

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR  
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

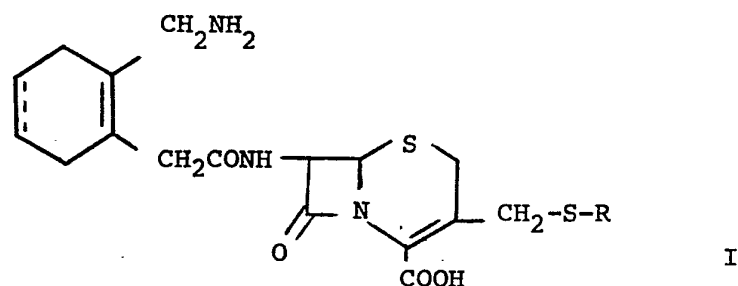


(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 143941 B

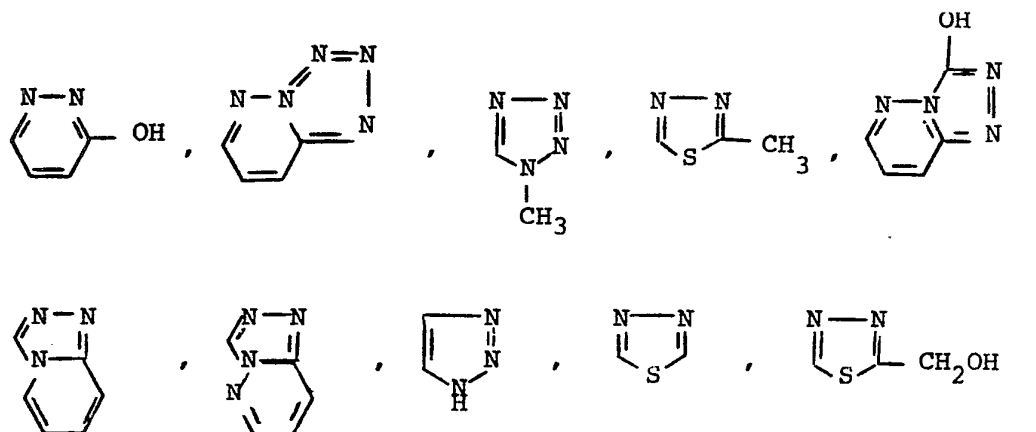
- (21) Ansøgning nr. 4665/74 (51) Int.Cl.<sup>3</sup> C 07 D 501/36  
(22) Indleveringsdag 3. sep. 1974 C 07 D 519/00  
(24) Løbedag 3. sep. 1974  
(41) Alm. tilgængelig 5. mar. 1975  
(44) Fremlagt 2. nov. 1981  
(86) International ansøgning nr. -  
(86) International indleveringsdag -  
(85) Videreførelsesdag -  
(62) Stamansøgning nr. -  
(30) Prioritet 4. sep. 1973, 394367, US 31. okt. 1973, 411559, US
- (71) Ansøger BRISTOL-MYERS COMPANY, New York, US.
- (72) Opfinder Takayuki Naito, JP: Jun Okumura, JP: Hideaki Hoshi,  
JP: Hajime Kamachi, JP.
- (74) Fuldmægtig Th. Osterfeld Patentbureau A/S.
- 
- (54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af cephalosporansyrederivater.

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte cephalosporansyrederivater med den almene formel:

143941 B

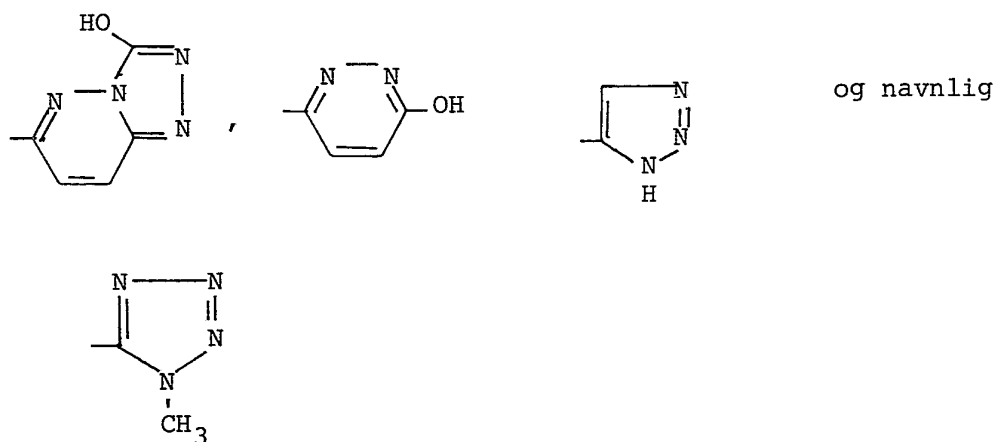


hvori den stiplede binding er fakultativ, og R betegner



eller let spaltelige estere, ikke-toxiske, farmaceutisk acceptable salte og Schiff-baser deraf, såsom med salicylaldehyd.

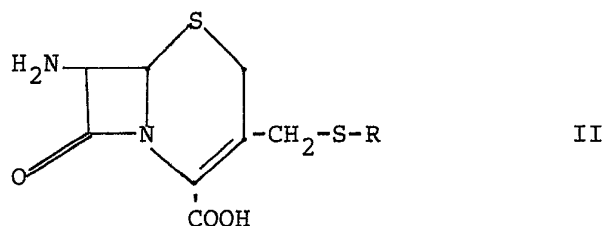
Foretrukne forbindelser er sådanne, hvori R betegner



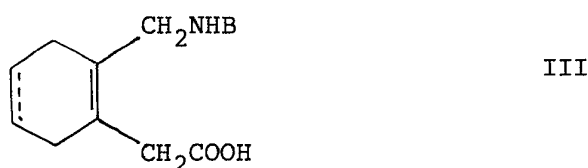
De nævnte salte omfatter carboxylsure salte, herunder ikke-toxiske, metalliske salte, såsom natrium-, kalium-, calcium- og aluminiumsalte, ammoniumsaltet og substituerede ammoniumsalte, f.eks. salte med ikke-toxiske aminer, såsom trialkylaminer, herunder triethylamin, procain, dibenzylamin, N-benzyl-beta-phenethylamin, l-ephedamin, N,N'-dibenzylethylendiamin, dehydroabietylamin, N,N'-bis-dehydroabietylethylendiamin, N-(lavere)-alkylpiperidin, f.eks. N-ethylpiperidin og andre aminer, der har været anvendt til at danne salte med benzylpenicillin, samt i alle tilfælde, de ikke-toxiske syreadditionssalte deraf (d.v.s. aminosaltene), herunder mineralsyreadditionssalte, såsom hydrochlorid-, hydrobromid-, hydroiodid-, sulfat-, sulfamat- og phosphatsalte, samt de organiske syreadditionssalte, såsom maleatet, acetatet, citratet, oxalatet, succinatet, benzoatet, tartratet, fumaratet, malatet, mandelatet, ascorbatet og lignende.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er karakteriseret ved, at man

a) omsætter en forbindelse med den almene formel:

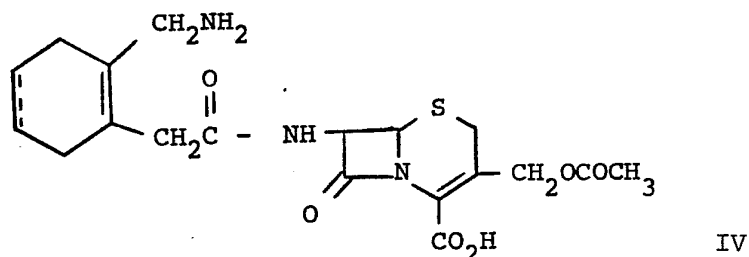


hvor i R har den ovenfor anførte betydning, eller en let spaltelig ester eller et salt deraf med et acylerende derivat af en syre med formelen:



hvor i den stiplede binding er fakultativ, og B betegner en aminobeskyttende gruppe, og fjerner den aminobeskyttende gruppe, og at man om ønsket, enten før eller efter fjernelse af B (i) på i og for sig kendt måde omdanner produktet i form af den frie syre eller et salt deraf til den tilsvarende Schiff-base, en let spaltelig ester eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf eller (ii) på i og for sig kendt måde omdanner produktet i form af en let spaltelig ester eller et salt deraf til den tilsvarende frie syre eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf, eller

b) omsætter en forbindelse med formelen:



hvori den stiplede binding er fakultativ,  
 eller en let spaltelig ester eller et salt deraf, med en thiol med  
 formlen



V

hvori R har den ovenfor anførte betydning eller et salt deraf, og  
 at man, om ønsket (i) på i og for sig kendt måde omdanner produktet  
 i form af den frie syre eller et salt deraf til den tilsvarende  
 Schiff-base, en let spaltelig ester eller et farmaceutisk accepta-  
 belt salt deraf eller (ii) på i og for sig kendt måde omdanner  
 produktet i form af en let spaltelig ester eller et salt deraf til  
 den tilsvarende frie syre eller et farmaceutisk acceptabelt salt  
 deraf.

Den som mellemprodukt anvendte 3-thiolerede 7-aminocephalosporan-  
 syre med formlen II kan fremstilles ved erstatning af 3-acetoxygruppen  
 i 7-aminocephalosporansyre eller et salt deraf med den tilsvarende hetero-  
 cycliske thiol eller et salt deraf. Erstatningen af en estergruppe med  
 en thiolgruppe er en kendt reaktion, og den udføres fortrinsvis i van-  
 dig opløsning med opvarmning.

De omhandlede forbindelser kan derefter opnås ved acylering på i  
 og for sig kendt måde af 7-aminogruppen i mellemproduktet II med acyle-  
 ringsmidlet med formlen III.

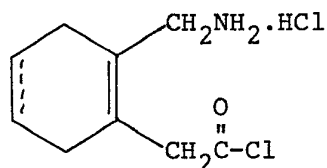
Mellemproduktet II kan, om ønsket, omdannes inden acyleringsreak-  
 tionen til en let spaltelig ester eller et syreadditionssalt deraf.  
 Fremgangsmåder til fremstilling af sådanne estere er omhandlet i litte-  
 raturen, og er velkendte for penicillin- og cephalosporinkemikere. En  
 foretrukket fremgangsmåde, som er særlig anvendelig til fremstilling  
 af de mest foretrukne, let hydrolyserbare estere, d.v.s. pivaloyloxy-

methyl-, acetoxymethyl-, methoxymethyl-, acetyl- og phenacylestrene, er omhandlet i U.S.A. patentskrift nr. 3.284.451.

Dette patentskrift beskriver esterificeringen af natriumcephalothin med den passende aktive chlor- eller bromforbindelse (f.eks. phenacylbromid, chloracetone, chlormethylether, pivaloyloxymethylchlorid, acetoxymethylchlorid) efterfulgt af enzymatisk fjernelse af thienyl- eddikesyresidekæden. En anden god fremgangsmåde indebærer, at triethylaminsaltet af 7-aminocephalosporansyre omsættes direkte med den aktive halogenforbindelse, som i britisk patentskrift nr. 1.229.453. En mere foretrukken fremgangsmåde består i omdannelse af forbindelsen med formlen II til en silylester, såsom ved metoder, der er beskrevet i litteraturen, f.eks. U.S.A. patentskrift nr. 3.249.622. Silylestergruppen kan fjernes efter acyleringsreaktionen ved hydrolyse eller alkoholyse.

Inden acyleringsreaktionen beskyttes aminogruppen i acyleringsmidlet III ved hjælp af en konventionel amino-blokerende gruppe B af den art, der anvendes i enten peptidsynteser eller i en hvilken som helst af de talrige synteser af  $\alpha$ -amino-benzylpenicillin ud fra 2-phenylglycin, der let kan fjernes ved reaktionens afslutning. Eksempler på egnede amino-beskyttende eller -blokerende grupper er t-butoxycarbonyl, carbobenzoyloxy, 2-hydroxy-1-naphthcarbonyl, trichlorethoxycarbonyl, 2-ethoxycarbonyl-1-methylvinyl og 2-methoxycarbonyl-1-methylvinyl.

En særlig værdifuld blokerende gruppe er en proton, som i forbindelsen med formlen

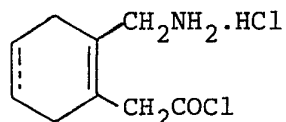


De foretrukne amino-beskyttende grupper er t-butoxycarbonyl, protonen og en  $\beta$ -diketon eller en  $\beta$ -ketoester, som i britisk patentskrift 1.123.333 eller U.S.A. patentskrifter 3.325.479 og 3.316.247, f.eks. methylacetoacetat, eller et  $\beta$ -ketoamid som i japansk patentskrift 71/24714. Når t-butoxycarbonyl-,  $\beta$ -ketoester-,  $\beta$ -diketon- eller  $\beta$ -ketoamid-beskyttende grupper anvendes, foretrækkes det at omdanne den acylerende syre, som indeholder den blokerede aminogruppe, til et blandet anhydrid, f.eks. med ethyl- eller isobutylchlorformiat, inden reaktionen med forbindelse II eller en ester eller et salt deraf. Efter

den koblende acyleringsreaktion kan den aminobeskyttende gruppe B fjernes på i og for sig kendt måde til dannelselse af det ønskede produkt med formlen I. Således kan f.eks. t-butoxycarbonylgruppen fjernes ved anvendelse af myresyre, carbobenzyloxygruppen ved katalytisk hydrogenering, 2-hydroxy-1-naphthcarbonylgruppen ved sur hydrolyse, trichloroethoxycarbonylgruppen ved behandling med zinkstøv i iseddikesyre, protonen ved neutralisering, etc.. Selvsagt kan andre funktionelt ækvivalente blokerende grupper for en aminogruppe anvendes.

Acylering af en 7-aminogruppe i en cephalosporin er en velkendt reaktion, og en hvilken som helst af de funktionelle ækvivalenter af forbindelser med formlen III, der sædvanligt anvendes som acyleringsmidler for primære aminogruyper, kan anvendes. Eksempler på egnede acylerende derivater af den frie syre er de tilsvarende syreanhydrider, blandede anhydrider, f.eks. alkoxyomyresyreanhydrider, syrehalogenider, syreazider, aktive estere og aktive thioestere. Den frie syre kan kobles med forbindelsen II efter at man først har omsat den frie syre med N,N'-dimethylchlorformiminiumchlorid eller ved anvendelse af enzymer eller af en N,N'-carbonyldiimidazol eller en N,N'-carbonylditriazol eller et carbodiimid-reagens, f.eks. N,N'-diisopropylcarbodiimid. N,N'-dicyclohexylcarbodiimid eller N-cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid [jfr. Sheehan og Hess, J. Amer. Chem. Soc., 77, 1967 (1955)] eller et alkyllaminreagens [jfr. R. Buijle og H.G. Viehe, Angew. Chem. International Edition 3, 582, (1964)] eller af et isoxasoliumsalt-reagens [jfr. R.B. Woodward, R.A. Olofson og H. Mayer, J. Amer. Chem. Soc. 83, 1010 (1961)] eller af et ketenimin-reagens [jfr. C.L. Stevens og M.F. Munk, J. Amer. Chem. Soc. 80, 4065 (1958)] eller af hexachlorocyclotriphosphatriazin eller hexabromocyclotriphosphatriazin (U.S.A. patentskrift nr. 3.651.050) eller af diphenylphosphorylazid [DPPA; J. Amer. Chem. Soc., 94 6203-6205 (1972)]. En anden ækvivalent af den frie syre er et tilsvarende azolid, d.v.s. et amid af den tilsvarende syre, hvis amidnitrogenatom indgår i en kvasiaromatisk, fem-leddet ring indeholdende mindst 2 nitrogenatomer, d.v.s. imidazol, pyrazol, triazolonerne, benzimidazol, benzotriazol og deres substituerede derivater. Som eksempel på den almene fremgangsmåde til fremstilling af et azolid omsættes N,N'-carbonyldiimidazol med en carboxylsyre i ækvimolære mængder ved stuetemperatur i tetrahydrofuran, chloroform, dimethylformamid eller et lignende inert opløsningsmiddel til dannelselse af carboxylsyreimidazolidet i praktisk taget kvantitativt udbytte under frigørelse af carbondioxid og et mol imidazol. Dicarboxylsyrer giver dimidazolid.

Biproduktet, imidazol, udfælder og kan fraskilles, og imidazolidet isoleres, men dette er ikke væsentligt. Et særligt foretrukket acyleringsmiddel er syrechlorid, hydrochloridet med formlen:



der også tjener en dobbeltfunktion med hensyn til carboxylaktivering og aminobeskyttelse. Ovenfor omtaltes anvendelsen af enzymer til kobling af den frie syre med dens blokerede aminogruppe med forbindelsen II. Indenfor rammerne af sådanne processer falder anvendelsen af en ester, f.eks. methylesteren, af denne frie syre med enzymer frembragt ved hjælp af forskellige mikroorganismer, f.eks. de af T. Takahashi et al. i J. Amer. Chem. Soc., 94(11), 4035-4037 (1972) og af T. Nara et al., i J. Antibiotics (Japan), 24(5), 321-323 (1971) og i vesttysk patentskrift 2.216.113 beskrevne.

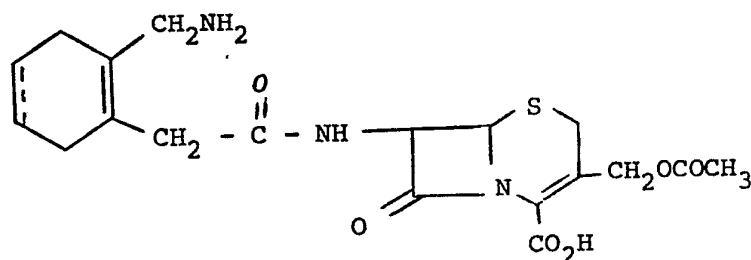
De særlige procesbetingelser, f.eks. temperatur, opløsningsmiddel, reaktionstid, etc., som vælges til koblingsreaktionen, bestemmes af den anvendte acyleringsmetodes natur og er velkendte for fagfolk. I almindelighed er det nyttigt at tilsætte en organisk tertiær amin, f.eks. triethylamin, N,N-dimethylanilin, ethylpiperidin, 2,6-lutidin eller quinolin, der tjener som en protonacceptor eller et saltdannende middel.

De omhandlede forbindelser kan isoleres på en hvilken som helst måde af de, der sædvanligvis anvendes til isolering af lignende cephalosporiner. Således kan produktet opnås som det neutrale molekyle, selv om dette formentlig bedre betegnes som zwitterionen, eller det kan isoleres som et salt. Dannelse af det ønskede farmaceutisk acceptable carboxylsyre- eller syreadditionssalt foretages på kendt måde, f.eks. ved omsætning af syren med en passende base eller syre.

Ved acyleringsreaktionens afslutning kan det opnåede produkt omdannes (før eller efter fjernelse af den amino-beskyttende gruppe) på i og for sig kendt måde til et andet ønsket produkt med formlen I. Således kan forbindelsen med formlen I i form af den frie syre eller et salt deraf omdannes på kendt måde til den tilsvarende Schiff-base, en let spaltelig ester eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf. Tilsvarende kan produktet med formlen I i form af en let spaltelig ester eller et salt deraf omdannes til den frie syre eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf ved fjernelse af den esterificerende gruppe.

pe, f.eks. ved vandig eller enzymatisk hydrolyse (såsom med human eller animalsk serum) eller sur eller alkalisk hydrolyse eller ved katalytisk hydrogenering eller ved behandling med natriumthiophenoxid som omhandlet i U.S.A. patentskrift 3.284.451.

Udgangsmaterialet til fremgangsmåde b) opnås ved at acylere 7-aminocephalosporansyre eller et salt deraf med syren med formlen III eller et acylerende derivat deraf til dannelse af en 7-acyleret cephalosporin med formlen:



IV

Forbindelsen IV i form af den frie syre eller en let spaltelig ester eller et salt deraf omsættes dernæst i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge opfindelsen med en heterocyklisk thiol med formlen V eller et salt deraf, særligt foretrukket, natrium- eller kaliumsaltet. Den reaktion, ved hvilken man erstatter en sådan acetoxygruppe med en sådan thiolgruppe, er en velkendt reaktion, og den kan udføres i opløsning samt i vand eller vandig acetone ved en temperatur på mindst stuetemperatur og fortrinsvis indenfor intervallet fra ca. 50 til ca. 100°C i nærværelse af en mild base, såsom natriumbicarbonat, f.eks. fortrinsvis nær neutralitet, såsom ved en pH-værdi på ca. 6. Et overskud af thiolen anvendes fortrinsvis. Reaktionsproduktet isoleres ved forsigtigt at gøre reaktionsblandingen sur og derefter ekstrahere med et med vand ublandbart organisk opløsningsmiddel. Produktet fra erstatningsreaktionen kan om ønsket omdannes til et farmaceutisk acceptabelt salt ved behandling med en passende syre eller base. Som ved den ovenfor beskrevne alternative fremgangsmåde til fremstilling af forbindelser med formlen I kan produktet i form af den frie syre eller et salt deraf omdannes til den tilsvarende Schiff-base, let spaltelig ester eller farmaceutisk acceptabelt salt deraf eller alternativt kan produktet i form af en let spaltelig ester eller et salt deraf omdannes til den frie syre eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

Schiff-baserne af forbindelsen med formlen I, navnlig med salicyl-

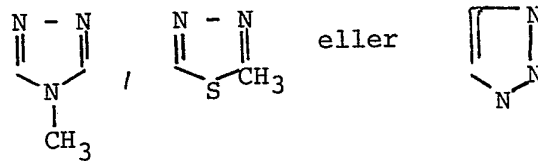
aldehyd, er også værdifulde som aktive antibakterielle midler. De fremstilles ved omsætning af den frie aminoforbindelse med formlen I med et aldehyd og fortrinsvis salicylaldehyd. Omsætningen udføres normalt ved omgivelsernes eller forhøjede temperaturer i et inert opløsningsmiddel, f.eks. benzen eller toluen, hvorfra vand kan fjernes ved azeotrop destillation eller i nærværelse af en vandfjerner, f.eks. kaliumcarbonat.

De let spaltelige estere af forbindelsen med formlen I er værdifulde som mellemprodukter til fremstilling af den frie syreforbindelse. Pivaloyloxymethyl-, acetoxymethyl- og methoxymethylestrene er også værdifulde som aktive antibakterielle midler, eftersom de ved oral administrering hurtigt hydrolyseres til den aktive metabolit. Disse estere har interesse, fordi de ved oral administrering giver forskellige absorptions-hastigheder og -mængder og giver varierende koncentrationer af det aktive antibakterielle middel i blod og væv.

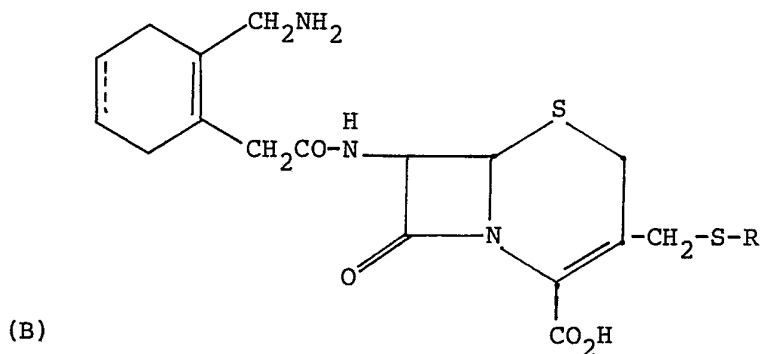
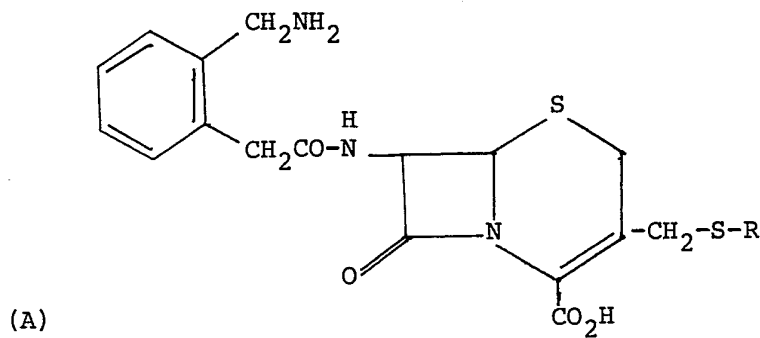
De omhandlede farmaceutisk aktive forbindelser er kraftige antibakterielle midler, der er værdifulde i behandlingen af infektionssygdomme hos fjerkræ, dyr og mennesker, forårsaget af mange Gram-positive og Gram-negative bakterier. De aktive forbindelser er også værdifulde som profylaktiske ernæringstilskud til dyrefoder og som midler til behandling af mastitis hos kvæg. De foretrukne forbindelser har også uventet vist sig at blive effektivt absorberet ved oral administrering.

Lægemidler, som indeholder de omhandlede, hidtil ukendte forbindelser, kan formuleres som farmaceutiske præparater, der ud over den aktive bestanddel omfatter en farmaceutisk acceptabel bærer eller et ditto fortyndingsmiddel. Forbindelserne kan administreres både oralt og parenteralt. De farmaceutiske præparatformer kan være faste, såsom kapsler, tabletter eller dragéer, eller flydende, såsom opløsninger, suspensioner eller emulsioner. Ved behandling af bakterielle infektioner hos mennesker kan de omhandlede forbindelser administreres parenteralt i en mængde på fra ca. 5 til ca. 200 mg/kg/dag og fortrinsvis ca. 5 til ca. 20 mg/kg/dag i opdelt dosis f.eks. 3 - 4 gange daglig. De administreres i dosisenheder indeholdende f.eks. 125, 250 eller 500 mg aktiv bestanddel med passende fysiologisk acceptable bærere eller strækkemidler. Dosisenhederne er i form af flydende præparater, såsom opløsninger eller suspensioner.

