合成ペニシリンの新合成法に関する研究 (第 1 報) 天然ペニシリンのアシル基交換

伊坂一郎, 柏木輝也, 中野功二, 川原紀夫, 甲田彰男,
沼崎洋三, 河原茂実, 村上増雄
山之内製薬株式会社中央研究所¹⁾

New Synthetic Procedure of Semisynthetic Penicillin. I. Studies on the Acyl Group Exchange of Natural Penicillin

ICHIRO ISAKA, TERUYA KASHIWAGI, KOHZI NAKANO, NORIO KAWAHARA, AKIO KODA,
YOSOH NUMASAKI, SHIGEMI KAWAHARA and MASUO MURAKAMI
Central Research Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.¹⁾

(Received September 16, 1971)

3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl benzylpenicillinate (IV) and trityl benzylpenicillinate (IX) were synthesised as a valuable intermediate in the chemical preparation of semisynthetic penicillins. These benzylpenicillin esters were treated with PCl_5 and followed by methanol to form iminoethers. The iminoether (VI) derived from IV was allowed to react with 3-*o*-chlorophenyl-5-methylisoxazole-4-carbonyl chloride directly affording 3',5'-di-*tert*-butyl-4'-hydroxybenzyl 3-*o*-chlorophenyl-5-methyl-4-isoxazolylpenicillinate (VII) which was converted to cloxacillin (VIII) under mild basic conditions. The reaction of the iminoether derived from IX with *D*(-)- α -phenylglycyl chloride hydrochloride afforded α -aminobenzylpenicillin (X) after treatment of the reaction mixture with water. Several other semisynthetic penicillins were also obtained from IV and IX by this new procedure.

従来合成ペニシリンは天然ペニシリンの酵素的脱アシル化によって得られる 6-aminopenicillanic acid (6-APA) のアシル化によって合成されている。このようにして得られる合成ペニシリン中には微量の蛋白質があり、これが allergen となってペニシリンの副作用を起こすといわれている。²⁾このような allergen の混入する機会を少なくするために天然ペニシリンを純化学的に脱アシル化して 6-APA³⁾ あるいは 6-APA エステル^{4a), b)} に導き、これらアシル化して合成ペニシリンを合成する試みが近年発表されている。しかし現在工業的に実施されている例は見当たらない。著者らは天然ペニシリンを素材とする純合成化学的な合成ペニシリンの工業的製造法を見いだす目的で本研究を実施した。

現在文献^{3, 4)} 上知られている天然ペニシリンの化学的脱アシル化法はまず天然ペニシリンをエステル化し、ついで緩やかな条件下に五塩化リンと反応させた後、アルコールで処理することにより対応するイミノエーテルとなし、これを加水分解して 6-APA あるいはそのエステルに導く方法である。この反応においては天然ペニシリンのカルボキシル基はエステル化をして保護しておかなければならないが、この保護エステル基は脱アシル化または合成ペニシリンに導くための再アシル化の後不安定な β -ラクタム環に作用しないようなきわめて緩やかな条件で脱離されるものでなければならない。しかし従来この目的で使われていた *p*-nitrobenzyl ester,^{4a)} phenacyl ester 類,⁵⁾ tri methylsilyl ester³⁾ などは必ずしもこの目的に充分かなっていないと思われるので著者らはまずこの保護エステル基の開発から開始した。

1) Location: Azusawa, Itabashi-ku, Tokyo.

2) E.T. Knudsen, J.M. Dewdney, J.A.P. Trafford, *Brit. Med. J.*, 1970, 469.

3) H.W.O. Weissenburger, M.G.v.d. Houven, Dutch patent 66/06872 (1966).

4) a) Aktiebolaget Astra, Fr. patent 1576027 (1969); b) W. v. Daehne, E. Frederiksen, E. Gundersen, F. Lund, P. Mørch, H. J. Petersen, K. Roholt, L. Tybring, W.O. Godtfredsen, *J. Med. Chem.*, 13, 607 (1970).

