

Una síntesis versátil y eficiente de nuevas cefalosporinas «caballo de Troya»

An efficient and versatile synthesis of new Trojan-horse cephalosporins

SPAGGIARI A^{A*}, BLASZCZAK LC^B, PRATI F^A

^a Dipartimento di Chimica, Università di Modena e Reggio Emilia,
via Campi, 183 – 41100 Modena (Italia)

^b Discovery Chemistry Research and Technologies, Lilly Corporate Center, Eli Lilly and Co.,
Indianápolis, Indiana 46285 (EE. UU.)

RESUMEN

Se describe un procedimiento útil para la síntesis de nuevas cefalosporinas de doble acción. Estas moléculas podrían representar una herramienta fascinante para el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas, ya que presentan una posible actividad inhibidora hacia las bacterias que expresan la β -lactamasa. La principal ventaja de este enfoque sintético de tres pasos reside en su versatilidad, que permite la preparación sistemática de un amplio conjunto de nuevas moléculas.

PALABRAS CLAVE: Caballo de Troya. Cefalosporina. Quinolona. β -lactama. AmpC. Antibióticos.

ABSTRACT

A useful synthesis of new dual-action cephalosporins is reported. These molecules could represent a fascinating tool for treatment of bacterial infectious diseases, since they display a possible inhibitor activity towards β -lactamase-expressing bacteria. The major advantage of this 3-step synthetic approach lies in its versatility, which allows the systematic preparation of a wide pool of new molecules.

KEYWORDS: Trojan-horse. Cephalosporin. Quinolone. β -lactam. AmpC. Antibiotics.

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas más cruciales e importantes relacionados con el tratamiento de las enfermedades infecciosas con antibióticos β -lactámicos es la resistencia bacteriana a estos fármacos¹, debida a la acción de enzimas hidrolíticas específicas conocidas como β -lactamasas. Entre las enzimas más fuertes y extendidas, AmpC, una β -lactamasa de clase C, se está convirtiendo en un problema importante debido a su agresividad, estrechamente relacionada con una amplia y preocupante difusión.²

El enfoque de «caballo de Troya» (TH), ya utilizado en el pasado para obtener moléculas de doble acción³⁻⁴, se podría también emplear

INTRODUCTION

One of the most important and crucial problems related to treatment of infectious diseases with β -lactam antibiotics is the bacterial resistance to these drugs,¹ because of the action of specific hydrolytic enzymes, known as β -lactamases. Amongst the stronger and more widespread of these enzymes, AmpC, a C-class β -lactamase, is becoming a relevant problem because of its aggressivity, closely associated to a worryingly wide diffusion.²

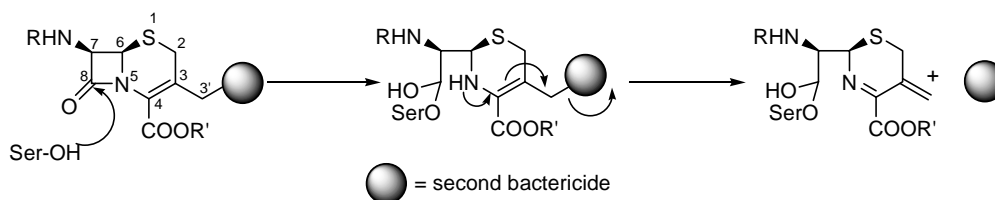
The Trojan-horse (TH) approach, already exploited in the past for obtaining dual-action molecules,³⁻⁴ could be successfully employed also as an innovative tool for selectively killing AmpC-expressing resistant bacteria. Di-

con éxito como herramienta innovadora para la destrucción selectiva de las bacterias resistentes que expresan *AmpC*. A diferencia del enfoque de «caballo de Troya» clásico, que intenta principalmente ampliar el espectro de actividad antibiótica⁵, nuestra investigación se centra en la búsqueda de TH con mejores características, que promuevan activamente la acilación del anillo de lactama mediante *AmpC* y que, mediante un segundo bactericida liberado tras el ataque enzimático inicial⁶, destruyan de forma selectiva a las bacterias que la expresan (Figura 1).

fferently from the classical Trojan-horse approach, which chiefly looks to simply expand the antibiotic activity spectrum,⁵ our investigation focuses on seeking better featured THs, which strongly encourage lactam ring acylation by *AmpC* and, by means of the second bactericide released after the initial enzymatic attack,⁶ selectively kill bacteria expressing it (Figure 1).

FIGURA 1. Mecanismo general de un «caballo de troya», cebado mediante acilación de *AmpC*.

FIGURE 1. General mechanism of a Trojan-horse, primed by *AmpC* acylation.



En concreto, para conseguir un objetivo tan específico deberíamos sintetizar un «caballo de Troya» (TH) que pudiera ser reconocido de manera estricta por *AmpC*, en lugar de por las proteínas de unión a la penicilina (PBPs). Desde esta perspectiva, una cefalosporina modificada en C-4 como éster *p*-nitrobenzílico debería ser lo suficientemente selectiva como para ser una diana atractiva sólo para *AmpC*. El C-4 carboxilato, omnipresente entre los antibióticos β -lactámicos, contribuye muy poco al reconocimiento por parte de las β -lactamasas, aunque parece ser esencial para el reconocimiento por parte de las PBPs.

Además, la presencia de un grupo formilo en lugar de una cadena lateral clásica en C-7, debería promover la acilación por parte de *AmpC* y, a la vez, descartar una acción análoga por parte de las PBPs. De hecho, las β -lactamasas hidrolizan rápidamente las cefalosporinas portadoras de un grupo formilo como cadena lateral amídica mientras que, a la inversa, las β -lactamasas con cadenas laterales pequeñas presentan una eficacia reducida contra

To achieve such a specific aim, in particular, we should synthesize a TH which could be strictly recognized by *AmpC*, rather than by Penicillin Binding Proteins (PBPs). In this view, a cephalosporin, masked at C-4 as *p*-nitrobenzyl ester, should be selective enough to be an attractive target only for *AmpC*. The C-4 carboxylate, which is ubiquitous among β -lactam antibiotics, adds little to recognition by β -lactamases, though it appears to be critical for recognition by PBPs.

Furthermore, the presence of a formyl group instead of a classical antibiotic side chain at C-7, should encourage the acylation by *AmpC* and discourage, at the same time, the analogous action by the PBPs. In fact, β -lactamases do quickly hydrolyze cephalosporins bearing a formyl group as the amide side chain, while, conversely, β -lactams with small side chains show poor efficacy against PBPs. In a previous work, in fact, we have already demonstrated that the minimal formamide side chain contributed 3.2 kcal/mol in interaction energy.⁷ Thus, according to these chemical strate-

las PBPs. De hecho, en un trabajo anterior, ya hemos demostrado que la mínima cadena lateral formamídica aporta 3.2 kcal/mol de energía de interacción⁷. Por tanto, según estas estrategias químicas, una molécula que tenga una mínima cadena lateral amídica y que carezca del carboxilato en C-4 debería ser hidrolizada rápidamente por *AmpC*, siendo a la vez un blanco pobre para las PBPs.

La elección de la segunda molécula de antibiótico viene determinada por razones tanto históricas (como en el caso del omadine)³ como médicas⁵. La primera debe proporcionarnos un estándar útil para la comparación mecanística, habiéndose demostrado también que un C-3' tio-piridinio puede ejercer una actividad antibacteriana sorprendente⁸, mientras que, en el segundo caso, hemos elegido una fluoroquinona (ciprofloxacina) por sus características farmacológicas intrínsecas y potencialmente útiles.

