bibułę uprzednio przygotowuje się zanurzając w buforze i susząc w strumieniu powietrza w temperaturze pokojowej (bibułę używa się natychmiast po wyschnięciu). W tym układzie czoło rozpuszczalnika osiąga ko-

niec bityły już po upływie około 3 godzin, jednakże chromatogram rozwija się jeszcze przez dalsze 18 godzin.

Aktywność pochodnych acylowych mierzy się przy użyciu *Staphylococcus aureus*. Stwierdzono, że aktywność pochodnej fenoksyacetylowej jest zbliżona do aktywności pochodnej fenyloacetylowej, przy czym aktywność pochodnej n-propionylowej jest znacznie mniejsza, zaś pochodne benzoylowa, izobutyrylowa i acetylowa wykazują określoną, lecz słabą aktywność.

Stwierdzono, że wszystkie te pochodne przesuwają się podczas elektroforezy na bibule przy wartości pH 4,5 o podobną odległość w kierunku anody, a położenie ich ujawnia się po wykonaniu bioautografii. Odległość o jaką te związki przesunęły się w kierunku anody, zbliżona jest do odległości uzyskanej przy wędrówce cefalosporyny C i benzylopenicyliny.

Pochodne fenyloacetylową, fenoksyacetylową i n-propionylową układu pierścieniowego cefalosporyny C można rozróżnić po przeprowadzeniu chromatografii bibulowej w układzie buforowym octan etylowy i octan sodowy, jak opisali Hale, Miller i Kelly (Nature 1953, 172, 545). Tabela 1 przedstawia wartości R_F różnych pochodnych spokrewnionych z benzylopenicyliną (fenyloacetylowa pochodna kwasu 6-aminopenicylanowego). Względne wartości R_F oznaczono symbolem R fenyloacetylo-6-APA.

Tabela 1

Pochodna	R fenyloacetylo-6-APA
n-propionilo-7 ACA	0,18
fenyloacetylo-7 ACA	0,46
fenoksyacetylo-7 ACA	0,51
n-propionilo-6 APA	
(etyloopenicylina)	0,43
fenyloacetylo-6-APA	
(benzyloopenicylina)	1,00
fenoksyacetylo-6 APA	
(fenoksymetyloopenicylina)	1,07
α -fenoksypropionilo-6-APA	
(α -fenoksyetyloopenicylina)	1,20

N-acylowe pochodne kwasu 7-aminocefalosporanowego reagując z uwodnioną pirydyną w zakresie wartości pH 7 tworzą aktywne związki typu C_A o wzorze 3. W czasie elektroforezy na bibule przy wartościach pH 4,5 lub 7,0 związki te (C_A) zachowują się tak, jak gdyby nie posiadały ładunku, podczas gdy same N-acylowe pochodne wędrują w kierunku anody.

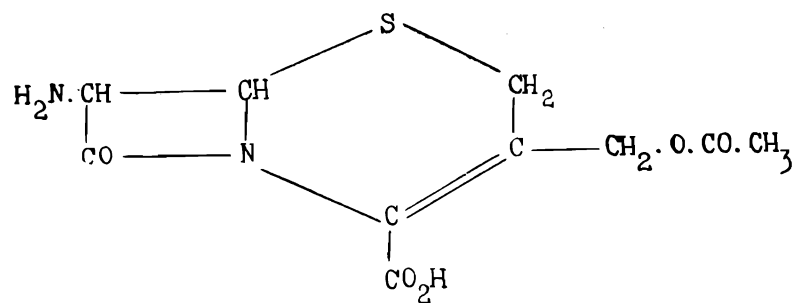
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania pochodnej cefalosporyny C, znamienny tym, że cefalosporynę C, cefalosporynę C_0 i cefalosporynę C_A lub pochodną każdego z tych związków, w których łańcuch boczny chroniony jest przez ugrupowania nie oddzielające się od niego podczas hydrolizy, poddaje się hydrolizie aż do usunięcia bocznego łańcucha, zaś daną pochodną wyosabia się z mieszaniny reakcyjnej.

