

1188/82

57.072/SZE

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

22533
64352

K I V O N A T

Eljárás cefalosporinok előállítására

ELI LILLY AND COMPANY, INDIANAPOLIS, Indiana,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1993. 04. 21.

Elsőbbsége: 1992. 04. 24. (07/874,257),

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

- A találmány tárgya eljárás az (I) általános képletű - ahol
- R jelentése adott esetben helyettesített öttagú vagy hattagú gyűrűs szénhidrogéncsoport vagy adott esetben helyettesített öttagú heterociklusos csoport, melyben az egy vagy több heteroatom nitrogén-, oxigén- vagy kénatom lehet;
- R¹ jelentése hidrogénatom, halogénatom, metoxicsoport, metilcsoport vagy egy olyan metiléncsoport, melyhez közvetlenül vagy oxigén-, kén- vagy nitrogénatomon át alkoxi-, alkoxi-karbonil-csoport vagy adott esetben helyettesített, 1-4 heteroatomot, mely lehet oxigén-, kén- vagy nitrogénatom, tartalmazó, öttagú vagy hattagú heterociklusos csoport kapcsolódik;
- R² jelentése hidrogénatom vagy karboxilcsoportot védő csoport -

cefalosporinok előállítására.

A találmány szerinti eljárást az jellemzi, hogy egy (III) általános képletű, α -helyzetben helyettesített α -aminosav reaktív származékát - ahol a karboxilcsoport hidroxilcsoportja szerves csoporttal helyettesített -, (II) általános képletű cefalosporinnal reagáltatják rögzített penicillin-aciláz enzim hatásos mennyiségének a jelenlétében 0°C és $+20^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten.

Albini Ammendar

1188/93

33623

57.072/SZE

S.B.G. & K.
Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1061 Budapest, Daiszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

64352

A

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

VSZQ-5 C07D501/46
AG1K 31/545

Eljárás cefalosporinok előállítására

ELI LILLY AND COMPANY, INDIANAPOLIS, Indiana,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Feltaláló:

GARDNER John Paul, INDIANAPOLIS, Indiana,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1993. 04. ~~21~~.

Elsőbbsége: 1992. 04. 24. (07/874,257),

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A találmány tárgya iparilag előnyösen alkalmazható
enzimatis eljárás cefalosporinok előállítására, mely abból áll,
hogy a megfelelő 7-amino-cefalosporin központi vegyülethez egy α -
-aminosavat kapcsolunk hozzá.

Cefalosporinoknak egy aminosavszármazék és egy 7-amino-cefa-
losporin enzimatis kondenzálásával történő előállítását írja le

le a 3 816 253 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom. A találmány legtöbb példájában a reakcióelegyhez adott enzimforrás maga az a mikroorganizmus, ami az enzimet termeli. A nyers sejtmentes készítmény, valamint a két kromatográfiás lépéssel előállított készítmény alkalmazására ugyancsak találunk példákat. A szabadalom szerint a reakciót 5-50°C hőmérsékleten, előnyösen 20°C és 40°C közötti hőmérsékleten hajtják végre. Egy kivétellel azonban a reakció 37°C hőmérsékleten történik, az egy kivételes esetben 25°C hőmérsékletet alkalmaznak, 63 %-os hozamot elérve.

Az említett szabadalom példáiban alkalmazott hőmérsékleteknél a kívánt termék hozamát csökkenthetik azok a konkuráló reakciók, melyek során a szennyező melléktermékek keletkeznek. Ilyen melléktermék elsősorban az aminosavszármazék hidrolízises terméke. Ezek a melléktermékek nem mindig távolíthatók el könnyen a reakcióelegyből. Függetlenül azonban a melléktermékek elválaszthatóságának lehetőségétől, megjelenésük mindenképpen növeli a termelés költségét.

A múltban használt enzimátikus eljárásoknál lényeges mennyiségű enzim használódott fel az egyes reakciókhoz, ezért az enzim ára az eljárás költségének lényeges részét tette ki.

Az enzimátikus eljárás jelenlegi költségei miatt a szokásos szerves kémiai eljárások vonzóbbak az ipar számára. Ha azonban az enzimátikus eljárások költségeit sikerül csökkenteni, számos olyan fontos előnyük van, mellyel a kémiai eljárások nem rendelkeznek. Így például az enzimátikus reakciók csak egy

reakciólépést igényelnek szemben a többlépéses kémiai eljárásokkal. Továbbá a kémiai eljárások hosszadalmasabbak, nagy mennyiségű oldószert, például piridint, igényelnek és nem kívánatos melléktermékek keletkezésével járnak.

A fentiekre tekintettel igény volt olyan enzimatiszus eljárások kidolgozására, amellyel legalább olyan vagy még jobb hozamok érhetők el, mint az előzőleg alkalmazott enzimatiszus eljárásoknál.

Felismertük, hogy van lehetőség a kívánt cefalosporin antibiotikum magasabb hozammal való előállítására, ha a kondenzációs reakciót 0-20°C hőmérséklettartományban végezzük, megfelelő reakcióközegben vagy oldószerben alkalmazott rögzített penicillin-aciláz enzim jelenlétében.

A találmány további felismerése, hogy a kondenzációt a környezet kémhatásán végezzük, melynek fogalmát az alábbiakban megmagyarázzuk.

A találmány további szempontja, hogy a kondenzációt olyan reakciókörülmények között hajtjuk végre, ahol az α -aminosavnak a cefalosporin központi vegyülethez való moláris aránya magas.