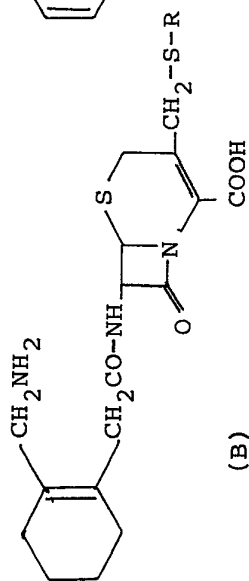
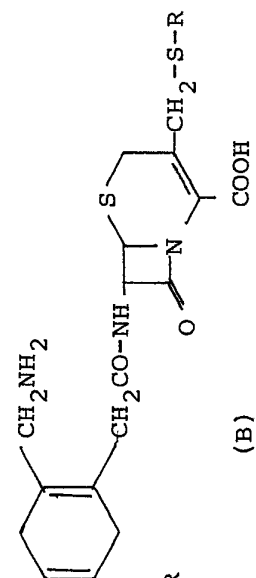
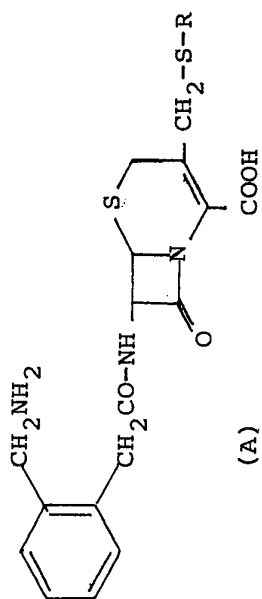
Visse 3-substituerede 7-[ $\alpha$ -(2-aminomethylphenyl)-acetamido]cephalosporansyrederivater (formel A nedenfor, hvori R betyder



se dansk patentskrift nr. 137.192, Farmdoc 76374T, svarende til U.S. patentskrift nr. 3.766.175, ansøgning indleveret 11. maj 1971) er kendte og tilvejebringer en række parenteralt brugbare cephalosporiner, der er meget effektive derivater med et bredt aktivitetsspektrum. Deres begrænsede opløselighed i vand (< 2 mg/ml) har imidlertid bevirket krystalluria-dannelse, selv når disse antibiotika er blevet indgivet parenteralt som let dissocierbare opløselige derivater. Med den foreliggende opfindelse tilvejebringes lige så aktive forbindelser (formel B nedenfor), der udviser høj opløselighed i vand, som zwitterionformen.



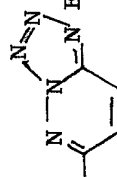
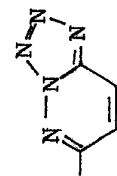
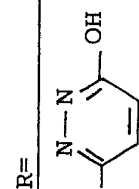
Mange af forbindelserne i den nye serie viste sig at være mere opløselige end de tilsvarende phenylderivater og at have en opløselighed på mere end 7 mg pr. ml bestemt rutinemæssigt i 0,1 M pH 7,0 phosphatpuffer som vist nedenfor sammenlignet med visse tilsvarende phenylderivater.



Opløselighed\*  
4,0 mg/ml

Opløselighed\*  
Eks. 18 4,1 mg/ml

Opløselighed\*  
16,0-16,8 mg/ml  
Eks. 1



3,5 mg/ml

Eks. 19 8,7 mg/ml

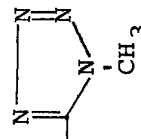
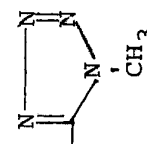
Eks. 2 3,0 mg/ml

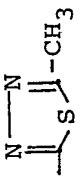
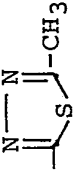
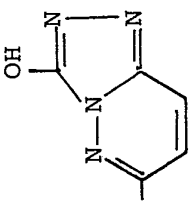
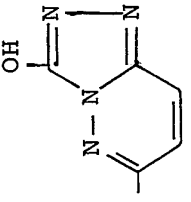
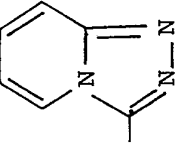
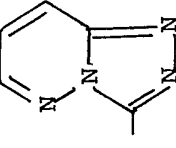
(1)

1,9 mg/ml

Eks. 20 9,7 mg/ml

23-26 mg/ml



R = _____	Opløselighed*	R = _____	Opløselighed*	Opløselighed*
Eks. 4 	4,3-4,6 mg/ml	Eks. 21 	7,6 mg/ml	0,9 mg/ml (2)
Eks. 5 	8 mg/ml	Eks. 22 	7,7 mg/ml	3,6 mg/ml
		Eks. 23 	9,0 mg/ml	
		Eks. 24 	8,4 mg/ml	

\* Omrørt ved 25°C i 4 timer i 0,1 M pH 7,0 phosphatpuffer --- filtreret gennem Millipore filter (0,45/μ) --- undersøgt spektroskopisk overfor egen standard.

(1) Denne forbindelse (også kaldet MR-S94) er omhandlet i Dansk patentskrift nr. 137.192 svarende til U.S. patentskrift nr. 3.766.175.

(2) Denne forbindelse (også kaldet MR-S96) er omhandlet i Dansk patentskrift nr. 137.192 svarende til U.S. patentskrift nr. 3.766.175.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen belyses nærmere i de følgende eksempler. Alle temperaturer er i °C. "Skellysolve B" er en petroleumsetherfraktion med kogepunkt 60 - 68°C og bestående i det væsentlige af n-hexan. "IR-120" også kaldet "Amberlite IR-120" er en stærk kationbytterharpiks indeholdende sulfonsyregrupper. "Amberlite IR-120" er en kommercielt tilgængelig kationbytterharpiks af polystyren-sulfonsyretypen; den er således en kernesulfoneret polystyrenharpiks tværbundet med divinylbenzen, og den opnås ved hjælp af den fremgangsmåde, som er beskrevet af Kunin i Ion Exchange Resins, 2. udgave (1958), John Wiley and Sons, Inc.

2,4-dinitrophenol er forkortet 2,4-DNP, N,N'-dicyclohexylcarbo-diimid som DCC, trifluoreddikesyre som TFA, tetrahydrofuran som THF, t-butoxycarbonylazid som t BuOCN<sub>3</sub> og t-butoxycarbonyl som t-BOC.

#### Fremstilling af udgangsmaterialer og sammenligningsforbindelser.

##### α-(2-aminomethyl-1,4-cyclohexadienyl)eddikesyre

En opløsning af 16,5 g (0,1 mol) o-aminomethylphenyleddikesyre i 1,5 liter flydende ammoniak (der havde været behandlet med 50 mg Li til fjernelse af et spor af fugtighed) fortyndedes langsomt med 500 ml tør t-BuOH. Til opløsningen sættes i små portioner 3,4 g (0,5 g. atom) Li over et tidsrum af 4 timer, og blandingen omrørtes i 16 timer ved stuetemperatur, idet den flydende ammoniak fjernedes i et stinkskab og endelig inddampedes til tørhed under 40°C. Remanensen opløstes i 500 ml vand og opløsningen kromatograferedes på en kolonne af "IR-120" (H<sup>+</sup>, 700 ml) harpiks og elueredes med 1% NH<sub>4</sub>OH-opløsning. Ninhydrin positive fraktioner af eluatet forenedes og inddampedes til tørhed. Remanensen vaskedes med fire 50 ml portioner varm acetone og omkrystalliseredes fra 500 ml ethanol-vand (1:1) til opnåelse af 11,2 g (67%) farveløse nåle, 2. Smeltepunkt 183°C.

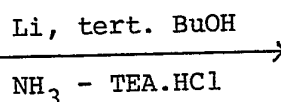
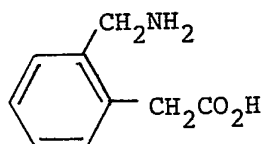
IR:  $\gamma_{\max}^{\text{nuj}}$  1630, 1520, 1380, 1356 cm<sup>-1</sup>.

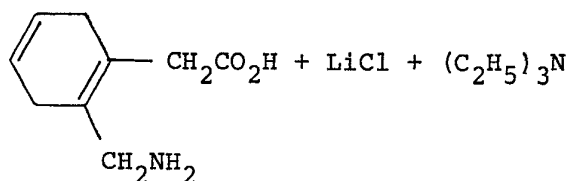
NMR:  $\delta$  D<sub>2</sub>O + K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2,72 (4H, s, H<sub>2</sub>C<), 3,01 (2H, s, CH<sub>2</sub>CO), 3,20 (2H, s, CH<sub>2</sub>-N), 5,78 (2H, s, H>C=).

Analyse beregnet for C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>: C, 64,65; H, 7,84; N, 8,38.

Fundet: C, 64,77; H, 8,06; N, 8,44.

##### Alternativ fremgangsmåde til fremstilling af α-(2-aminomethyl-1,4-cyclohexadienyl)-eddikesyre





Den af Welch, Dolfini og Giarrusso i U.S.A. patentskrift 3.720.665 (eksempel 1) anvendte fremgangsmåde til fremstilling af D-2-amino-2-(1,4-cyclohexadienyl)eddikesyre tilpasses. En opløsning af 830 ml destilleret flydende ammoniak tørredes med 40 mg lithium under en argon atmosfære. Til den således omrørte opløsning sættes 11,0 g (0,07 mol) 2-aminomethylphenyleddikesyre og 340 ml tert. butylalkohol. Ialt 1,6 g (0,225 mol) lithium sættes til den kraftigt omrørte opløsning over et tidsrum af 2 timer. Dernæst behandlede den grå blanding med 35 g (0,215 mol) triethylamin (TEA) hydrochlorid og omrørtes natten over ved stuetemperatur i 18 timer. Den tertiære butylalkohol fjernedes ved 40° (15 mm) til dannelse af en hvid remanens, der tørredes i vakuum over P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> natten over. Det faste stof opløstes i 30 ml 1:1 methanol-vand og sættes under omrøring til 3,5 liter 1:1 chloroform-acetone ved 5°. Blandingen omrørtes i 20 minutter, og aminosyren 2, α-(2-aminomethyl-1,4-cyclohexadienyl)eddikesyre opsamledes og tørredes i 16 timer i vakuum over P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> til opnåelse af 6,3 g (58%) hvide krystaller, smeltepunkt 190° dekomp.. IR- og NMR-spektrene var konsistente med strukturen.

α-[2-(t-butoxycarbonylaminomethyl)-1,4-cyclohexadienyl]eddikesyre (1)

Til en omrørt opløsning af 8,0 g (0,048 mol) α-(2-aminomethyl-1,4-cyclohexadienyl)eddikesyre og 3,8 g (0,096 mol) NaOH i 150 ml vand sættes en opløsning af 10,3 g (0,072 mol) t-butoxycarbonylazid i 80 ml THF, og blandingen omrørtes i 18 timer ved stuetemperatur. THF fjernedes under reduceret tryk, og den tilbageblevne opløsning vaskedes med ether (2 x 100 ml), gjordes sur med 6 N HCl og ekstraheredes med ether (3 x 100 ml). De forenede ekstrakter vaskedes med vand (2 x 100 ml), og en mættet NaCl-opløsning (100 ml) tørredes med Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og inddampedes til tørhed. Den olieagtige remanens tritureredes med n-hexan til opnåelse af 10,5 g (82%) farveløst pulver 1, der smeltede ved 113°C.

IR:  $\gamma_{\text{max}}^{\text{nuj}}$  3370, 1715, 1640, 1530, 1280, 1160 cm<sup>-1</sup>.

NMR:  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{CDCl}_3}$  1,45 (9H, s, t-BuH), 2,73 (4H, s, H<sub>2</sub>C=C), 3,16 (2H, s, CH<sub>2</sub>CO), 3,76 (2H, d, 6Hz, CH<sub>2</sub>N), 4,90 (1H, m, NH), 5,66 (2H, s,

$\text{H}>\text{C}=\text{)$ , 10,6 (1H, br-s, COOH).

Analyse beregnet for  $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ : C, 62,90; H, 7,92; N, 5,24.

Fundet: C, 63,13; H, 8,21; N, 5,26.

[2-(N-t-butoxycarbonylamino)methyl-1-cyclohexen-1-yl]-eddikesyre (2)

En opløsning af [2-(N-t-butoxycarbonylamino)methyl-1,4-cyclohexadien-1-yl]eddikesyre (1), (1,33 g, 5 mmol) i 3% ammoniumhydroxid (10 ml) hydrogeneredes ved 40 psi med palladium-på-trækul (10%, 0,2 g). En teoretisk mængde hydrogen opsamledes i 3 timer. Katalysatoren fjernes, og filtratet gjordes surt til pH-værdien 2 med fortyndet HCl og ekstraheredes med ethylacetat (2 x 50 ml). De forenede ekstrakter vaskedes med vand (20 ml), tørredes med  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  og inddampedes under reduceret tryk til dannelsen af en olie (1,34 g), der størknede ved henstand i nogle dage. Omkrystallisation fra n-hexan - ethylacetat gav 1,2 g (90%) af 2 i form af farveløse prismer, der smeltede ved 118-119°C.

IR:  $\gamma_{\text{max}}^{\text{nujol}}$  3450, 1730, 1660, 1510  $\text{cm}^{-1}$ .

NMR:  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{CDCl}_3}$  1,58 (9H, s, t-butyl-H), 1,50 - 1,90 (4H, m,  $-\text{CH}_2-$ ), 1,90 - 2,20 (4H, m, allylisk methylen-H), 3,18 (2H, s,  $\text{CH}_2-\text{CO}$ ), 3,78 (2H, d, 6Hz,  $\text{CH}_2-\text{N}$ ), 5,00 (1H, br-s, NH), 8,98 (1H, br-s, COOH).

Analyse beregnet for  $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ : C, 62,43; H, 8,61; N, 5,20.

Fundet: C, 62,12; H, 8,77; N, 5,37.

$\alpha$ -[2-(t-butoxycarbonylaminomethyl)-1,4-cyclohexadienyl]eddikesyre (3)

Til en omrørt opløsning af 8,0 g (0,048 mol) stof 2 og 3,8 g (0,096 mol) NaOH i 150 ml vand sættes en opløsning af 10,3 g (0,072 mol) t-butoxycarbonylazid i 80 ml THF, og blandingen omrørtes i 18 timer ved stuetemperatur. THF'en fjernes ved reduceret tryk, og den tilbageblevne opløsning udvaskedes med ether (2 x 100 ml), gjordes sur med 6 N HCl og ekstraheredes med ether (3 x 100 ml). De forenede ekstrakter udvaskedes med vand (2 x 100 ml) og en mættet NaCl-opløsning (100 ml), tørredes med  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  og inddampedes til tørhed. Den olieagtige remanens tritureredes med n-hexan, hvilket gav 10,5 g (82%) farveløst pulver 3, der smeltede ved 113°C.

IR:  $\gamma_{\text{max}}^{\text{nuj}}$  3370, 1715, 1640, 1530, 1280, 1160  $\text{cm}^{-1}$ .

NMR:  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{CDCl}_3}$  1,45 (9H, s, t-Bu-H), 2,73 (4H, s,  $\text{H}_2\text{C}<\text{C}=\text{C}$ ), 3,16 (2H, s,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3,76 (2H, d, 6Hz,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4,90 (1H, m, NH), 5,66 (2H, s,  $\text{H}>\text{C}=\text{)$ , 10,6 (1H, br-s, COOH).

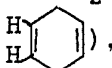
Analyse beregnet for  $C_{14}H_{21}NO_4$ : C, 62,90; H, 7,92; N, 5,24.

Fundet: C, 63,13; H, 8,21; N, 5,26.

Natrium{2-[N-(1-carbethoxypropen-2-yl)aminomethyl]-1,4-cyclohexadienyl} acetat (4)

Til en omrørt opløsning af 460 mg (0,02 mol) metallisk natrium i 100 ml absolut EtOH sættes 3,34 g (0,02 mol) stof 2 og 3,1 g (0,024 mol) ethylacetoacetat, og blandingen opvarmedes til tilbagesvaling i 4 timer under omrøring. Den varme reaktionsblanding filtreredes, og filtratet henstod koldt natten over, hvorved der opnåedes 2,0 g farveløse nåle 4, der smeltede ved  $264^{\circ}C$ . Yderligere produkt (3,3 g) opnåedes ved koncentrering af modervæsken. Det totale udbytte var 5,3 g (88%).

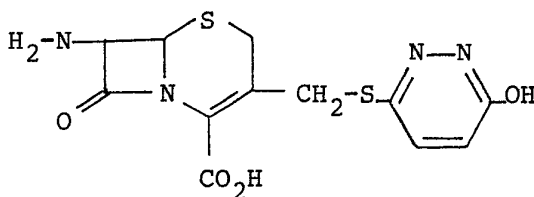
IR:  $\gamma_{\max}^{\text{nuj}}$  3300, 1635, 1600, 1570, 1300, 1275, 1170, 1090  $\text{cm}^{-1}$ .

NMR:  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{D}_2\text{O}}$  1,23 (3H, t, 7Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,96 & 2,25 (3H, s,  $\text{C}=\text{C}-\text{CH}_3$ , cis & trans), 2,70 (4H, s,  $\text{H}_2\text{C}^{\leftarrow}$ ), 3,04 (2H, s,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3,66 & 3,95 (2H, s,  $\text{CH}_2-\text{N}$ , cis & trans), 4,07 (2H, q, 7 Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4,45 & 4,56 (1H, s,  $=\text{H}$ , cis & trans), 5,76 (2H, s, )

Analyse beregnet for  $C_{15}H_{20}NO_4\text{Na}$ : C, 59,79; H, 6,69; N, 4,64.

Fundet: C, 59,69; H, 6,76; N, 4,75.

7-amino-3-(3-hydroxypyridazin-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (4a)



3-chlor-6-hydroxypyridazin

En blanding af 22,47 g (0,15 mol) 3,6-dichlorpyridazin og 50 ml eddikesyre tilbagesvales i 2 timer. Reaktionsblandingen afkøledes og fortyndedes med 50 ml vand og koncentrerades dernæst til tørhed under reduceret tryk. Remanensen omkrystalliseredes fra vand, hvilket gav 15,8 g (80%) 3-chlor-6-hydroxypyridazin som farveløse prismar, der smeltede ved  $133-7^{\circ}C$  (lit  $138-140^{\circ}C$ ). Se N. Takabayashi, Yakugaku

Zasshi, 75, 778 (1955).

### 3-hydroxy-6-mercaptopyridazin

En blanding af 2,6 g (0,02 mol) 3-chlor-6-hydroxypyridazin og 5,0 g (0,07 mol) frisk fremstillet kaliumhydrogensulfid i 30 ml ethanol opvarmedes ved 130-140°C i et forseglet rør i 6 timer. Reaktionsblandingen afkøledes og fortyndedes med 200 ml vand. Næsten hele mængden af organisk opløsningsmiddel fjernedes ved destillation under reduceret tryk. Den tilbageblevne vandige opløsning gjordes sur med fortyndet saltsyre til pH-værdien 3 og ekstraheredes med ethylacetat (6 x 50 ml). De forenede ekstrakter inddampedes til tørhed, og remanensen genudfældedes fra 30 ml ethanol-ligroin (1:1), hvilket gav 2,2 g (87%) amorf 3-hydroxy-6-mercaptopyridazin, smeltepunkt 158-159°C (lit. 157-158°C).

Se J. Druey et al., Helv. Chem. Acta. 37, 121 (1954).

### 3-hydroxy-6-mercaptopyridazin

Til en opløsning af 5,6 g (0,05 mol) 3,6-dihydroxypyridazin i 150 ml pyridin sattes portionsvis 2,70 g (0,012 mol) phosphorpentasulfid under kraftig omrøring og tilbagesvaling. Tilbagesvalingen fortsattes i 1 time, og dernæst fortyndedes reaktionsblandingen med 200 ml vand og koncentreredes til fjernelse af pyridinen. Den resulterende olieagtige remanens suspenderedes i vand og ekstraheredes med ethylacetat. De organiske ekstrakter forenedes og koncentreredes igen, hvilket gav et olieagtigt materiale, der tritureredes med en lille smule vand til opnåelse af 3-hydroxy-6-mercaptopyridazin som et gult fast stof. Omkrystallisation fra vand gav 0,62 g (12%) af produktet, som var identisk med det ovenfor fremstillede.

### 3,6-dihydroxypyridazin

Til en kogende opløsning af 315 g (3 mol) hydrazindihydrochlorid i 2 liter vand sattes portionsvis 295 g (3 mol) fint formalet maleinsyreanhydrid under omrøring. Efter at tilsætningen var afsluttet, fortsattes opvarmningen i 4 timer, og blandingen henstod natten over i køleskab, hvilket gav 285 g (85%) 3,6-dihydroxypyridazin som massive stave. Smeltepunkt >290°C.

### 3,6-dichlorpyridazin

En blanding af 150 g (1,33 mol) 3,6-dihydroxypyridazin og 250 g phosphoroxychlorid tilbagesvaledes i 3 timer under beskyttelse mod fugtighed. Overskuddet af phosphoroxychlorid fjernedes under reduceret tryk, og den mørke remanens hældtes i et kg knust is. Det resulterende bundfald opsamledes ved filtrering. Et andet udbytte af produktet opnå-

edes fra modervæsken ved ekstraktion med fem 300 ml portioner chloroform efterfulgt af behandling med 1 g trækul og afdampning af opløsningsmidlet. Det første og andet udbytte forenedes, opløstes i 500 ml chloroform og behandlede igen med 1 g trækul og koncentreredes, hvilket gav 165 g (83%) 3,6-dichlorpyridazin som fine nåle, der smeltede ved 60-61°C (i et lukket rør).

#### 6-chlor-3-hydroxypyridazin

En suspension af 60 g (0,4 mol) 3,6-dichlorpyridazin i 200 ml 10% saltsyre tilbagesvales i 2 timer, indtil der opnåedes en klar opløsning. Den klare opløsning behandlede med ca. 1,5 g aktiv carbon og filtreredes. Filtratet koncentreredes under reduceret tryk, hvilket gav 6-chlor-3-hydroxypyridazin som farveløse nåle. Udbytte 49,5 g (98%). Smeltepunkt 137-139°C.

#### 3-hydroxy-6-mercaptopyridazin

En blanding af 50 g (0,38 mol) 6-chlor-3-hydroxypyridazin, 60 g (0,83 mol) kaliumhydrogensulfid i 250 ml ethanol opvarmedes i en 500 ml autoklav ved 140°C i 14 timer med magnetomrøring. Trykket nåede 15-20 kg/cm<sup>2</sup>. Blandingen inddampedes til tørhed, og remanensen opløstes i 300 ml vand. Den vandige opløsning gjordes sur med fortyndet saltsyre til pH-værdi 3 og ekstraheredes med ti 200 ml portioner ethylacetat. De forenede ekstrakter koncentreredes, hvilket gav 34,3 g (70%) amorf 3-hydroxy-6-mercaptopyridazin. Smeltepunkt 151-152°C.

#### 7-amino-3-(6-hydroxypyridazin-3-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre

En blanding af 0,60 g (0,0047 mol) 3-hydroxy-6-mercaptopyridazin, 1,27 g (0,0047 mol) 7-aminocephalosporansyre, 0,78 g (0,0094 mol) natriumbicarbonat i 25 ml 0,1 M fosfatpuffer (pH-værdi 6,4) opvarmedes ved 60°C i 5 timer. Reaktionsblandingen filtreredes til fjernelse af spor af uopløseligt materiale, og filtratet indstilledes på pH-værdien 5 med eddikesyre, hvilket gav et brunt bundfald, der opsamledes ved filtrering, udvaskedes med vand og acetone i rækkefølge og tørredes i vakuum til opnåelse af 7-amino-3-(6-hydroxypyridazin-3-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre; 1,03 g (71%). Smeltepunkt 290-300°C (dekomponering).

IR:  $\gamma_{\max}^{\text{KBr}}$  1805, 1680, 1650, 1580, 1415 cm<sup>-1</sup>.

UV:  $\lambda_{\max}^{1\% \text{ NaOH}}$  249 nm ( $\epsilon$  19400).

NMR:  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{D}_2\text{O}-\text{K}_2\text{CO}_3}$  3,22 (1H, d, 19Hz), 3,37 (1H, d, 14 Hz), 3,65 (1H, d, 14 Hz), 3,72 (1H, d, 19 Hz), 4,90 (1H, d, 4 Hz), 5,30 (1H, d,

4 Hz), 6,75 (1H, d, 10 Hz), 7,30 (1H, d, 10 Hz).

Analyse beregnet for  $C_{12}H_{12}N_4O_4S_2 \cdot 1/2H_2O$ :

C, 41,25; H, 3,75; N, 16,04; S, 18,36.

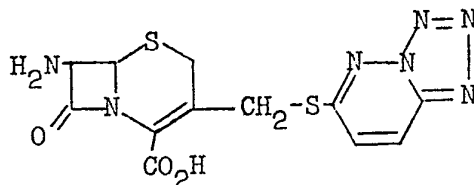
Fundet:

C, 41,45; H, 3,70; N, 15,83; S, 18,03.

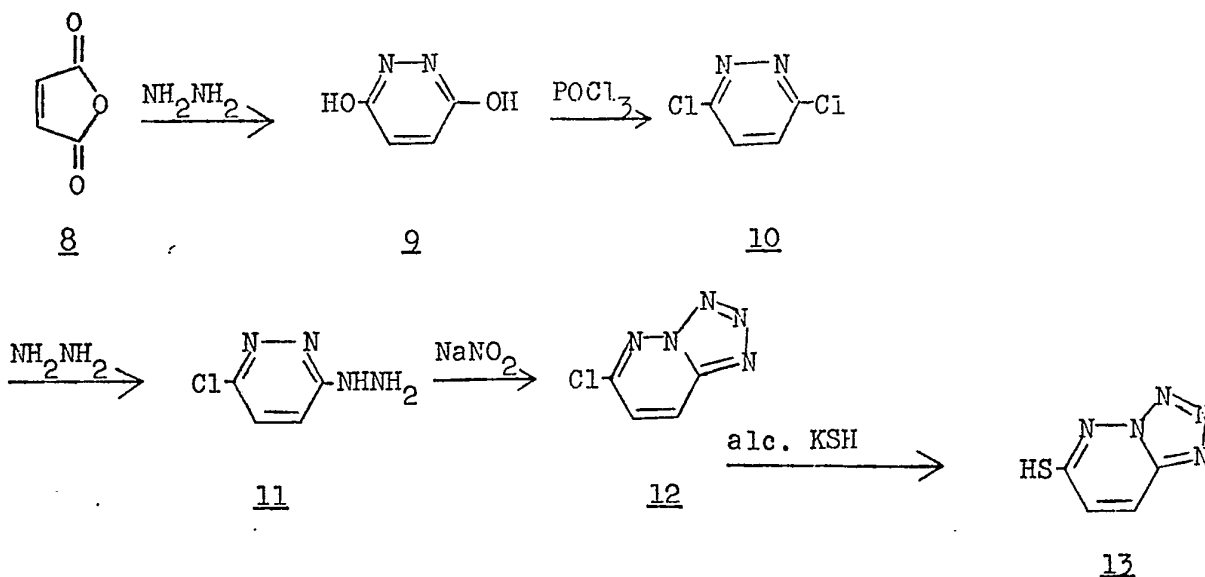
7-amino-3-(3-hydroxypyridazin-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre

En blanding af 141 g (0,52 mol) 7-ACA, 92 g (1,1 mol) natriumbicarbonat og 73 g (0,57 mol) 3-hydroxy-6-mercaptopyridazin i 1,5 liter 0,1 M fosfatpuffer (pH-værdi 6,4) opvarmedes ved 60-65°C under nitrogenatmosfære i 4 timer. Den varme blanding behandlede med 2 g trækul og filtreredes. Filtratet afkøledes til stuetemperatur og indstilledes på pH-værdien 4,5 med iseddikesyre til opnåelse af et bundfald, der opsamledes ved filtrering, udvaskedes med 1 liter acetone og lufttørredes ved stuetemperatur til opnåelse af et udbytte på 125 g (70%) 7-amino-3-(3-hydroxy-pyridazin-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre. Smeltepunkt 240-250°C (dek.).