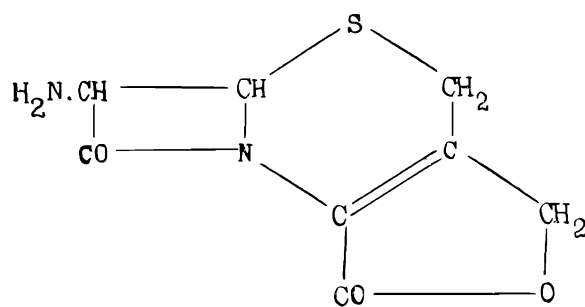
2. Sposób według zastrz. 1, w przypadku wytwarzania układu pierścieniowego cefalosporyny C o wzorze 1, znamienny tym, że poddaje się hydrolizie 2,4-dwunitrofenylową pochodną cefalosporyny C.
3. Sposób według zastrz. 2, znamienny tym, że hydrolizę prowadzi się przez traktowanie kwasem.
4. Sposób według zastrz. 3, znamienny tym, że stosuje się rozcieńczony kwas mineralny.
5. Sposób według zastrz. 4, znamienny tym, że stosuje się rozcieńczony kwas solny.
6. Sposób według zastrz. 5, znamienny tym, że stosuje się rozcieńczony kwas solny o stężeniu 0,1 n — 0,3 n.
7. Sposób według zastrz. 2 — 6, znamienny tym, że reakcję prowadzi się w obecności rozpuszczalnika mieszającego się z wodą.
8. Sposób według zastrz. 7, znamienny tym, że jako rozpuszczalnik mieszający się z wodą stosuje się acetonitryl.
9. Sposób według zastrz. 2 — 8, znamienny tym, że reakcję prowadzi się w obojętnej atmosferze.
10. Sposób według zastrz. 9, znamienny tym, że jako obojętną atmosferę stosuje się azot.
11. Sposób według zastrz. 1 — 10, w przypadku wytwarzania soli pochodnej układu pierścieniowego cefalosporyny C, znamienny tym, że układ pierścieniowy cefalosporyny C traktuje się solą sodową, potasową lub amoniową albo mocnym kwasem.
12. Sposób według zastrz. 11, w przypadku wytwarzania pochodnej układu pierścieniowego cefalosporyny C w postaci soli kwasu mineralnego, znamienny tym, że układ pierścieniowy cefalosporyny C traktuje się kwasem mineralnym.
13. Sposób według zastrz. 11, w przypadku wytwarzania chlorowodoru pochodnej układu pierścieniowego cefalosporyny C, znamienny tym, że układ pierścieniowy cefalosporyny C traktuje się kwasem solnym.
14. Sposób według zastrz. 1, w przypadku wytwarzania układu pierścieniowego cefalosporyny C_0 o wzorze 2, znamienny tym, że poddaje się hydrolizie cefalosporynę C_0 .
15. Sposób według zastrz. 14, w przypadku wytwarzania pochodnej cefalosporyny C_0 w postaci soli mocnego kwasu znamienny tym, że układ pierścieniowy cefalosporyny C_0 traktuje się mocnym kwasem.
16. Sposób według zastrz. 15, znamienny tym, że jako mocny kwas stosuje się kwas solny.
17. Sposób według zastrz. 1, w przypadku wytwarzania układów pierścieniowych cefalosporyny C_A , o wzorze 3, w którym R^+ oznacza słabą trzeciorzędową zasadę, cefalosporynę C lub cefalosporynę C_A poddaje się hydrolizie.
18. Sposób według zastrz. 17, w przypadku wytwarzania układu pierścieniowego cefalosporyny C_A (pirydyna), znamienny tym, że stosuje się związek o wzorze 3, w którym R^+ oznacza pirydynę.
19. Sposób według zastrz. 17 i 18 w przypadku wytwarzania soli mocnego kwasu układu pier-