A találmány tárgya eljárás az (I) általános képletű - ahol R jelentése adott esetben helyettesített, öt- vagy hattagú szénhidrogéngyűrű vagy adott esetben helyettesített, 1-4

heteroatomot, mely lehet nitrogén-, oxigén- vagy kénatom, tartalmazó öttagú heterociklusos csoport;

R¹ jelentése hidrogén- vagy halogénatom, metil-, metoxi-

csoport vagy szerves csoporthoz, adott esetben oxigén-,
kén- vagy nitrogénatomon keresztül kötött metiléncsoport;
 R^2 jelentése hidrogénatom vagy karboxilcsoportot védő
csoport -

cefalosporinok előállítására, mely abból áll, hogy a (III)
általános képletű α -helyzetben helyettesített α -aminosav aktív
származékát, (ahol a karboxilcsoport hidroxilcsoportja helyettesí-
tett) egy (II) általános képletű - ahol R, R^1 és R^2 jelentése
azonos a fentebb tett meghatározásokkal - 7-amino-cefalosporin
szubsztráttal reagáltatjuk - előnyösen rögzített állapotban lévő
- penicillin-aciláz enzim jelenlétében 0-20°C hőmérsékleten; vagy
környezeti kémhatásnál; vagy magas α -aminosav/cefalosporin mól-
arányánál, az egyes megnevezett reakciókörülményeket egymástól
függetlenül alkalmazva.

A cefalosporinok enzimátikus előállítását a szennyező
melléktermékek mennyiségével és az előállítási folyamat alatt
jelentkező enzimveszteséggel jellemezzük. A jelen találmány első
kivitelezési formájánál a (III) általános képletű, α -helyettesí-
tett α -aminosav aktív származéka és a (II) általános képletű 7-
-amino-cefalosporin szubsztrát rögzített enzim jelenlétében,
0-20°C hőmérsékleten végzett kondenzációja alatt termelődő
szennyeződések mennyisége csökkent.

Alacsony hőmérsékleten az enzimek aktivitása általában
csökken, gyakran jelentékeny mértékben. A probléma feloldására a
találmány általában nagyobb enzimmenyiséget használ. Ily módon

kedvező termékhozam érhető el nagyon alacsony hőmérsékleten is, például 0-5°C-on.

A bio-katalizátoros kondenzáció gyakorlatában egy maximális termékkoncentráció érhető el egy bizonyos időtartam alatt, ami függ az enzim mennyiségétől, a szubsztráttól és más, a szakemberek előtt ismert tényezőktől. Ezt követően a termék koncentrációja egy ideig állandó marad, mely időtartam arányos azzal az idővel, ami a maximális termékkoncentráció eléréséhez szükséges. Így például, ha a maximális termékkoncentrációt 2 óra alatt érjük el, az állandó koncentráció platója kb. egy órás időtartamú. Ezután a termék koncentrációja rendszerint csökken. A találmány gyakorlati megvalósításánál előnyös olyan mennyiségű penicillin-acilázt használni, melynél az állandó termékkoncentráció (koncentráció plató) kb. egy órán át tart, mely idő elegendő ahhoz, hogy a terméket kinyerjük a reaktorból. A gyakorlatban a 10-120, előnyösen 30-80 perces koncentráció alkalmas a találmány megvalósításához.

A találmány egy másik kivitelezési formájánál környezeti kémhatásnál végezzük a reakciót, vagyis - más szavakkal kifejezve - a reakcióközeg nem pufferolt. A környezeti kémhatásnál a reakcióidő alatt közbeavatkozás nélkül hagyjuk a pH értékét eltolódni vagy változni. Általában a pH-érték 7-7,5 értéknél áll be és hagyjuk, hogy a reakció során pH = 6-7 értékre csökkenjen. Úgy véljük a környezeti kémhatásnál a PGME és a végtermék hidrolízise csökken a végtermék keletkezési mértékéhez

viszonyítva.

A találmány valamennyi megvalósítási módjánál az alkalmazott enzimmenyiség 50-3000 IU a 7-amino-cefalosporin szubsztrát (II) 1 g-jára számolva.

Amint a szakemberek előtt nyilvánvaló, az előnyösen alkalmazott enzimmenyiség természetesen változó a szubsztrát természetétől és minőségétől, a reakció méreteitől, a hőmérséklettől és az alkalmazott készüléktípustól függően.

A képletekben R jelentése öt- vagy hattagú alifás vagy aromás szénhidrogényűrű (például fenil-, ciklohexadienil-, ciklohexenil- vagy ciklohexilcsoport), mely adott esetben egy vagy több szubsztituenssel helyettesített. A szubsztituens lehet (nem korlátozva csak a megnevezetekre): hidroxil-, halogén-, alkil-, alkoxi-, karboxil-, nitro-, aminocsoport, stb. R jelentése lehet továbbá egy vagy több (előnyösen négynél nem több) heteroatomot tartalmazó öttagú heterociklusos csoport, mely heteroatom lehet oxigén-, nitrogén- vagy kénatom, vagy ezek kombinációja (például tienil-, furilcsoport, stb.); a heterociklusos csoport egy vagy több (előnyösen nem több, mint három) szubsztituenssel lehet helyettesítve, mely szubsztituens lehet (nem korlátozva kizárólag a megnevezettek): hidroxil-, alkil-, alkoxi-, karboxil-, nitro-, aminocsoport, stb. Különösen előnyösek azok az (I) általános képletű termékvegyületek és a megfelelő (III) általános képletű vegyületek, ahol R jelentése helyettesítetlen fenil-, p-hidroxifenil- vagy 1,4-ciklohexa-

dién-1-il-csoport.

Ha R jelentése heterociklusos csoport, a 4-tiazolil-, furil- és tienilcsoport különösen előnyös.