En el presente trabajo preliminar, presentaremos los primeros resultados obtenidos en los procesos de síntesis, en relación con los aspectos mencionados anteriormente.

MATERIALES Y MÉTODOS

¹H y ¹³C-NMR se registraron en espectrómetros Bruker DPX 200 y Avance 400; los desplazamientos químicos se indican en ppm usando TMS como estándar interno. Para la determinación de espectros de masa (EI, 70 eV) se utilizó un sistema Finnigan MAT SSQ A. La espectrometría de masa con ionización por electropulverización, cuando se utilizó, se realizó en un espectrómetro Micromass Platform LCZ. Los análisis elementales se realizaron con un analizador elemental Carlo Erba mod. 1110 CHNS-O. El secado y la destilación de todos los disolventes orgánicos se realizó según los métodos estándar. La purificación cromatográfica de los compuestos se realizó sobre silicagel [Φ 0.06-0.2 mm].

gies, a molecule having a minimal amide side chain and lacking the C-4 carboxylate, ought to be rapidly hydrolyzed by *AmpC*, being, at the same time, a poor target for PBPs.

The choice of the second antibiotic molecule has been dictated both by historical (as in the case of the omadine)³ and by medical⁵ reasons. The former one should provide us a useful standard for mechanistic comparison, being also demonstrated that a C-3' thio-linked pyridinium scaffold can exert an astonishing antibacterial activity,⁸ while, in the latter case, we choose a fluoroquinolone (ciprofloxacin), because of its intrinsic, and potentially useful, pharmacological characteristics.

In the present preliminary work, we shall illustrate our first synthetic results, concerning these recent efforts in this direction.

MATERIALS AND METHODS

¹H and ¹³C-NMR were recorded on a Bruker DPX 200 and Avance 400 spectrometers; chemical shifts are reported in δ from TMS as internal standard. For mass spectra determination (EI, 70 eV) a Finnigan MAT SSQ A was used. Electron-Spray Mass Spectrometry, where used, was performed on a Micromass Platform LCZ spectrometer. Elemental analyses were performed with a Carlo Erba Elemental Analyser mod. 1110 CHNS-O. All organic solvents were dried and distilled by standard methods. Chromatographic purification of compounds was performed on silica gel [Φ 0.06-0.2 mm].

7-amino-3-bromomethyl-deacetoxycephalosporanic acid p-nitrobenzyl ester hydrochloride (2)

Dry CH₂Cl₂ (50 mL) was cooled to -35 °C and, under argon atmosphere, triphenyl phosphite (2.89 mL, 11 mmol) was added. Through a sintered glass probe, chlorine was bubbled in, until the solution turned from colorless to bright yellow, always remaining clear. The color was then discharged, by adding a few drops of triphenyl phosphite, until pale a yellow (almost colorless) solution was obtained. After 5 minutes, maintaining the temperature below -30 °C, the 7-phenoxyacetamido-3-bromome-

Éster p-nitrobenzílico del clorhidrato de 7-amino-3-bromometil-deacetoxicefalosporánico clorhidrato (2)

CH₂Cl₂ seco (50 mL) se enfrió a -35 °C y se añadió trifenilfosfito (2.89 mL, 11 mmol) en atmósfera de argón. Se borboteó cloro introducido en la disolución a través de una sonda de vidrio fritado hasta que la disolución pasó de ser incolora a amarilla brillante, permaneciendo transparente en todo momento. A continuación se atenuó el color añadiendo unas gotas de trifenilfosfito hasta obtener una disolución de color amarillo pálido (casi incolora). Después de 5 minutos, manteniendo la temperatura por debajo de -30 °C, se añadió el éster p-nitrobenzílico del ácido 7-fenoxiacetamido-3-bromometil-deacetoxicefalosporánico (5.624 g, 10 mmol) **1**, seguido inmediatamente de 850 µL (11.5 mmol) de piridina seca. Tras 90 minutos, se retiró el baño frío y se añadió alcohol isobutílico (6.0 mL, 65 mmol). La mezcla era naranja y transparente, hasta que comenzaron a precipitarse los primeros cristales del producto. Después de tres horas se completó la precipitación y se formó una notable cantidad de sólido. A continuación, el sólido se pasó por un filtro Buchner y se lavó con diclorometano. El sólido blanco se secó durante la noche a 40 °C, obteniéndose 4.20 g (91%) del compuesto **2** en forma de polvo fino de color blanco marfil.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3.45 (br, 2H, NH₂), 3.77 (AB, 2H, SCH₂), 4.59 (AB, 2H, CH₂Br), 5.27 (AB, 2H, COOCH₂), 5.52-5.37 (m, 2H, COCH y SCH), 7.70 (d, 2H, *J*=8.4 Hz, *m*-aromáticos), 8.23 (d, 2H, *J*=8.4 Hz, *o*-aromáticos).

¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 26.5, 44.2, 47.5, 54.9, 57.6, 66.1, 123.7, 124.5, 125.0, 127.1, 128.7, 145.0, 160.3.

MS (*m/z*): M⁺ *no observado*, 217(18%), 171(19), 153(12), 136(100), 125(10), 106(18), 89(42), 78(33).

Anál. Calc. de C₁₅H₁₅BrClN₃O₅S: C 38.77 H 3.25 N 9.04 S 6.90

Encontrado: C 38.76 H 3.29 N 9.06 S 6.88

thyl-deacetoxycephalosporanic acid p-nitrobenzyl ester (5.624 g, 10 mmol) **1** was added, immediately followed by 850 µL (11.5 mmol) of dry pyridine. After 90 minutes, the cold bath was removed and isobutyl alcohol (6.0 mL, 65 mmol) was added. The mixture was orange and clear, until the first crystals of the product started to precipitate. After 3 hours the precipitation was complete and a conspicuous amount of solid was formed. The solid was then filtered off on a buchner, and washed with dichloromethane. The white solid was dried overnight at 40 °C, affording 4.20 g (91%) of the title compound as an ivory-white fine powder.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3.45 (br, 2H, NH₂), 3.77 (AB, 2H, SCH₂), 4.59 (AB, 2H, CH₂Br), 5.27 (AB, 2H, COOCH₂), 5.52-5.37 (m, 2H, COCH and SCH), 7.70 (d, 2H, *J*=8.4 Hz, *m*-aromatics), 8.23 (d, 2H, *J*=8.4 Hz, *o*-aromatics).

¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 26.5, 44.2, 47.5, 54.9, 57.6, 66.1, 123.7, 124.5, 125.0, 127.1, 128.7, 145.0, 160.3.

MS (*m/z*): M⁺ *not seen*, 217(18%), 171(19), 153(12), 136(100), 125(10), 106(18), 89(42), 78(33).

Anal. Calc. for C₁₅H₁₅BrClN₃O₅S: C 38.77 H 3.25 N 9.04 S 6.90

Found: C 38.76 H 3.29 N 9.06 S 6.88

7-formyl-3-bromomethyl-deacetoxycephalosporanic acid p-nitrobenzyl ester (3)

Acetic anhydride (16 mL, 170 mmol) and formic acid (6.4 mL, 170 mmol) were vigorously stirred under Ar atmosphere, heating the mixture to 45 °C for 1 hour.