7-amino-3-(tetrazol[1,5-b]pyridazin-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (4b)



Fremstilling af 6-mercaptotetrazol[4,5-b]pyridazin



3,6-dihydroxypyridazin (9)

Til en kogende opløsning af 315 g (3 mol) hydrazindihydrochlorid i 2 liter vand sattes portionsvis 295 g (3 mol) fint formalet maleinsyreanhydrid 8 under omrøring. Efter at tilsætningen var afsluttet fortsattes opvarmningen i 4 timer og blandingen henstod derefter natten over i køleskab, hvilket gav 285 g (85%) stof 9 som massive stave. Smeltepunkt  $>290^{\circ}\text{C}$ .

3,6-dichlorpyridazin (10)

En blanding af 150 g (1,33 mol) stof 9 og 250 g phosphoroxychlorid tilbagesvales i 3 timer, idet det beskyttedes mod fugtighed. Overskuddet af phosphoroxychlorid fjernedes under reduceret tryk, og den mørke remanens hældtes i et kg knust is. Det resulterende bundfald opsamledes ved filtrering. Et andet udbytte af produktet opnåedes fra modervæsken ved ekstraktion med fem 300 ml portioner chloroform, efterfulgt af behandling med 1 g trækul og afdampning af opløsningsmidlet. Det første og andet udbytte forenedes, opløstes i 500 ml chloroform og behandledes igen med et g trækul og koncentreredes, hvilket gav et udbytte på 165 g (83%) af stof 10 som fine nåle, der smeltede ved  $60-61^{\circ}\text{C}$  (i et lukket rør).

3-chlor-6-hydrazinpyridazin (11)

En blanding af 40 g (0,27 mol) 3,6 dichlorpyridazin (10) og 40 ml 80% hydrazinhydrat i 80 ml ethanol tilbagesvales i 1 time. Reaktionsblandingen inddampedes til tørhed, og remanensen omkrystalliseredes fra benzen, hvilket gav 39 g (100%) stof 11, der smeltede ved  $114-115^{\circ}\text{C}$ .

6-chlortetrazol[4,5-b]pyridazin (12)

Til en opløsning af 25,7 g (0,174 mol) stof 11 i 100 ml 15% eddikesyre sattes dråbevis en opløsning af 13,8 g (0,2 mol) natriumnitrit i 50 ml vand under kraftig omrøring ved  $5-10^{\circ}\text{C}$ . Omrøringen fortsattes i en time ved den samme temperatur. Bundfaldet, som udskilte, frafiltreredes, udvaskedes med 20 ml vand og lufttørredes, hvilket gav 17,02 g stof 12. Yderligere produkt opnåedes ved inddampning af filtratet. Totalt udbytte 18,32 g (64%). Smeltepunkt  $104-105^{\circ}\text{C}$ .

6-mercaptotetrazol[4,5-b]pyridazin (13)

En blanding af 21,3 g (0,137 mol) stof 12 og 20 g (0,25 mol) kaliumhydrogensulfid i 200 ml ethanol tilbagesvales i 2 timer og indampedes til tørhed. Remanensen opløstes i 100 ml vand, filtreredes til fjernelse af en lille smule uopløseligt materiale. Filtratet gjordes surt til pH-værdien 1 med fortyndet saltsyre til udfældning af stof 13



(ii) En omrørt opløsning af 16,8 g (0,11 mol) stof 13 og 18,48 g (0,22 mol)  $\text{NaHCO}_3$  i 1 liter 0,1 M fosfatpuffer (pH 6,4) opvarmedes ved  $50^\circ\text{C}$ , og til opløsningen sattes portionsvis 30 g (0,11 mol) 7-ACA. Blandingen opvarmedes ved  $80^\circ\text{C}$  i 2,5 timer, i løbet af hvilket tidsrum der stadig blev uopløseligt materiale tilbage. Reaktionsblandingen afkøledes til stuetemperatur, og det udfældede stof 4b opsamledes ved filtrering, udvaskedes grundigt med 200 ml vand og lufttørredes.

Yderligere stof 4b opnåedes fra filtratet og vaskevæskerne ved at man gjorde surt til pH-værdi 5 med fortyndet HCl. Totalt udbytte 32,9 g (83%). Smeltepunkt  $245\text{--}250^\circ\text{C}$  (dek.).

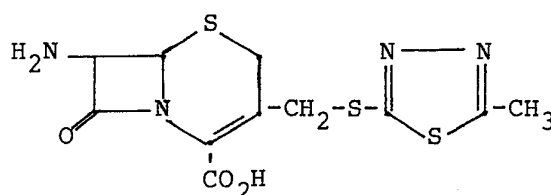
IR:  $\gamma_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  1800, 1615, 1538, 1360  $\text{cm}^{-1}$ .

UV:  $\lambda_{\text{max}}^{1\% \text{NaHCO}_3}$  237 nm ( $\epsilon$  19500), 275 nm ( $\epsilon$  12000), 310 nm (sh) ( $\epsilon$  5700).

NMR:  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{D}_2\text{O}+\text{K}_2\text{CO}_3}$  3,35 (1H, d, 18 Hz, 2-H), 3,76 (1H, d, 18 Hz, 2-H), 4,00 (1H, d, 10 Hz, 3- $\text{CH}_2$ ), 4,48 (1H, d, 10 Hz, 3- $\text{CH}_2$ ), 4,93 (1H, d, 4 Hz, 6-H), 5,32 (1H, d, 4 Hz, 7-H), 7,46 (1H, d, 10 Hz, pyridazin-H), 8,18 (1H, d, 10 Hz, pyridazin-H).

Analyse beregnet for  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_7\text{O}_3\text{S}_2$ : C, 39,44; H, 3,03; N, 26,83; S, 17,55.  
Fundet: C, 39,19; H, 2,71; N, 26,84; S, 17,35.

7-amino-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (4d)



2-mercaptop-5-methyl-1,3,4-thiadiazol

Lit. ref. U.S.A. patentskrift 3.516.997 (1970); J. Antibiotics, 23, 131-36 (1970).

11,5 g (0,1 mol) 2-amino-5-methyl-1,3,4-thiadiazol formaleses omhyggeligt sammen med 32 g (0,45 mol) natriumnitrit og sattes langsomt til 160 ml 48% HBr indeholdende 50 mg pulveriseret kobber ved  $-10^\circ\text{C}$  under omrøring. Efter at tilsætningen var afsluttet, omrørtes opløsningen ved  $-5^\circ\text{C}$  i 1 time, og dernæst ved  $20^\circ\text{C}$  i 1 1/2 time. pH-værdien indstilledes på 9,5 ved tilsætning af 50% KOH, og opløsningen opvarmedes til  $60^\circ\text{C}$ . Ved  $60^\circ\text{C}$  genindstilledes pH-værdien på 9,5 ved tilsætning

50% KOH. Opløsningen afkøledes og filtreredes. Bundfaldet opløstes i ether, og filtratet ekstraheredes med 2 x 200 ml ether. De forenede etheropløsninger tørredes over natriumsulfat og inddampedes til tørhed. Produktet omkrystalliseredes fra benzen - "Skellysolve B". Udbytte 12 g, smeltepunkt 105-107°C.

12 g (0,07 mol) 2-brom-5-methyl-1,3,4-thiadiazol og 5 g (0,07 mol) thiourinstof opløstes i 40 ml 100% ethanol og tilbagesvales i 1 1/2 time på dampbad. Denne opløsning sattes til 4,5 g (0,08 mol) KOH i 65 ml H<sub>2</sub>O, og blandingen opvarmedes til kogning i 5 minutter. Ethanol fjernedes under vakuum, og pH-værdien af den vandige opløsning indstilledes på 3 ved tilsætning af 3 N HCl. Produktet udkrystalliserede, og efter afkøling ved 0°C i 1 time opsamledes det ved filtrering, udvaskedes med koldt vand og omkrystalliseredes fra 100% ethanol. Udbytte 5 g, smeltepunkt 186-187°C.

Analyse beregnet for C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>: C, 27,25; H, 3,05; N, 21,19; S, 48,51.

Fundet: C, 27,20; H, 3,34; N, 21,18; S, 48,48.

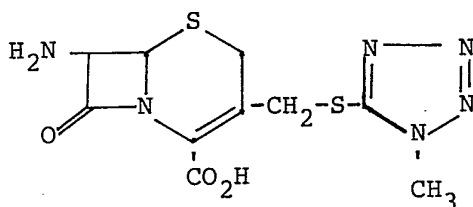
7-amino-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre

Til en omrørt suspension af 2,72 g (0,01 mol) 7-ACA i 50 ml 0,1 M, pH-værdi 6,4 phosphatpuffer, sattes 1,68 g (0,02 mol) NaHCO<sub>3</sub> efterfulgt af 1,45 g (0,011 mol) 2-mercapto-5-methyl-1,3,4-thiadiazol og blandingen opvarmedes og omrørtes ved 60°C i 5 timer. Den resulterende opslemning henstod dernæst til en afkøling til ca. 22°C i løbet af 1 time. Det krystallinske bundfald opsamledes ved filtrering, udvaskedes med vand og lufttørredes. Udbytte 1,3 g, dekomponeringspunkt 206°C. Multiplikation af reaktionen 10X gav 18,0 g.

Analyse beregnet for C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S<sub>3</sub>: C, 38,37; H, 3,52; S, 27,96.

Fundet: C, 39,06; H, 3,91; S, 26,67.

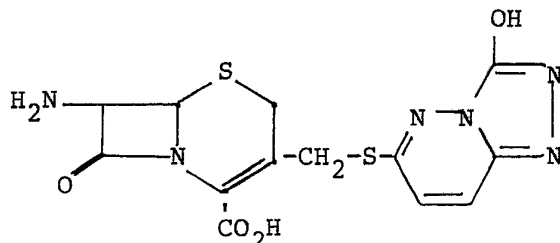
7-amino-3-(1-methyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (4c)



Den ovenfor beskrevne fremgangsmåde gentoges under anvendelse af 1-methyl-1,2,3,4-tetrazol-5-thiol i stedet for thiadiazolen. Der opnåedes 25 g (76%) 7-amino-3-(1-methyl-1,2,3,4-tetrazol-5-thiomethyl)- $\Delta^3$ -cephem-4-carboxylsyre. Fremstillingen af denne forbindelse er også be-

skrevet i U.S.A. patentskrift 3.516.997 i spalte 6 under overskriften "Preparation 7".

7-amino-3-(3-hydroxypyridazin[3,2-c]-s-triazol-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (4e)



6-mercapto-2,3-dihydro-s-triazol[4,3-b]-pyridazin-3-on

En blanding af 6-chlor-2,3-dihydro-s-triazol[4,3-b]-pyridazin-3-on [P. Francavilla og F. Lauria, J. Het. Chem., 8, 415 (1971)] (1,70 g, 0,01 mol) og kaliumhydrogensulfid (1,44 g, 0,02 mol) i ethanol (30 ml) opvarmedes i et lukket rør i 8 timer ved 140°. Efter afkøling sættes vand (50 ml) til reaktionsblandingen, og en lille smule uopløseligt materiale fjernes ved filtrering. Filtratet koncentreredes under reduceret tryk og gjordes surt til pH-værdien 2 med fortyndet HCl til opnåelse af et gult bundfald af 6-mercapto-2,3-dihydro-s-triazol[4,3-b]-pyridazin-3-on, der opsamledes ved filtrering, udvaskedes med vand (10 ml) og tørredes i vakuum over P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Udbytte 1,43 g (84%). Smeltepunkt >300°C.

IR:  $\gamma_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  2500, 1710, 1495, 1350 cm<sup>-1</sup>.

UV:  $\lambda_{\text{max}}^{1\% \text{NaHCO}_3}$  261 nm ( $\epsilon$  9000), 320 nm ( $\epsilon$  2700)

NMR:  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{D}_2\text{O}-\text{K}_2\text{CO}_3}$  6,96 (1H, d, 10 Hz, 7-H eller 8-H). 7,12 (1H, d, 10 Hz, 7-H eller 8-H).

Analyse beregnet for C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>OS: C, 35,71; H, 2,40; N, 33,31; S, 19,07.

Fundet: C, 35,17; H, 2,28; N, 33,38; S, 19,76.

7-amino-3-[2,3-dihydro-s-triazol[4,3-b]pyridazin-3-on-6-ylthiomethyl]-3-cephem-4-carboxylsyre (4e)

7-ACA (1,36 g, 5 mmol) sættes ved 50°C til en opløsning af 6-mercapto-2,3-dihydro-s-triazol[4,3-b]-pyridazin-3-on (0,84 g, 5 mmol) og natriumbicarbonat (0,84 g, 10 mmol) i 20 ml 0,1 M fosfatpuffer-opløsning (pH-værdi 6,4) og blandingen opvarmedes i 2 timer ved 70°C. En lille smule uopløseligt materiale fjernes ved filtrering og ved at gøre filtratet surt til pH-værdien 5 med fortyndet HCl opnåedes stof 4e

som opsamledes ved filtrering, udvaskedes med vand (30 ml) og tørredes i vakuum over  $P_2O_5$ . Udbytte af 7-amino-3-[2,3-dihydro-3-triazol(4,3-b)-pyridazin-3-on-6-ylthiomethyl]-3-cephem-4-carboxylsyre 1,25 g (66%), smeltepunkt  $>300^{\circ}C$ .

IR:  $\gamma_{\max}^{KBr}$  1805, 1720, 1620, 1550  $cm^{-1}$ .

UV:  $\lambda_{\max}^{1\%NaHCO_3}$  257 ( $\epsilon$  17700).

NMR:  $\delta_{ppm}^{D_2O-K_2CO_3}$  3,40 (1 H, d, 20 Hz, 2-H), 3,78 (1H, d, 20 Hz, 2-H), 4,00 (1 H, d, 13 Hz, 3- $CH_2$ ), 4,35 (1 H, d, 13 Hz, 3- $CH_2$ ), 5,02 (1 H, d, 4 Hz, 6-H), 5,40 (1 H, d, 4 Hz, 7-H), 6,70 (1 H, d, 9 Hz, pyridazin-H), 7,40 (1 H, d, 9 Hz, pyridazin-H).

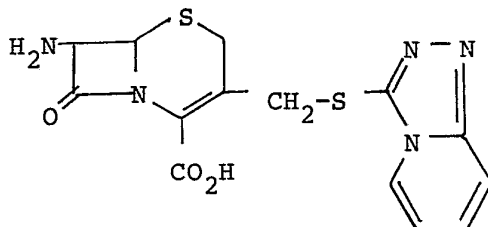
Analyse beregnet for  $C_{13}H_{12}N_6O_4S_2 \cdot H_2O$ :

C, 39,19; H, 3,54; N, 21,09; S, 16,09.

Fundet:

C, 39,40; H, 3,39; N, 20,36; S, 15,89.

7-amino-3-(pyrido[2,1-c]-s-triazol-3-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (4.f)



Til en varm ( $60^{\circ}$ ) opløsning af 3-mercapto-s-triazol-[4,3-a]pyridin [D.S. Tarhell et al., J. Am. Chem. Soc. 70, 1381 (1948)] (1,51 g, 10 mmol) og  $NaHCO_3$  (1,68 g, 20 mmol) i 0,1 M pH 7,4 fosfatpuffer (50 ml) sattes portionsvis 7-ACA (2,72 g, 10 mmol) og blandingen opvarmedes ved  $80-85^{\circ}$  i 30 minutter. Reaktionsblandingen behandlede med carbon, og filtratet gjordes surt til pH-værdi 5 med fortyndet saltsyre, hvilket gav 7-amino-3-(s-triazol[4,3-a]pyridin-3-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, der opsamledes ved filtrering, udvaskedes med vand (10 ml), tørredes i vakuum over  $P_2O_5$ . Udbytte 1,40 g (39%). Smeltepunkt  $215-220^{\circ}$  (dek.).

IR:  $\gamma_{\max}^{KBr}$  1805, 1620, 1530, 1410, 1545  $cm^{-1}$ .

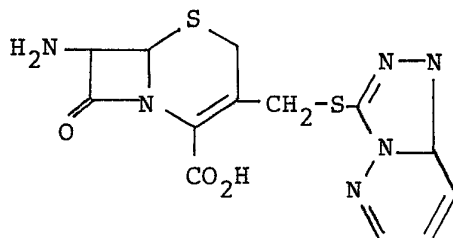
UV:  $\lambda_{\text{max}}^{1\% \text{NaHCO}_3}$  280 nm ( $\epsilon$  13200).

NMR:  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{D}_2\text{O}+\text{K}_2\text{CO}_3}$  3,23 (1H, d, 18 Hz, 2-H), 3,63 (1H, d, 13 Hz, 3-H),  
3,68 (1 H, d, 18 Hz, 2-H), 4,18 (1H, d, 13 Hz, 3-H), 4,7-5,3  
(2H, m, 6-H & 7-H).

Analyse beregnet for  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}_2$ : C, 46,27; H, 3,61; N, 19,27; S, 17,65.

Fundet: C, 45,81; H, 3,58; N, 18,21; S, 17,08.  
45,74 3,69 18,13

7-amino-3-pyridazino[2,1-c]-s-triazol-3-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (4g)



3-mercapto-s-triazol[4,3-b]pyridazin

En blanding af 1,20 g (8 mmol) 3-chlor-s-triazol[4,3-b]pyridazin [P-Francavilla og F. Lauvia, J. Het. Chem., 8, 415 (1971)] og 1,20 g (16 mmol) KSH i 20 ml ethanol opvarmedes i 8 timer ved 130<sup>o</sup> i et lukket rør. Efter afkøling indampedes blandingen til tørhed, og remanensen opløstes i 100 ml vand, behandlede med aktivt carbon, gjordes surt til pH-værdien 1 med fortyndet HCl til udfældning af 3-mercapto-s-triazol[4,3-b]pyridazin, der opsamledes, vaskedes med 10 ml vand og tørredes i vakuum over  $\text{P}_2\text{O}_5$  til opnåelse af et udbytte på 0,75 g (62%), smeltepunkt 260-270<sup>o</sup> (dek.).

IR:  $\gamma_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3080, 2940, 2760, 1620, 1500, 1280, 1055  $\text{cm}^{-1}$ .

NMR:  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{DMSO-d}_6}$  6,99 (1 H, d-d, 4 & 10 Hz, 7-H), 7,67 (1 H, d-d, 2 & 10 Hz, 8-H), 8,15 (1 H, d-d, 2 & 4 Hz, 6-H), 12,3 (1 H, br-s, forsvinder ved tilsætning af  $\text{D}_2\text{O}$ ).

Analyse beregnet for  $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{S} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ : C, 37,26; H, 3,13; N, 34,76.

Fundet: C, 37,35; H, 2,32; N, 34,81.

7-amino-3-(s-triazol[4,3-b]pyridazin-3-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (4g)

7-ACA (1,36 g, 5 mmol) sættes portionsvis til en opløsning af 0,68g

(4,5 mmol) 3-mercapto-s-triazol[4,3-b]pyridazin og 0,84 g (10 mmol)  $\text{NaHCO}_3$  i 20 ml 0,1M pH-værdi 7,4 phosphatpuffer ved 40-50°. Blandingen opvarmedes ved 80-85° i 40 minutter, behandlede med en lille smule aktivt carbon og gjordes surt med fortyndet HCl til pH-værdi 4 til udfældning af 7-amino-3-(s-triazol[4,3-b]-pyridazin-3-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre, der opsamledes, udvaskedes med 20 ml vand og tørredes i vakuum over  $\text{P}_2\text{O}_5$  til opnåelse af et udbytte på 0,81 g (49%), smeltepunkt >300°.

IR:  $\gamma$   $\text{KBr}$  max 1705, 1620, 1540, 1415, 1350  $\text{cm}^{-1}$ .

UV:  $\lambda$  1% $\text{NaHCO}_3$  max 275 nm ( $\epsilon$  13100)

NMR:  $\delta$   $\text{D}_2\text{O} + \text{K}_2\text{CO}_3$  ppm 3,35 (1 H, d, 18 Hz, 2-H), 3,86 (1 H, d, 18 Hz, 2-H), 4,80 (1 H, d-d, 4&2 Hz, 6-H), 5,24 (1 H, d, 4 Hz, 7-H), 7,1-8,6 (3 H, m, pyridazin-H)

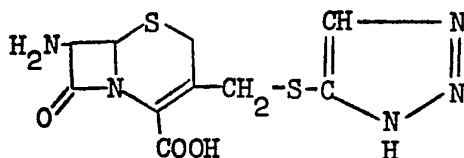
Analyse beregnet for  $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_3\text{S}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ :

C, 40,83; H, 3,69; N, 21,96; S, 16,78.

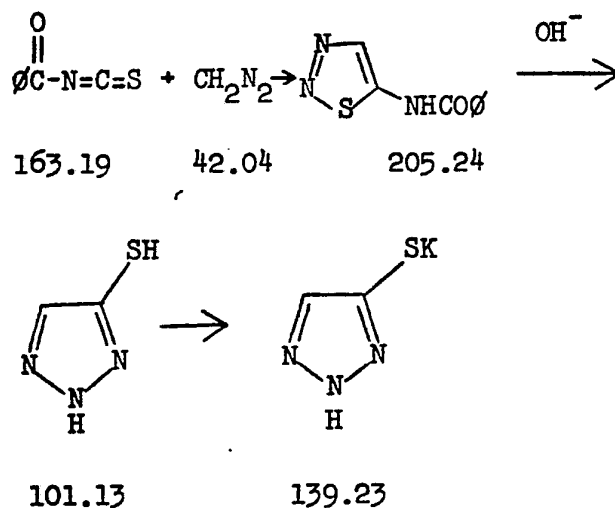
Fundet:

C, 41,15; H, 3,24; N, 20,37; S, 17,90.

7-amino-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (5h)



Syntese af kalium 1,2,3-triazol-5-thiolat



Syntese af thiolen skete ved hjælp af en fremgangsmåde, der i det væsentlige er identisk med en i litteraturen beskrevet [J. Goerdler og G. Gnad, Chem. Ber. 99, 1618 (1966)].

#### 5-benzamido-1,2,3-thiadiazol

Til en omrørt opløsning af benzoylisothiocyanat (50,6 g, 310 mmol) i kommerciel vandfri ether (400 ml) holdt ved 0° og i nitrogen atmosfære sattes dråbevis under kraftig omrøring 0,685 N etherisk diazomethan (453 ml, 310 mmol). Da tilsætningen var afsluttet omrørtes blandingen i 1 time ved 0°, det faste stof opsamledes ved filtrering, og tørredes i vakuum. Smeltepunktet af det rå materiale (23,3 g), der herved opnåedes iagttoges at ligge et eller andet sted i området 232-257°. Goerdler har angivet smeltepunkt 267° for det rene materiale. Et lille andet udbytte (2,1 g) opnåedes ved inddampning af modervæsken i vakuum. Det totale udbytte var derfor 40%.

#### 1,2,3-triazol-5-thiol

En opløsning af den ovennævnte benzamido-forbindelse (8,2 g, 40 mmol) i 2N natriumhydroxid (80 ml, 160 mmol) opvarmedes ved tilbagesvalings-temperatur i en nitrogen atmosfære i 24 timer. Opløsningen afkølede til 0° i is og koncentreret saltsyre (26 ml) tilsattes, mens en kontinuert strøm af nitrogen ledtes gennem opløsningen. Benzoesyren, der udfældede, opsamledes ved filtrering; filtratet mættedes med natriumchlorid og den yderligere benzoesyre, som udskilte, fjernedes ved filtrering. Filtratet ekstraheredes straks med ethylacetat, ekstrakten udvaskedes med mættet saltopløsning, tørredes over magnesiumsulfat og inddampedes dernæst i vakuum. Den tilbageblevne viskose olie fordampdestilleredes umiddelbart i vakuum (70-75°/0,001 mm), hvilket gav en olie (2,84 g, 70%), der størknede (smeltepunkt 52-59°; Goerdler angav smeltepunkt 60°) spontant.

#### Kalium 1,2,3-triazol-5-thiolat

Til en opløsning af den ovennævnte thiol (2,84 g, 28,1 mmol) i absolut ethanol (28 ml) sattes 1,93 N alkoholisk kaliumhydroxid-opløsning (14,5 ml). Opløsningen fortyndedes dernæst med vandfri ether, indtil udkrystallisation af saltet var tilendebragt. Det faste stof opsamledes ved filtrering, udvaskedes med ether og tørredes i vakuum. Det på denne måde opnåede salt (3,65 g, 93%) havde smeltepunkt 225° med dekomponering.

#### 7-amino-3-[S-(1,2,3-triazol-5-yl)-thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylsyre (4h)

10 g (0,075 mol) 5-mercapto-1,2,3-triazol som kaliumsalt sattes

til en omrørt opslæmning af 19 g (0,07 mol) rensed 7-aminocephalosporansyre og 5,9 g (0,07 mol)  $\text{NaHCO}_3$  i 350 ml 0,1M phosphatpuffer (pH-værdi 6,4), og blandingen opvarmedes og omrørtes ved  $55^\circ\text{C}$  i 3 1/2 time under nitrogenatmosfære. Den resulterende opløsning afkøledes til  $22^\circ\text{C}$ , og pH-værdien indstilledes på 5,5 med 40%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Det resulterende bundfald frafiltreredes, udvaskedes med koldt vand (50 ml) og lufttørredes. Udbyttet af 7-amino-3-[S-(1,2,3-triazol-5-yl)thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylsyre var 8 g, dekomponeringspunkt  $230^\circ\text{C}$ . IR analyse viste nogen dekomponering af  $\beta$ -lactamringen, men stoffet anvendtes som det var i det følgende trin.