R^1 jelentése lehet hidrogénatom, halogénatom (bróm, klór, jód, fluor), metoxi-, metilcsoport vagy olyan metiléncsoport, melyhez egy szerves csoport kapcsolódik, például 1-6 szénatomszámú alkoxi-, 1-6 szénatomszámú alkoxi-karbonil-csoport vagy olyan öt- vagy hattagú heterociklusos csoport kapcsolódik, mely 1-4 heteroatomot (oxigén-, kén-, nitrogénatomot vagy ezek kombinációját) tartalmaz, és a metiléncsoport adott esetben oxigén-, kén- vagy nitrogénatomon keresztül kötődik a fenti csoportokhoz. A heterociklusos csoport adott esetben egy vagy több szubsztituenssel lehet helyettesített, mely szubsztituens lehet (korlátozás nélkül): hidroxil-, halogén-, 1-6 szénatomszámú alkil-, 1-6 szénatomszámú alkoxi-, karbonil-, karboxil-, ciano-, amino-, nitrocsoport, stb. Különösen előnyös, ha R^1 jelentése metil-, metoxics csoport, klóratom vagy acetoxi-metilén-csoport. Előnyös R^1 heterociklusos csoport az 1H-1,2,3-triazol-4-il-, 1H-tetrazol-5-il- és a 2-tiazolil-csoport.

Az α -helyettesített α -aminosav aktív származékán azokat a származékokat értjük, ahol a karboxilcsoport hidroxilcsoportja olyan szerves csoporttal helyettesített, amit ha a kondenzációhoz használt penicillin-aciláz lehidrolizál, visszaalakul a karbonsav.

Feltételezzük, hogy ezek az aktív származékok reagálnak az

enzimmel egy aktív acil-enzim köztiterméket alkotva, ami ezután reakcióba léphet, kialakítva a (II) általános képletű 7-amino-cefalosporin központi vegyülettel az amidkötést.

Az aktív származékokra példaként említhetjük az alkil-észtereket (például metil-, etil-észter), az aralkil-észtereket (például benzil-észterek), az amidokat és dipeptideket (azaz olyan amidokat, melyek egy második aminosavval képződnek). Előnyösek a D-fenil-glicin, D-p-hidroxifenil-glicin és a D-1,4-ciklohexadién-1-il-glicin metilészterei. A karboxilcsoport védőcsoportjaira (R^2) példákat a 4 892 942 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalomban; E. Haslan: "Protective groups in organic chemistry (J.G.W. McOmie szerk., Plenum Press, N.Y. (1973), 5. fejezet) és T.W. Greene: "Protective groups in organic synthesis (John Wiley & Sons, N.Y., (1981), 5. fejezet) munkákban találunk.

Különösen lényegesek az alábbi (II) általános képletű savak: 7-amino-cefalosporánsav, 7-amino-3-deacetoxi-cefalosporánsav és a 7-amino-3-klór-cefalosporánsav.

A találmányhoz alkalmazott penicillin-aciláz enzim bármelyik ismert mikrobiális forrásból származhat. Ez tartozhat a Xanthomonas, Pseudomonas, Aeromonas, Escherichia, Arthrobacter, Corynebacterium és Bacillus nemzetséghez.

Különösen előnyös az Escherichia coli ATCC 9637 törzsből származó penicillin-acilázt használni.

A találmány szerint előnyös a reakciót rögzített enzim

jelenlétében végezni. Ehhez felhasználhatjuk valamennyi ismert rögzítő eljárást: abszorpciót, ionos vagy kovalens kötést polimer mátrixhoz, kereszt-kötést, gélbe vagy szálba történő bezárást, mikroenkapszulációt, ultrafiltrációs membrán mögé zárást membrán reaktorban. Előnyös a cellulóz-triacetát szál szerkezetébe zárt vagy poliakrilamid gyantához kovalens kötéssel kötött enzimet alkalmazni.

A rögzített penicillin-aciláz készítmény - akár szálba zárva, akár polimer hordozóhoz kovalensen kötve - kereskedelmi forgalomból beszerezhető (Recordai, S.p.a., Biochemical Unit De.Bi., Cassina de Pecchi, Olaszország).

A (II) általános képletű vegyületet 0,5-2 %-os, előnyösen 1,4-1,5 %-os (súly/térf.) koncentrációban alkalmazzuk. A találmány egy másik kivitelezési módja, hogy a (III) általános képletű aktív származékot a (II) általános képletű vegyülethez viszonyítva magas molarányban - 3-5 között - alkalmazzuk.

Noha a reakciót 0-20°C közötti hőmérséklettartományban hajthatjuk végre, előnyösen 0-2°C hőmérsékletet alkalmazunk.

Előnyös oldószer kizárólag a víz, de használhatunk szerves oldószert is, ami lehet etilén-glikol, rövidszénláncú alkohol (metanol, etanol, izopropanol, 2-butanol), acetone, stb., melyek vizes rendszerként alkalmazhatók.

Az eljárás során a reakció előrehaladt volta és a termék minősége HPLC módszerrel vagy más módon követhető nyomon.

Legelőnyösebb az eljárást úgy végrehajtani, hogy két

tényezőt, a hőmérsékletet, és a molarányt szabályozzuk és a kémhatást hagyjuk a körülményeknek megfelelően változni.

Az elmondottak szemléltetésére az alábbiakban példákat adunk meg. A példák kizárólag szemléltető célzatúak és a találmány oltami körét nem korlátozzák.