In the meantime, the hydrochloride **2** (1500 mg, 3.23 mmol) was stirred in a beaker with 500 mL satd. NaHCO₃, until the solution became almost clear and bright yellow. The mixture was then extracted with EtOAc (3 x 150 mL) and dried (MgSO₄). After filtration and evaporation of the solvent, a sticky orange oil was obtained. Without any further treatment, it was added to the mixed anhydride, previously removed from the warm bath and immediately cooled to 0 °C with an ice bath. The reaction was carried out at 0 °C for about 30 minutes and checked by TLC. At the end

Éster p-nitrobenílico del ácido 7-formil-3-bromometil-deacetoxicefalosporánico (3)

Ahídrido acético (16 mL, 170 mmol) y ácido fórmico (6.4 mL, 170 mmol) se agitaron enérgicamente en atmósfera de argón, calentando la mezcla a 45 °C durante 1 hora.

Mientras tanto, el clorhidrato **2** (1500 mg, 3.23 mmol) se agitó en un vaso de precipitados con 500 mL de una disolución saturada de NaHCO₃ hasta que la disolución se volvió casi transparente y de color amarillo brillante. A continuación se extrajo la mezcla con EtOAc (3 x 150 mL) y se secó (MgSO₄). Tras el filtrado y la evaporación del disolvente, se obtuvo un aceite naranja pegajoso. Sin ningún tratamiento adicional, se añadió al anhídrido mezclado, retirado previamente del baño caliente y enfriado inmediatamente a 0 °C en un baño de hielo. La reacción se realizó a 0 °C durante unos 30 minutos y se comprobó mediante TLC. Al final de la reacción, la mezcla naranja se diluyó con EtOAc y tolueno y se evaporó repetidamente, añadiendo cada vez unos mililitros de tolueno. El residuo oleoso final se cristalizó con acetona, obteniendo 1.060 g (72%) del compuesto **3** en forma de sólido de color amarillo pálido.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3.70 (AB, 2H, SCH₂), 4.55 (AB, 2H, CH₂Br), 5.23 (d, 1H, *J*=4.9 Hz, CHS), 5.45 (AB, 2H, COOCH₂), 5.89 (dd, 1H, *J*=4.9 y 9.0 Hz, CONH), 7.72 (d, 2H, *J*=8.8 Hz, *m*-aromáticos), 8.15 (s, 1H, CHO), 8.25 (d, 2H, *J*=8.8 Hz, *o*-aromáticos), 9.11 (d, 1H, *J*=9.0 Hz, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 26.8, 44.1, 57.9, 58.0, 66.7, 123.9, 125.2, 126.8, 128.9, 129.5, 143.2, 162.0, 165.6.

MS (*m/z*): 336(2%) (M⁺ - CH₂PhNO₂), 306(2), 304(22), 203(2%), 169(27), 137(35), 136(100), 121(21), 106(37), 90(40), 89(70), 71(74), 63(30), 58(32).

Anál. Calc. de C₁₆H₁₄BrN₃O₆S: C 42,12 H 3,09 N 9,21 S 7,03

Encontrado: C 42.17 H 3.11 N 9.20 S 7.04

of the reaction, the orange mixture was diluted with EtOAc and toluene and evaporated repeatedly, every time adding a few milliliters of toluene. The final oily residue was crystallized with acetone, obtaining 1.060 g (72%) of the title compound as a pale-yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3.70 (AB, 2H, SCH₂), 4.55 (AB, 2H, CH₂Br), 5.23 (d, 1H, *J*=4.9 Hz, CHS), 5.45 (AB, 2H, COOCH₂), 5.89 (dd, 1H, *J*=4.9 and 9.0 Hz, CONH), 7.72 (d, 2H, *J*=8.8 Hz, *m*-aromatics), 8.15 (s, 1H, CHO), 8.25 (d, 2H, *J*=8.8 Hz, *o*-aromatics), 9.11 (d, 1H, *J*=9.0 Hz, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 26.8, 44.1, 57.9, 58.0, 66.7, 123.9, 125.2, 126.8, 128.9, 129.5, 143.2, 162.0, 165.6.

MS (*m/z*): 336(2%) (M⁺ - CH₂PhNO₂), 306(2), 304(22), 203(2%), 169(27), 137(35), 136(100), 121(21), 106(37), 90(40), 89(70), 71(74), 63(30), 58(32).

Anal. Calc. for C₁₆H₁₄BrN₃O₆S: C 42.12 H 3.09 N 9.21 S 7.03

Found: C 42.17 H 3.11 N 9.20 S 7.04

7-formyl-3-(1-oxypyridine-2-thiomethyl)-deacetoxycephalosporanic acid p-nitrobenzyl ester (4)

The formyl derivative **3** (450 mg, 1 mmol) was dissolved in dry DMF (8 mL), under Ar stream. To this clear solution, 2.4 mL (1.18 mmol) of a 0.5 M solution of 1-hydroxypyridine-2-thione sodium salt (omadine) in dry DMF were added. After 15 minutes, further 300 µL omadine solution were added and the stirring was continued over a 40 minutes period. The mixture was then diluted with EtOAc (5 mL), acidified to pH 5 by 0.1 N HCl and extracted with EtOAc. The organic phases were pooled, dried over MgSO₄ and evaporated to dryness under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (CHCl₃-MeOH 95 : 5), affording 634 mg of **4** as a white solid in 89% yield.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3.69 (AB, 2H, SCH₂), 4.19 (AB, 2H, CH₂Spyridine), 5.20 (d, 1H, *J*=4.2 Hz, SCH), 5.55 (dd, 1H, *J*=4.2 and 9.2 Hz, COCH), 5.41 (s, 2H, COOCH₂), 7.12-7.39 (m, 4H, pyridine), 7.62 (d, 2H, *J*=8.8 Hz, *m*-aromatics), 8.10 (s, 1H, CHO), 8.12

Éster p-nitrobencílico del ácido 7-formil-3-(1-oxipiridino-2-tiometil)-deacetoxicefalosporánico (4)

El formil derivado de **3** (450 mg, 1 mmol) se disolvió en DMF seca (8 mL), bajo una corriente de Ar. A esta disolución transparente se añadieron 2.4 mL (1.18 mmol) de una disolución 0.5 M de sal sódica de 1-hidroxipiridino-2-tiona (omadine) en DMF seca. Tras 15 minutos, se añadieron 300 µL más de disolución de omadine y se siguió agitando durante un período de 40 minutos. A continuación se diluyó la mezcla con EtOAc (5 mL), se acidificó hasta pH 5 con 0.1 N y se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas se reunieron, se secaron con MgSO₄ y se evaporaron a sequedad a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía por desorción súbita en silicagel (CHCl₃-MeOH 95 : 5), y se obtuvieron 634 mg de **4** en forma sólida blanca con un rendimiento del 89%.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3.69 (AB, 2H, SCH₂), 4.19 (AB, 2H, CH₂Spiridina), 5.20 (d, 1H, *J*=4.2 Hz, SCH), 5.55 (dd, 1H, *J*=4.2 y 9.2 Hz, COCH), 5.41 (s, 2H, COOCH₂), 7.12-7.39 (m, 4H, piridina), 7.62 (d, 2H, *J*=8.8 Hz, *m*-aromáticos), 8.10 (s, 1H, CHO), 8.12 (d, 2H, *J*=8.8 Hz, *o*-aromáticos), 9.10 (d, 1H, *J*=9.2 Hz, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 28.2, 34.6, 50.8, 59.5, 66.5, 118.3, 122.1, 122.9, 123.8, 125.8, 128.0, 129.4, 138.7, 143.1, 147.6, 150.0, 162.0, 164.2, 167.2.