Analyse beregnet for  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}_2$ : C, 38,39; H, 3,54;

Fundet: C, 38,36; H, 3,78.

Rensning af 7-amino-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (4h)

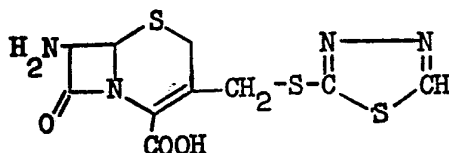
Rå 7-amino-3-(1,2,3-triazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (16,1 g) indeholdende ca. 20 molprocent 7-aminocephalosporansyre som en urenhed, bragtes i opløsning med 600 ml methanol og 40 ml koncentreret HCl. Efter carbonbehandling fortyndedes opløsningen med 1,5 liter isvand og ekstraheredes en gang med ethylacetat. Den vandige fase koncentreredes ved reduceret tryk til fjernelse af methanol. Det kolde vandige koncentrat indstilledes dernæst langsomt på pH-værdien 4,0 med 20% natriumhydroxid, hvilket bevirkede, at produktet udkrystalliserede. Produktet opsamledes ved filtrering, udvaskedes med vand og methanol og tørredes i vakuum over phosphopentoxid; 11,4 g. NMR-spektret indikerede, at dette produkt indeholdt ca. 7 molprocent 7-aminocephalosporansyre som en urenhed.

Den ovennævnte rensningsprocedure gentoges på 11,4 g af produktet under anvendelse af 425 ml methanol, 28 ml koncentreret HCl og 1 liter isvand, hvilket gav et udbytte på 8,0 g produkt. NMR-spektret var helt konsistent med det ønskede produkt og viste ingen spor af 7-aminocephalosporansyre som en urenhed.

Analyse beregnet for  $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}_2$ : C, 38,42; H, 3,55; N, 22,40.

Fundet: C, 39,06; H, 3,56; N, 22,05;  $\text{H}_2\text{O}$  1,78.  
38,53            3,51            21,60

7-amino-3-[2-(1,3,4-thiadiazolyl)-thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylsyre (4i)



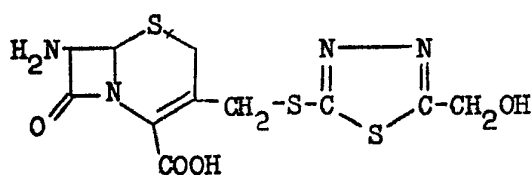
2-mercapto-1,3,4-thiadiazol

Den af J. Goerdeler, J. Ohm og O. Tegtmeyer i Berichte 89, 1534 (1956) beskrevne fremgangsmåde fulgtes. Til en opløsning af 160 ml 48% hydrogenbromidsyre og 100 mg pulveriseret kobber ved  $-7^{\circ}$  sattes langsomt alternerende 13,6 g (0,1 mol) 2-amino-1,3,4-thiadiazol (Eastman) og 32 g natriumnitrit i små portioner over et tidsrum af 1/2 time. Blandingen omrørtes i 1 1/2 time ved  $0^{\circ}$  og 1 time ved stuetemperatur. Dernæst neutraliseredes blandingen med 50% kaliumhydroxid til pH-værdi 9,5. Blandingen filtreredes, og filtratet ekstraheredes kontinuert med ether i 6 timer. Etheren inddampedes til 15 mm ( $25^{\circ}$ ) til et fast stof, der opløstes i 40 ml ethylalkohol og behandledes med 5 g thiourinstof. Opløsningen opvarmedes til tilbagesvaling i 1 1/2 time. En opløsning af 4,5 g kaliumhydroxid i 65 ml vand tilsattes, og blandingen opvarmedes ved tilbagesvaling i yderligere 1 1/2 time. Alkoholens afdampedes ved 15 mm ( $32^{\circ}$ ), og den vandige remanens neutraliseredes med koncentreret saltsyre til pH-værdien 3,5. Efter afkøling i 2 timer på isbad opsamledes der 3,5 g 2-mercapto-1,3,4-thiadiazol som gule krystaller, der vejede 3,5 g. Smeltepunkt  $125-127^{\circ}$ .

IR- og NMR-spektrene var konsistente med strukturen.

7-amino-3-[2-(1,3,4-thiadiazolyl)-thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylsyre (4i)

Til en suspension af 8,1 g (0,03 mol) 7-aminocephalosporansyre og 3,5 g (0,03 mol) 2-mercapto-1,3,4-thiadiazol i 200 ml 0,1 M phosphatpuffer (pH-værdi 6,5) sattes under omrøring 5,4 g (0,064 mol) natriumbicarbonat. Blandingen omrørtes ved  $55^{\circ}$  under nitrogen, og alt det faste stof opløstes. Omrøringen fortsattes 3 timer, og opløsningen afkøledes til  $5^{\circ}$  og indstilledes på pH-værdien med iseddikesyre. Blandingen opbevarede i 2 timer, og produktet 7-amino-3-[2-(1,3,4-thiadiazolyl)-thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylsyre opsamledes og vejede 9 g. Smeltepunkt  $>140^{\circ}$  (langsom dek.). IR- og NMR-spektrene var konsistente med strukturen.

7-amino-3-[2-(5-hydroxymethyl-1,3,4-thiadiazolyl)-thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylsyre (4j)

1-hydroxyacetylthiosemicarbazid

En blanding af 18,2 g (0,2 mol) thiosemicarbazid og 30,4 g (0,4 mol) glycolsyre opvarmedes sammen ved 80-90° i 2 timer under god omrøring. Blandingen afkøledes ved stuetemperatur og udvaskedes med kold absolut alkohol. Det faste stof opsamledes og lufttørredes til en vægt på 40 g. Produktet omkrystalliseredes fra 100 ml kogende 50% alkohol til opnåelse af et udbytte på 23 g krystallinsk 1-hydroxyacetylthiosemicarbazid. Smeltepunkt 189-190°.

Analyse beregnet for  $C_3H_7N_3OS$ : C, 24,18; H, 4,74; N, 28,21; S, 21,51.

Fundet: C, 24,08; H, 4,50; N, 27,67; S, 21,35.

IR- og NMR-spektrene var konsistente med strukturen.

2-acetoxymethyl-5-amino-1,3,4-thiadiazol

En blanding af 22,4 g (0,15 mol) 1-hydroxyacetylthiosemicarbazid og 60 ml acetylchlorid omrørtes ved stuetemperatur i 2 timer og opvarmedes dernæst til 40°, indtil alt det faste stof var opløst (ca. 2 timer). Acetylchloridet fjernedes under reduceret tryk 40° (15 min.), og remanensen omrørtes med 100 ml isvand. Blandingen indstilledes på pH-værdien 9,2 med 10% KOH, og produktet opsamledes. Det rå faste stof omkrystalliseredes fra absolut alkohol til et udbytte efter tørring i luft på 6 g krystallinsk 2-acetoxymethyl-5-amino-1,3,4-thiadiazol, smeltepunkt 191-192°C.

Analyse beregnet for  $C_5H_7N_3O_2S$ : C, 34,63; H, 4,07; N, 24,26.

Fundet: C, 35,16; H, 4,35; N, 24,38.

2-hydroxymethyl-5-mercapto-1,3,4-thiadiazol

Den af Goerdler m.fl. beskrevne fremgangsmåde fulgtes under anvendelse af 34,6 g (0,2 mol) 2-acetoxymethyl-5-amino-1,3,4-thiadiazol og 64 g (0,9 mol) natriumnitrit i 320 ml 48% hydrogenbromidsyre og 0,1 g pulveriseret kobber. Bromforbindelsen behandledes med 7,6 g (0,1 mol) thiourinstof og 11,2 g kaliumhydroxid i 25 ml vand. Efter at blandingen var gjort sur med 6N saltsyre, ekstraheredes mercaptanen i ethylacetat og behandledes med 17 g kalium 2-ethylhexanoat. Kaliumsaltet opsamledes, udvaskedes med ethylacetat og tørredes til en vægt på 12,2 g. Saltet omkrystalliseredes fra acetone-vand, hvilket gav 7,6 g krystallinsk kalium 2-hydroxymethyl-5-mercapto-1,3,4-thiadiazol. Smeltepunkt 130-131°C.

Analyse beregnet for  $C_3H_3KN_2S_2O \cdot H_2O$ : C, 17,64; H, 2,46; N, 13,70.

Fundet: C, 17,81; H, 2,43; N, 13,66.

IR- og NMR-spektrene var konsistente med strukturen.



NMR:  $\delta$   $\text{DMSO-d}_6$  1,23 (9H, s, t-Bu-H), 1,96 (3H, s, 3-OAc), 4,48 (1H, d, 13 Hz, 3-CH<sub>2</sub>), 4,83 (1H, d, 13 Hz, 3-CH<sub>2</sub>), 4,89 (1H, d, 4 Hz, 6-H), 5,48 (1H, d-d, 4 og 8 Hz, 7-H), 8,5 (1H, d, 8 Hz, CONH).

Analyse beregnet for C<sub>24</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S. 1/2 H<sub>2</sub>O:

C, 54,12; H, 6,43; N, 7,88; S, 6,02.

Fundet:

C, 54,16; H, 6,19; N, 8,36; S, 5,61.  
54,07; 6,22; 8,34; 5,79.

7-[ $\alpha$ -(2-aminomethyl-1-cyclohexenyl)acetamido]cephalosporansyre (6w)

En blanding af trifluoreddikesyre (2 ml) og stof 5w (1,20 g, 2,3 mmol) omrørtes i 30 minutter ved stuetemperatur og fortyndedes med ether (50 ml) til udfældning af trifluoracetat, der opslæmmedes i vand (2 ml). Blandingen indstilledes til pH-værdi 6 med ammoniumhydroxid og fortyndedes med acetonitril (200 ml) til udfældning af stof 6w. Udbytte 0,68 g (69%). Smeltepunkt 250-260°C (dek.).

IR:  $\nu_{\text{max}}^{\text{nuj}}$  1800, 1735, 1625, 1570, 1230 cm<sup>-1</sup>.

UV:  $\lambda_{\text{max}}^{1\%K_2CO_3}$  255 nm ( $\epsilon$ , 7100).

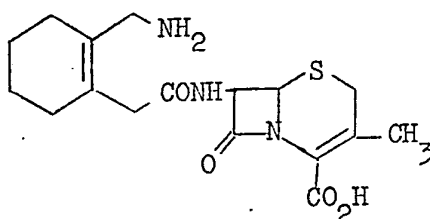
Analyse beregnet for C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S.1/2 H<sub>2</sub>O:

C, 52,76; H, 6,05; N, 9,71; S, 7,41.

Fundet:

C, 52,36; H, 6,09; N, 9,74; S, 7,71.  
52,15; 6,06; 9,71; 7,81.

Opløseligheden var 5,4 (BA) og 5,3 (UV).



6x

7-[ $\alpha$ -(2-t-butoxycarbonylaminoethyl-1-cyclohexenyl)-acetamido]desacetoxy-cephalosporansyre (5x)

En blanding af [2-(N-t-butoxycarbonylamino)-methyl-1-cyklohexen-1-yl]-eddikesyre (1,08 g, 4 mmol), 2,4 dinitrophenol (0,74 g, 4 mmol) og DCC (0,82 g, 4 mmol) i THF (20 ml) omrørtes i 1 time ved stuetemperatur og filtreredes til fjernelse af udfældet dicyclohexylurinstof, der vaskedes med THF (10 ml). Det forenede filtrat og vaske-

væskerne hældtes i en portion ved 5°C i en opløsning af 7-ADCA (4x) (0,64 g, 3 mmol) og triethylamin (0,81 g, 8 mmol) i 50% vandig THF (20 ml). Reaktionsblandingen omrørtes ved stuetemperatur i 18 timer og vaskedes med ether (2 x 50 ml). Det vandige lag gjordes surt til pH-værdi 2 med fortyndet HCl og ekstraheredes med ethylacetat (2 x 50 ml). De forenede ekstrakter vaskedes med vand (50 ml), behandlede med en lille smule carbon og tørredes over vandfri Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Inddampning af opløsningsmidlet under reduceret tryk gav en olieagtig remanens, der størknede ved triturering i ether - n-hexan (1:1, 100 ml), hvilket gav stof 5x. Udbytte 0,88 g (63%). Smeltepunkt 120-127°C (dek.).

IR:  $\gamma_{\max}^{\text{nuj}}$  1780, 1680, 1520, 1250, 1160 cm<sup>-1</sup>

NMR:  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{DMSO-d}_6}$  1,35 (9H, s, t-Bu-H), 1,98 (3H, s, 3-CH<sub>3</sub>), 4,86 (1H, d, 4 Hz, 6-H), 5,40 (1H, d-d, 4 og 8 Hz, 7-H), 8,50 (1H, d, 8 Hz CONH).

Analyse beregnet for C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S:

C, 56,76; H, 6,71; N, 9,03; S, 6,89.

Fundet:

C, 56,21; H, 6,65; N, 8,98; S, 6,71.  
56,21; 6,77; 9,04; 7,00.

7-[ $\alpha$ -(2-aminomethyl-1-cyclohexenyl)acetamido]-desacetoxycephalosporan-syre (6x)

Til en afkølet (0°C) trifluoreddikesyre (2 ml) sættes stof 5x (0,84 g, 1,8 mmol), og blandingen omrørtes i 1/2 time ved stuetemperatur. Blandingen fortyndedes med ether (50 ml) til udfældning af trifluoracetatet, der opslæmmedes i vand (2 ml). Blandingen indstilledes til pH-værdi 6 med ammoniumhydroxid og fortyndedes med acetonitril (200 ml), hvilket gav stof 6x, der vaskedes med acetonitril (20 ml). Udbytte 0,48 g (73%). Smeltepunkt 240-245°C (dek.).

IR:  $\gamma_{\max}^{\text{nuj}}$  3580, 3300, 1750, 1640, 1525 cm<sup>-1</sup>.

UV:  $\lambda_{\max}^{1\%K_2CO_3}$  260 nm ( $\epsilon$ , 6500).

Analyse beregnet for C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S.H<sub>2</sub>O:

C, 53,24; H, 6,57; N, 10,95; S, 8,36.

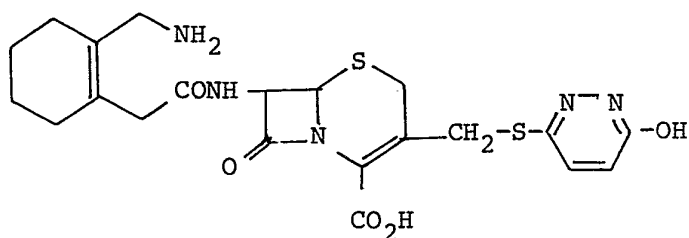
Fundet:

C, 53,83; H, 6,06; N, 11,08; S, 8,75.  
53,87; 6,23; 10,99; 9,01.

Opløseligheden var 4,1 (BA) og 3,3 (UV).

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen belyses i det følgende nærmere ved udførelseseksempler.

Eksempel 1



6a

7-[ $\alpha$ -(2-t-butoxycarbonylaminomethyl-1-cyclohexenyl)-acetamido]-3-(6-hydroxypyridazin-3-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (5a)

En blanding af [2-(N-t-butoxycarbonylamino)-methyl-1-cyklohexen-1-yl]-eddikesyre (1,08 g, 4 mmol, 2,4-dinitrophenol (0,74 g, 4 mmol) og DCC (0,82 g, 4 mmol) i THF (20 ml) omrørtes i 1 time ved stuetemperatur og filtreredes til fjernelse af udfældet dicyclohexylurinstof, der udvaskedes med THF (10 ml). Det kombinerede filtrat og vaskevæskerne afkøledes ved 5 °C og hældtes i en portion i en kold opløsning af 7-amino-3-(6-hydroxypyridazin-3-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (1,02 g, 3 mmol) og triethylamin (0,81 g, 8 mmol) i 50% vandig THF (20 ml). Blandingen omrørtes natten over ved stuetemperatur og udvaskedes med ether (2 x 50 ml). Det vandige lag gjordes surt til pH-værdi 2 med fortyndet HCl til udfældning af rå 5a, der opløstes i THF (100 ml) og filtreredes til fjernelse af uopløseligt materiale. Filtratet behandledes med en lille smule carbon og tørredes over vandfri natriumsulfat. Inddampning af opløsningsmidlet under reduceret tryk gav stof 5a, som en olieagtig remanens, der størknede ved triturering i ether (100 ml). Udbytte 0,84 g (47%). Smeltepunkt 185-195 °C (dek.).

IR:  $\gamma$   $\frac{\text{nuj}}{\text{max}}$  3250, 1780, 1660, 1580, 1430, 1370, 1250, 1160  $\text{cm}^{-1}$ .

NMR:  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{DMSO-d}_6}$  1,40 (9H, s, t-Bu-H), 5,13 (1H, d, 4Hz, 6-H), 5,70 (1H, d-d, 4 og 8 Hz, 7-H), 6,88 (1H, d, 10 Hz, pyridazin-H), 7,45 (1H, d, 10 Hz, pyridazin-H), 9,0 (1H, d, 8 Hz, CONH), 13,2 (1H, br-s, -OH).

Analyse beregnet for  $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_2 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$ :

C, 51,98; H, 5,70; N, 11,65; S, 10,67.

Fundet:

C, 51,53; H, 5,63; N, 11,28; S, 11,48  
51,56      5,80      11,34      11,31

7-[ $\alpha$ -(2-aminomethyl-1-cyclohexenyl)acetamido]-3-(6-hydroxypyridazin-3-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (6a)

Til trifluoreddikesyre (1,5 ml) sættes stof 5a (0,80 g, 1,4 mmol) og blandingen omrørtes i 30 minutter ved stuetemperatur og fortyndedes med ether (50 ml) til udfældning af trifluoracetatet af stof 6a, der opsamledes ved filtrering og opslæmmedes i vand (2 ml). Blandingens indstilledes på pH-værdien 6 med ammoniakvand og fortyndedes med acetonitril (200 ml) til udfældning af stof 6a. Udbytte 0,64 g (93%). Smeltepunkt 200-208 (dek.).

IR:  $\gamma_{\text{max}}^{\text{nuj}}$  1780, 1680 - 1640, 1580  $\text{cm}^{-1}$ .

UV:  $\lambda_{\text{max}}^{1\% \text{K}_2\text{CO}_3}$  255 nm ( $\epsilon$ , 14100).

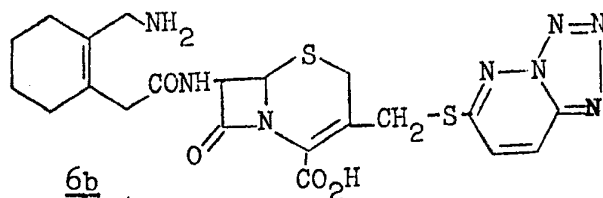
Analyse beregnet for  $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}_2 \cdot 3/2 \text{H}_2\text{O}$ :

C, 45,48; H, 5,82; N, 12,63; S, 11,56.

Fundet:

C, 45,73; H, 4,50; N, 12,45; S, 11,83.  
45,83;      4,47;      12,59;      12,06.

Eksempel 2



7-[ $\alpha$ -(2-t-butoxycarbonylaminomethyl-1-cyclohexenyl)-acetamido]-3-(pyridazin[2,3-d]tetrazol-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (5b)

En blanding af [2-(N-t-butoxycarbonylamino)-methyl-1-cyclohexen-1-yl]-eddikesyre (1,08 g, 4 mmol), 2,4-dinitrophenol (0,74 g,

4 mmol) og DCC (0,82, 4 mmol) i THF (20 ml) omrørtes i 1 time ved stuetemperatur og filtreredes til fjernelse af dicyclohexylurinstof, der udvaskedes med THF (10 ml). Det kombinerede filtrat og vaskevæsken afkøledes ved 5°C og hældtes i en opløsning af 7-amino-3-(pyridazin[2,3-d]tetrazol-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (4b) (1,08 g, 3 mmol) og triethylamin (0,81 g, 8 mmol) i 50% vandig THF (20 ml) ved 5°C. Blandingen omrørtes natten over ved stuetemperatur og vaskedes med ether (2 x 50 ml). Det vandige lag gjordes surt til pH-værdien 2 med fortyndet HCl og ekstraheredes med ethylacetat (3 x 50 ml). De forenede ekstrakter vaskedes med vand (50 ml), behandlede med carbon og tørredes over vandfri Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Fjernelse af opløsningsmidlet under reduceret tryk gav 5b som en olie, der størknede ved triturering med ether (50 ml). Produktet opsamledes ved filtrering, vaskedes med ether og tørredes. Udbytte 0,94 g (51%). Smeltepunkt 125-134°C (dek.).

IR:  $\gamma_{\max}^{\text{KBr}}$  1780, 1680, 1520, 1370, 1250, 1160 cm<sup>-1</sup>.

NMR:  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{DMSO-d}_6}$  1,40 (9H, s, t-Bu-H), 4,23 (1H, d, 14 Hz, 3-CH<sub>2</sub>S), 4,70 (1H, d, 15 Hz, 3-CH<sub>2</sub>S), 5,15 (1H, d, 4 Hz, 6-H), 5,78 (1H, d-d, 4 og 8 Hz, 7-H), 7,88 (1H, d, 10 Hz, pyridazin-H), 8,75 (1H, d, 10 Hz, pyridazin-H), 9,0 (1H, d, 8 Hz, 7-CONH).

Analyse beregnet for C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>8</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>: C, 50,64; H, 5,23; S, 10,40.

Fundet: C, 50,36; H, 5,11; S, 9,60.  
50,42; 5,21;

7-[ $\alpha$ -(2-aminomethyl-1-cyclohexenyl)acetamido]-3-(pyridazin[2,3-d]tetrazol-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (6b)

Til trifluoreddikesyre (1,5 ml) sattes stof 5b (0,90 g, 1,5 mmol) ved 0°C, og blandingen omrørtes i 30 minutter ved stuetemperatur. Blandingen fortyndedes med ether (50 ml) til udfældning af trifluoracetat, der opsamledes ved filtrering og suspenderedes i vand (2 ml). Suspensionen indstilledes til pH-værdi 6 med ammoniumhydroxid og fortyndedes med acetonitril (200 ml) til udfældning af stof 6b, der opsamledes ved filtrering og tørredes. Udbytte 0,65 g (83%). Smeltepunkt 184-188°C (dek.)

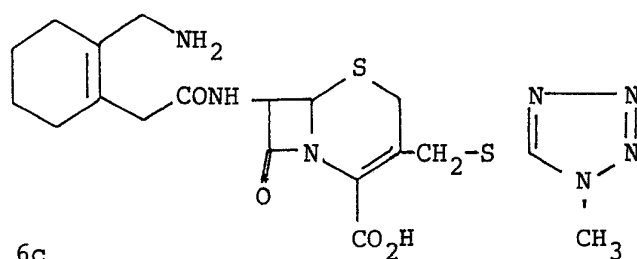
IR:  $\gamma_{\max}^{\text{nuj}}$  1780, 1620, 1570 cm<sup>-1</sup>

UV:  $\lambda_{\max}^{1\%K_2CO_3}$  245 nm ( $\epsilon$ , 18500), 255 nm (sh) ( $\epsilon$ , 16300), 275 nm (sh) ( $\epsilon$ , 10700), 315 nm (sh) ( $\epsilon$ , 4700).

Analyse beregnet for C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>8</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>·1/2H<sub>2</sub>O:

C, 47,99; H, 4,79; N, 21,32; S, 12,20.

Fundet: C, 48,21; H, 4,61; N, 20,68; S, 11,47.  
47,90; 4,67; 20,63;

Eksempel 3

7- {2-[(N-t-butoxycarbonylamino)methyl-1-cyclohexen-1-yl]-acetamido} -  
3-(1-methyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (5c)

En blanding af [2-(N-t-butoxycarbonylamino)-methyl-1-cyklohexen-1-yl]-eddikesyre (1,30 g, 4,8 mmol) 2,4-dinitrophenol (0,88 g, 4,8 mmol) og DCC (0,99 g, 4,8 mmol) i THF (20 ml) omrørtes i 1 time ved stuetemperatur til udfældning af dicyclohexylurinstof, der fjernedes ved filtrering, og der vaskedes med THF (5 ml). Det forenede filtrat og vaskevæske hældtes på en kold opløsning af 7-amino-3-(1-methyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (4c) (1,31 g, 4 mmol) og triethylamin (1,01 g, 10 mmol) i 50% vandig THF under omrøring ved 5°C. Blandingen omrørtes natten over ved stuetemperatur, inddampedes under reduceret tryk under 40°C og vaskedes grundigt med ether (3 x 30 ml). Det vandige lag gjordes surt til pH-værdien 2 med fortyndet saltsyre og ekstraheredes med ethylacetat (4 x 500 ml). De forenede ekstrakter behandledes med en lille mængde carbon og tørredes. Fjernelse af opløsningsmidlet under 40°C under reduceret tryk gav en olieagtig remanens, der størknede ved triturering med ether (100 ml), hvilket gav 1,33 g af stof 5c. Smeltepunkt 146-159°C (dek.).

IR:  $\gamma_{\max}^{\text{nuj}}$  1780, 1700 (sh), 1680, 1520, 1240, 1155  $\text{cm}^{-1}$ .

NMR:  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{DMSO-d}_6}$  1,42 (9H, s, t-butyl-H), 1,5-1,7 (4H, m, alifatisk methylen-H), 1,8-3,3 (4H, m, allylisk methylen-H), 4,12 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 5,15 (1H, d, 5 Hz, 6-H), 5,80 (1H, d-d 5 og 8 Hz, 7-H), 6,85 (1H, br-s, NHBOC), 9,00 (1H, d, 8 Hz, CONH).

Analyse beregnet for C<sub>24</sub>H<sub>33</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>:

C, 49,73; H, 5,74; N, 16,91; S, 11,06.

Fundet:

C, 49,46; H, 5,53; N, 16,00; S, 11,01.  
49,46; 5,62; 15,97.