5) 藤井忠夫, 藤本健太郎, 渡辺哲夫, 阿部仁之助, 第14回日本薬学会関東支部大会, 講演要旨集, p. 1—4, 東京昭和45年11月5日。

Chart 1

有機カルボン酸の *p*-hydroxybenzyl ester 型化合物 (I) は塩基によるフェノール性水酸基のプロトンの引き抜きによって容易に開裂することが予測される。そこで天然ペニシリンのこの型のエステルの合成に着手した。

抗酸化剤として広く用いられている 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol (BHT) のブロム化もしくは 2,6-di-*tert*-butyl-

Chart 2

phenol のクロルメチル化によって容易に得られる 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl bromide (IIIa)⁶⁾ あるいは chloride (IIIb)⁷⁾ を potassium benzylpenicillinate (II) とジメチルホルムアミド中反応させると目的とする 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl benzylpenicillinate (IV) が高収率で得られた。IV はエーテルから晶出させる際、融点 99.5—100° の細針状晶を与える場合と融点 110—113° のプリズム状晶を与える場合がありこの両者は結晶多形と考えられる。IV は酸性条件下ではかなり安定であるが種々の無機および有機塩基の作用により予想通り容易に保護エステル基が脱離される。たとえば potassium 2-ethylhexanoate のような弱塩基性物質をきわめて緩やかな条件で作用させても容易に脱離反応が起こり II が高収率で生成することが認められた。

そこで著者らは IV に Daehne^{4b)} あるいは Houven³⁾ の方法に準じてジメチルアニリンの存在下五塩化リンを作用させてイミノクロリド (V) とし、ついでメタノールと反応させ imino ether (VI) とした。

ところでこのようなイミノエーテルとアシル化剤の反応に興味を持たれるので、このイミノエーテル化後の反応液に過剰のジメチルアニリンを加えた後、試みに 3-*o*-chlorophenyl-5-methylisoxazole-4-carbonyl chloride を低温で反応せしめた所、すみやかに反応が起こりメタノールの大量共存下にもかかわらず methyl 3-*o*-chlorophenyl-5-methylisoxazole-4-carboxylate はほとんど生成せず融点 170—171° を示す 3',5'-di-*tert*-butyl-4'-hydroxybenzyl 3-*o*-chlorophenyl-5-methyl-4-isoxazolympenicillinate (VII) を 74% の収率で単離することが出来た。VII は methyl isobutyl ketone (以下 MIBK と記す) 中で sodium 2-ethylhexanoate の MIBK 溶液の添加により室温で反応させ sodium 3-*o*-chlorophenyl-5-methyl-4-isoxazolympenicillinate (cloxacillin) (VIII) を収率 88% で与えた。

著者らはついで酸性条件下で容易に脱離出来る保護エステル基を求めた。この種のエステルとしては *tert*-butyl ester,⁸⁾ *p*-methoxybenzyl ester,⁹⁾ phthalimidomethyl ester,¹⁰⁾ などが知られているが trifluoroacetic acid や臭化水素酸-酢酸などを用いるこれらの脱離条件はペニシリンの場合適当ではない。

Zervas,¹¹⁾ や Amiard¹²⁾ はアミノ酸の trityl ester を合成しているが、不安定なためペプチド合成には用いられない。著者らは II に重炭酸塩の存在下ジメチルホルムアミド中で trityl chloride を作用させて高収率で融点 143—144° (decomp.) の trityl benzylpenicillinate (IX) を得た。IX は安定な化合物で長時間室温に保存することが出来る。この IX を IV の場合と同様イミノエーテルとし、イミノエーテル反応液に過剰のジメチルアニリンを添加した後、低温で D(-)- α -phenylglycyl chloride hydrochloride を加えて反応させ、ついで水処理すると、直接 α -aminobenzylpenicillin (X) が約 80% の収率で得られることを見いだした。