MS (*m/z*): 486(8%) (M⁺ - O), 375(12), 336(18), 307(43), 293(100), 274(40), 262(75), 246(35), 167(22), 136(37), 127(98), 110(60), 89(62), 78(88).

Anál. Calc. de C₂₁H₁₈N₄O₇S₂: C 50.19 H 3.61 N 11.15 S 12.76

Encontrado: C 50.22 H 3.57 N 11.17 S 12.73

Éster p-nitrobencílico del ácido 7-formilo-3-[[4-(3-carboxi-1-ciclopropilo-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-quinolinilo)-1-piperacino]metil]-deacetoxicefalosporánico (5)

Bajo flujo de argón y sometido a una fuerte agitación magnética, se suspendió una muestra comercial de clorhidrato de ciprofloxacina (654 mg, 1.97 mmol) en DMF seca (40

(d, 2H, *J*=8.8 Hz, *o*-aromatics), 9.10 (d, 1H, *J*=9.2 Hz, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 28.2, 34.6, 50.8, 59.5, 66.5, 118.3, 122.1, 122.9, 123.8, 125.8, 128.0, 129.4, 138.7, 143.1, 147.6, 150.0, 162.0, 164.2, 167.2.

MS (*m/z*): 486(8%) (M⁺ - O), 375(12), 336(18), 307(43), 293(100), 274(40), 262(75), 246(35), 167(22), 136(37), 127(98), 110(60), 89(62), 78(88).

Anal. Calc. for C₂₁H₁₈N₄O₇S₂: C 50.19 H 3.61 N 11.15 S 12.76

Found: C 50.22 H 3.57 N 11.17 S 12.73

7-formyl-3-[[4-(3-carboxy-1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-quinoliny)]-1-piperazinyl]methyl]-deacetoxycephalosporanic acid p-nitrobenzyl ester (5)

Under argon flow and vigorous magnetic stirring, commercially available ciprofloxacin hydrochloride (654 mg, 1.97 mmol) was suspended in dry DMF (40 mL) and NaHCO₃ (332 mg, 3.95 mmol) was added. After 20 minutes, the formyl derivative **3** (900 mg, 1.97 mmol) was added, followed by a few crystals of catalytic KI, and the mixture was stirred over a 48 hours period. The mixture was then filtered off to eliminate the insoluble portion and the liquor was concentrated to small volume. The residue was partitioned between EtOAc and water and the aqueous phase extracted with EtOAc (3 x 20 mL). The organic phases were pooled, dried over MgSO₄, filtered off and evaporated under reduced pressure. The oily residue was purified by flash chromatography on silica gel (CH₂Cl₂-MeOH 95 : 5), affording 913 mg (66%) of **5**, as a yellow powder.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.10-1.41 (m, 4H, cyclopropyl), 2.55 (br, 4H, piperidine), 3.25 (br, 4H, piperidine), 3.70 (br, 2H, SCH₂), 3.80 (br, 1H, cyclopropyl), 4.05 (AB, 2H, CH₂N), 5.19 (d, 1H, *J*=4.8 Hz, SCH), 5.28-5.48 (m, 3H, COCH and COOCH₂), 7.52 (d, 1H, *J*=7.6 Hz, FCCCH), 7.71 (d, 2H, *J*=8.7 Hz, *m*-aromatics), 7.89 (d, 1H, *J*=13.3 Hz, CHCF), 8.12 (s, 1H, CHO), 8.23 (d, 2H, *J*=8.7 Hz, *o*-aromatics), 8.62 (s, 1H, =CHN), 9.08 (d, 1H, *J*=8.5 Hz, NH).

¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.0, 26.9,

mL) y se añadió NaHCO₃ (332 mg, 3.95 mmol). 20 minutos después se añadió el formilderivado **3** (900 mg, 1.97 mmol), seguido de algunos cristales del catalizador KI, y la mezcla se agitó durante 48 horas. A continuación, se filtró la mezcla para eliminar la parte insoluble y se concentró el extracto hasta alcanzar un volumen pequeño. El residuo se dividió entre EtOAc y agua y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 20 mL). Las fases orgánicas se reunieron, se secaron con MgSO₄, se filtraron y se evaporaron a presión reducida. El residuo oleoso se purificó mediante cromatografía por desorción súbita en silicagel (CH₂Cl₂-MeOH 95 : 5), y se obtuvieron 913 mg (66%) de **5**, en forma de polvo amarillo.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.10-1.41 (m, 4H, ciclopropilo), 2.55 (br, 4H, piperidina), 3.25 (br, 4H, piperidina), 3.70 (br, 2H, SCH₂), 3.80 (br, 1H, ciclopropilo), 4.05 (AB, 2H, CH₂N), 5.19 (d, 1H, *J*=4.8 Hz, SCH), 5.28-5.48 (m, 3H, COCH y COOCH₂), 7.52 (d, 1H, *J*=7.6 Hz, FCCCH), 7.71 (d, 2H, *J*=8.7 Hz, *m*-aromáticos), 7.89 (d, 1H, *J*=13.3 Hz, CHCF), 8.12 (s, 1H, CHO), 8.23 (d, 2H, *J*=8.7 Hz, *o*-aromáticos), 8.62 (s, 1H, =CHN), 9.08 (d, 1H, *J*=8.5 Hz, NH).

¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.0, 26.9, 36.3, 49.8, 52.6, 57.9, 66.2, 107.2, 111.2, 119.5, 123.9, 124.1, 126.5, 128.9, 129.1, 129.5, 139.6, 143.4, 145.6, 147.7, 148.4, 162.0, 162.2, 165.3, 166.4, 176.8, 176.9.

MS (*m/z*): *imposible de obtener*.

Anál. Calc. de C₃₃H₃₁FN₆O₉S: C 56.09 H 4.42 N 11.89 S 4.54

Encontrado: C 56.11 H 4.47 N 11.87 S 4.58

Éster p-nitrobencílico del ácido 7-fenoxiacetamido-3-[[4-(3-carboxi-1-ciclopropilo-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-quinolinilo)-1-piperacínilo]metil]-deacetoxicefalosporánico (6)

Se suspendió clorhidrato de ciprofloxacina (2950 mg, 8.89 mmol) en DMF seca (100 mL) y se desprotonó con NaHCO₃ (1570 mg, 18.7 mmol). Transcurridos 15 minutos, se añadió la cefalosporina inicial **1** (5000 mg, 8.89 mmol), seguida de una cantidad catalítica de KI, y la mezcla turbia y lechosa de color beige se agitó durante 48 horas. La mezcla se vertió en un

36.3, 49.8, 52.6, 57.9, 66.2, 107.2, 111.2, 119.5, 123.9, 124.1, 126.5, 128.9, 129.1, 129.5, 139.6, 143.4, 145.6, 147.7, 148.4, 162.0, 162.2, 165.3, 166.4, 176.8, 176.9.

MS (*m/z*): *unobtainable*.