7-[(2-aminomethyl-1-cyclohexen-1-yl)acetamido]-3-(1-methyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (6c)

En blanding af trifluoreddikesyre (2 ml) og stof 5c (1,30 g, 2,4

mmol) omrørtes magnetisk i 30 minutter ved stuetemperatur. Blandingen fortyndedes med ether (50 ml) til udfældning af trifluoracetatet af stof 6c. Trifluoracetatet suspenderedes i en lille smule vand (2 ml) og suspensionen indstilledes til pH-værdien 6 med ammoniumhydroxid og fortyndedes med acetonitril (200 ml), hvilket gav stof 6c, der vaskedes med acetonitril (50 ml) og tørredes. Smeltepunkt 194-207°C (dek.). Udbytte 0,80 g (69%).

IR:  $\nu_{\max}^{\text{nuj}}$  1770, 1630, 1590, 1370  $\text{cm}^{-1}$ .

UV:  $\lambda_{\max}^{1\%K_2CO_3}$  270 nm ( $\xi$ , 10000).

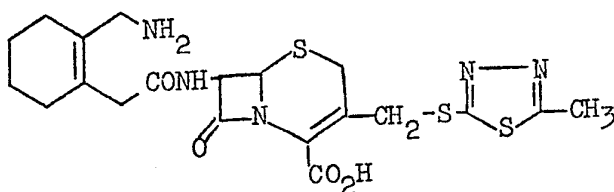
Analyse beregnet for  $C_{19}H_{25}N_7O_4S_2 \cdot H_2O$ :

C, 45,86; H, 5,47; N, 19,70; S, 12,89.

Fundet:

C, 45,89; H, 5,26; N, 19,74; S, 12,49  
46,18; 5,28; 19,82.

#### Eksempel 4



6d

#### 7-[ $\alpha$ -(2-t-butoxycarbonylaminoethyl-1-cyclohexenyl)-acetamido]-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (5d)

En blanding af [2-(N-t-butoxycarbonylamino)-methyl-1-cyklohexen-1-yl]-eddikesyre (1,08 g, 4 mmol), 2,4-dinitrophenol (0,74 g, 4 mmol) og DCC (0,82 g, 4 mmol) i THF (20 ml) omrørtes i 1 time ved stuetemperatur og filtreredes til fjernelse af dicyclohexylurinstoffet, der vaskedes med THF (10 ml). Det forenede filtrat og vaskevæske afkøledes ved 5°C og hældtes i en portion i en kold (5°C) opløsning af 7-amino-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (4d) (0,94 g, 3 mmol) og triethylamin (0,81 g, 8 mmol) i 50% vandig THF (20 ml). Reaktionsblandingen omrørtes natten over ved stuetemperatur og vaskedes med ether (2 x 50 ml). Det vandige lag gjordes surt til pH-værdien 2 med fortyndet HCl og ekstraheredes med ethylacetat (3 x 50 ml). De forenede ekstrakter vaskedes med vand (50 ml), behandledes med en lille smule carbon, tørredes med  $Na_2SO_4$  og inddampedes under reduceret tryk til opnåelse af en olieagtig remanens, der størknede ved triturering med ether - n-hexan (1:1, 100 ml). Produktet 5d opsamledes

ved filtrering, vaskedes med n-hexan (50 ml) og tørredes. Udbytte 1,29 g (72%). Smeltepunkt 95-102°C (dek.).

IR:  $\gamma_{\max}^{\text{nuj}}$  1780, 1680, 1520, 1245, 1160  $\text{cm}^{-1}$ .

NMR:  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{DMSO-d}_6}$  1,30 (9H, s, t-Bu-H), 2,58 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 4,03 (1H, d, 14 Hz, 3-CH<sub>2</sub>S), 4,38 (1H, d, 14 Hz, 3-CH<sub>2</sub>S), 4,88 (1H, d, 4 Hz, 6-H), 5,46 (1H, d-d, 4 og 8 Hz, 7-H), 8,54 (1H, d, 8 Hz, CONH).

Analyse beregnet for C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S<sub>3</sub>:

C, 50,40; H, 5,58; N, 11,76.

Fundet:

C, 50,76; H, 5,67; N, 11,27.  
50,98      5,67      11,28.

7-[ $\alpha$ -(2-aminomethyl-1-cyclohexenyl)acetamido]-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (6d)

En blanding af trifluoreddikesyre (2 ml) og stof 5d (1,20 g, 2 mmol) omrørtes i 30 minutter ved stuetemperatur og fortyndedes med ether (50 ml) til udfældning af trifluoracetatet af stof 6d. Trifluoracetatet opslæmmedes i vand (2 ml), indstilledes til pH-værdien 6 med ammoniumhydroxid og fortyndedes med acetonitril (200 ml) til udfældning af stof 6d. Udbytte 0,75 g (76%). Smeltepunkt 215-220°C (dek.).

IR:  $\gamma_{\max}^{\text{nuj}}$  1760, 1640, 1580  $\text{cm}^{-1}$

UV:  $\lambda_{\max}^{1\%K_2CO_3}$  276 nm ( $\epsilon$ , 13400).

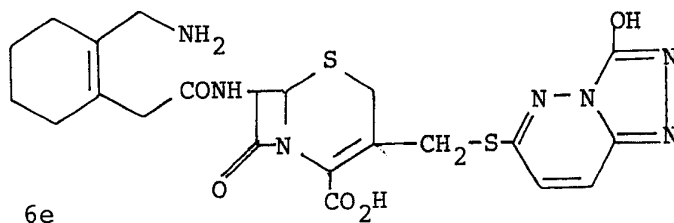
Analyse beregnet for C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S<sub>3</sub>·1/2H<sub>2</sub>O:

C, 47,60; H, 5,19; N, 13,87; S, 19,06.

Fundet:

C, 47,14; H, 4,96; N, 13,61; S, 18,66.  
47,23;      5,07;      13,70.

Eksempel 5



7-[ $\alpha$ -(2-t-butoxycarbonylaminomethyl-1-cyclohexenyl)-acetamido]-3-(3-hydroxypyridazin-[3,2-c]-s-triazol-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (5e)

En blanding af [2-(N-t-butoxycarbonylamino)-methyl-1-cyklohexen-1-yl]-eddikesyre (1,08 g, 4 mmol, 2,4-dinitrophenol (0,74 g,

4 mmol) og DCC (0,82 g, 4 mmol) i THF (20 ml) omrørtes i 1 time ved stuetemperatur og filtreredes til fjernelse af det udfældede dicyclohexylurinstof, der vaskedes med THF (10 ml). Det forenede filtrat og vaskevæske afkøledes ved 5°C og hældtes i en portion i en kold (5°C) opløsning af 7-amino-3-(3-hydroxypyridazin[3,2-c]-s-triazol-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (1,14 g, 3 mmol) og triethylamin (0,81 g, 8 mmol) i 50% vandig THF (20 ml). Blandingen omrørtes natten over ved stuetemperatur og vaskedes med ether (2 x 50 ml). Det vandige lag gjordes surt til pH-værdien 2 med fortyndet HCl. Bundfaldet opløstes ved 50°C i THF (100 ml), behandlede med en lille smule carbon og tørredes med vandfri Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Inddampning af opløsningsmidlet under reduceret tryk gav en olieagtig remanens, der størknede ved triturering med ether (50 ml), hvilket gav stof 5e. Udbytte 0,85 g (45%). Smeltepunkt 190-198°C (dek.).

IR:  $\gamma_{\max}^{\text{KBr}}$  1780, 1700, 1520, 1350, 1250, 1160 cm<sup>-1</sup>.

NMR:  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{DMSO-d}_6}$  1,40 (9H, s, t-Bu-H), 5,20 (1H, d, 4 Hz, 6-H), 5,80 (1H, m, 7-H), 7,10 (1H, d, 10 Hz, pyridazin-H), 7,80 (1H, d, 10 Hz, pyridazin-H).

Analyse beregnet for C<sub>27</sub>H<sub>33</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>·1/2H<sub>2</sub>O:

C, 50,61; H, 5,35; S, 10,01.

Fundet:

C, 50,59; H, 5,40; S, 9,57.  
50,68; 5,59; 9,55.

7-[ $\alpha$ -(2-aminomethyl-1-cyclohexenyl)acetamido]-3-(3-hydroxypyridazin[3,2-c]-3-triazol-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (6e)

En blanding af trifluoreddikesyre (2 ml) og stof 5e (0,81 g, 1,3 mmol) omrørtes i 30 minutter ved stuetemperatur og fortyndedes med ether (50 ml) til udfældning af trifluoracetatet af stof 6e. Trifluoracetatet opslæmmedes i vand (2 ml). Blandingen indstilledes til pH-værdi 6 med ammoniumhydroxid og fortyndedes med acetonitril (200 ml), hvilket gav stof 6e. Udbytte 0,57 g (82%). Smeltepunkt 225-234°C (dek.).

IR:  $\gamma_{\max}^{\text{nuj}}$  1770, 1710, 1630, 1545 cm<sup>-1</sup>.

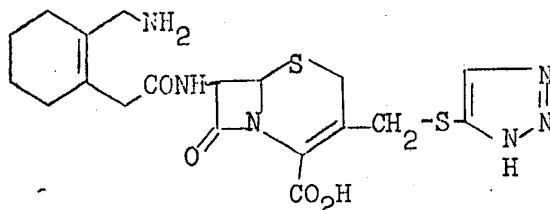
UV:  $\lambda_{\max}^{\text{1\%K}_2\text{CO}_3}$  260 nm ( $\epsilon$ , 18100), 305 nm (sh) ( $\epsilon$ , 6300).

Analyse beregnet for C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O:

C, 45,12; H, 5,34; N, 16,74; S, 10,94.

Fundet:

C, 45,28; H, 4,35; N, 16,56; S, 11,75  
45,44; 4,45; 16,66.

Eksempel 66h

7-[ $\alpha$ -(2-t-butoxycarbonylaminoethyl-1-cyclohexenyl)-acetamido]-3-(1H-1,2,3-triazol-4-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (5h)

En blanding af [2-(N-t-butoxycarbonylamino)-methyl-1-cyclohexen-1-yl]-eddikesyre (1,08 g, 4 mmol), 2,4-dinitrophenol (0,74 g, 4 mmol) og DCC (0,82 g, 4 mmol) i THF (20 ml) omrørtes i 1 time ved stuetemperatur og filtreredes til fjernelse af dicyclohexylurinstof, der vaskedes med THF (10 ml). Det forenede filtrat og vaskevæskerne hældtes i en portion ved 5°C i en opløsning af 7-amino-3-(1H-1,2,3-triazol-4-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (4h) (1,24 g, 4 mmol) og triethylamin (0,81 g, 8 mmol) i 50% vandig THF (20 ml). Reaktionsblandingen omrørtes natten over ved stuetemperatur og vaskedes med ether (2 x 50 ml). Det vandige lag gjordes surt til pH-værdi 2 med fortyndet saltsyre og ekstraheredes med ethylacetat (3 x 50 ml). De forenede ekstrakter vaskedes med vand (50 ml), behandlede med en lille smule carbon og tørredes over vandfri Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Fjernelse af opløsningsmidlet under reduceret tryk gav en olieagtig remanens, der størknede ved triturering med ether - n-hexan (1:1, 100 ml), hvilket gav 0,60 g (26%) stof 5h. Smeltepunkt 120-128°C (dek.).

IR:  $\gamma$   $\begin{matrix} \text{nuj} \\ \text{max} \end{matrix}$  1780, 1720, 1680, 1520, 1250, 1160 cm<sup>-1</sup>.

NMR:  $\delta$   $\begin{matrix} \text{DMSO-d}_6 \\ \text{ppm} \end{matrix}$  1,38 (9H, s, t-Bu-H), 5,08 (1H, d, 4 Hz, 6-H), 5,65 (1H, d-d, 4 og 8 Hz, 7-H), 8,00 (1H, s, triazol-H), 8,92 (1H, d, 8 Hz CONH).

Analyse beregnet for C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>·1/2H<sub>2</sub>O:

C, 50,25; H, 5,80; N, 14,65; S, 11,18.

Fundet:

C, 50,51; H, 5,73; N, 14,57; S, 10,05.  
50,69; 5,65; 14,25; 10,16.

7-[ $\alpha$ -(2-aminomethyl-1-cyclohexenyl)acetamido]-3-(1H-1,2,3-triazol-4-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (6h)

En blanding af trifluoreddikesyre (1 ml) og stof 5h (0,55 g, 0,98 mmol) omrørtes i 30 minutter ved stuetemperatur og fortyndedes med ether (50 ml), hvilket gav et bundfald, der opsamledes ved filtrering og opslæmmedes i en lille smule vand (2 ml). Blandingen indstilledes til pH-værdi 6 med ammoniumhydroxid og fortyndedes med acetonitril (200 ml) til udfældning af stof 6h, der vaskedes med acetonitril (50 ml). Udbytte 0,36 g (80%). Smeltepunkt 203-215°C (dek.).

IR:  $\gamma_{\max}^{\text{nuj}}$  1760, 1630, 1570  $\text{cm}^{-1}$ .

UV:  $\lambda_{\max}^{1\%K_2CO_3}$  266 nm ( $\epsilon$ , 8000).

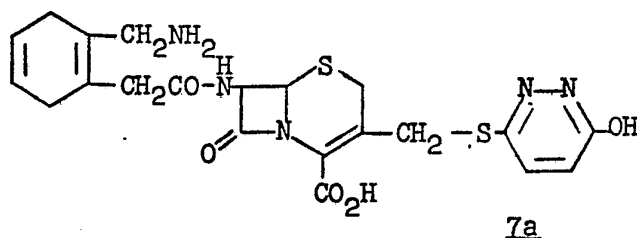
Analyse beregnet for  $C_{19}H_{24}N_6O_4S_2 \cdot 1 \frac{1}{2} H_2O$ :

C, 46,42; H, 5,54; N, 17,10; S, 13,04.

Fundet:

C, 46,06; H, 5,18; N, 18,06; S, 12,37  
46,16; 5,28; 18,02.

Eksempel 7



7-[ $\alpha$ -(2-t-butoxycarbonylaminomethyl-1,4-cyclohexadienyl)acetamido]-3-(3-hydroxypyridazin-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (6'a)

Til en omrørt opløsning af 1,1 g (4,1 mmol)  $\alpha$ -[2-(t-butoxycarbonylaminomethyl)-1,4-cyclohexadienyl]-eddikesyre (3) og 800 mg (4,4 mmol) 2,4-dinitrophenol i 40 ml ethylacetat sættes i en portion 0,9 g (4,4 mmol) N,N'-dicyclohexylcarbodiimid (DCC). Reaktionsblandingen omrørtes ved stuetemperatur i 3 timer. Det udskilte dicyclohexylurinstof frafiltreredes. Filtratet inddampedes til tørhed til opnåelse af den olieagtige aktiverede ester, der opløstes i 30 ml THF. Til opløsningen sættes en opløsning af 1,26 g (3,7 mmol) 7-amino-3-(3-hydroxypyridazin-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (4a) og 1,03 ml (7,4 mmol) triethylamin i 20 ml 50% THF. Blandingen omrørtes ved stuetemperatur i

18 timer og koncentreredes i vakuum til et volumen på 10 ml. Koncentratet udvaskedes med fem 100 ml portioner ether, gjordes surt med 6N saltsyre og ekstraheredes med seks 100 ml portioner ethylacetat. De forenede ekstrakter vaskedes med vand og en mættet NaCl-opløsning. Den tørrede opløsning koncentreredes til tørhed, hvilket gav 720 mg (33%) N-BOC-beskyttet cephalosporin 6'a, der smeltede ved 170°C (dek.).

IR:  $\gamma_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  1780, 1710, 1690, 1670, 1580, 1520, 1370, 1255, 1170  $\text{cm}^{-1}$ .

NMR:  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{DMSO-d}_6}$  1,34 (9H, s,  $\text{CH}_3\text{-C}(\text{C})$ ), 2,57 (4H, s,  $\text{H}_2\text{C}(\text{C})$ ), 3,03 (2H, s,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3,4 - 3,7 (4H, m, 2-H &  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 3,9 - 4,2 (2H, m, 3- $\text{CH}_2$ ), 4,98 (1H, d, 4,5 Hz, 6-H), 4,9 - 5,2 (3H, m,  $\text{H}$ ) ( & C-NH), 6,29 (1H, d, 9,5 Hz, pyridazin-H), 7,23 (1H, d, 9,5 Hz, pyridazin-H), 8,77 (1H, d, 7,5 Hz, CONH).

Analyse beregnet for  $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ :

C, 51,56; H, 5,16; N, 11,56; S, 10,59.

Fundet:

C, 51,43; H, 5,13; N, 11,66; S, 10,79.

7-[ $\alpha$ -(2-aminomethyl-1,4-cyclohexadienyl)acetamido]-3-(3-hydroxypyridazin-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (7a)

(A) En opløsning på 670 mg (1,13 mmol) af den BOC-beskyttede cephalosporin 6'a i 1,5 ml trifluoreddikesyre omrørtes ved 0°C i 1 time. Til opløsningen sattes 100 ml tør ether. Det resulterende bundfald opsamledes ved filtrering, suspenderedes i 20 ml vand og indstilledes til pH-værdi 6 med fortyndet ammoniumhydroxid, hvilket gav en viskos olie, der tritureredes med acetonitril, hvilket gav 380 mg (75,5%) af det ønskede produkt 7a, der smeltede ved 200-205°C (dek.).

IR:  $\gamma_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  1765, 1640, 1580, 1390, 1350  $\text{cm}^{-1}$ .

Analyse beregnet for  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}_2 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ : C, 50,59; H, 4,85; N, 14,05.

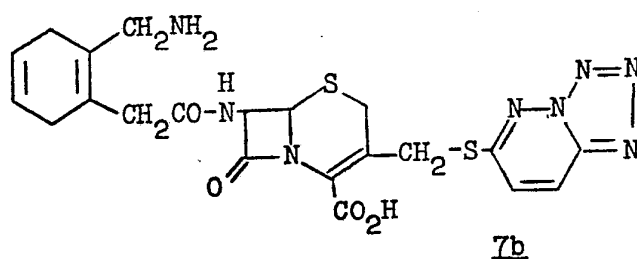
Fundet:

C, 50,95; H, 4,79; N, 13,10.

(B) Til en omrørt opslæmning af 1,1 g (3,6 mmol) natrium {2-[N-(1-carbethoxypropen-2-yl)aminomethyl]-1,4-cyclohexadienyl} acetat (4) i 20 ml tør tetrahydrofuran (THF) indeholdende en dråbe N,N-dimethylbenzylamin sattes 0,38 ml (3,95 mmol) ethylchlorformiat ved -10 til -5°C. Til den blandede anhydridopløsning sattes i en portion en opløsning af 1,02 g (3 mmol) 7-amino-3(3-hydroxypyridazin-6-ylthiomethyl)-

3-cephem-4-carboxylsyre (4a) i 10 ml 50 % vandig THF indeholdende 0,42 ml (3 mmol) triethylamin. Blandingen omrørtes i 30 minutter ved stuetemperatur, behandlede med aktivt carbon og filtreredes. Til filtratet sattes 3 ml myresyre, og blandingen omrørtes i 30 minutter ved stuetemperatur. Det resulterende bundfald frafiltreredes, vaskedes med vand og acetonitril, hvilket gav 570 mg af stof 7 a.

Eksempel 8



7- { [2-(N-t-butoxycarbonylaminomethyl)-1,4-cyclohexadienyl]-acetamido } -  
3-(tetrazolo[1,5-b]pyridazin-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (6<sup>b</sup>)

Til en omrørt opløsning af 3,2 g (0,012 mol) α-[2-(t-butoxycarbonylaminomethyl)-1,4-cyclohexadienyl]eddikesyre (3) og 0,3 g (0,0125 mol) 2,4-dinitrophenol i 50 ml THF sattes 2,6 g (0,0125 mol) DCC, og blandingen omrørtes i 1,5 time ved stuetemperatur. Det bundfældede urinstof fjernedes ved filtrering. En opløsning af 3,65 g (0,01 mol) 7-amino-3-(tetrazolo[1,5-b]pyridazin-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (4b) og 2,8 ml (0,02 mol) triethylamin i 100 ml vand sattes til den aktive esteropløsning. Blandingen omrørtes i 18 timer ved stuetemperatur. Det meste THF fjernedes under reduceret tryk under 40°C, og den tilbageblevne opløsning vaskedes med ether (3 x 50 ml) og gjordes sur med 6N HCl og ekstraheredes med ethylacetat (8 x 100 ml). De forenede ekstrakter vaskedes med vand (3 x 100 ml) og mattedes med NaCl-opløsning (2 x 100 ml) og inddampedes til tørhed. Den olieagtige remanens tritureredes med ether, hvilket gav 2,2 g (52%) stof 6<sup>b</sup>, der smeltede ved 165°C (dek.).

IR:  $\gamma_{\max}^{\text{nuj}}$  1770, 1710, 1670, 1510, 1240, 1150  $\text{cm}^{-1}$ .

Analyse beregnet for  $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_2$ :

C, 50,18; H, 4,92; N, 18,23; S, 10,43.

Fundet:

C, 51,05; H, 4,97; N, 17,24; S, 9,09.

7-[2-aminomethyl-1,4-cyclohexadienyl)acetamido]-3-(tetrazolo[1,5-b]-pyridazin-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (7b)

En blanding af 3,1 g (5,05 mmol) stof 6'b og 6 ml trifluoreddikesyre omrørtes i 1 time under afkøling og fortyndedes med 200 ml ether for at udskille trifluoracetatet af stof 7b, der opløstes i 5 ml vand, indstilledes til pH-værdi 6 med koncentreret  $\text{NH}_4\text{OH}$  og fortyndedes med 900 ml acetonitril. Det gule bundfald opsamledes ved filtrering og vaskedes med acetonitril, hvilket gav 2,3 g (88,5%) stof 7b, der smeltede ved  $210^\circ\text{C}$  (dek.). Omkrystallisation af 2 g af stof 7b fra 350 ml 50% THF gav 1,19 g lysegule nåle, der smeltede ved  $220-230^\circ\text{C}$  (dek.).  
IR:  $\nu_{\text{max}}^{\text{nuj}}$  1785, 1640, 1610,  $1570\text{ cm}^{-1}$ .

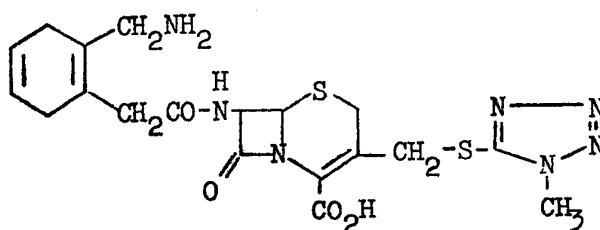
Analyse beregnet for  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}_4\text{S}_2, 1/2\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ :

C, 50,17; H, 4,76; N, 20,35; S, 11,64.

Fundet:

C, 50,17; H, 4,56; N, 19,59; S, 11,30.

Eksempel 9



7c

7-[(2-N-t-butoxycarbonylaminomethyl-1,4-cyclohexadienyl)-acetamido]-3-(1-methyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (6'c)

Til en omrørt opløsning af 3,2 g (0,012 mol)  $\alpha$ -[2-(t-butoxycarbonylaminomethyl)-1,4-cyclohexadienyl]-eddikesyre (3) og 2,3 g (0,012 mol) 2,4-dinitrophenol i 50 ml THF sættes i en portion 2,6 g (0,012 mol) DCC, og blandingen omrørtes i 1,5 time ved stuetemperatur. Det bundfældede urinstof fjernedes ved filtrering. Til filtratet sættes en opløsning på 3,28 g (0,01 mol) 7-amino-3-(1-methyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (4c) og 2,8 ml (0,02 mol) triethylamin i 100 ml vand, og blandingen omrørtes i 18 timer ved stuetemperatur. Det meste THF fjernedes under reduceret tryk under  $40^\circ\text{C}$ , og den tilbageblevne vandige opløsning vaskedes med ether (2 x 50 ml), gjordes sur med 6N HCl og ekstraheredes med ethylacetat (4 x 50 ml). De forenede ekstrakter vaskedes med vand (2 x 50 ml) og en mættet NaCl-opløsning

(2 x 50 ml), tørredes med  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  og inddampedes til tørhed. Den olieagtige remanens tritureredes med ether (100 ml), hvilket gav 2,3 g (48%) stof 6'c, der smeltede ved  $145^\circ\text{C}$  (dek.).

IR:  $\gamma_{\text{max}}^{\text{nuj}}$  1780, 1700, 1510, 1240, 1150  $\text{cm}^{-1}$ .

Analyse beregnet for  $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_7\text{O}_6\text{S}_2$ :

C, 49,90; H, 5,41; N, 16,97; S, 11,10.

Fundet:

C, 50,23; H, 5,23; N, 15,80; S, 12,43.

7-[(2-aminomethyl-1,4-cyclohexadienyl)acetamido]-3-(1-methyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (7c)

En blanding af 2,2 g (3,8 mmol) stof 6'c og 5 ml trifluoreddikesyre omrørtes i 1 time under afkøling og fortyndedes med 200 ml ether for at fjerne trifluoracetatet i stof 7c, der opløstes i 5 ml vand. Opløsningen indstilledes til pH-værdi 6 med koncentreret  $\text{NH}_4\text{OH}$  og fortyndedes med 200 ml acetonitril, hvilket gav det gule bundfald, der opsamledes ved filtrering, vaskedes med acetonitril til opnåelse af 1,5 g (82,5%) af stof 7c, der smeltede ved  $200^\circ\text{C}$  (dek.), der omkrystalliseredes fra 50% THF og gav lysegule nåle. Smeltepunkt  $210^\circ\text{C}$  (dek.).

IR:  $\gamma_{\text{max}}^{\text{nuj}}$  1785, 1640, 1615, 1570  $\text{cm}^{-1}$ .

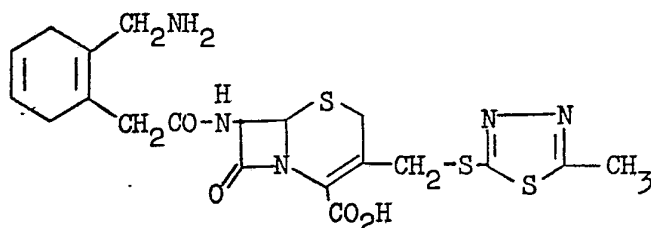
Analyse beregnet for  $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}_4\text{S}_2, 1/2\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ :

C, 49,11; H, 5,30; N, 19,09; S, 12,48.

Fundet:

C, 49,85; H, 5,20; N, 18,53; S, 12,26.