- ścieniowego cefalosporyny C_A , znamieny tym, że układ pierścieniowy cefalosporyny C_A traktuje się mocnym kwasem.
20. Sposób według zastrz. 19, znamieny tym, że jako mocny kwas stosuje się kwas mineralny. 5
21. Sposób według zastrz. 20 w przypadku wytwarzania chlorowodoru układu pierścieniowego cefalosporyny C_A , znamieny tym, że układ pierścieniowy cefalosporyny C_A traktuje się kwasem solnym. 10
22. Sposób według zastrz. 1, w przypadku wytwarzania układu pierścieniowego cefalosporyny C, cefalosporyny C_c lub cefalosporyny C_A , znamieny tym, że cefalosporynę C, C_c lub C_A poddaje się hydrolizie za pomocą kwasu. 15
23. Sposób według zastrz. 22, znamieny tym, że stosuje się rozcieńczony kwas mineralny.
24. Sposób według zastrz. 22, znamieny tym, że stosuje się rozcieńczony kwas solny.
25. Sposób według zastrz. 1 i 22, znamieny tym, że hydrolizę prowadzi się kwasem solnym o wartości pH od 0 do 2,5 w temperaturze w zakresie od -10°C do $+50^\circ\text{C}$ w ciągu czasu od 12 godzin do 30 dni. 20
26. Sposób według zastrz. 25, znamieny tym, że stosuje się kwas solny o stężeniu 0,1 n w temperaturze około 20°C w ciągu około 3 dni.
27. Sposób według zastrz. 22, znamieny tym, że cefalosporynę C traktuje się kwasem solnym o mocy od 0,5 n do 1 n, w okresie 2 — 4 dni. 30
28. Sposób według zastrz. 1, w przypadku wytwarzania acetylowanych pochodnych układów pierścieniowych cefalosporyny C, cefalosporyny C_c i cefalosporyny C_A , o wzorze ogólnym 4, w którym X oznacza układ pierścieniowy cefalosporyny C, cefalosporyny C_c lub cefalospo-

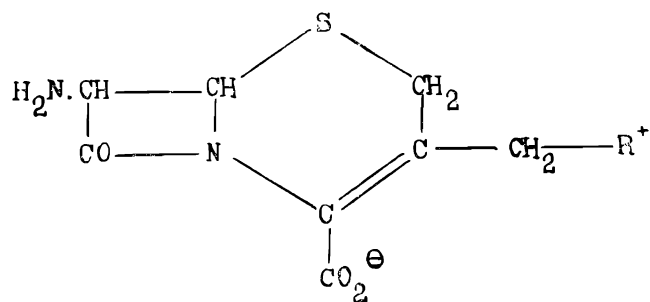
- ryny C_A , połączony przez swoją pozycję 7 z grupą $R_1R_2CH\cdot CO$, a R_1 , R_2 oznaczają wodór, grupę alkilową, grupę fenyłową, podstawioną grupę fenyłową lub grupę o budowie R_3-O- , w której R_3 oznacza grupę alkilową, grupę fenyłową lub podstawioną grupę fenyłową, które to układy są takie same lub różne, znamieny tym, że układ pierścieniowy cefalosporyny C, cefalosporyny C_c lub cefalosporyny C_A traktuje się związkiem chlorku acetylu o wzorze 5, w którym R_1 i R_2 oznaczają grupy, których znaczenie podano powyżej.
29. Sposób według zastrz. 28, w przypadku wytwarzania fenyloacetylowej pochodnej układu pierścieniowego cefalosporyny C, o wzorze 6, znamieny tym, że układ pierścieniowy cefalosporyny C traktuje się chlorkiem fenyloacetylu.
30. Sposób według zastrz. 28, w przypadku wytwarzania fenyloacetylowej pochodnej układu pierścieniowego cefalosporyny C_c , o wzorze 7, znamieny tym, że układ pierścieniowy cefalosporyny C traktuje się chlorkiem fenyloacetylu.
31. Sposób według zastrz. 28, w przypadku wytwarzania fenyloacetylowych pochodnych układu pierścieniowego cefalosporyny C_A , o wzorze 8, w którym R^+ oznacza słabą trzeciorzędową zasadę, układ pierścieniowy cefalosporyny C_A traktuje się chlorkiem fenyloacetylu.
32. Sposób według zastrz. 29, w przypadku wytwarzania fenyloacetylowej pochodnej układu pierścieniowego cefalosporyny C_A (pirydyna), o wzorze 9, znamieny tym, że układ pierścieniowy cefalosporyny C_A (pirydyna) traktuje się chlorkiem fenyloacetylu.