Anal. Calc. for C₃₃H₃₁FN₆O₉S: C 56.09 H 4.42 N 11.89 S 4.54

Found: C 56.11 H 4.47 N 11.87 S 4.58

7-phenoxyacetamido-3-[[4-(3-carboxy-1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-quinolinyl)-1-piperazinyl]methyl]-deacetoxycephalosporanic acid p-nitrobenzyl ester (6)

Ciprofloxacin hydrochloride (2950 mg, 8.89 mmol) was suspended in dry DMF (100 mL) and deprotonated with NaHCO₃ (1570 mg, 18.7 mmol). After 15 minutes, the starting cephalosporin **1** (5000 mg, 8.89 mmol) was added, followed by a catalytic amount of KI and the resulting cloudy and milky beige mixture was stirred over a 48 hours period. The mixture was poured in a separatory funnel with water (1 L) and EtOAc (100 mL), the phases were separated and the extraction was repeated twice. All the organic phases were pooled, dried (MgSO₄) and evaporated, yielding an amber oil. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc), obtaining 4300 mg (60%) of the title compound.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.10-1.38 (m, 4H, cyclopropyl), 2.50 (br, 4H, piperidine), 3.25 (s, 4H, piperidine), 3.66 (br, 2H, SCH₂), 3.75 (br, 1H, cyclopropyl), 4.02 (m, 2H, CH₂CN), 4.60 (AB, 2H, OCH₂CO), 5.18 (d, 1H, *J*=4.8 Hz, SCH), 5.42 (AB, 2H, COOCH₂), 5.76 (dd, 1H, *J*=4.8 and 8.4 Hz, COCH), 6.89-7.00 (m, 5H, aromatics), 7.72 (d, 2H, *J*=8.8 Hz, *m*-aromatics-NO₂), 7.86 (d, 1H, *J*=13.6, CHCF), 7.95 (s, 1H, FCCCH), 8.21 (d, 2H, *J*=8.8 Hz, *o*-aromatics-NO₂), 8.65 (s, 1H, NCH=C), 9.10 (d, 1H, *J*=8.4 Hz, NH).

¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.0, 27.5, 36.2, 49.9, 52.6, 58.3, 66.2, 66.7, 107.2, 115.0, 121.6, 123.9, 124.6, 129.0, 129.5, 129.8, 139.6, 143.4, 155.8, 158.2, 162.2, 164.8, 166.4, 169.0, 170.8, 176.6.

MS (*m/z*): *unobtainable*.

Anal. Calc. for C₄₀H₃₇FN₆O₁₀S: C 59.11 H 4.59 N 10.34 S 3.95

embudo separador con agua (1 L) y EtOAc (100 mL), se separaron las fases y se repitió la extracción dos veces. Todas las fases orgánicas se colocaron en cubetas, se secaron (MgSO_4) y se evaporaron, obteniéndose un aceite color ámbar. El residuo se purificó mediante cromatografía por desorción súbita en silicagel (EtOAc), obteniéndose 4300 mg (60%) del compuesto **6**.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 1.10-1.38 (m, 4H, ciclopropilo), 2.50 (br, 4H, piperidina), 3.25 (s, 4H, piperidina), 3.66 (br, 2H, SCH_2), 3.75 (br, 1H, ciclopropilo), 4.02 (m, 2H, CH_2CN), 4.60 (AB, 2H, OCH_2CO), 5.18 (d, 1H, $J=4.8$ Hz, SCH), 5.42 (AB, 2H, COOCH_2), 5.76 (dd, 1H, $J=4.8$ y 8.4 Hz, COCH), 6.89-7.00 (m, 5H, aromáticos), 7.72 (d, 2H, $J=8.8$ Hz, *m*-aromáticos- NO_2), 7.86 (d, 1H, $J=13.6$, CHCF), 7.95 (s, 1H, FCCCH), 8.21 (d, 2H, $J=8.8$ Hz, *o*-aromáticos- NO_2), 8.65 (s, 1H, $\text{NCH}=\text{C}$), 9.10 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 8.0, 27.5, 36.2, 49.9, 52.6, 58.3, 66.2, 66.7, 107.2, 115.0, 121.6, 123.9, 124.6, 129.0, 129.5, 129.8, 139.6, 143.4, 155.8, 158.2, 162.2, 164.8, 166.4, 169.0, 170.8, 176.6.

MS (*m/z*): imposible de obtener.

Anál. Calc. de $\text{C}_{40}\text{H}_{37}\text{FN}_6\text{O}_{10}\text{S}$: C 59.11 H 4.59 N 10.34 S 3.95

Encontrado: C 59.16 H 4.58 N 10.37 S 4.00

Ácido 7-amino-3-(1-oxipiridino-2-tiometil)-deacetoxicefalosporánico (**7**)

7-ACA (1360 mg, 5 mmol) se suspendió en agua y se ajustó a pH 7 añadiendo lentamente NH_4OH 2N, hasta que la mezcla lechosa se convirtió en una disolución transparente. A continuación se añadió omadine, como sal sódica, (745 mg, 5 mmol) y la mezcla se volvió naranja y turbia. Tras agitarla durante 5 días, la mezcla se liofilizó, obteniéndose 1070 mg (63%) del compuesto titular **7**, en forma de polvo naranja muy higroscópico.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3.35 (m, 2H, SCH_2), 4.29 (AB, 2H, CH_2S -piridina), 4.46 (d, 1H, $J=4.8$ Hz, SCH), 4.87 (d, 1H, $J=4.8$ Hz, COCH), 7.15-8.22 (m, 4H, aromáticos).

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 32.6, 60.1, 116.7, 122.0, 124.2, 129.9, 131.1, 152.8, 165.5, 167.1, 170.1.

Found: C 59.16 H 4.58 N 10.37 S 4.00

7-amino-3-(1-oxypyridine-2-thiomethyl)-deacetoxyccephalosporanic acid (**7**)

7-ACA (1360 mg, 5 mmol) was suspended in water and brought to pH 7 by slowly dropping 2N NH_4OH , until the milky mixture became a clear solution. Omadine, as sodium salt, (745 mg, 5 mmol) was then added and the mixture turned orange and turbid. After 5 days' stirring, the mixture was lyophilized, affording 1070 mg (63%) of the title compound **7**, as a very hygroscopic orange powder.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3.35 (m, 2H, SCH_2), 4.29 (AB, 2H, CH_2S -pyridine), 4.46 (d, 1H, $J=4.8$ Hz, SCH), 4.87 (d, 1H, $J=4.8$ Hz, COCH), 7.15-8.22 (m, 4H, aromatics).

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 32.6, 60.1, 116.7, 122.0, 124.2, 129.9, 131.1, 152.8, 165.5, 167.1, 170.1.

MS (*m/z*): 260(3%) ($\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_4\text{NO}$), 258(10), 256(33), 192(11), 160(22), 149(5), 130(8), 128(42), 96(36), 71(17), 64(100), 57(27).