Eksempel 10



7d

7-[(2-N-t-butoxycarbonylaminomethyl-1,4-cyclohexadienyl)-acetamido]-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (6'd)

Til en omrørt opløsning af 900 mg (3,3 mmol)  $\alpha$ -[2-(t-butoxycarbonylaminomethyl)-1,4-cyclohexadienyl]eddikesyre (3) og 660 mg (3,6 mmol) 2,4-dinitrophenol i 40 ml THF sættes i en portion 740 mg (3,6 mmol) DCC, og blandingen omrørtes i 2 timer ved stuetemperatur. Det bundfæl-

dede urinstof fjernedes ved filtrering. Til filtratet sattes en opløsning af 1,03 g (3 mmol) 7-amino-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (4d) og 1,3 ml (9 mmol) triethylamin i 30 ml vand i en portion, og blandingen omrørtes i 18 timer ved stuetemperatur. THF fjernedes under reduceret tryk under 40°C, og koncentrationen vaskedes med ether (3 x 10 ml) og gjordes surt med 6N HCl og ekstraheredes med ethylacetat (5 x 10 ml). De forenede ekstrakter vaskedes successivt med vand (2 x 10 ml) og en mættet NaCl-opløsning (10 ml). Inddampning efterfulgt af triturering med ether gav 980 mg (55%) af stof 6'd.

IR:  $\gamma_{\max}^{\text{nuj}}$  1770, 1710, 1660, 1610, 1510, 1240, 1150  $\text{cm}^{-1}$ .

Analyse beregnet for  $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_3$ :

C, 50,57; H, 5,26; N, 11,80.

Fundet:

C, 50,51; H, 5,20; N, 11,46.

7-[(2-aminomethyl-1,4-cyclohexadienyl)acetamido]-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (7d)

(A) En blanding af 940 mg (1,58 mmol) af stof 6'd og 2 ml trifluoreddikesyre omrørtes i 1 time under afkøling og fortyndedes med 100 ml ether for at fjerne trifluoracetatet i stof 7d, der opløstes i 5 ml vand og 5 ml acetonitril. Opløsningen indstilledes til pH-værdi 6 med koncentreret  $\text{NH}_4\text{OH}$  og fortyndedes med 100 ml acetonitril. Det resulterende lysegule bundfald opsamledes ved filtrering og vaskedes med acetonitril (5 ml), hvilket gav 600 mg (77%) af stof 7d, der smeltede ved 230 - 240°C (dek.).

IR:  $\gamma_{\max}^{\text{nuj}}$  1790, 1650, 1580  $\text{cm}^{-1}$ .

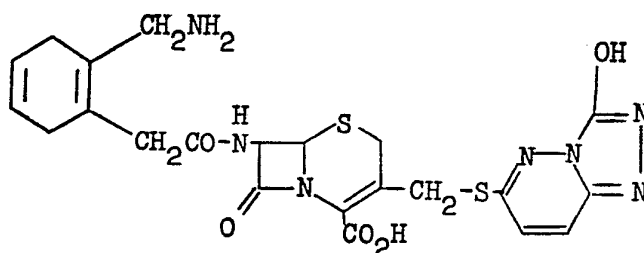
Analyse beregnet for  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_3$ :

C, 48,66; H, 4,70; N, 14,19; S, 19,49.

Fundet:

C, 49,24; H, 4,59; N, 13,88; S, 20,16.

(B) Til en omrørt opslæmning af 1,1 g (3,6 mmol) natrium {2-[N-(1-carbethoxypropen-2-yl)aminomethyl]-1,4-cyclohexadienyl} acetat (4) i 20 ml tør THF indeholdende en dråbe N,N-dimethylbenzylamin sattes 0,38 ml (3,95 mmol) ethylchlorformiat i løbet af 10 minutter ved -10 til -15°C. Til den blandede anhydridopløsning sattes i en portion en opløsning af 1,03 g (3 mmol) stof 4d i 10 ml 50% vandig THF indeholdende 0,42 ml (3 mmol) triethylamin, og blandingen omrørtes i 30 minutter ved stuetemperatur. Nogle få dråber myresyre tilsattes og blandingen filtreredes. Til filtratet sattes 200 ml ether og 3 ml myresyre. Bundfaldet opsamledes ved filtrering, vaskedes med vand og acetonitril, hvilket gav 1,1 g (62%) af stof 7d.

Eksempel 117e

7-[(2-N-t-butoxycarbonylaminomethyl)-1,4-cyclohexadienyl]acetamido]-3-(3-hydroxypyridazino[3,2-c]-s-triazol-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (6'e)

Til en omrørt blanding af 900 mg (3,3 mmol)  $\alpha$ -[2-(t-butoxycarbonylaminomethyl)-1,4-cyclohexadienyl]eddikesyre (3) og 660 mg (3,6 mmol) 2,4-dinitrophenol i 30 ml THF sættes i en portion 740 mg (3,6 mmol) DCC, og blandingen omrørtes i 2 timer ved stuetemperatur. Det udskilte urinstof frafiltreredes. Til den aktiverede esteropløsning sættes i en portion en opløsning af 1,13 g (3 mmol) 7-amino-3-(3-hydroxypyridazino[3,2-c]-s-triazol-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (4e) og 1,25 ml (9 mmol) triethylamin i 30 ml vand, og blandingen omrørtes i 18 timer ved stuetemperatur. THF afdestilleredes under reduceret tryk under 40°C, og remanensen vaskedes med ether (2 x 10 ml) og gjordes sur med 6N HCl og ekstraheredes med ethylacetat (5 x 10 ml). De forenede ekstrakter vaskedes med vand (2 x 10 ml) og en mættet NaCl-opløsning (10 ml) og inddampedes til tørhed. Remanensen tritureredes med ether hvilket gav 505 mg (27%) af stof 6'e, der smeltede ved 175 - 180°C (dek.).

IR:  $\gamma_{\text{max}}^{\text{nuj}}$  1770, 1700, 1510, 1200, 1150 cm<sup>-1</sup>.

Analyse beregnet for C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>:

C, 51,50; H, 4,96; N, 15,57; S, 10,18.

Fundet:

C, 51,61; H, 4,80; N, 14,47; S, 10,25.

7-[(2-aminomethyl)-1,4-cyclohexadienyl]acetamido]-3-(3-hydroxypyridazino[3,2-c]-s-triazol-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (7e)

Trifluoreddikesyre (1 ml) sættes til 470 mg (0,747 mmol) af stof 6'e, og blandingen omrørtes i 1 time under afkøling og fortyndedes med 100 ml ether for at fjerne trifluoracetatet i stof 7e, der opløstes i 5 ml vand og indstilledes til pH-værdi 6 med koncentreret NH<sub>4</sub>OH. En tilsætning af 100 ml acetonitril til blandingen gav et gult bundfald,

der opsamledes ved filtrering og vaskedes med acetonitril, hvilket gav 360 mg (91%) af stof 7e, der smeltede ved 210-220°C (dek).

IR:  $\gamma_{\max}^{\text{nuj}}$  1760, 1710, 1640, 1580  $\text{cm}^{-1}$ .

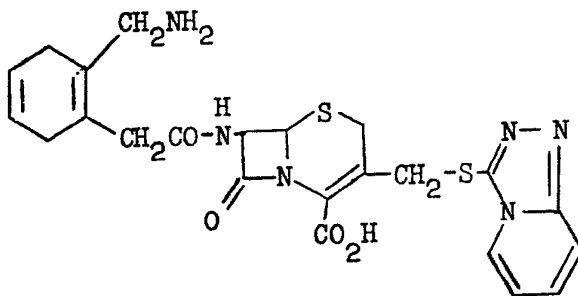
Analyse beregnet for  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}_5\text{S}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ :

C, 48,25; H, 4,60; N, 17,91; S, 11,71.

Fundet:

C, 48,75; H, 4,60; N, 16,56; S, 12,17.

Eksempel 12



7f

7-[2-N-t-butoxycarbonylaminomethyl-1,4-cyclohexadienyl]-acetamido]-3-(pyrido[2,1-c]-s-triazol-3-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (6'f)

DCC (740 mg, 3,6 mmol) sættes til en opløsning af 950 mg (3,3 mmol)  $\alpha$ -[2-(t-butoxycarbonylaminomethyl)-1,4-cyclohexadienyl]eddikesyre (3) og 660 mg (3,6 mmol) 2,4-dinitrophenol i 30 ml THF, og blandingen omrørtes i 1 time ved stuetemperatur, og urinstoffet frafiltreredes. Til filtratet sættes en opløsning af 1,1 g (3 mmol) 7-amino-3-(pyrido[2,1-c]-s-triazol-3-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (4f) og 1,25 ml (9 mmol) triethylamin i 30 ml vand, og blandingen omrørtes i 18 timer ved stuetemperatur. THF fjernedes under reduceret tryk under 40°C, og remanensen vaskedes med ether (2 x 10 ml), gjordes sur med 6N HCl og ekstraheredes med ethylacetat (5 x 10 ml). De forenede ekstrakter vaskedes med vand (2 x 10 ml) og en mættet NaCl-opløsning (10 ml) og inddampedes til tørhed under 40°C. Triturering af remanensen med ether gav 1,15 g (63%) af stof 6'f, der smeltede ved 145-150°C (dek.).

IR:  $\gamma_{\max}^{\text{nuj}}$  1770, 1680, 1510, 1240, 1150  $\text{cm}^{-1}$ .

Analyse beregnet for  $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_2$ :

C, 54,89; H, 5,26; N, 13,72; S, 10,47.

Fundet:

C, 53,84; H, 5,13; N, 13,12; S, 9,26.

7-[2-aminomethyl-1,4-cyclohexadienyl]acetamido]-3-(pyrido[2,1-c]-s-triazol-3-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (7f)

Trifluoreddikesyre (2,5 ml) sættes til den BOC-blokerede cephalosporin 6'f (1,1 g, 1,8 mmol) under omrøring i løbet af 1,5 time samt

afkøling, og blandingen fortyndedes med 100 ml ether for at fjerne tri-fluoracetatet i stof 7f, der opløstes i 5 ml vand, indstilledes til pH-værdi 6 med koncentreret  $\text{NH}_4\text{OH}$  og fortyndedes med 100 ml acetonitril. Det resulterende gule bundfald opsamledes ved filtrering, vaskedes med acetonitril, hvilket gav 700 mg (76%) af stof 7f, der smeltede ved 200-210°C (dek.).

IR:  $\nu_{\text{max}}^{\text{nuj}}$  1790, 1660, 1630, 1580  $\text{cm}^{-1}$ .

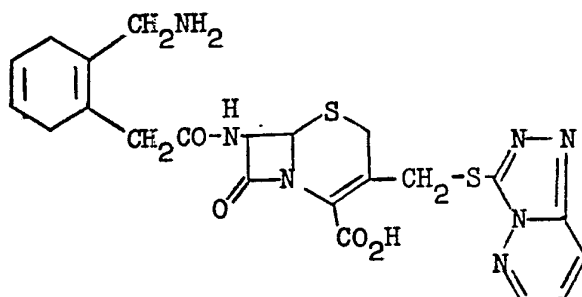
Analyse beregnet for  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}_2, 1/2\text{H}_2\text{O}$ :

C, 52,96; H, 4,83; N, 16,11; S, 12,29.

Fundet:

C, 53,08; H, 4,64; N, 15,16; S, 12,29.

### Eksempel 13



### 7-[(2-N-t-butoxycarbonylaminoethyl)-1,4-cyclohexadienyl]-acetamido]-3-pyridazino[2,1-c]-s-triazol-3-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (6'g)

Til en opløsning af  $\alpha$ -[2-(t-butoxycarbonylaminoethyl)-1,4-cyclohexadienyl]eddikesyre (3) (1,07 g, 4 mmol) og 2,4-dinitrophenol (0,74 g, 4 mmol) i tør THF (10 ml) sattes DCC (0,82 g, 4 mmol), og blandingen omrørtes i 1 time ved stuetemperatur til bundfældning af urinstof, der fjernedes ved filtrering. Til filtratet sattes i en portion en kold opløsning af 7-amino-3-pyridazino[2,1-c]-s-triazol-3-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (4g) (1,09 g, 3 mmol) og triethylamin (0,81 g, 8 mmol) i 50% vandig THF (20 ml), og blandingen omrørtes i 20 timer ved stuetemperatur. Reaktionsblandingen vaskedes med ether (2 x 50 ml), gjordes sur til pH-værdi 2 med fortyndet saltsyre og ekstraheredes med ethylacetat (6 x 50 ml). De forenede ekstrakter vaskedes med vand (2 x 30 ml), behandlede med carbon og tørredes på vandfri natriumsulfat. Inddampning af opløsningsmidlet under reduceret tryk gav en olieagtig remanens, der størknede ved ttriturering med ether (50 ml), hvilket gav 0,63 g (34%) af stof 6'g, smeltepunkt 202 - 213°C (dek.).

IR:  $\gamma$   $\begin{matrix} \text{nuj} \\ \text{max} \end{matrix}$  1785, 1780, 1520, 1250, 1160  $\text{cm}^{-1}$ .

NMR:  $\delta$   $\begin{matrix} \text{DMSO-d}_6 \\ \text{ppm} \end{matrix}$  1,39 (9H, s,  $\text{CH}_3\text{-C}$ ), 3,89 (4H, s,  $\text{H}_2\text{C}$ ), 5,03 (1H, d, 4Hz, 6-H), 5,67 (3H, br-s, 1-H &  $\text{H}\text{C}=\text{O}$ ), 7,20 - 8,90 (3H, m, pyridazin-H), 9,05 (1H, d, 8Hz, NHCO).

Analyse beregnet for  $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_7\text{O}_6\text{S}_2\text{H}_2\text{O}$ :

C, 48,08; H, 4,95; N, 17,83; S, 11,67.

Fundet:

C, 48,32; H, 3,94; N, 17,19; S, 11,90.

7-(2-aminomethyl-1,4-cyclohexadienylacetamido)-3-(pyridazino[2,1-c]-s-triazol-3-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (7g)

En blanding af 6'g (0,53 g, 0,86 mmol) i trifluoreddikesyre (1 ml) omrørtes i en time ved 0-5°C og fortyndedes med ether (30 ml) til bundfældning af trifluoracetatet i stof 7g, der opsamledes ved filtrering og opløstes i vand (4 ml). Opløsningen indstilledes til pH-værdi 6 med ammoniumhydroxid og fortyndedes med acetonitril (100 ml) til bundfældning af stof 7g, der opsamledes ved filtrering, vaskedes med acetonitril (30 ml) og tørredes i vakuum på  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Udbytte 0,38 g (86%). Smeltepunkt 208-216°C (dek.).

IR:  $\gamma$   $\begin{matrix} \text{nuj} \\ \text{max} \end{matrix}$  1780, 1620, 1570, 1340  $\text{cm}^{-1}$ .

UV:  $\lambda$   $\begin{matrix} \text{1\%K}_2\text{CO}_3 \\ \text{max} \end{matrix}$  276 nm ( $\epsilon$  5600).

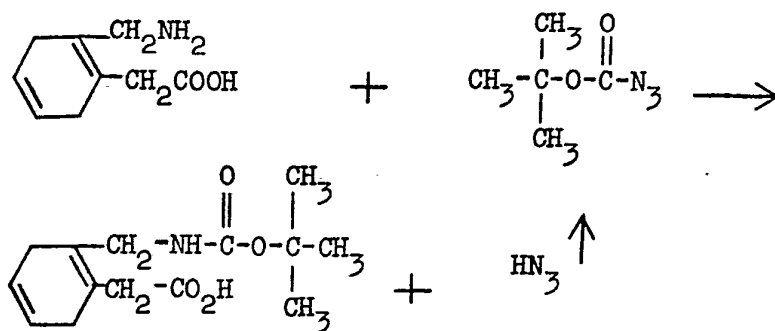
Analyse beregnet for  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}_4\text{S}_2\text{H}_2\text{O}$ :

C, 51,33; H, 5,27; N, 15,52; S, 10,15.

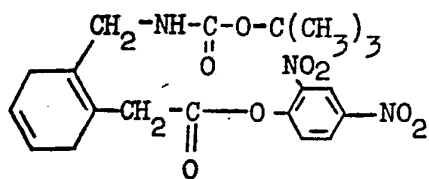
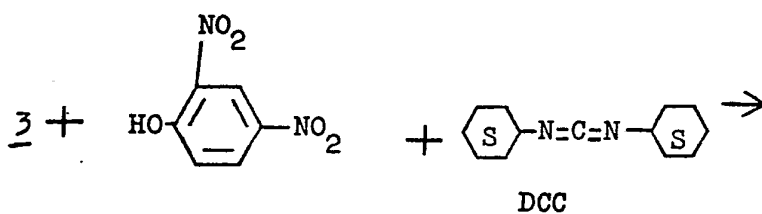
Fundet:

C, 51,00; H, 5,10; N, 15,00; S, 10,12.

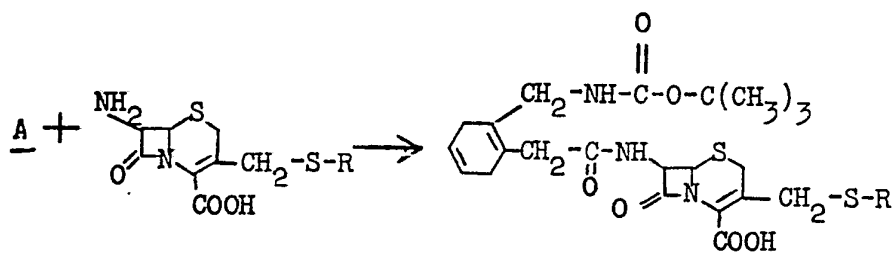
Reaktionsskema for eksemplerne 14, 15 og 16



3

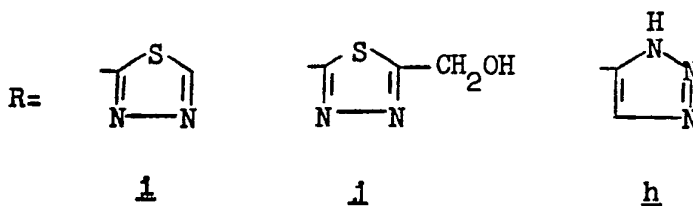
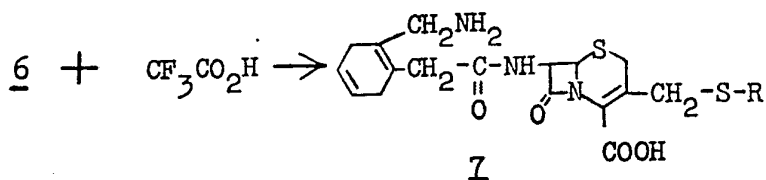


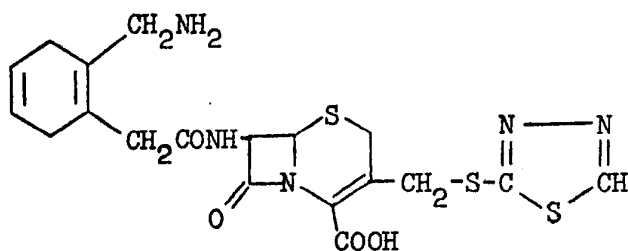
A



5

6



Eksempel 14

71

7-[(2-tert-butoxycarbonylaminomethyl-1,4-cyclohexadienyl)acetamido]-3-(1,3,4-thiadiazol-2-mercaptomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (6'i)

Til en omrørt opløsning af 1,10 g (0,0041 mol) af stof 3 og 0,80 g (0,0044 mol) af 2,4-dinitrophenol i 40 ml ethylacetat sættes i en portion 0,90 g (0,0044 mol) N,N'-dicyclohexylcarbodiimid og blandingen omrørtes i 3 timer ved 25°. Dicyclohexylurinstoffet opsamledes og filtreret inddampedes ved 45° (15 mm), hvilket gav den aktiverede ester som en olie. Olien opløstes i 30 ml THF. En opløsning af 1,22 g (0,0037 mol) 7-amino-3-(1,3,4-thiadiazol-2-mercaptomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre og 1,03 ml (0,0074 mol) triethylamin i 20 ml 50% THF-vand sættes til opløsningen af den aktiverede ester og omrørtes i 18 timer ved 25°. THF fjernedes ved 40° (15 mm) og koncentratet (10 ml) vaskedes med ether (5 x 100 ml) og gjordes sur til pH-værdi 2 med 40% phosphorsyre. Blandingen ekstraheredes med ethylacetat (6 x 100 ml), og de forenede ekstrakter vaskedes med vand og dernæst med en mættet natriumchloridopløsning. Ethylacetatopløsningen inddampedes ved 40° (15 mm) til et volumen på 20 ml og fortyndedes med 30 ml Skellysolve B. Produktet 6'i opsamledes og tørredes i 16 timer i vakuum over P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ved 25°, hvilket gav 1,4 g (65,4%) af et hvidt pulver. IR- og NMR-spektrene stemte overens med strukturen. Smeltepunkt 135° langsom dekomponering.

7-[(2-aminomethyl-1,4-cyclohexadienyl)acetamido]-3-(1,3,4-thiadiazol-2-mercaptomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (7i)

En opløsning af 1,30 g (0,00226 mol) af stof (6'i) og 3,0 ml trifluoreddikesyre omrørtes i 1 time ved 0°. Opløsningen fortyndedes med 200 ml ether, og bundfaldet opsamledes ved filtrering. Trifluoracetatsaltet opslæmmedes i 40 ml vand og indstilledes til pH-værdi 6,0 med fortyndet ammoniumhydroxid. Den gummiagtige remanens tritureredes dernæst med 25 ml acetonitril hvilket gav 370 mg (34,5%) af et hvidt pulver. Produktet tørredes i 16 timer i vakuum over P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ved 25°. IR-

og NMR-spektrene stemte overens med strukturen. Smeltepunkt  $135^{\circ}$  langsom dekomponering.

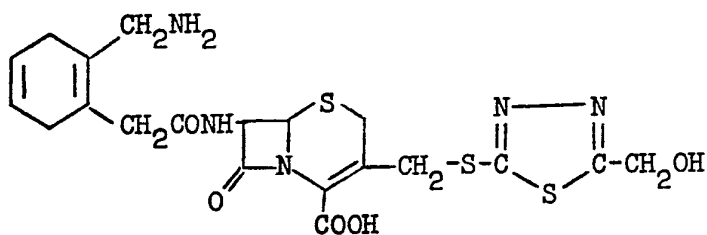
Analyse beregnet for  $C_{19}H_{21}N_5O_4S_3 \cdot H_2O$ : C, 45,85; H, 4,65; N, 14,07.

Fundet:

C, 45,71; H, 4,52; N, 14,12.

Ligevægtsopløseligheden af denne forbindelse i mg/ml var 4,28 i destilleret vand og 5,85 i fosfatpuffer med pH-værdien 7,0.

#### Eksempel 15



**7i**

#### 7-[(2-aminomethyl-1,4-cyclohexadienyl)acetamido]-3-(5-hydroxymethyl-1,3,4-thiadiazol-2-mercaptomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (7j)

Der anvendtes samme fremgangsmåde som i eksempel 14 med undtagelse af, at produktet opsamledes fra vandet, hvilket gav 340 mg (29,8%) af et tan-farvet pulver. En anden fraktion opnåedes fra filtratet hvilket gav 230 mg (20,0%) af stof 7j som et gult krystallinsk hemi-hydrat. IR- og NMR-spektrene stemte overens med strukturen. Smeltepunkt  $150^{\circ}$  langsom dekomponering.

Analyse beregnet for  $C_{20}H_{23}N_5O_5S_3 \cdot 1 \frac{1}{2} H_2O$ :

C, 44,75; H, 4,88; N, 13,05.

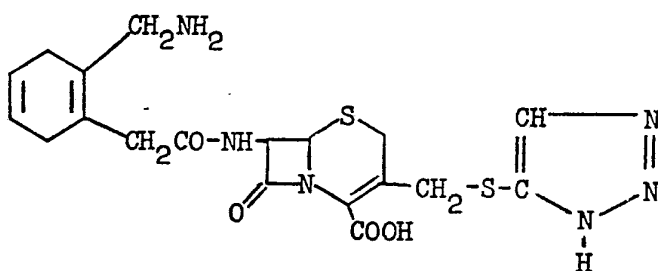
Fundet:

C, 44,84; H, 4,63; N, 12,75.

Den anden fraktion havde den samme renhed.

IR- og NMR-spektrene stemte overens med strukturen.

#### Eksempel 16



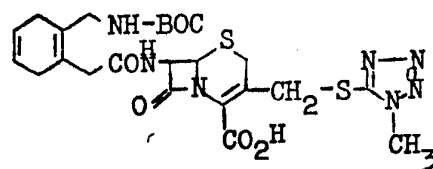
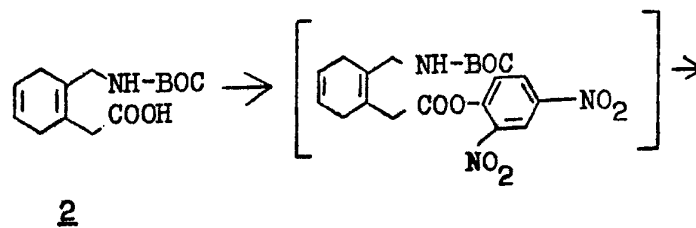
**7h**

7-[(2-aminomethyl-1,4-cyclohexadienyl)acetamido]-3-(1,2,3-triazol-5-mercaptomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (7h)

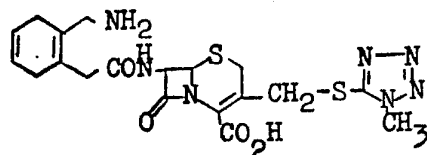
Der anvendtes samme fremgangsmåde som i eksempel 14 med undtagelse af, at produktet opsamledes fra 15 ml acetonitril, hvilket gav 100 mg (19,1%) af stof 7h som et lyst tan-farvet pulver. IR- og NMR-spektrene stemte overens med strukturen. Smeltepunkt 160 langsom dekomponering. Analyse beregnet for  $C_{19}H_{22}N_6O_4S_2 \cdot 2H_2O$ : C, 46,17; H, 4,88; N, 16,38. Fundet: C, 45,76; H, 5,25; N, 16,85.