A példákban cefalosporin szubsztrátként 7-amino-3-klór-
-cefalosporánsavat (7-ACCA) használunk. A 7-ACCA R.R. Chauvette és munkatársai módszerével (J.Med.Chem., 18: 403 (1975)) állítható elő. A D-fenil-glicin-metil-észtert (PGME) és a D-p-
-hidroxi-fenil-glicin-metil-észtert (HPGME) a kereskedelmi forgalomból beszerezhető (például Sigma) aminosavakból állíthatjuk elő a szokásos észterifikációs eljárásokkal, például metanollal reagáltatva sósav jelenlétében. Az aminosav ilyen és más származékának előállítására felhasználható C.A.Buehler és D.E. Pearson munkája: "Survey of organic synthesis" (Wiley-
-Interscience, New York (1970), 1. köt. 801-830. old. és 2. köt. (1977), 711-726. oldal).

1. példa

7-(D-2-Ammónium-2-fenil-acetamido)-3-klór-3-cefem-4-karboxilát
belső só

Lombikban 96,0 ml vízhez hozzáadunk 0,9388 g (4,0007 mmól) 7-ACCA-t (1). A kémhatás pH = 4,12. 1,78 ml 3M ammónia hozzáadása után a kémhatás pH = 7,57. Ezt követően 4,7594 g (23,602 mmól) D-fenil-glicin-metil-észter-hidrokloridot (2) adunk a reakció-

elegyhez. A kémhatás pH = 5,68. A reakcióelegyet 5°C hőmérsékletre hűtjük és 1,90 ml 3M ammónia hozzáadásával a kémhatás pH = 7,00 értékre emelkedik. 6,1442 g (940 IU/g) enzimet adunk a reakcióelegyhez. A HPLC analízis szerint a reakció az I. táblázatban bemutatott módon halad előre. A 200. percben a reakcióelegyet leszűrve eltávolítjuk a rögzített enzimet. A reakcióhozam 93,0 %-os.

A reakciófolyamatot az 1. ábrán mutatjuk be.

I. T Á B L Á Z A T

idő	pH	hőmérséklet	(1) vegyület	(2) vegyület	termelődött
perc		(°C)	maradék (%)	maradék (%)	(3) vegyület (%)

0	7,00	6	100	100	-
85	6,28	5	9,2	67,1	91,4
120	6,16	4	9,1	64,3	91,5
180	5,97	4,5	8,9	63,7	91,8
200	5,91	4,5	8,8	65,3	93,0

2. példa

7-(D-2-Ammónium-2-fenil-acetamido)-3-klór-3-cefem-4-karboxilát,
belső só

Lombikban 550 ml tisztított vízhez hozzáadunk 1,0072 g (4,000 mmól) 7-ACCA-t (1). A kémhatás pH = 3,39. 4,10 ml 3M ammónia hozzáadása után a kémhatás pH = 6,73. Ezt követően 4,8397 g (24,000 mmól) D-fenil-glicin-metil-észter-hidrokloridot adunk a reakcióelegyhez, a kémhatás pH = 6,5. 13,77 ml víz hozzáadásával meghígítjuk a reakcióelegyet, térfogata ekkor 75,09 ml . 3,0672 g (470 IU/g) nedves enzimet adunk a reakcióelegyhez. A reakció alatt a kémhatást 30 percenként pH = 6,5 értékre állítjuk be. HPLC analízis szerint a reakció a II. táblázatban összefoglaltak szerint zajlik le. 350 perc elmúltával a keveréket leszűrjük. A kívánt termék hozama 88,2 %-os.

II. T Á B L Á Z A T

idő	pH	hőmérséklet	(1) vegyület	(2) vegyület	termék
perc		(°C)	mennyisége	mennyisége	mennyisége (%)
			(%)	(%)	
0	6,48	6	95,9	100	-
30	6,34	5,5	53,0	87,0	32,5
60	6,39	5,5	36,0	82,3	48,9
90	6,41	5	24,2	79,6	59,7
120	6,41	5,5	17,6	73,2	66,3
210	6,38	3,5	9,0	69,5	78,5
240	6,37	5	8,0	67,8	80,8
270	6,38	4,5	6,9	66,3	82,3

300	6,42	4,5	6,8	61,7	80,8
330	6,42	4,0	6,2	61,0	80,1
350	6,42	5	7,1	47,7	88,2

3-17. példa

7-(D-2-Ammonium-2-fenil-acetamido)-3-klór-3-cefem-4-karboxilát,
belső só

Az eljárás a következő: vízben lévő 1,0072 g (4,00 mmól) 7-ACCA-t 3M ammónium hozzáadásával oldatba viszünk. A D-fenil-glicin-metil-észter-hidroklorid alábbiakban feltüntetett mennyiségét adjuk az oldathoz. A reakcióelegyet 5°C hőmérsékletre hűtjük. 3M ammóniát adunk a reakcióelegyhez, ezáltal az alábbiakban megadott kémhatásokat elérve. A reakcióelegyet vízzel annyira hígítjuk, hogy az alábbiakban megnevezett koncentrációkat érjük el. 3,07 g (500 IU/g) nedves enzimet adunk a reakcióelegyhez. A kémhatást nem állítjuk be, kivéve ott, ahol a kezdeti kémhatás pH = 6,5. Ez utóbbi esetben a kémhatást pH = 6,2-6,5 értéken tartjuk.

Reakciókörülmények:

- A) 1,0 egyenértéksúlynyi D-fenil-glicin-metil-észter-hidroklorid;
- B) 3,5 egyenértéksúlynyi D-fenil-glicin-metil-észter-

-hidroklorid;

C) 6,0 egyenértéksúlynyi D-fenil-glicin-metil-észter-

-hidroklorid;

D) koncentráció: 0,5;

E) koncentráció: 1,25

F) koncentráció: 2,0

G) kiindulási kémhatás pH = 6,5

H) kiindulási kémhatás pH = 7,25

I) kiindulási kémhatás pH = 8,0.