Anal. Calc. for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$: C 46.01 H 3.89 N 12.38 S 18.90

Found: C 45.99 H 3.85 N 12.45 S 18.94

7-formyl-3-(1-oxypyridine-2-thiomethyl)-deacetoxyccephalosporanic acid (**8**)

The mixed anhydride was prepared by mixing acetic anhydride (2.2 mL, 23 mmol) and formic acid (870 μL , 23 mmol) at 45 °C under argon flow. To this solution the aminoacid **7** (400 mg, 1.17 mmol), previously deprotonated by stirring with NaHCO_3 (220 mg, 2.6 mmol) in water (5 mL), was added and the reaction was stirred for 3 hours. The crude mixture was evaporated under reduced pressure, adding toluene and EtOAc several times in small portions. The brown oily residue was purified by repeated crystallization (MeOH-petroleum ether), affording 180 mg (42%) of the title compound as a pale-yellow powder.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3.21 (AB, 2H, SCH_2), 4.20 (s, 2H, CH_2S pyridine), 4.91 (d, 1H, $J=4.8$ Hz, SCH), 5.46 (dd, 1H, $J=4.8$

MS (*m/z*): 260(3%) (M^+ - C_5H_4NO), 258(10), 256(33), 192(11), 160(22), 149(5), 130(8), 128(42), 96(36), 71(17), 64(100), 57(27).

Anál. Calc. de $C_{13}H_{13}N_3O_4S_2$: C 46.01
H 3.89 N 12.38 S 18.90

Encontrado: C 45.99 H 3.85 N 12.45 S 18.94

Ácido 7-formilo-3-(1-oxipiridino-2-tiometil)-deacetoxicefalosporánico (8)

El anhídrido mezclado se preparó mezclando anhídrido acético (2.2 mL, 23 mmol) y ácido fórmico (870 μ L, 23 mmol) a 45 °C bajo flujo de argón. A esta disolución se añadió el aminoácido **7** (400 mg, 1.17 mmol), desprotonado previamente mediante agitación con $NaHCO_3$ (220 mg, 2.6 mmol) en agua (5 mL), y la reacción se agitó durante 3 horas. La mezcla cruda se evaporó a presión reducida, añadiendo tolueno y EtOAc varias veces en pequeñas cantidades. El residuo oleoso marrón se purificó mediante cristalización repetida (éter de petróleo MeOH), obteniéndose 180 mg (42%) del compuesto titular **8** en forma de polvo amarillo pálido.

1H -NMR (200 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 3.21 (AB, 2H, SCH_2), 4.20 (s, 2H, CH_2 Spíridina), 4.91 (d, 1H, $J=4.8$ Hz, SCH), 5.46 (dd, 1H, $J=4.8$ y 9.0 Hz, COCH), 7.21-8.40 (m, 4H, aromáticos), 8.13 (s, 1H, CHO), 8.88 (d, 1H, $J=9.0$ Hz, NH).

^{13}C -NMR (50 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 26.9, 33.0, 57.2, 57.5, 114.2, 121.3, 123.0, 125.7, 132.2, 151.3, 166.0, 165.8, 168.0, 172.8.

MS (*m/z*): M^+ no observado, 337(4%) (M^+ - COOH), 242(100), 214(12), 186(37), 156(17), 144(15), 130(20), 86(22).

Anál. Calc. de $C_{14}H_{13}N_3O_5S_2$: C 45.77 H 3.57 N 11.44 S 17.46

Encontrado: C 45.80 H 3.55 N 11.49 S 17.44

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El enfoque inicial para la síntesis de ambos tipos de THs debería ser lo suficientemente versátil como para permitir la preparación de un intermedio clave común (es decir, el 7-*N*-formilderivado), a partir del cual pu-

and 9.0 Hz, COCH), 7.21-8.40 (m, 4H, aromáticos), 8.13 (s, 1H, CHO), 8.88 (d, 1H, $J=9.0$ Hz, NH).

^{13}C -NMR (50 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 26.9, 33.0, 57.2, 57.5, 114.2, 121.3, 123.0, 125.7, 132.2, 151.3, 166.0, 165.8, 168.0, 172.8.

MS (*m/z*): M^+ not seen, 337(4%) (M^+ - COOH), 242(100), 214(12), 186(37), 156(17), 144(15), 130(20), 86(22).

Anal. Calc. for $C_{14}H_{13}N_3O_5S_2$: C 45.77
H 3.57 N 11.44 S 17.46

Found: C 45.80 H 3.55 N 11.49 S 17.44

RESULTS AND DISCUSSION

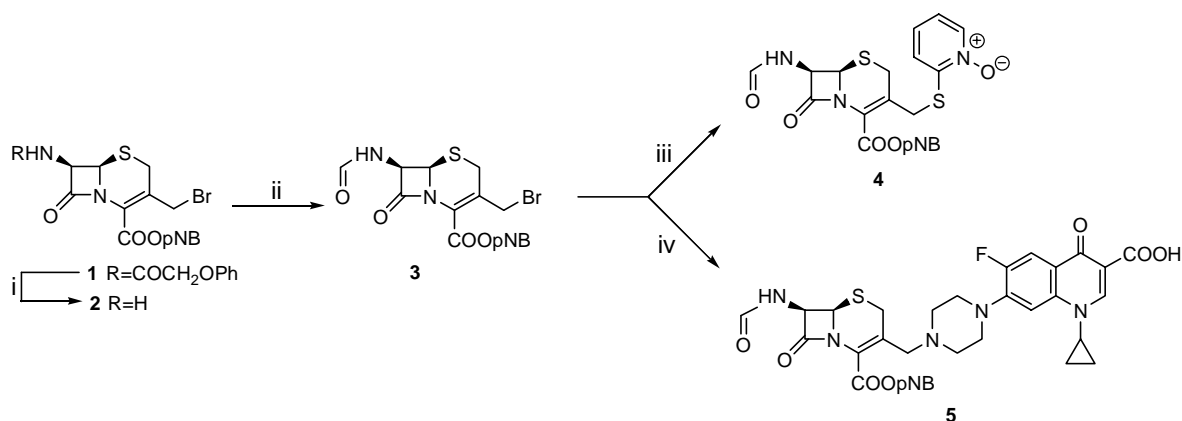
The initial approach to synthesizing both types of THs ought to be versatile enough to allow the preparation of a common key intermediate (i.e. the 7-*N*-formyl derivative), for which further transformations could be developed. With this goal well established in our minds, the synthetic route reported in Figure 2 was attempted. Along this line, a convenient starting material was envisaged to be a V-sidechained cephem, namely the 7-phenoxyacetamido-3-bromomethyl-deacetoxycephalosporanic acid *p*-nitrobenzyl ester **1**, available in good quantities and relatively cheap. The first transformation which the starting cephem underwent was its conversion into the amino derivative **2**, it being the ideal synthon to proceed subsequently to the formylation step and obtain the key intermediate, namely the 7-*N*-formylcephem **3**. The cleavage of the phenoxyamido side chain was achieved by means of the iminochloride method, but, differently from the commonly used PCl_5 reaction, we carried out the cleavage using a simpler and more convenient system, from triphenyl phosphite and chlorine at -30 °C, according to the methodology recently studied and developed in our group.⁹ The reagent, formed *in situ* by the action of chlorine on triphenyl phosphite, was stabilized with pyridine and used as such, simply by adding the substrate. A final alcoholysis, in the presence of isobutyl alcohol, afforded the hydrochloride salt of the amine as a white solid, well recovered by simple filtration with an excellent yield (91%). In this way, we avoided the awkward use of unpleasant reagents, like PCl_5 as the oxophilic phos-