Eksempel 17

Fremstilling af 7-[(2-aminomethyl-1,4-cyclohexadienyl)-acetamido]-3-(1-methyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (7c). Prøve 2



6'c



**7c**

Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (9,0 g, 0,044 mol) sættes til en blanding af 11,2 g (0,042 mol) af (2-N-t-butoxycarbonylamino-1,4-cyclohexadienyl)eddikesyre (2) og 8,03 g (0,044 mol) af 2,4-dinitrophenol i 250 ml THF. Blandingen omrørtes ved stuetemperatur i 1,5 time, og det bundfældede urinstof frafiltreredes. Til filtratet sættes en opløsning af 11,5 g (0,035 mol) 7-amino-3-(1-methyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre og 14,7 ml (ca. 0,105 mol) triethylamin i 250 ml vand. Blandingen omrørtes ved stuetemperatur i 20 timer, og THF fjernedes under reduceret tryk under 40°C. Den vandige opløsning vaskedes med ether (200 ml), gjordes sur med 6N HCl og ekstraheredes med ethylacetat (3 x 200 ml). Ekstrakterne vaskedes med vand og en mættet vandig NaCl-opløsning, tørredes med Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og inddampedes til tørhed. Den olieagtige remanens tritureredes med ether (500 ml), hvilket gav 8,05 g (40%) af det N-blokerede stof 7c (d.v.s. stof 6'c).

IR:  $\gamma$   $\begin{matrix} \text{nujol} \\ \text{max} \end{matrix}$  1770, 1710, 1650, 1510 cm<sup>-1</sup>.

En blanding af 8,0 g (0,0138 mol) af stof 6'c og 16 ml trifluoreddikesyre (TEA) omrørtes ved 0-5°C i 1 time og fortyndedes dernæst med 300 ml ether for at fjerne trifluoracetatet i stof 7c, der opløstes i 30 ml 50% acetonitril, indstilledes til pH-værdi 6 med koncentreret NH<sub>4</sub>OH og fortyndedes med 500 ml acetonitril. Det gule bundfald, der udskilte, vaskedes godt med acetonitril (200 ml), hvilket gav 5,2 g (79%) amorf stof 7c (prøve 2).

Smeltepunkt 195-205°C (dek.).

IR:  $\gamma$   $\begin{matrix} \text{nujol} \\ \text{max} \end{matrix}$  1780, 1650, 1620, 1560 cm<sup>-1</sup>.

UV:  $\lambda$   $\begin{matrix} \text{pH 7 puffer} \\ \text{max} \end{matrix}$  274 nm ( $\epsilon$ , 9100).

Analyse beregnet for C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O:

C, 46,05; H, 5,08; N, 19,78; S, 12,94.

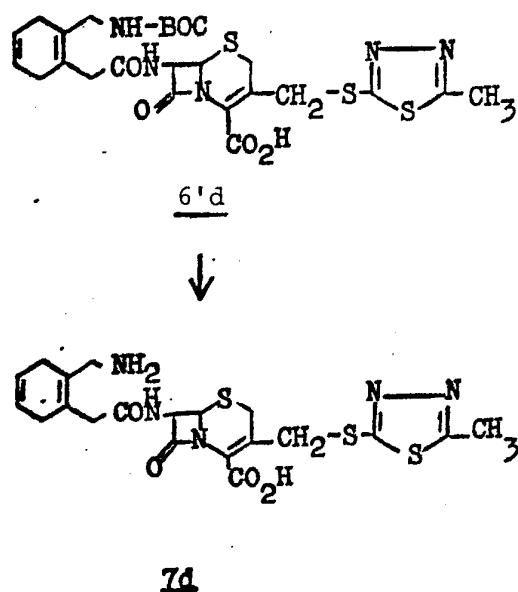
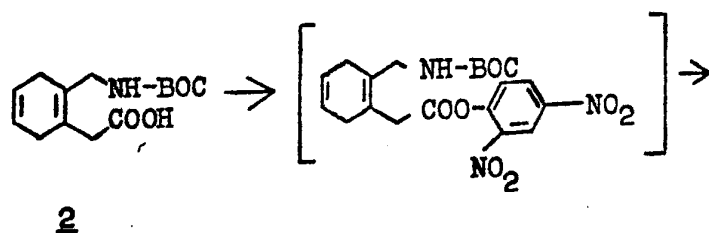
Fundet:

C, 46,64; H, 4,60; N, 18,63; S, 12,59.

Opløselighed i 0,1 M fosfatpuffer (pH-værdi 7): 9,4 mg/ml.

#### Eksempel 18

Fremstilling af 7-[(2-aminomethyl-1,4-cyclohexadienyl)-acetamido]-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (7d)  
prøve 2



Til en omrørt opløsning af 8,02 g (0,03 mol) 2-(N-t-butoxycarbonylaminomethyl)-1,4-cyclohexadienyleddikesyre (2) og 5,6 g (0,0304 mol) 2,4-dinitrophenol i 80 ml tør THF sættes 6,2 g (0,0304 mol) DCC ved 5 - 10°C i en portion, og blandingen omrørtes i 2 timer ved stuetemperatur. Efter fjernelse af det bundfældede urinstof blandedes reaktionsblandingen ved 0 - 5°C med en opløsning af 9,4 g (0,027 mol) 7-amino-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre og 7,7 ml (0,055 mol) triethylamin i 30 ml vand og 50 ml THF. Blandingen omrørtes i 20 timer ved stuetemperatur og koncentreredes under reduceret tryk for at fjerne det meste THF. Den vandige opløsning behandlede med 2 g aktiv carbon. Filtratet dækkedes med 100 ml ethylacetat og gjordes surt med 10% HCl. Det vandige lag ekstraheredes med to 50 ml portioner ethylacetat. Ethylacetatlaget forenedes med ethylacetatekstrakterne, vaskedes med to 100 ml portioner vand, tørredes med vandfri Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og koncentreredes til tørhed under 40°C, hvilket gav stof 6d som

en viskos olie, der størknede ved triturering med ether, hvilket gav stof 6d. Udbytte 12,5 g (70%). IR:  $\gamma_{\max}^{\text{KBr}}$  1780, 1700, 1680, 1510  $\text{cm}^{-1}$ .

Den BOC-beskyttede cephalosporin 6'd (12,5 g, 0,021 mol) behandlede med 25 ml TFA ved 0 - 5°C under omrøring. Omrøringen fortsattes i 1 time ved samme temperatur. Blandingen fortyndedes med 300 ml ether, hvilket gav det hvide bundfald, der opløstes i 30 ml 50% vandig acetonitril og behandlede med 1 g aktiv carbon. Filtratet indstillede til pH-værdi 6 med koncentreret  $\text{NH}_4\text{OH}$  og fortyndedes med 250 ml acetonitril, hvilket gav 8 g (77%) af stof 7d (prøve2) som et bleggult pulver. Smeltepunkt 230-235°C (dek.).

IR:  $\gamma_{\max}^{\text{KBr}}$  1790, 1650, 1620, 1570  $\text{cm}^{-1}$ .

UV:  $\lambda_{\max}^{1\% \text{NaHCO}_3\text{-pH 7 puffer}}$  225 nm (sh) ( $\epsilon$ , 11800), 277 nm ( $\epsilon$ , 12400).

Analyse beregnet for  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_3$ :

C, 48,66; H, 4,70; N, 14,19; S, 19,49.

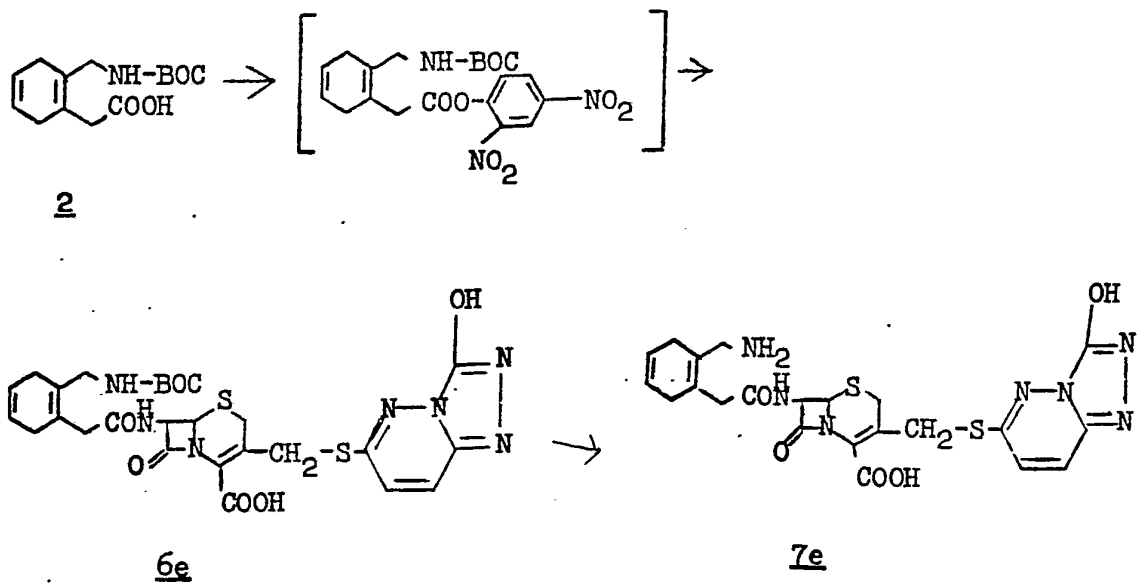
Fundet:

C, 48,55; H, 4,34; N, 13,74; S, 19,00.

Opløselighed i 0,1M fosfatpuffer (pH-værdi 7): 3,4 mg/ml.

#### Eksempel 19

Fremstilling af 7-[(2-aminomethyl-1,4-cyclohexadienyl)-acetamido]-3-(3-hydroxypyridazino-[3,2-c]-s-triazol-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (7e) (prøve 2)



Til en omrørt opløsning af 10,1 g (0,038 mol)  $\alpha$ -[2-(t-butoxycarbonylaminoethyl)-1,4-cyclohexadienyl]-eddikesyre (2) og 8,1 g (0,044 mol) 2,4-dinitrophenol i 300 ml THF sættes 9,1 g (0,044 mol) DCC i en portion, og blandingen omrørtes i 2 timer ved stuetemperatur. Det udskilte urin-stof frafiltreredes. Til filtratet sættes en opløsning af 14,4 g (0,038 mol) 7-amino-3-(3-hydroxypyridazino[3,2-c]-s-triazol-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre og 12,2 g (0,12 mol) triethylamin i 250 ml vand, og blandingen omrørtes i 16 timer ved stuetemperatur. Reaktionsblandingen indampedes under reduceret tryk under 40°C, og det vandige koncentrat vaskedes med ether (5 x 200 ml) og behandlede med aktiv carbon. Filtratet gjordes surt med fortyndet HCl til pH-værdi 2, hvilket gav et bundfald, der vaskedes med 200 ml vand og ekstraheredes med varm THF (5 x 500 ml). THF-ekstrakterne indampedes under reduceret tryk under 40°C, og remanensen tritureredes med 500 ml ether, hvilket gav det N-blokerede stof 7e (d.v.s. 6'e). IR:  $\gamma_{\max}^{\text{KBr}}$  1765, 1700, 1340, 1240, 1150  $\text{cm}^{-1}$ .

Til den BOC-blokerede cephalosporin 6'e (7,8 g, 0,0124 mol) sættes dråbevis 16 ml TFA ved 5°C, og blandingen omrørtes i 1,2 time ved stuetemperatur. Blandingen fortyndedes med 1000 ml ether, og det resulterende bundfald opløstes i 50 ml 50% acetonitril. Opløsningen indstillede til pH-værdi 4-5 med koncentreret  $\text{NH}_4\text{OH}$  og fortyndedes med 200 ml acetonitril, hvilket gav 5,55 g (84%) af stof 7e (prøve 2). Smeltepunkt 220 - 230°C (dek.).

IR:  $\gamma_{\max}^{\text{KBr}}$  1760, 1710, 1640, 1540, 1460  $\text{cm}^{-1}$ .

UV:  $\lambda_{\max}^{\text{K}_2\text{CO}_3}$  - pH 7 puffer 253 nm ( $\epsilon$ , 20.000).

Analyse beregnet for  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}_5\text{S}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ :

C, 47,06; H, 5,03; N, 17,46.

Fundet: C, 46,28; H, 3,73; N, 17,20.  
46,37 3,71 16,93.

Opløselighed i 0,1 M fosfatpuffer (pH-værdi 7): 1,1 mg/ml.

Genudfældning --- Trifluoreddikesyre (0,5 ml) sættes til stof 7e (prøve 2, 100 mg) ved 5°C og blandingen omrørtes i 5 minutter ved stuetemperatur. Opløsningen fortyndedes med 50 ml ether. Det resulterende trifluoracetat opløstes i 10 ml 50% vandig acetonitrilopløsning. Opløsning indstilledes til pH-værdi 6,0 med 10%  $\text{NH}_4\text{OH}$ , hvilket gav et lysebrunt bundfald (91 mg), smeltepunkt 224-234°C (dek.).

IR:  $\gamma_{\max}^{\text{nujol}}$  1760, 1710, 1630, 1540, 1460  $\text{cm}^{-1}$ .

UV:  $\lambda_{\max}^{\text{K}_2\text{CO}_3}$  + pH 7 puffer 253 nm ( $\epsilon$ , 19.000).

Analyse beregnet for  $C_{22}H_{23}N_7O_5S_2 \cdot 2H_2O$ :

C, 47,06; H, 5,03; N, 17,46.

Fundet:

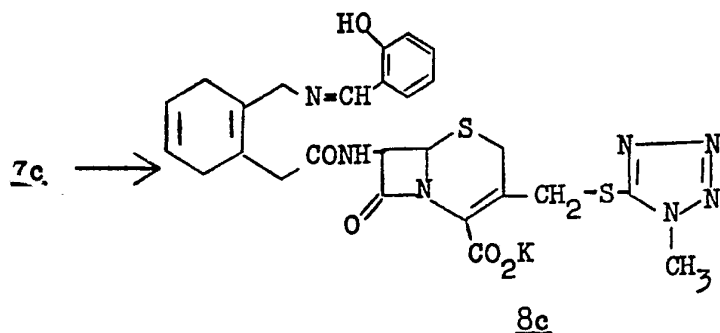
C, 47,30; H, 4,23; N, 17,89.

47,25      4,21      17,82

Opløselighed i 0,1M phosphatpuffer (pH-værdi 7): 1,1 mg/ml.

Eksempel 20

Salicylaldehyd-adduktet af 7-[(2-aminomethyl-1,4-cyclohexadienyl)aceta-  
midol-3-(1-methyltetrazol-5-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (7c)



Til en omrørt opløsning af stof 7c (eksempel 17, prøve 2, 766 mg, 1,6 mmol) og triethylamin (300 mg, 3 mmol) i methanol (8 ml) sættes salicylaldehyd (370 mg, 3 mmol), og blandingen omrørtes i 30 minutter ved stuetemperatur, hvilket gav en klar mørkegul opløsning. Opløsningen behandlede med en lille smule carbon og KEH (2 ml, 1M opløsning i ethylacetat af kalium 2-ethylhexanoat) sættes til filtratet. Blandingens fortyndedes med en stor mængde ether (100 ml) til udfældning af produktet 8c, der opsamledes ved filtrering, vaskedes med ether (30 ml) og tørredes. Udbytte 788 mg (78%), smeltepunkt 165-175°C (dek).

IR:  $\gamma_{\max}^{\text{nuj}}$  1760, 1660, 1625, 1605, 1280  $\text{cm}^{-1}$ .

UV:  $\lambda_{\max}^{\text{pH 7 puffer}}$  256 nm ( $\epsilon$  19500), 275 nm ( $\epsilon$  14000, sh), 325 nm ( $\epsilon$  2600).

NMR:  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{DMSO-d}_6}$  3,95 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 4,96 (1H, d, 4 Hz, 6-H), 5,50 (1H, m, 7-H), 5,69 (2H, s, c=C-H), 6,7 - 7,6 (4H, m, phenyl-H), 8,68 (1H, s, -CH=N-), 9,00 (1H, d, 8 Hz, 7-CONH).

Analyse beregnet for  $C_{26}H_{26}O_5N_7S_2K \cdot H_2O$ :

C, 48,96; H, 4,43; N, 15,37; S, 10,06.

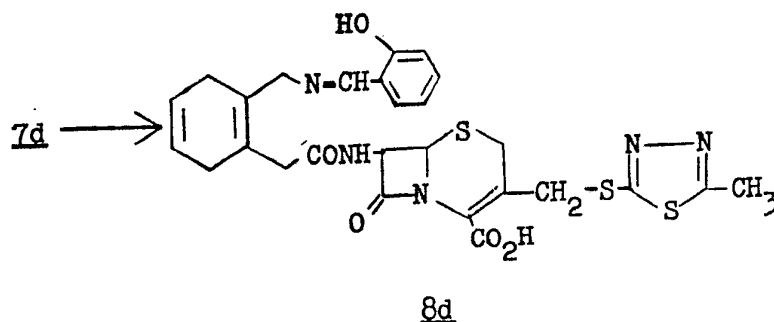
Fundet:

C, 48,96; H, 4,01; N, 14,33; S, 9,31.

48,85      4,10      14,26      9,70.

## Eksempel 21

Salicylaldehyd-adduktet af 7-[(2-aminomethyl-1,4-cyclohexadienyl)acetamido]-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (7d)



Til en omrørt blanding af stof 7d (eksempel 18, prøve 2, 778 mg, 1,6 mmol) og triethylamin (300 mg, 3 mmol) i methanol (8 ml) sættes salicylaldehyd (370 mg, 3 mmol), og opløsningen omrørtes i 15 minutter ved stuetemperatur til opnåelse af en klar mørkegul opløsning, der behandlede med en lille mængde carbon. KEH (2 ml, 1M opløsning i ethylacetat) sættes til filtratet. Blandingen fortyndedes med en stor mængde ether (100 ml) til bundfældning af produktet 8d, der opsamledes ved filtrering, vaskedes med ether (30 ml) og tørredes. Udbytte 855 mg (84%). Smeltepunkt 163-170°C (dek.).

IR:  $\gamma_{\max}^{\text{nuj}}$  1765, 1630, 1610, 1280  $\text{cm}^{-1}$ .

UV:  $\lambda_{\max}^{\text{pH 7 puffer}}$  257 nm ( $\epsilon$  19800), 275 nm ( $\epsilon$  14200, sh), 325 nm ( $\epsilon$  2700).

NMR:  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{DMSO-d}_6}$  2,68 (3H, s,  $-\text{CH}_3$ ), 4,94 (1H, d, 4 Hz, 6-H), 5,50 (1H, m, 7-H), 5,68 (2H, s, C=C-H), 6,70 - 7,60 (4H, m, phenyl-H), 8,65 (1H, s, CH=N), 8,92 (1H, d, 8 Hz,  $-\text{CONH}-$ ).

Analyse beregnet for  $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{O}_5\text{N}_5\text{S}_3\text{K}$ , 3/2  $\text{H}_2\text{O}$ :

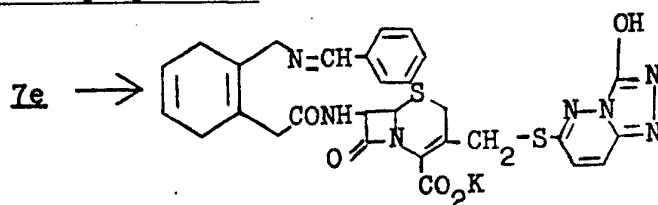
C, 48,92; H, 4,41; N, 10,57; S, 14,51.

Fundet:

C, 48,91; H, 3,74; N, 10,15; S, 12,75.  
49,24      4,04      10,34      13,57.

## Eksempel 22

Salicylaldehyd-adduktet af 7-[(2-aminomethyl-1,4-cyclohexadienyl)acetamido]-3-(3-hydroxypyridazino-[3,2-c]-s-triazol-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (7e)



8e

Til en omrørt opløsning af stof 7e (eksempel 19, prøve 2, 754 mg, 1,42 mmol) og triethylamin (300 mg, 3 mmol) i N,N-dimethylformamid (7 ml) sættes salicylaldehyd (370 mg, 3 mmol), og opløsningen omrørtes i 1,5 time ved stuetemperatur til opnåelse af en mørkegul opløsning, der behandlede med en lille mængde carbon. KEH (1,5 ml, 1M opløsning i ethylacetat) sættes til filtratet. Blandingen fortyndedes med en stor mængde ether (100 ml) til udfældning af produktet 8e, der vaskedes med ether (30 ml) og tørredes. Udbytte 906 mg (95%). Smeltepunkt 215-222°C. (dek.).

IR:  $\gamma_{\max}^{\text{nuj}}$  1760, 1720, 1660, 1615, 1600, 1345, 1275  $\text{cm}^{-1}$ .

UV:  $\lambda_{\max}^{\text{pH 7 puffer}}$  255 nm ( $\epsilon$  28800), 310 nm ( $\epsilon$  8500,sh).

NMR:  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{DMSO-d}_6}$  5,00 (1H, d, 4Hz, 6-H), 5,50 (1H, m, 7-H), 5,72 (2H, s, C=C-H), 6,7 - 7,6 (6H, m, phenyl-H), 8,70 (1H, s, CH=N), 9,00 (1H, d, 8Hz, -CONH).

Analyse beregnet for  $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_6\text{N}_7\text{S}_2\text{K}, \text{H}_2\text{O}$ :

C, 50,49; H, 4,09; N, 14,21; S, 9,30.

Fundet:

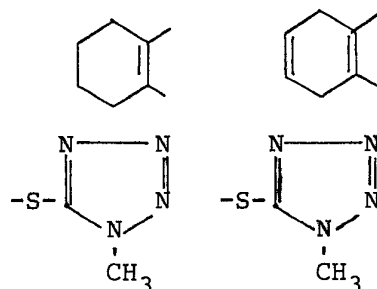
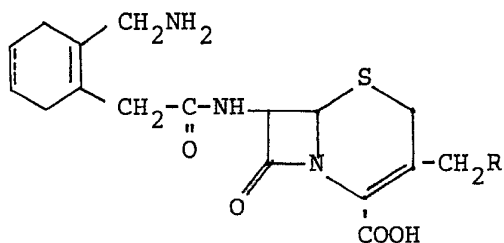
C, 50,34; H, 4,15; N, 14,02; S, 9,36.  
50,30      4,00      14,03      9,31.

### Eksempel 23

Til belysning af fremgangsmåde b) omsættes 7-[ $\alpha$ -(2-aminomethyl-1-cyclohexenyl)acetamido]cephalosporansyre (6w) med 6-mercaptotetrazol [4,5-b]pyridazin (13) under analoge betingelser som angivet foran i afsnittet "fremstilling af udgangsmaterialer og sammenligningsforbindelser" for fremstillingen af 7-amino-3-(tetrazol[4,5-b]pyridazin-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (4b) ud fra 7-ACA og den samme thiol til fremstilling af 7-[ $\alpha$ -(2-aminomethyl-1-cyclohexenyl)acetamido]-3-(pyridazin)[2,3-d]tetrazol-6-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylsyre (6b), smeltepunkt 184-188°C (dek.)

### BIOLOGISK UNDERSØGELSE

De tilsvarende forbindelser indeholdende en 3-acetoxymethylgruppe og en 3-methylgruppe fremstilledes og sammenlignedes in vitro med de i henhold til eksempel 3 og 9 fremstillede forbindelser, hvorved følgende resultater opnåedes.



Organisme	M.I.C.-værdier (mcg/ml)			
	R= -OCOCH <sub>3</sub>		-H	
	6w	6x	6c (eks.3)	(eks. 9)
S. aureus Smith <sup>†</sup> A9537	0,8	>3,1, 25	0,2 - 0,4	0,8
S. aureus Smith <sup>‡</sup> A 9537 + 50% serum	3,1	>6,3, 25	0,8 - 1,6	1,6
S. aureus Russel	0,8-1,6	>12,5, 12,5	0,4 - 0,8	0,8
S. aureus BX1633 A9606	3,1	>12,5, 25	1,6	1,6
Str. pyogenes* A9604 + 5% serum	0,8-0,16	1,25-2,5	0,04-0,08	0,16
D. pneumoniae* A9585 + 5% serum	0,16-0,31	>2,5, 10	0,04-0,08	0,08
Mycobacterium 607	>100	>100	>100	>100
E.coli NIHJ	25-50	>100	1,6-3,1	3,1
E.coli ATCC 8739	25	>100	3,1-6,3	3,1
E.coli Juhl <sup>‡</sup> A15119	25	>100	3,1-6,3	6,3
K. pneumoniae <sup>‡</sup> A9977	12,5-25	>100	0,8-3,1	3,1
K. pneumoniae <sup>‡</sup> A15130	12,5-50	>100	3,1-6,3	3,1
Pr. mirabilis <sup>‡</sup> A9900	50	>100	100	25
Pr. morgani <sup>‡</sup> A15153	>100	>100	>100	>100
Sal. enteritidis <sup>‡</sup> A9531	12,5	>100	1,6-3,1	1,6
Ser. marcescens <sup>‡</sup> A20019	>100	>100	>100	>100
Ps. aeruginosa <sup>‡</sup> A9843	>100	>100	>100	>100

\* 50% næringssubstrat - 45% antibiotisk prøvesubstrat.

<sup>‡</sup> ved 10<sup>-4</sup> fortynding.

De ovennævnte prøver viste efter opløsning i næringssubstrat at udvise de angivne minimale inhibitoriske koncentrationer (M.I.C.-værdier) i mcg/ml overfor de angivne mikroorganismer bestemt ved inkubation natten over ved 37°C ved seriefortynding.

Den fremragende in vivo aktivitet af de i henhold til opfindelsen fremstillede foretrukne forbindelser, eksempelvis (7c, eks. 9, BB-S311) og (6c, eks. 3, BB-S336) vistest ved at sammenligne de pågældende forbindelser med 7-( $\alpha$ -aminomethylphenylacetamido)-3-[(1-methyl-1,2,3,4-tetrazol-5-thio)methyl]ceph-3-em-4-carboxylsyre (MR-S94) under bestemmelse (ved subkutan administrering af lægemidlet i inficerede mus) af den minimale helbredende dosis for 50% af musene ( $CD_{50}$ ) i mg/kg i forhold til lethale doser af de angivne mikroorganismer med følgende resultater:

Organisme	$CD_{50}$ i mg /kg		
	BB-S311 (prøve 1)	BB-S336	MR-S94
S. aureus BX-1633	1,8	2,4	3,4
St. pyogenes A 9604	1,0	-	0,8
E. coli Juhl	6,25	5,4	4,4
E. coli Juhl	5,6	-	4,2
Pr. mirabilis A9900	9,4	-	8
K. pneumoniae D-11	8,5	-	4,6
S. aureus Smith	1,8	-	3,1

Ved studier over udvindingen fra urin hos rotter administreredes cephalosporinerne subkutan ved en dosis på 200 mg/kg, idet zwitterionerne blev indgivet som vandig suspension (40 mg/ml; DMSO - 0,5%  $NaHCO_3$  -  $H_2O$  = 1:1:8) og salicylaldehydderivaterne, der er ækvipotente på molar basis, i vandig opløsning.