A különféle reakciókörülményeknél kapott eredményeket a III. táblázatban foglaljuk össze.

III. T Á B L Á Z A T

példa	reakció- körülmények	idő (perc)	termékhozam
3	C, F, H	150	86,9
4	C, D, H	150	80,6
5	A, F, H	275	46,6
6	A, D, H	180	28,9
7	C, E, I	60	83,4
8	C, E, G	330	84,7
9	A, E, I	45	34,3
10	A, E, G	540	42,8
11	B, F, I	60	79,8

12	B, F, G	360	78,9
13	B, D, I	60	56,2
14	B, D, G	630	70,8
15	B, E, H	180	80,4
16	B, E, H	190	81,0
17	B, E, H	180	80,8

18. példa

7-(D-2-Ammónium-2-fenil-acetamido)-3-klór-3-cefem-4-karboxilát,
belső só

150 ml vízhez hozzáadunk 4,8338 g (20 mmól) 7-ACCA-t. A kémhatás pH = 3,67. 8,40 ml 3M ammóniát adunk hozzá. A kémhatás pH = 8,20. 23,0 g (114 mmól) D-fenil-glicin-metilésztert adunk a reakcióelegyhez, kémhatás pH = 5,29. A keveréket leszűrjük, 100 ml vízzel meghígítjuk. Az oldat térfogata 310 ml. Hozzáadunk 5 ml vizet, és az oldatot lehűtjük 1°C hőmérsékletűre. Kémhatás pH = 5,80. 16,6 ml 3M ammóniával a kémhatást pH = 7,28 értékre állítjuk be. Térfogat; 332 ml. Vízzel mosott enzimet (15,34 g) adunk a reakcióelegyhez. A HPLC analízis szerint a reakció a IV. táblázatban foglaltak szerint zajlik le.

IV. T Á B L Á Z A T

idő (perc)	pH	hőmér- séklet (°C)	(1) vegyület mennyisége (%)	(2) vegyület mennyisége (%)	termék mennyisége
---------------	----	--------------------------	--------------------------------	--------------------------------	----------------------

0	7,28	2	96,0	94,5	-
90	6,94	1	8,1	61,5	87,7
120	6,83	1	6,6	56,0	84,8
145	6,76	1	7,1	58,5	89,8

19. példa

7-(D-2-Ammónium-2-fenil-acetamido)-3-klór-3-cefem-4-karboxilát,
belső só

42,0 ml 0,0033M dikálium-hidrogén-foszfát pufferhez (pH = 6,5) hozzáadunk 0,494 g (2,000 mmól) 7-ACCA-t. Kémhatás pH = 5,91. Az oldathoz hozzáadunk 0,92 ml 45 %-os trikálium-foszfát-oldatot. Kémhatás pH = 7,24. 2,3797 g (11,801 mmól) D-fenil-glicin-metil-észter-hidrokloridot adunk a reakcióelegyhez. A kémhatás pH = 6,40. 1,10 ml 45 %-os trikálium-foszfát-oldatot adunk hozzá, kémhatás pH = 7,0. 2,6120 g (800 IU/g) enzimet adunk a reakcióelegyhez.

A 43. percben a kémhatást 1,34 ml 45 %-os trikálium-foszfát oldattal beállítjuk pH = 7,00 értékre. A termék maximális hozama 66,1 %.

Az eredményeket az V. táblázatban foglaljuk össze.

V. T Á B L Á Z A T

idő (perc)	pH	hőmér- séklet (°C)	(1) vegyület mennyisége (%)	(2) vegyület mennyisége (%)	termék mennyisége
0	6,95	0,25	93,6	95,1	0,0
5	6,72	26,5	32,0	66,8	54,8
10	6,62	27,5	20,6	55,7	64,0
15	6,50	28	17,6	48,8	66,1
20	6,36	28,5	16,6	42,8	64,5
25	6,27	28,5	16,6	40,3	64,5
30	6,18	29	17,0	37,9	64,1
35	6,10	29	17,0	36,6	64,8
40	6,03	29,5	17,3	34,2	61,6
45	6,95	29,5	-	30,6	59,9
50	6,84	29,5	24,5	22,8	53,7
55	6,75	30	27,3	17,9	49,1
60	6,68	60	29,1	14,3	45,2

20. példa

7-(D-2-ammónium-2-fenil-acetamido)-3-klór-3-cefem-4-karboxilát,
belső só

A 19.példában leírtak szerint állítjuk elő, azzal a különbséggel, hogy 2,2707 g (2660 IU/g) száraz enzimet használunk. A reakció alatt a kémhatást nem állítjuk be. Maximális hozam 67,5 %.

VI. T Á B L Á Z A T

idő (perc)	pH	hőmér- séklet (°C)	(1) vegyület mennyisége (%)	(2) vegyület mennyisége (%)	termék mennyisége
0	7,00	23,5	99,6	99,4	-
5	6,95	24	62,7	80,8	275
10	6,88	25	40,2	74,1	49,0
15	6,85	25	30,1	68,6	58,5
20	6,78	25,5	22,2	63,7	63,7
25	6,71	26	18,0	58,5	66,1
30	6,65	26,5	16,8	55,6	67,5
35	6,59	27	15,5	51,7	66,8
40	6,54	27	15,5	49,8	66,5
45	6,49	27	16,7	46,3	65,5
50	6,44	27,5	16,2	44,8	64,8
55	6,38	27,5	16,2	42,8	63,5
60	6,34	28	16,2	41,4	63,2
180	5,75	27	17,4	32,7	50,8

21. példa

7-(D-2-Ammónium-2-fenil-acetamido)-3-klór-3-cefem-4-karboxilát,
belső só

A 19. példában leírtak szerint állítjuk elő az alábbi
eltérésekkel:

(1) vegyület: 0,4698 g (2,002 mmól)

(2) vegyület: 2,381 g (11,8074 mmól)

44,0 ml és 1,06 ml 45 %-os trikálium-foszfát oldat

8,1686 g (1660 IU/g) nedves enzim.