dieran ser desarrolladas transformaciones posteriores. Con este objetivo bien establecido y definido, se intentó la ruta de síntesis indicada en la Figura 2. Junto con esta línea, se pensó en un material inicial oportuno como cefem de cadena lateral V, es decir, el éster *p*-nitrobenílico del ácido 7-fenoxiacertamido-3-bromometilo-deacetoxicefalosporánico **1**, disponible en cantidad suficiente y relativamente barato. La primera transformación a la que se sometió el cefem inicial fue su conversión en el aminoderivado **2**, siendo el sitio ideal para proceder posteriormente al paso de formilación y obtener el intermedio clave común, es decir, el 7-*N*-formilcefem **3**. La separación de la cadena lateral de fenoxiamido se consiguió mediante el método del iminocloruro pero, en lugar de la reacción PCl_5 comúnmente utilizada, realizamos la separación utilizando un sistema más sencillo y práctico, a partir del trifenilfosfito a $-30\text{ }^\circ\text{C}$, según la metodología recientemente estudiada y desarrollada en nuestro grupo⁹. El reactivo formado *in situ* por la acción del cloro sobre el trifenilfosfito se estabilizó con piridina y se utilizó tal cual, añadiendo simplemente el sustrato. Una alcoholisis final en presencia de alcohol isobutílico permitió obtener la sal de clorhidrato de la amina como sólido blanco, bien recuperado mediante filtración simple con un rendimiento excelente (91%). De esta forma, evitamos el uso poco práctico de reactivos desagradables, como el PCl_5 como reactivo fósforo oxofílico, y las condiciones de reacción engorrosas que de otra forma hubiesen sido necesarias según el método de iminocloruro clásico. Todo el procedimiento ha demostrado ser más rápido, sencillo y seguro, y sin necesidad de ninguna purificación posterior.

phorus reagent, and the related cumbersome reaction conditions, as otherwise needed for the classical iminocloride method. The complete procedure has proved faster, easier and safer, with no further purification needed.

FIGURA 2. Síntesis de las cefalosporinas del «caballo de troya». *Reactivos y condiciones:* **i.** $(\text{PhO})_3\text{PCl}_2$, piridina, DCM, $-30\text{ }^\circ\text{C}$ (91%); **ii.** Ac_2O , HCOOH , rt (72%); **iii.** sal sódica de omadine, DMF (89%); **iv.** ciprofloxacino, NaHCO_3 , DMF, rt (66%).

FIGURE 2. Synthesis of the Trojan-horse cephalosporins. *Reagents and conditions:* **i.** $(\text{PhO})_3\text{PCl}_2$, pyridine, DCM, $-30\text{ }^\circ\text{C}$ (91%); **ii.** Ac_2O , HCOOH , rt (72%); **iii.** Omadine sodium salt, DMF (89%); **iv.** Ciprofloxacin, NaHCO_3 , DMF, rt (66%).



La formulación de **2**, para obtener el intermedio formilo **3**, se realizó mediante el método de anhídrido mezclado, pero utilizando el propio anhídrido como disolvente. De esta forma, la cefalosporina **2** se desprotonó inicialmente mediante bicarbonato sódico, restaurando así la nucleofilia amínica, añadiéndola a continuación al anhídrido a $0\text{ }^\circ\text{C}$. El exceso de anhídrido que no reaccionó se eliminó evaporando conjuntamente la mezcla naranja con tolueno a presión reducida, repitiendo la operación varias veces. El producto, que no requirió purificación adicional, del que se obtuvo un buen rendimiento (72%), se almacenó, en atmósfera de argón, en el estante del laboratorio. Al disponer del derivado formilo, se abordó el desplazamiento nucleofílico para introducir el segundo fragmento de antibiótico. Ambas transformaciones se realizaron básicamente según el mismo procedimiento, para obtener un método general para funcionalizar el intermedio de formilo.

El derivado de omadine **4** se obtuvo en una reacción de un solo paso con un rendimiento muy bueno (89%), agitando el formil-derivado **3** en DMF con omadine. La reacción procedió con rapidez, impulsada por la fuerza de los grupos nucleofílicos tioles, según un mecanismo clásico de desplazamiento nucleofílico $\text{S}_{\text{N}}2$. El derivado **5** de ciprofloxa-

The formylation of **2**, to afford the formyl intermediate **3**, was performed by the mixed anhydride method, but using the anhydride itself as a solvent. Accordingly, therefore, cephalosporin **2** was initially deprotonated by sodium bicarbonate, thus restoring the aminic nucleophilicity, and then simply added to the anhydride at $0\text{ }^\circ\text{C}$. The excess of unreacted anhydride was stripped off by coevaporating the orange mixture with toluene at reduced pressure, repeating the operation several times. The product, which did not require further purifications, was secured with a good yield (72%) and stored, under argon atmosphere, on the lab shelf. With the formyl derivative in hand, the nucleophilic displacement to introduce the second antibiotic fragment was directly faced up. Both transformations were basically performed according to the same procedure, in order to obtain a general method to functionalize the formyl intermediate.

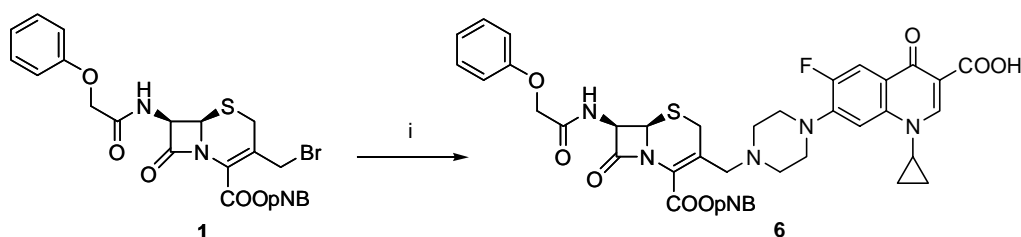
The omadine-derivative **4** was obtained in a single-step reaction with a very good yield (89%), by stirring the formyl derivative **3** in DMF with omadine. The reaction proceeded rapidly, driven by the strength of the nucleophilic thiol-head, according to a classical $\text{S}_{\text{N}}2$ nucleophilic displacement mechanism. By close analogy to the omadine-derivative **4**, the ciprofloxacin-derivative **5** was prepared. As was

cino se preparó de manera análoga a como se preparó el derivado de omadine **4**. Como era de esperar, en este caso la reacción fue un poco más difícil, por ser peor la nucleofilia de la amina en comparación con el tiol o por la bajísima solubilidad de la ciprofloxacina. No obstante, siguiendo el procedimiento anterior, la ciprofloxacina se agitó en DMF con el formilcefem **3**, obteniéndose el derivado de la ciprofloxacina **5** con un rendimiento del 66%. Para disponer de un término de comparación para evaluar la acción del grupo formilo en la acilación de las PBPs, preparamos también del derivado de cadena lateral V de la ciprofloxacina, **6**, como se describe en la Figura 3. El material inicial **1** se agitó en DMF con ciprofloxacino, obteniéndose **6** con un rendimiento del 60%.

to be expected, in this case the reaction was a little more difficult, with either the nucleophilicity of the amine compared to the thiol being worse or the solubility of the ciprofloxacin dramatically poor. Nevertheless, according to the previous procedure, the ciprofloxacin was stirred in DMF with the formylcephem **3**, affording the ciprofloxacin-derivative **5** in 66% yield. To get a comparison term for evaluating the action of the formyl group on PBPs acylation, we prepared also the V-side-chained derivative of the ciprofloxacin, **6**, as described in Figure 3. The starting material **1** was stirred in DMF with ciprofloxacin, affording **6** in 60% yield.