Ved rotte-krystalluria-studier gav BB-S311 tilfredsstillende høje serum- og urinkoncentrationer uden nogen tegn på krystalluria. Studier af hunde viser, at BB-S311 giver høje krystalfrie urinkoncentrationer. Parenterale (IM) absorptionsstudier af mus viser, at størsteværdien for BB-S311 er højere end for cephalothin, og at dette stof som antibiotikum kan klare sig længere tid i blodet end cephalothin. Mængden af den IM-administreredes dosis af BB-S311, som udvandedes fra urinen hos rotter var 31%, en værdi, der ganske svarer til den, som opnås med MR-S94 (35,5%) Cephaloridin-udvindingen var 43,1%, hvorimod den for cephalothin var 18,1%. BB-S311 optrådte i urinen som en enkelt bioaktiv forbindelse med en Rf-værdi, som var identisk med den man fandt med en vandig opløsning af selve forbindelsen.

Den aktibakterielle aktivitet af BB-S311 sammenlignedes også med MR-S94 i et agar fortyndingsprøvesystem. I forsøg på Mueller-Hinton med 18 gram-positive og 58 gram-negative organismer viste det sig, at BB-S311 havde en aktivitet af samme størrelsesorden som MR-S94. I en yderligere række forsøg bestemtes den relative aktivitet af MR-S94

og BB-S311 overfor 32 stammer af hver af *Serratia marcescens*, *Enterobacter* sp., *Providencia stuartii* og *Proteus* sp. Disse forbindelser havde fremragende aktivitet overfor de fleste repræsentanter af *Enterobacter* sp., *P. stuartii*, og alle *Proteus* sp. bortset fra *P. morganii*.

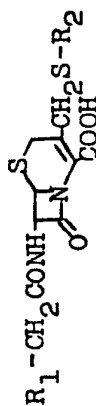
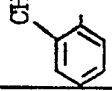
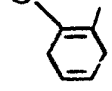
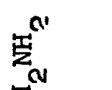
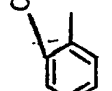
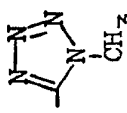
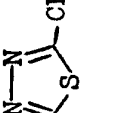

De i henhold til opfindelsen fremstillede forbindelser viste sig efter fortynding, f.eks. i DMSO eller vand ved 2 mg/ml efterfulgt af fortynding med næringssubstrat, at udvist følgende minimale inhibitoriske koncentrationer (M.I.C.-værdier) i mcg/ml overfor de angivne mikroorganismer bestemt ved inkubation natten over ved 37°C ved seriefortynding. Der er ligeledes gengivet resultater med forskellige kendte cephalosporiner. I disse og andre forsøg er salicylaldehydderivaterne ækvivalente med den tilsvarende zwitterion, og de er ligeledes meget opløselige i vand.

Næringssubstrat Organisme	MR-S94	M. I. C.-værdi ( /ug/ml)		BB-S312 (7d) (eks. 10)
		BB-S311	MR-S96	
		(7c) (eks. 9)		
D. pneumoniae* (10 <sup>-3</sup> )**	A9585	0,008	0,016	0,008
Str. pyogenes* (10 <sup>-3</sup> )**	A9604	0,008	0,016	0,016
S. aureus Smith (10 <sup>-4</sup> )	A9537	0,13	0,13	0,06
		0,25		0,13
S. aureus + 50% serum (10 <sup>-4</sup> )	A9537	0,25	0,25	0,13
		0,5		0,25
S. aureus BX1633 (10 <sup>-3</sup> )	A9606	0,3	0,25	0,16
		0,3		0,3
S. aureus BX1633 (10 <sup>-2</sup> )	A9606	0,3	0,25	0,16
		0,6		0,3
S. aureus Meth-Res. (10 <sup>-3</sup> )	A15097	1	2	1
		2	2	2
Sal. enteritidis (10 <sup>-4</sup> )	A9531	0,16	0,16	0,08
				0,16
E. coli Juhl (10 <sup>-4</sup> )	A15119	0,3	0,6	0,6
				1,3
E. coli (10 <sup>-4</sup> )	A9575	2	2	2
		4		2
K. pneumoniae (10 <sup>-4</sup> )	A9977	0,08	0,6	0,16
				0,3
K. pneumoniae (10 <sup>-4</sup> )	A15130	1	2	2
		2	2	2

Organisme	MR-S94	BB-S311	MR-S96	BB-S312
Pr. mirabilis ( $10^{-4}$ )	A9900 0,3	0,3 0,6	0,6	0,3 0,6
Pr. morgani ( $10^{-4}$ )	A15153 4	4 4	4	4 8
Ps. aeruginosa ( $10^{-4}$ )	A9843A >125	>125 >125	>125	>125 >125
Ser. marcescens ( $10^{-4}$ )	A20019 16	8 16	16	16 16
Ent. cloacae ( $10^{-4}$ )	A9656 16	32 16	63	32 125
Ent. cloacae ( $10^{-4}$ )	A9657 0,3	0,6 1,3	0,3	0,3 0,6
Ent. cloacae ( $10^{-4}$ )	A9659 1	2 4	2	4 8

x 45% antibiotisk prøvesubstrat + 5% serum + 50% næringssubstrat

xx Fortynding af natgammel dyrkningskultur

$R_1$ -CH <sub>2</sub> CONH 	R <sub>1</sub>				
					
					

Næringssubstrat	Organisme	M.I.C.-værdi i mcg/ml									
		Cephalothin	Cephaloridin	Cephalpirin	Cefazolin	Cephacetril	Cephalexon	Cefamandol	BB-S311		
	D. pneumoniae <sup>x</sup> (10 <sup>-3</sup> ) <sup>xx</sup>	0,08	0,004	0,008	0,008	0,02	0,016	0,008	0,016	0,016	
	Str. pyogenes <sup>x</sup> (10 <sup>-3</sup> ) <sup>xx</sup>	0,08	0,004	0,008	0,008	0,04	0,008	0,008	0,016	0,016	
	S. aureus Smith (10 <sup>-4</sup> )	0,16	0,016	0,13	0,16	0,25	0,25	0,25	0,13	0,13	
	S. aureus + 50% serum (10 <sup>-4</sup> )	0,3	0,03	0,16	2	0,3	1	0,5	0,13	0,13	
	S. aureus BX1633 (10 <sup>-3</sup> )	0,3	0,3	0,3	0,6	0,6	0,5	0,5	0,3	0,3	
	S. aureus BX1633 (10 <sup>-2</sup> )	0,3	4	1,3	2	0,6	4	2	0,3	0,3	
	S. aureus meth.3 resist. (10 <sup>-3</sup> )	2	4	4	8	4	8	4	1	1	
	Sal. enteritidis (10 <sup>-4</sup> )	0,3	0,6	0,3	0,6	2,5	0,5	0,06	0,08	0,08	
	E. coli Juhl (10 <sup>-4</sup> )	16	2	16	0,5	8	1	1	0,3	0,3	
	E. coli (10 <sup>-4</sup> )	63	4	125	4	16	4	16	2	2	
	K. pneumoniae (10 <sup>-4</sup> )	1	1,3	1	0,5	4	0,5	0,5	0,16	0,16	
	K. pneumoniae (10 <sup>-4</sup> )	16	4	8	2	16	2	16	1	1	
	Pr. mirabilis (10 <sup>-4</sup> )	1	1	1	0,5	4	1	1	0,3	0,3	

Næringssubstrat	Organisme	M. I. C-værdi i mcg/ml									
		Cephal- othin	Cephal- oridin	Cepha- pirin	Cefa- zolin	Cepha- ceptril	Cepha- non	Cefa- mandol	BB-S311		
	Pr. morgani (10 <sup>-4</sup> ) A15153	>125	>125	>125	125	>125	32	2	4		
	Ps. aeruginosa (10 <sup>-4</sup> ) A9843A	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125		
	Ser. marcescens (10 <sup>-4</sup> ) A20019	>125	>125	>125	>125	>125	>125	125	32		
	Ent. cloacae (10 <sup>-4</sup> ) A9656	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	32		
	Ent. cloacae (10 <sup>-4</sup> ) A9657	4	2	2	0,5	8	1	2	1,3		
	Ent. cloacae (10 <sup>-4</sup> ) A9659	>125	>125	>125	125	>125	63	32	2		

\* 45% Antibiotisk prøvesubstrat + 5% serum + 50% næringssubstrat.

\*\* Fortynding af natgammel dyrkningskultur.



Organisme	Forsøg nr. 721A		M.I.C.-værdi i mcg/ml		Forsøg nr. 731A	
	7i: Eks. 14	MR-S94	7j: Eks. 15	MR-S94	7h: Eks. 16	MR-S94
Pr. morgani (10 <sup>-4</sup> ) A15153	8	2	4	2	32	1
Ps. aeruginosa (10 <sup>-4</sup> ) A9843A	>125	>125	>125	>125	>125	>125
Ser. marcescens (10 <sup>-4</sup> ) A20019	32	8	32	8	>125	8
Ent. cloacae (10 <sup>-4</sup> ) A9656	63	32	32	32	>125	63
Ent. cloacae (10 <sup>-4</sup> ) A9657	0,3	0,6	1,3	1,3	2,5	1,3
Ent. cloacae (10 <sup>-4</sup> ) A9659	4	1	4	1	32	1

\* 45% antibiotisk prøvesubstrat - 5% serum - 50% næringssubstrat  
 \*\* Fortynding af natgammel dyrkningskultur.

Den fremragende in vivo aktivitet af en i henhold til opfindelsen fremstillet foretrukken forbindelse (6c, eks. 3, BB-S336) påvistes ved sammenligning med resultater tidligere opnået ved i alt væsentligt samme metode for MR-S94 under bestemmelse (ved subkutan administrering af lægemidlet i inficerede mus) af den minimale helbredende dosis for 50% af musene ( $CD_{50}$ ) i mg/kg overfor lethale doser af de angivne mikroorganismer med følgende resultater.

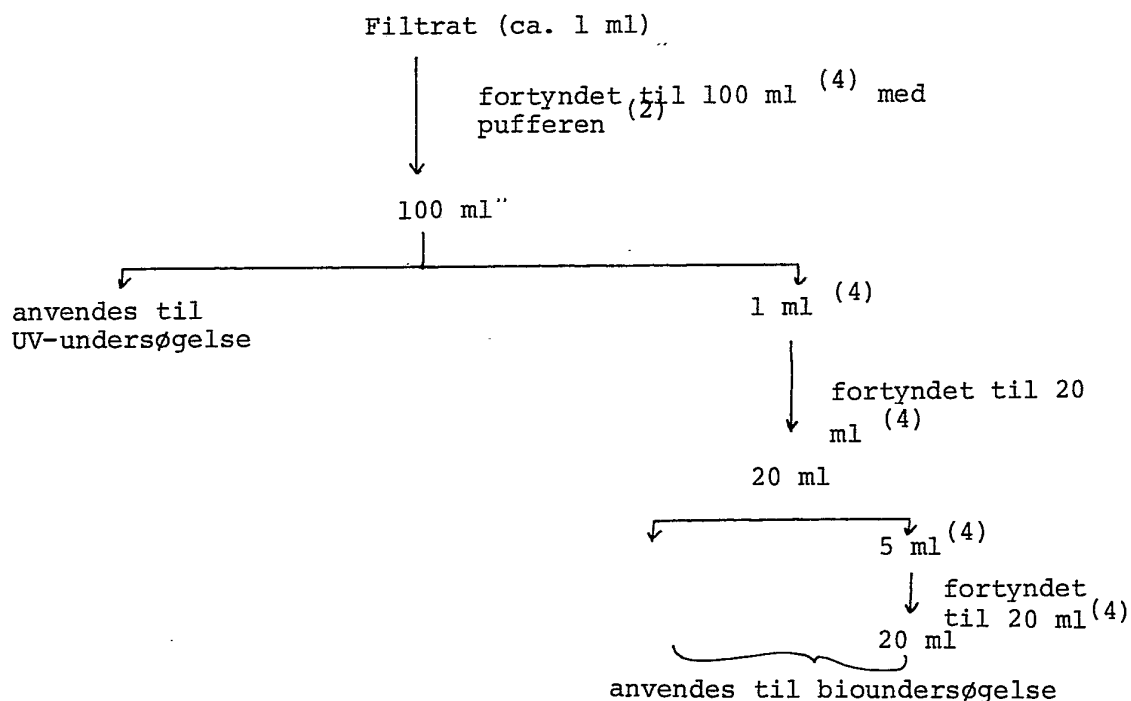
<u>Angrebs- organisme</u>	$CD_{50}$ i mg/kg	
	<u>BB-S336</u>	<u>MR-S94</u>
S. aureus BX 1633	2,4	3,4
E. coli Juhl	5,4	4,4

#### Bestemmelse af opløseligheder

Opløselighederne af cephalosporinderivaterne i 0,1 M pH-værdi 7,0 fosfatpuffer bestemtes ved biundersøgelse, samt spektroskopisk (når prøven udviser UV-absorption) i hvert tilfælde med forbindelsens egen standard, der er blevet gjort fuldstændig opløselig. Prøveopløsningen og standardopløsningen fremstilles som beskrevet nedenfor.

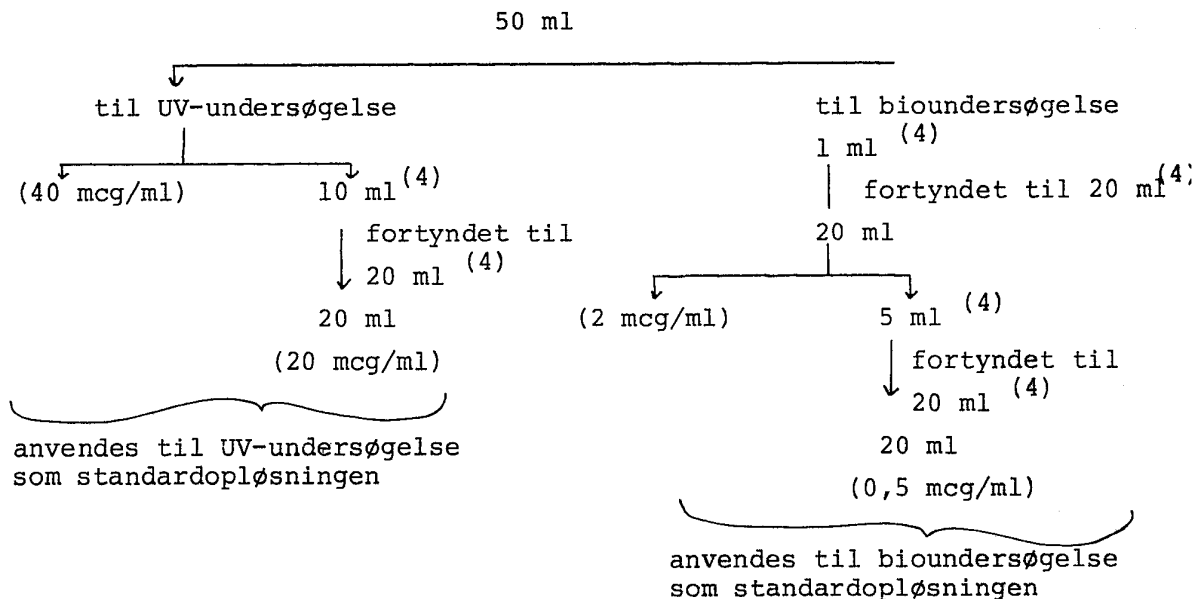
#### Fremstilling af prøveopløsning

Ca. 10 mg (1) af en prøve anbringes i en kolbe og blandes med 1 ml 0,1M fosfatpuffer (pH-værdi 7,0). Kolben tilstoppes, aflukkes med et metallåg, anbringes på en rotationsryster og rystes ved 160 omdr./min. i 4 timer ved 25°C. Opløsningen filtreres igennem et Millipore-filter (HAWP 01300, middelporestørrelse 0,45  $\mu$ m). Filtratet fortyndes til brug for biundersøgelse og UV-undersøgelse på følgende måde:



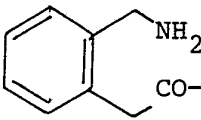
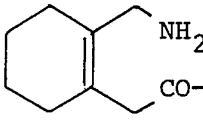
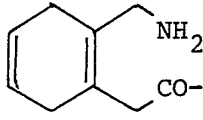
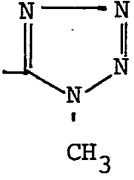
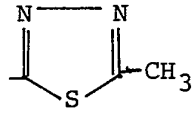
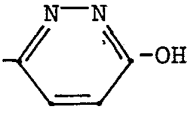
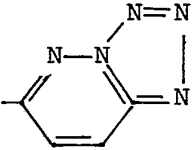
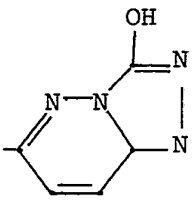
### Fremstilling af standardopløsningen

Ca. 2 mg af den samme prøve afvejes nøjagtigt og opløses i 4 ml 1%  $K_2CO_3$ -opløsning <sup>(3)</sup> (sædvanligvis indenfor 1 minut). Opløsningen fortyndes nøjagtigt til 50 ml i en kolbe med 0,1 M fosfatpuffer (pH-værdi 7,0) og anvendes til fremstilling af standardopløsningerne til biundersøgelse og UV-undersøgelse som følger:



- (1) En prøve på 20 mg eller mere anvendes, når prøven forventes at være mere opløselig.
- (2) 0,1M fosfatpuffer (pH-værdi 7,0) anvendes som fortyndingsmiddel i den foreliggende prøve og ligeledes som referenceopløsning i UV-undersøgelsen.
- (3) Det var tidligere blevet bekræftet, at næsten samme resultat opnås, når prøven opløses i DMSO (dimethylsulfoxid) og dernæst fortyndes på tilsvarende måde med pufferen.
- (4) Opløsningens volumen måles nøjagtigt med en passende pipette eller kolbe.

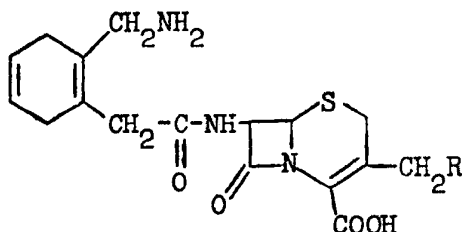
Opløseligheder (mg/ml) i 0,1M fosfatpuffer (pH-værdi 7,0)

7-sidekæde $R-NH-$ ; $R =$  3-sidekæde $-CH_2-S-R'$ ; $R' =$  			
	MR-S94 <u>BA</u> <u>UV</u> 2,0    1,9	BB-S336 (6c) <u>BA</u> <u>UV</u> 25,6   24,6 23,0   26,0	BB-S311 (7c) <u>BA</u> <u>UV</u> 9,7    9,7 9,4 9,6   7,8 7,8   7,8
	MR-S96 1,2    0,9	BB-S341 (6d) 4,3    4,6	BB-S312 (7d) 8,8    7,6 3,4
	BB-S150 4,4    4,4	BB-S340 (6a) 16,8   16,0	BB-S180 (7a) 3,1 4,1
	BB-S226 2,5 2,1 3,8   3,5 2,2	BB-S338 (6b) 3,0    3,0	BB-S269 (7b) 12,5   9,0 1,7
	BB-S207 4,2    3,9 3,6	BB-S339 (6e) 8,0    8,1	BB-S313 (7e) 5,9    7,7 1,3 1,5   3,1 3,7   4,4
			BB-S314 (7f) 8,7    8,9
			BB-S324 (7g) 8,0

BA: Biundersøgelse, UV: UV-undersøgelse

Resultater angivet for en bestemt forbindelse på forskellige linier opnåedes ved anvendelse af prøver fra forskellige portioner.

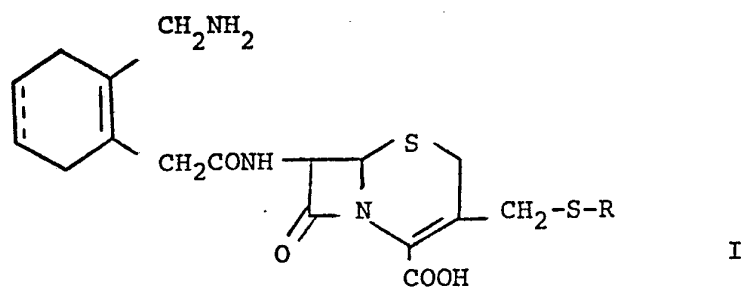
De tilsvarende forbindelse indeholdende en 3-acetoxymethylgruppe og en 3-methylgruppe fremstilledes og sammenlignedes in vitro med forbindelsen ifølge eksempel 1 og der opnåedes følgende resultater:



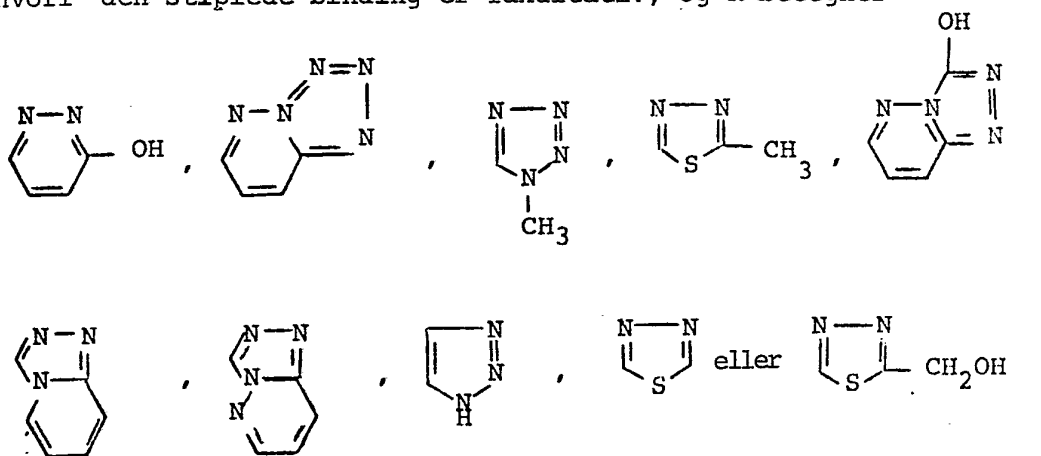
<u>Organisme</u>	<u>M.I.C.-værdi (mcg/ml)</u>			
	R= -OCOCH <sub>3</sub>	-H		
S. aureus Smith	A9537	1,6	>3,1	0,8
S. aureus Smith + 50% serum	A9537	6,3	>6,3	1,6
S. aureus Russel		3,1	>12,5	0,8
S. aureus BX1633	A9606	3,1	>12,5	1,6
Str. pyogenes + 5% serum	A9604	0,31	>2,5	0,16
D. pneumoniae + 5% serum	A9585	0,31	>2,5	0,08
Mycobacterium 607		>100	>100	>100
E. coli NIHJ		100	>100	3,1
E. coli ATCC 8739		25	>100	3,1
E. coli Juhl	A15119	50	>100	6,3
K. pneumoniae	A9977	25	>100	3,1
K. pneumoniae	A15130	25	>100	3,1
Pr. mirabilis	A9900	100	>100	25
Pr. morgani	A15153	>100	>100	100
Sal. enteritidis	A9531	25	>100	1,6
Ser. marcescens	A20019	>100	>100	>100
Ps. aeruginosa	A9843	>100	>100	>100

PATENTKRAV

Analogifremgangsmåde til fremstilling af cephalosporansyre-derivater med den almene formel:

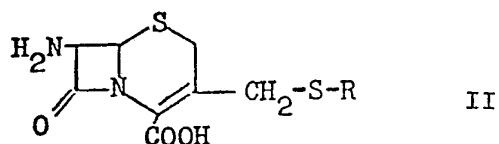


hvori den stiplede binding er fakultativ, og R betegner

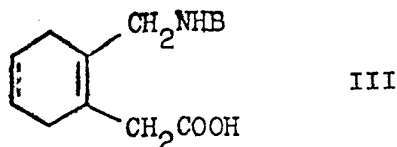


eller let spaltelige estere, farmaceutisk acceptable salte og Schiff-baser deraf, kendte ved,

a) at man omsætter en forbindelse med den almene formel:



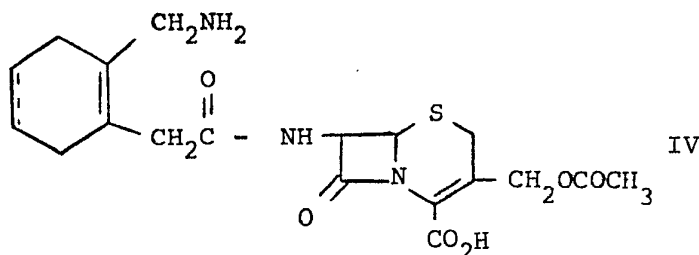
hvor R har den ovenfor anførte betydning eller en let spaltelig ester eller et salt deraf med et acylerende derivat af en syre med den almene formel:



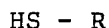
hvor den stiplede binding er fakultativ,

og B betegner en amino-beskyttende gruppe, og fjerner den amino-beskyttende gruppe, og om ønsket, enten før eller efter fjernelse af B, (i) på i og for sig kendt måde omdanner produktet i form af den frie syre eller et salt deraf til den tilsvarende Schiff-base, en let spaltelig ester eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf, eller (ii) på i og for sig kendt måde omdanner produktet i form af en let spaltelig ester eller et salt deraf til den tilsvarende frie syreforbindelse eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf, eller

b) at man omsætter en forbindelse med formlen:



hvor den stiplede binding er fakultativ, eller en let spaltelig ester eller et salt deraf med en thiol med formelen



V

hvor R har den ovenfor anførte betydning eller et salt deraf og om ønsket (i) på i og for sig kendt måde omdanner produktet i form af den frie syre eller et salt deraf til den tilsvarende Schiff-base, en let spaltelig ester eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf, eller (ii) på i og for sig kendt måde omdanner produktet i form af en let spaltelig ester eller et salt deraf til den tilsvarende frie syreforbindelse eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

Fremdragne publikationer:

Dansk patentansøgning nr. 2317/72 (patent nr. 137192).