最近 benzylpenicillin を原料として直接化学的にアシル交換する合成ペニシリン合成法が阿部ら⁵⁾ によって発表されている。この方法では中間体のジアシル体よりモノアシル体への脱アシル化の際の選択性に限界があると思われる。著者らの合成法においては、このような点が解決され、どのような合成ペニシリンにも適用出来る利点がある。

著者らの方法によってたとえば methylphenylisoxazolympenicillin (oxacillin) (XI), aminocyclohexylpenicillin (cyclacillin) (XII), α -amino-(1,4-cyclohexadienyl)methylpenicillin (epicillin) (XIII), α -carboxybenzyl penicillin (carbenicillin) (XIV), α -azidobenzylpenicillin (XV), phenoxypropylpenicillin (propicillin) (XVI), biphenylpenicillin (XVII), carboxyquinoxalynylpenicillin (quinacillin) (XVIII) などが合成された。

実 験 の 部¹³⁾

3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl Benzylpenicillinate (IV) Potassium benzylpenicillinate (II) 9.3 g (0.025

- 6) C.D. Cook, N.G. Nash, H.R. Flanagan, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1783 (1955).
- 7) J.R. Geigy A.G., Dutch patent 6600394 [*Chem. Abstr.*, **65**, 18619a (1966)].
- 8) J.F.W. McOmie, "Advances in Org. Chemistry: Methods and Results," Vol. III, Interscience Publishers, New York, 1963, p. 247.
- 9) F. Weygand, K. Hunger, *Chem. Ber.*, **95**, 1 (1962).
- 10) G.H.L. Nefkens, *Rec. Trav. Chim.*, **82**, 941 (1963).
- 11) E. Gasis, B. Bezas, G.C. Stelakatos, L. Zervas, "Peptides," Proceeding of the 5th European Symposium, Oxford, 1962, ed. G.T. Young, Pergamon Press, Oxford, 1967, p. 17.
- 12) G. Amiard, R. Heymé, *Bull. Soc. Chim. France*, **1957**, 1373.
- 13) 融点はすべて未補正。

mole), KHCO_3 2.5 g および 2,6-di-*tert*-butylphenol 1.0 g のジメチルホルムアミド 93ml の懸濁液を -10 — -20° に冷却し、攪拌しながら、3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl bromide (IIIa)⁶⁾ 11.0 g (0.037 mole) を少量ずつ 4 時間で加える。更に 1 時間同温度で攪拌後、反応液を氷水 150 ml 中に分散、析出油状物をエーテル抽出。冷水洗浄後無水 MgSO_4 で乾燥し減圧下濃縮、濃縮液に白濁するまで石油エーテルを加えて放置、析出結晶を濾取し、石油エーテルで洗浄、無色針状晶 11.7 g (85%) を得る。mp 99 — 101° , $[\alpha]_D^{25} + 212^\circ$ ($c=1$, EtOH). Anal. Calcd. $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{O}_5\text{N}_2\text{S}$: C, 67.36; H, 7.29; N, 5.07; S, 5.80. Found: C, 67.21; H, 7.37; N, 5.10; S, 5.68. IR cm^{-1} : ν_{OH} 3640, ν_{NH} 3150—3550 broad, $\nu_{\text{C=O}}$ 1785 (β -ラクタム), $\nu_{\text{C=O}}$ 1750 (エステル), $\nu_{\text{C=O}}$ 1655 (アミド) (KBr).

前記同様に反応後得たエーテル抽出液を、冷水洗浄後無水 MgSO_4 で乾燥。減圧下低温で濃縮乾固。結晶性残留物を得る。エーテル—石油エーテルを加えて濾過。石油エーテル洗浄。無色プリズム晶 11.8 g (85.5%) を得る。mp 110 — 113° . Anal. Calcd. $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{O}_5\text{N}_2\text{S}$: C, 67.36; H, 7.29; N, 5.07; S, 5.80. Found: C, 67.25; H, 7.20; N, 5.11; S, 5.75. IR cm^{-1} : ν_{OH} 3570, ν_{NH} 3360, $\nu_{\text{C=O}}$ 1800 (β -ラクタム), $\nu_{\text{C=O}}$ 1745 shoulder, 1710 (エステル), $\nu_{\text{C=O}}$ 1680 (アミド) (KBr).