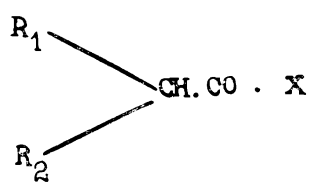
WZOR 1



WZOR 2



WZOR 3



WZOR 4

FIG.1.

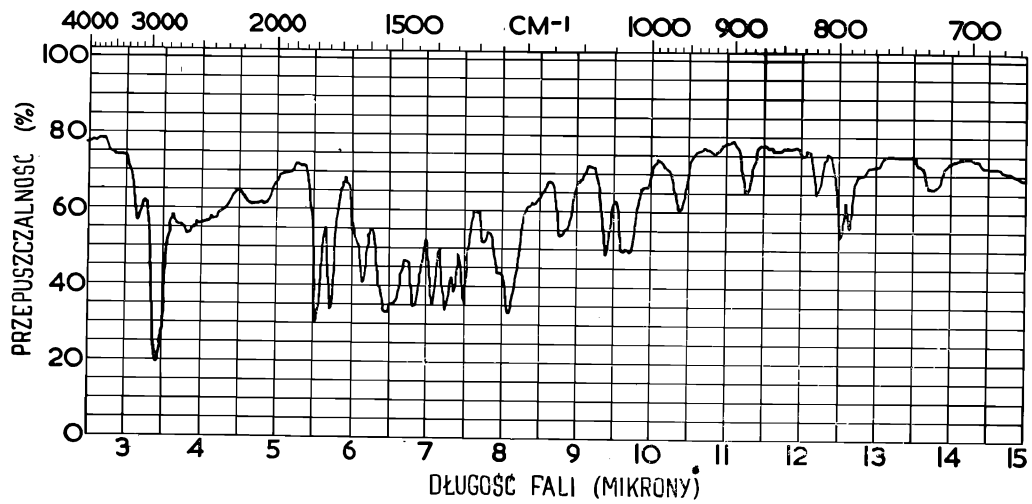
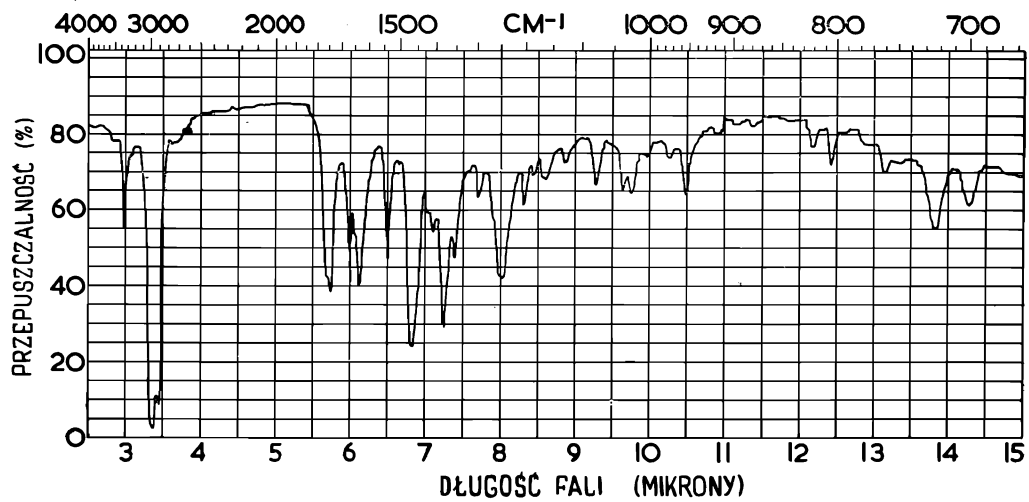
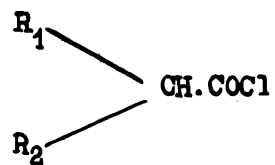