A t = 52. percben a reakcióelegy kémhatását 1,37 ml 45 %-os
trikálium-foszfát oldattal pH = 7,00 értékre állítjuk be.
Maximális hozam 65,6 %.

VII. T Á B L Á Z A T

idő	pH	hőmér- séklet	(1) vegyület mennyisége (%)	(2) vegyület mennyisége (%)	termék mennyisége
(perc)		(°C)			

0	7,00	23,5	95,7	95,6	-
5	6,72	24	19,9	51,9	61,9
10	6,45	25	17,1	40,9	65,6
15	6,26	25	17,8	36,2	65,6
20	6,11	25,5	18,1	32,4	63,5
25	5,99	26	18,7	31,3	62,2

30	5,88	26	19,5	30,4	62,7
35	5,81	26,5	19,7	29,6	61,9
40	5,73	26,5	20,0	28,9	61,1
45	5,66	27	20,1	28,3	59,5
50	5,61	27	20,6	28,5	60,4
55	6,90	27	29,6	17,6	49,2
282	6,16	28	74,1	-	0,9

22. példa

7-(D-2-Ammónium-2-fenil-acetamido)-3-klór-3-cefem-4-karboxilát,
belső só

48,0 g 0,033M dikálium-hidrogén-foszfát pufferhez (pH = 6,5)
hozzáadunk 0,470 g (2,0058 mmól) 7-ACCA-t (1). Az oldat
kémhatása pH = 5,73. Az edényt 20°C hőmérsékletű fürdőbe
helyezzük. 1,06 ml 45 %-os trikálium-foszfát oldatot adunk hozzá.
Kémhatás: pH = 7,21. 2,3811 g (11,8099 mmól) D-fenil-glicin-
-metil-észter-hidrokloridot (2) adunk az oldathoz. Kémhatás: pH =
6,60. 0,71 ml 45 %-os trikálium-foszfát oldattal a kémhatást pH =
7,00 értékre állítjuk be. Hozzáadunk 3,0727 g nedves enzimet.
Maximális in situ hozam: 74,6 %.

VIII. T Á B L Á Z A T

idő (perc)	pH	hőmér- séklet (°C)	(1) vegyület mennyisége (%)	(2) vegyület mennyisége (%)	termék mennyisége
---------------	----	--------------------------	--------------------------------	--------------------------------	----------------------

0	7,00	20,5	100	100	-
5	6,89	20,5	43,4	76,1	48,7
10	6,78	20,5	25,4	62,0	62,1
15	6,68	21	21,8	59,5	71,0
20	6,60	21	20,1	56,0	74,0
25	6,52	21	18,9	52,2	73,5
30	6,45	21	18,6	49,1	72,0
35	6,40	20,5	19,1	47,8	74,6
40	6,35	20,5	19,0	46,9	73,4
45	6,31	21	18,7	44,2	71,2
50	6,27	20,5	19,3	46,0	72,9
55	6,22	21	19,5	44,5	72,5
60	6,19	21	19,8	43,7	72,4

23. példa

7-(D-2-Ammónium-2-fenil-acetamido)-3-klór-3-cefem-4-karboxilát,
belső só

48,0 ml 0,033M dikálium-hidrogén-foszfát pufferhez (pH =

6,5) hozzáadunk 0,4710 g (2,0071 mmól) 7-ACCA-t (1). Kémhatás: pH = 6,02. Hozzáadunk 0,98 ml 45 %-os trikálium-foszfát-oldatot, hogy a szubsztrát beoldódjon. Kémhatás: pH = 7,34. 2,3801 g (11,803 mmól) D-fenil-glicin-metil-észter-hidrokloridot adunk az oldathoz. Kémhatás: pH = 6,58. A reakcióedényt 20°C hőmérsékletű fürdőbe helyezzük, 0,63 ml 45 %-os trikálium-foszfát oldattal a kémhatást pH = 7,00 értékre állítjuk be. 3,0738 g nedves enzimet adunk az oldathoz. A maximális hozam 70,18 %.

IX. T Á B L Á Z A T

idő	pH	hőmér-	(1) vegyület	(2) vegyület	termék
(perc)		séklet	mennyisége (%)	mennyisége (%)	mennyisége
		(°C)			

0	6,99	19,5	99,3	98,7	-
5	7,01	20	52,2	80,6	36,3
10	7,02	20	33,9	69,4	57,7
15	7,00	20	24,4	60,4	63,1
20	7,00	20	20,6	55,1	67,1
25	7,00	20	20,1	51,9	69,6
30	7,00	20	19,7	47,4	70,1
35	7,00	20	20,3	43,5	68,7
40	7,03	20	21,3	39,9	67,9
45	7,00	20	22,2	36,7	66,2
50	7,01	20	23,8	33,5	65,7
140	6,58	20	37,2	14,4	50,2
240	6,41	20	38,0	11,1	44,1

(Megjegyzés a táblázathoz: 5-50 perc közötti időszakban egy perccel az 5 perces periódusok letelte előtt kevés 45 %-os trikálium-foszfát oldattal az oldat kémhatását közel pH = 7,00-ra állítjuk be).