融点 99 — 101° および融点 110 — 113° の二種の結晶は CHCl_3 溶液で赤外線吸収スペクトルおよび CDCl_3 溶液中の核磁気共鳴スペクトルで同一の吸収を示すのでこの両者は結晶多形であると考えられる。

3,5-Di-*tert*-butylbenzyl chloride (IIIb)⁷⁾ を用いても前記同様の結果を得る。

IV のエステル基の脱離 IV 5.56g (10 mmole) を MIBK 45 ml に溶解。Potassium 2-ethylhexanoate の 50% (w/w) *n*-BuOH 溶液 4 g (11 mmole) を加え室温で 1.5 時間攪拌。析出結晶を濾取。エーテル洗浄。potassium benzylpenicillinate (II) 3.0g (80%) を得る。mp 214 — 216° (decomp.) $[\alpha]_D^{25} + 289.8^\circ$ ($c=0.649$, H_2O). 標品と融点、旋光度、赤外線吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトルの一致を見た。

3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl 3-*o*-Chlorophenyl-5-methyl-4-isoxazolympenicillinate (VII) 前記 IV 5.52 g (10mmole) および *N,N*-dimethylaniline 4.12 ml を 1,2-ジクロロエタン 55 ml に溶解。 -25° に冷却下 PCl_5 2.3 g (11 mmole) を加えて $-25 \pm 5^\circ$ で 1.5 時間攪拌。反応液を $-25 \pm 5^\circ$ に保って MeOH 40ml を滴下し、さらに同温度で 2.5 時間攪拌、反応液に *N,N*-dimethylaniline 6.82 ml を添加後、 $-25 \pm 5^\circ$ を保って 3-*o*-chlorophenyl-5-methylisoxazole-4-carbonyl chloride¹⁴⁾ 3.34g (13mmole) を含む 1,2-ジクロロエタン 20 ml の溶液を 15 分で滴下。さらに同温度で 2 時間攪拌後反応液を約 -20° で一夜放置。反応液を氷水 100 ml に加えて振りまぜ、有機層を分離。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水 MgSO_4 で乾燥後溶媒留去。残留油状物にイソプロピルエーテル 50 ml を加えて結晶化。濾取。石油エーテル洗。無色針状晶 4.83 g (74%) を得る。mp 170 — 171° (decomp.) $[\alpha]_D^{25} + 76.1^\circ$ ($c=1$, CHCl_3). Anal. Calcd. $\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{N}_3\text{SCl}$: C, 62.42; H, 6.16; N, 6.42; S, 4.90; Cl, 5.42. Found: C, 62.27; H, 6.18; N, 6.27; S, 4.94; Cl, 5.69.

Sodium 3-*o*-Chlorophenyl-5-methyl-4-isoxazolympenicillinate (Cloxacillin) (VIII) VII 2.0 g, MIBK 20 ml の懸濁液に sodium 2-ethylhexanoate の 33% (w/w) MIBK 溶液 2 ml を加え、室温で 2 時間攪拌。反応液に

TABLE I. Semisynthetic Penicillins, Prepared by the Acyl Group Exchange of Benzylpenicillin

Compound	Starting benzylpenicillin ester	Removing agent of ester group	Precipitating agent of penicillin	Decompose point ($^\circ\text{C}$)	Total yield (%)
XI·Na·H ₂ O	IV	Na 2-ethylhexanoate		188—189	73.0
XI·Na·H ₂ O	IX		Na 2-ethylhexanoate	188—189	44.7
XII·H ₂ O	IV	diethylamine		168—173	47.2
XIII·1/2H ₂ O	IV	diethylamine		200—202	36.0
XIV·K ^{a)}	IV	K 2-ethylhexanoate			
XV·K	IV	K 2-ethylhexanoate		190—193	53.4
XVI·K	IX		K 2-ethylhexanoate	194—199	59.7
XVII·Na	IX		Na 2-ethylhexanoate	181—186	43.3
XVIII·Na·H ₂ O	IX		Na 2-ethylhexanoate	250—255	52.5

a) bioautography により生成を確認した

14) F.P. Doyle, J.C. Hanson, A.A.W. Long, J.H.C. Nayler, E.R. Stove, *J. Chem. Soc.*, 1963, 5838.