FIGURA 3. Síntesis de las cefalosporinas del «caballo de troya». *Reactivos y condiciones:*
i. ciprofloxacino, NaHCO₃, DMF, rt (60%).

FIGURE 3. Synthesis of the Trojan-horse cephalosporins. *Reagents and conditions:*
i. Ciprofloxacin, NaHCO₃, DMF, rt (60%).



De nuevo, la comparación con los derivados de *p*-nitrobenzilo y uno de ellos en forma ácida libre podría proporcionar información útil sobre el efecto de un grupo protector en la capacidad de *AmpC* para acilar el anillo de acetidinona. No obstante, hemos observado que la eliminación de *p*NB en **4** y **5** era bastante difícil, probablemente debido a la gran insolubilidad de las moléculas, si bien es cierto que se han descrito varios métodos para su separación¹⁰⁻¹¹. Por esa razón se utilizó el enfoque alternativo descrito en la Figura 4. En consecuencia, se suspendió en agua ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) disponible comercialmente, se ajustó el pH entorno a 7, y se añadió omadine a esta disolución, obteniéndose de esta forma el aminoderivado de omadine **7** con un rendimiento del 63%. En

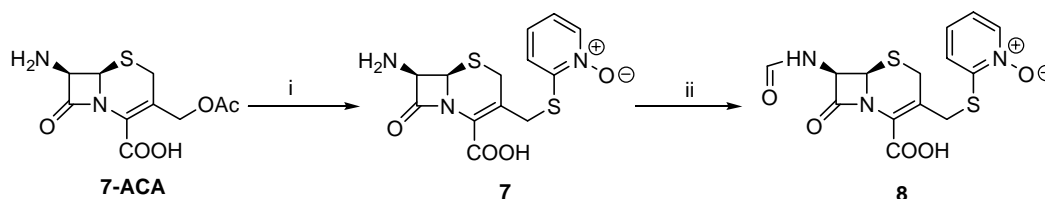
Yet again, a comparison with the *p*-nitrobenzyl derivatives and one of them in the free acid form could provide useful information about the effect of a protective group towards the *AmpC* ability in acylating the azetidinone ring. However, we found the removal of the *p*NB on **4** and **5** was quite difficult, probably undermined by the great insolubility of the molecules, albeit several methods for its cleavage are described.¹⁰⁻¹¹ Hence, for that reason, the alternative approach outlined in Figure 4 was undertaken. Accordingly, commercially available 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) was suspended in water, the pH was adjusted to about 7, and omadine was added to this solution, thus obtaining the omadine-aminoderivative **7** in 63% yield. On this intermediate, a classical formylation pro-

este intermedio se realizó un procedimiento de formilación clásico, obteniendo de manera gratificante el producto deseado libre de ácido **8** con un rendimiento del 42%.

cedure was performed, gratifyingly affording the desired free-acid product **8** in 42% yield.

FIGURA 4. Síntesis de las cefalosporinas del «caballo de troya». *Reactivos y condiciones:*
i. omadine, NH_4OH , H_2O , rt (63%); ii. Ac_2O , HCOOH , rt (42%).

FIGURE 4. Synthesis of the Trojan-horse cephalosporins. *Reagents and conditions:*
i. Omadine, NH_4OH , H_2O , rt (63%); ii. Ac_2O , HCOOH , rt (42%).



CONCLUSIONES

En resumen, se ha intentado con éxito la síntesis eficiente de nuevas cefalosporinas de doble acción, a través de una secuencia lineal, con un buen rendimiento general. La versatilidad de este enfoque se caracteriza principalmente por la preparación de un intermedio clave, que representa un valioso y conveniente núcleo β -lactámico para sintetizar una amplia variedad de dichas moléculas, estudios que se han convertido en la actualidad en una cuestión central para nuestros laboratorios.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a Eli Lilly and Company (Indianápolis, EE. UU.) por su amabilidad al proporcionarnos el derivado de cefalosporina **1**, y a Antibioticos SpA (Milán, Italia) por su generosa donación de 7-ACA. Agradecemos también a la fundación Fondazione Cassa di Risparmio di Modena la concesión de una beca postdoctoral.

CONCLUSIONS

In summary, the efficient synthesis of new dual-action cephalosporins has been successfully attempted, through a linear sequence, with good overall yields. The versatility of this approach is mainly featured by the preparation of a key intermediate, which represents a valuable and convenient β -lactam core for synthesizing a wider range of such molecules, the study thereof is currently featuring as a central issue in our laboratories.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Eli Lilly and Company (Indianapolis, USA) for kindly providing cephalosporin derivative **1**, and Antibioticos SpA (Milan, Italy) for a generous gift of 7-ACA. A.S. thanks Fondazione Cassa di Risparmio di Modena for a postdoctoral grant.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Blaszcak LC, Eid CN, Flokowitsch J, Gregory GS, Hitchcock SA, Huffman GW, Mayhugh DR, Nesler MJ, Preston DA, Zia-Ebrahimi M. Synthesis of new 3-thiosubstituted carbacephem antibiotics and their activity against penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997; 7: 2261-2264.
2. Rice LB, Bonomo RA. β -lactamases: which ones are clinically important? *Drug Resist. Updat.* 2000; 3: 178-189.
3. O'Callaghan CH, Sykes RB, Staniforth SE. A new cephalosporin with a dual mode of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1976; 10: 245-248.
4. Keith DD, Albrecht HA, Beskid G, Chan KK, Christenson JG, Cleeland R, Deitcher K, Delaney M, Georgopapadakou NH, Konzelmann F, Okabe M, Pruess D, Rossmann P, Specian A, Then R, Wei CC, Weigele M. Mechanism-based dual-action cephalosporins. *Special Publication-Royal Society of Chemistry* 1993; 119: 79-92.
5. Albrecht HA, Beskid G, Chan KK, Christenson JG, Deitcher K, Georgopapadakou NH, Keith DD, Konzelmann F, Pruess D, Wei CC. Dual-action cephalosporins incorporating a 3'-tertiary-amine-linked quinone. *J. Med. Chem.* 1994; 37: 400-407 and references cited therein.
6. Faraci SW, Pratt RF. Elimination of a leaving group from the 3'-position of a cephalosporin need not to be concerted with β -lactam ring opening. *J. Am. Chem. Soc.* 1984; 106:1489-1490.
7. Caselli E, Powers RA, Blaszcak LC, Wu CYE, Prati F, Shoichet BK. Energetic, structural and antimicrobial analyses of β -lactam side chain recognition by β -lactamases. *Chem. Biol.* 2001; 8: 17-31.
8. Springer DM, Luh BY, Bronson JJ. Anti-MRSA cepheems. Part 1: C-3 substituted thiopyridinium derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001; 11: 797-801.
9. Spaggiari A, Blaszcak LC, Prati F. Low-temperature deacylation of *N*-monosubstituted amides. *Org. Lett.* 2004; 6: 3885-3888.
10. Lammert SR, Ellis AI, Chauvette RR, Kukulja S. Azetidinone antibiotics. 19. A simple method for the removal of *p*-nitrobenzyl acid protective group. *J. Org. Chem.* 1978; 43: 1243-1244.
11. Chauvette RR, Pennington PA. Chemistry of cephalosporin antibiotics. XXIX. 3-Halo- and 3-Methoxy-3-cepheems. *J. Am. Chem. Soc.* 1974; 95:4986-4987.