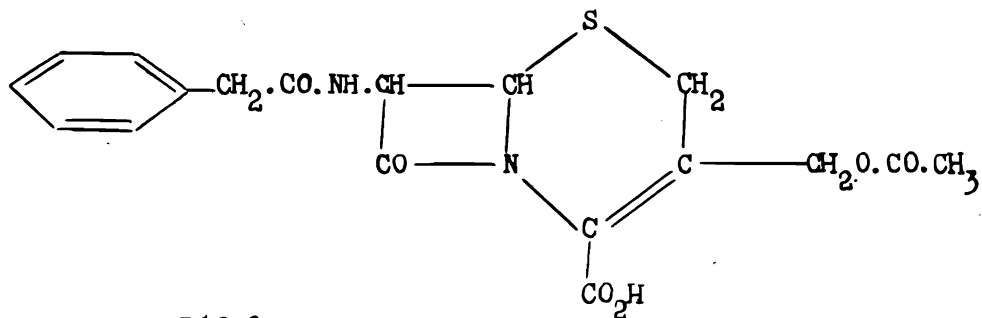
FIG. 2.



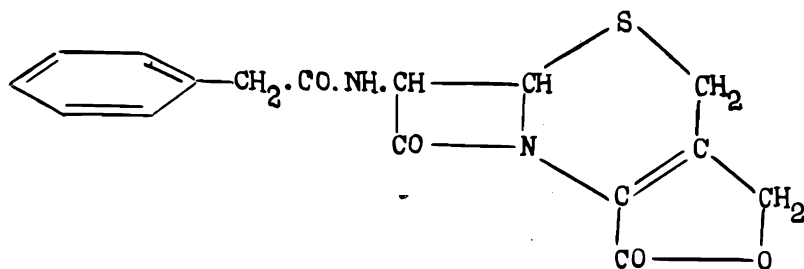
48 408



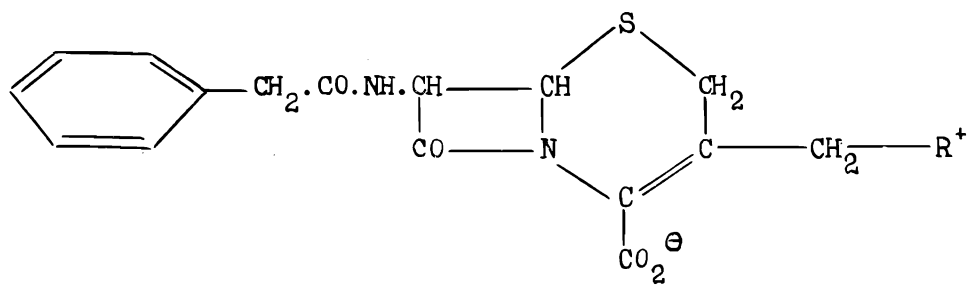
WZÓR 5



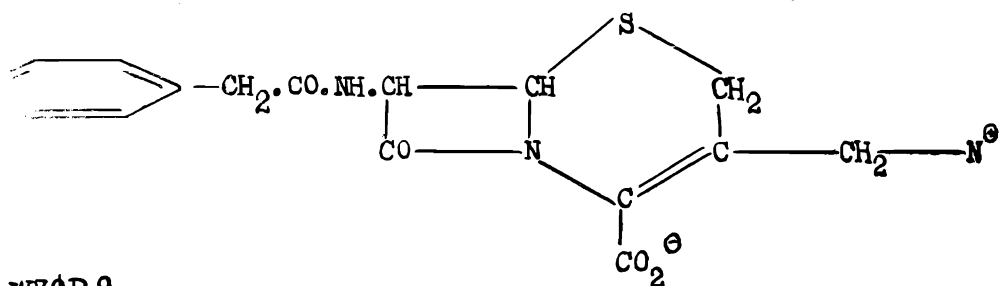
WZÓR 6



WZÓR 7



WZÓR 8



WZÓR 9