MIBK 10 ml を加え、析出結晶をろ取 (1.43 g). 結晶を 20% 含水アセトン 10 ml に溶解し、ろ過。アセトン 70 ml を加えて冷暗所に一夜放置後、析出結晶をろ取。結晶はアセトンで洗浄。VIII·H₂O の無色針状晶 1.28 g (88%) を得る。mp 170—174° (decomp.) [α]_D²⁰ +163° (*c*=1, H₂O). 標品と赤外線吸収スペクトル, 核磁気共鳴スペクトルの一致を認めた。

Triphenylmethyl Benzylpenicillinate (IX) Potassium benzylpenicillinate (II) 37.2 g (0.1 mole) および KHCO₃ 2.0 g のジメチルホルムアミド 400 ml の懸濁液に攪拌下 triphenylmethyl chloride 27.9 g (0.1 mole) を少量ずつ 1 時間で添加。さらに室温で 3 時間攪拌。反応液を 5% NaHCO₃ 水 300 ml および水 200 g の混液中に分散し、次いで AcOEt で抽出。抽出液を水洗。無水 MgSO₄ および K₂CO₃ で乾燥後溶媒留去。結晶残留物にエーテルを加えてろ過。エーテル洗。無色粉末状結晶 53 g (92%) を得る。mp 143—144° (decomp.). *Anal.* Calcd. C₃₅H₃₂O₄N₂S: C, 72.89; H, 5.59; N, 4.86. Found: C, 73.28; H, 5.62; N, 4.67.

D(-)- α -Aminobenzylpenicillin (Ampicillin) (X) IX 5.8 g (10 mmole) および N,N-dimethylaniline 4.12 ml を 1,2-ジクロロエタン 58 ml に溶解。-25° に冷却下 PCl₅ 2.3 g (11 mmole) を加えて -25 ± 5° で 1.5 時間攪拌。反応液を -25 ± 5° に保って MeOH 40 ml を滴下。さらに同温度で 2.5 時間攪拌。反応液に N,N-dimethylaniline 6.86 ml を添加後、-25 ± 5° を保って D(-)- α -phenylglycyl chloride·hydrochloride 2.5 g (12 mmole) を少量ずつ 1 時間で添加。さらに同温度で 2 時間攪拌後反応液を約 -20° で一夜放置。反応液に氷水 40 ml を加えて振り、パーライト (東興パーライト製) を加えてろ過。パーライトを水 10 ml で洗浄。ろ、洗液を合し、水層と有機層を分離。有機層を水各 20 ml で 2 回抽出。全水抽出液を合し MIBK で洗浄。帯黄色澄明水溶液 (pH 2.5) 140 ml を得る。この水溶液を高圧ろ紙電気泳動¹⁵⁾ により標品と比較して X の生成を確認した。水溶液 1 ml を採取し、10 ml に mess up. *B. subtilis* を用いた paper disk 法により bioassay し X·3H₂O 含量 2350 mcg/ml であった。全量 3290 mg (81.1%)。

種々の合成ペニシリンの合成 前記方法に従い IV または IX をイミノエーテル化した後対応する acid chloride (XVIII の場合は acid anhydride) を反応させることにより Table I に示す結果を得た。

15) Pyridine: AcOH: H₂O buffer 溶液 (1: 10: 89), 3 kV 1 hr 展開後 1% ninhydrin-EtOH 溶液で発色。
B. subtilis による bioautography も行なった。