24. példa

7-(D-2-ammónium-2-fenil-acetamido)-3-klór-3-cefem-4-karboxilát,
belső só

48,0 ml vízhez hozzáadunk 0,4696 g (2,0012 mmól) 7-ACCA-t
(1). Kémhatás: pH = 3,5. Az oldatot 10°C hőmérsékletre hűtjük.
2,47 ml 3M ammóniát adunk az oldathoz. Kémhatás: pH = 7,10.
2,3835 g (11,8198 mmól) D-fenil-glicin-metil-észter-hidro-
kloridot (2) adunk az oldathoz. Kémhatás: pH = 5,65. 4,30 ml 3M
ammóniát adunk az oldathoz. Kémhatás: pH = 7,00. 3,0778 g (1000
IU/g) nedves enzimet adunk az oldathoz. A 256. per^cben az oldat
kémhatását 2,60 ml 3M ammóniával pH = 7,00 értékre állítjuk be.
Maximális hozam: 71,1 %.

X. T Á B L Á Z A T

idő	pH	hőmér-	(1) vegyület	(2) vegyület	termék
(perc)		séklet	mennyisége (%)	mennyisége (%)	mennyisége
		(°C)			

0	6,98	10	97,0	96,7	-
5	6,89	10	55,9	81,8	33,6
10	6,80	10	36,3	76,0	52,0
15	6,73	10	27,3	71,0	58,3
20	6,65	10	22,3	69,5	61,8
25	6,56	10	19,3	68,3	68,3
30	6,50	10	17,3	67,9	70,5
35	6,44	10	15,7	65,4	71,1
40	6,37	10	14,2	62,5	62,5
45	6,31	10	14,1	64,0	64,0
50	6,27	10	13,6	65,7	65,7
55	6,22	10	13,0	63,4	63,4
75	6,07	10	12,1	62,8	62,8
236	5,50	10	10,9	61,4	61,4
257	7,00	10	10,9	59,5	59,5
276	6,64	10	11,5	51,1	51,1
313	6,25	10	11,1	45,6	45,6

25. példa

7-(D-2-Ammónium-2-fenil-acetamido)-3-klór-3-cefem-4-karboxilát,
belső só

48,0 ml vízhez hozzáadunk 0,4694 g (2,0003 mmól) 7-ACCA-t
(1). Kémhatás: pH = 3,25. Az oldatot 10°C hőmérsékletre hűtjük.
3,05 ml 3M ammóniát adunk az oldathoz. Kémhatás: pH = 7,08.
2,3809 g (11,8069 mmól) D-fenil-glicin-metil-észter-hidrokloridot
adunk az oldathoz. Kémhatás: pH = 5,40. 7,24 ml 3M ammóniát adunk
az oldathoz, a kémhatás: pH = 7,00. 8,1840 g (2670 IU/g) nedves
enzimet adunk a reakcióelegyhez. A 37. percben 1,72 ml 3M
ammóniával a kémhatást pH = 6,52 értékre állítjuk be. A 298.
percben 1,72 ml 3M ammóniával a kémhatást pH = 6,55 értékre
állítjuk be. A maximális hozam: 71,2 %.

XI. T Á B L Á Z A T

idő (perc)	pH	hőmér- séklet (°C)	(1) vegyület mennyisége (%)	(2) vegyület mennyisége (%)	termék mennyisége
---------------	----	--------------------------	--------------------------------	--------------------------------	----------------------

0	7,00		98,6	97,0	-
5	6,75	10	22,3	58,7	59,9
10	6,46	10	14,1	49,0	71,2
15	6,20	10	12,5	43,6	68,3
20	5,98	10	11,8	42,3	69,1
25	5,80	10	12,4	41,1	69,1
30	5,70	10	12,6	41,8	69,7
35	5,58	10	12,4	40,6	68,9
40	6,52	10	13,0	38,6	70,1
45	6,14	10	13,6	33,7	66,9
50	5,96	10	13,9	33,3	67,4
55	5,80	10	14,7	33,2	68,0
60	5,69	10	14,8	32,5	67,6
121	5,11	10	15,1	31,0	67,8
300	6,55	10	16,9	28,9	66,1

26. példa

7-(D-2-Ammónium-2-fenil-acetamido)-3-klór-3-cefem-4-karboxilát,
belső só

48,0 ml vízhez hozzáadunk 0,4698 g (2,002 mmól) 7-ACCA-t

(1). Kémhatás: pH = 3,46. 3,50 ml 3M ammóniát adunk az oldathoz. Kémhatás: pH = 7,23. 2,3798 g (11,8015 mmól) D-fenil-glicin-metil-észter-hidrokloridot adunk az oldathoz. Kémhatás: pH = 5,48. A reakcióelegyet 5°C hőmérsékletre hűtjük és 4,33 ml 3M ammóniával a kémhatást pH = 7,00 értékre állítjuk be. 3,0710 g (1000 IU/g) nedves enzimet adunk az oldathoz. A 295. percben 2,87 ml 3M ammóniával a kémhatást pH = 7,00 értékre állítjuk be. Maximális hozam: 79,5 %.

XII. T Á B L Á Z A T

idő (perc)	pH	hőmér- séklet (°C)	(1) vegyület mennyisége (%)	(2) vegyület mennyisége (%)	termék mennyisége
0	7,03	5	95,3	94,8	-
5	6,82	5	34,6	74,3	55,2
30	6,63	6	19,8	67,4	67,8
45	6,49	5	15,3	64,0	69,9
80	6,20	5	12,0	62,3	73,6
105	6,06	5,5	11,4	62,0	74,6
120	6,04	4,5	10,9	61,0	73,8
150	5,92	5	10,8	60,6	75,9
180	5,81	6	10,7	61,7	77,0
215	5,73	5,5	10,2	59,9	74,3
240	5,69	5,5	10,4	62,1	75,9
270	5,63	6	10,4	62,2	76,3
300	6,96	6	10,3	58,9	76,4
330	6,61	5,5	10,5	52,8	79,5

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás az (I) általános képletű - ahol

- R jelentése adott esetben helyettesített öttagú vagy hattagú gyűrűs szénhidrogéncsoport vagy adott esetben helyettesített öttagú heterociklusos csoport, melyben az egy vagy több heteroatom, nitrogén-, oxigén- vagy kénatom lehet;
- R¹ jelentése hidrogénatom, halogénatom, metoxicssoport, metilcsoport vagy egy olyan metiléncsoport, melyhez közvetlenül vagy oxigén-, kén- vagy nitrogénatomon át alkoxi-, alkoxi-karbonil-csoport vagy adott esetben helyettesített, 1-4 heteroatomot, mely lehet oxigén-, kén- vagy nitrogénatom, tartalmazó, öttagú vagy hattagú heterociklusos csoport kapcsolódik;
- R² jelentése hidrogénatom vagy karboxilcsoportot védő csoport -

cefalosporinok előállítására, azzal j e l l e m e z v e, hogy egy (III) általános képletű, α -helyzetben helyettesített α -aminosav reaktív származékát - ahol a karboxilcsoport hidroxilcsoportja szerves csoporttal helyettesített -, (II) általános képletű cefalosporinnal reagáltatjuk rögzített penicillin-aciláz enzim hatásos mennyiségének a jelenlétében 0°C és +20°C közötti hőmérsékleten.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, az (I) általános képletű - ahol R jelentése fenilcsoport és R¹ jelentése klóratom - előállítására, azzal jellemezve, hogy a megfelelő szubsztituált reagenseket reagáltatjuk egymással.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a (III) általános képletű, α -helyzetben helyettesített α -aminosav reaktív származék a D-fenil-glicin-metil-észter, D-p-hidroxi-fenil-glicin-metil-észter, D-1,4-ciklohexadién-1-il-glicin-metil-észter vagy ezek alkalmazható sója.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a reakciót 0°C és +5°C között hajtjuk végre.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kémhatás a mindenkori reakciókörülmények között kialakult pH érték.

6. Eljárás az (I) általános képletű - ahol

R jelentése adott esetben helyettesített öttagú vagy hattagú, gyűrűs szénhidrogéncsoport vagy adott esetben helyettesített, öttagú, egy vagy több heteroatomot - mely lehet nitrogén-, oxigén- vagy kénatom - tartalmazó heterociklusos csoport;

R¹ jelentése hidrogénatom, halogénatom, metoxics csoport, metilcsoport vagy olyan metilén-csoport, melyhez közvetlenül vagy oxigén-, kén- vagy nitrogénatomon át alkoxi-, alkoxi-karbonil-csoport vagy adott esetben helyettesített, 1-4 heteroatomot - mely lehet oxigén-, kén- vagy nitrogénatom - tartalmazó, öttagú vagy hattagú heterociklusos csoport kapcsolódik; és

R² jelentése hidrogénatom vagy karboxilcsoportot védő csoport -

cefalosporinok előállítására, azzal jellemezve, hogy a (III) általános képletű, α -helyen helyettesített α -aminosav reaktív

származékát - ahol a karboxilcsoport hidroxilcsoportja szerves csoporttal helyettesített - (II) általános képletű cefalosporinnal reagáltatjuk rögzített penicillin-aciláz enzim hatásos mennyiségének jelenlétében a reakcióelegy kémhatást a mindenkori beállló pH értéken hagyva.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás az (I) általános képletű - ahol R jelentése fenilcsoport és R^1 jelentése klóratom - cefalosporinok előállítására, azzal jellemezve, hogy a megfelelően helyettesített reagenseket reagáltatjuk egymással.

8. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a (III) általános képletű α -helyen helyettesített α -aminosav reaktív származéka a D-fenil-glicin-metil-észter, D-p-hidroxifenil-glicin-metil-észter, D-1,4-ciklohexadién-1-il-glicin-metil-észter vagy ezek alkalmazható sói.

9. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a reakciót 0°C és $+5^\circ\text{C}$ között hajtjuk végre.

10. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a reakcióelegy kémhatása $\text{pH} = 5-8$ tartományban van.

+ 2 lap rajz
1993. 10. 20.
Allási Anna Maria

A meghatalmazott

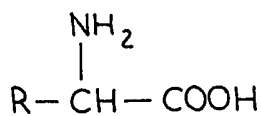
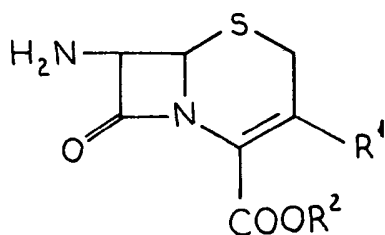
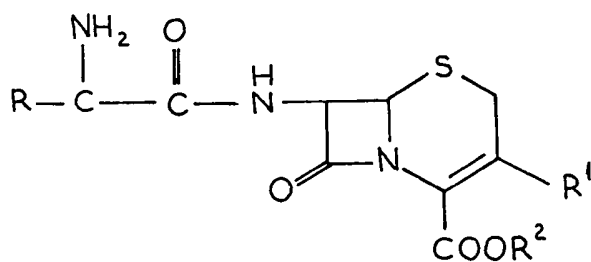
Ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

1188/93

64352

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

2/1



2/2

1. ábra

