



(19) Republik  
Österreich  
Patentamt

(11) Nummer: AT 393 452 B

(12)

# PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1248/89

(51) Int.CI.<sup>5</sup> : A61K 31/545  
A61K 47/16, //A61K 9/08

(22) Anmeldetag: 5. 8.1986

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 4.1991

(45) Ausgabetag: 25.10.1991

(62) Ausscheidung aus Anmeldung Nr.: 2110/86

(30) Priorität:

5. 8.1985 US 762235 beansprucht.

(56) Entgegenhaltungen:

US-PS4406899 DE-OS2945387 GB-PS2126479

(73) Patentinhaber:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY  
10154 NEW YORK (US).

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES CEPHALOSPORINPRÄPARATES ZUR HERSTELLUNG EINER INJEKTIONSLÖSUNG

(57) Physikalische Gemische aus  
7-(alpha-2-Aminothiazol-4-yl)-alpha-(Z)-methoxyimino-  
acetamido)-3-((1-methyl-1-pyrrolidinio)-methyl)-3-ce-  
phem-4-carboxylat-Säureadditionssalzen und pharmazeu-  
tischverträglichen Basen werden hergestellt, indem man  
die genannten Bestandteile in solchen Anteilen mitein-  
ander vermengt, daß nach Verdünnen des Gemisches mit  
Wasser bis zu einer injizierbaren Konzentration ein  
pH-Wert von 3,5 bis 7 erzielt wird.

Diese Injektionslösungen sind zum Unterschied von  
Cephalosporinsalzlösungen in reinem Wasser wesentlich  
besser verträglich und rufen keine Reizungen oder  
Schmerzreaktionen hervor.

B

AT 393 452

AT

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Cephalosporinpräparates zur Herstellung einer Injektionslösung unter Zusatz einer Base. Als Base wird eine pharmazeutisch verträgliche nicht-toxische organische oder anorganische Base eingesetzt.

5 In der US-PS 4 406 899 (Aburaki et al.) ist die Zwitterionenform von 7-[ $\alpha$ -(2-Aminothiazol-4-yl)- $\alpha$ -(Z)-methoxyiminoacetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinio)-methyl]-3-cephem-4-carboxylat beschrieben. Dort sind auch entsprechende Säureadditionssalze erwähnt, die in injizierbaren Mitteln in der Zwitterionenform vorliegen. Es wird ausgeführt, daß die Zwitterionenform ein breiteres Wirkungsspektrum besitzt als Ceftazidim und Cefotaxim.

10 Jedoch sind die dort beschriebenen Cephalosporine in Form der injizierbaren Mittel nur einige Stunden stabil. Das Zwitterion ist selbst als Trockenpulver bei Raumtemperatur instabil und verliert 30 % oder mehr seiner Aktivität bei 1-wöchiger Lagerung bei erhöhter Temperatur (z. B. 45 °C und darüber). Daher ist es erforderlich, eine speziell isolierte Verpackung einzusetzen und/oder zu kühlen. Dieses Präparat besitzt somit, verglichen mit Ceftazidim und Cefotaxim Nachteile bezüglich der Lagerung und der Verpackung.

15 Obwohl im oben genannten US-Patent Säureadditionssalze erwähnt sind, ist in dieser Patentschrift jedoch nicht ausgeführt, wie diese Salze hergestellt werden, und welche von ihnen - falls überhaupt - in Trockenpulverform über eine gute Stabilität verfügen. Kessler et al., "Comparison of a New Cephalosporin, BMY 28142, with Other Broad-Spectrum  $\beta$ -Lactam Antibiotics", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Band 27, Nr. 2, Seiten 207-216, Februar 1985, erwähnen das Sulfatsalz, geben jedoch nicht an, wie dieses Salz erhalten werden kann oder daß dieses Salz bei Raumtemperatur stabil ist und als Trockenpulver über eine gute Stabilität selbst bei erhöhter Temperatur verfügt.

20 Aus der DE-OS 2 945 387 ist es bekannt, Cephradin mit Arginin zu versetzen, um dieses Präparat zu einer relativ stabilen Injektionslösung zu verarbeiten. Cephradin ist die Trivialbezeichnung für  $\alpha$ -Amino-2,5-dihydrobenzyl-3-desacetoxycephalosporin, das in der genannten Mischung ein festes wasserfreies Präparat darstellt.

25 In der GB-PS 2 126 479 ist angegeben, daß  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in saurer oder amphotischer Form mit Basen gemischt zu Injektionslösungen verarbeitet werden. Da aber auch diese Präparate noch unzureichende Stabilität besitzen, wird in dieser Schrift vorgeschlagen, die Mischungen unter einer Schutzatmosphäre mit einem höheren  $\text{CO}_2$ -Gehalt als dem der Luft aufzubewahren. Dieses Verfahren ist aufwendig und unbefriedigend.

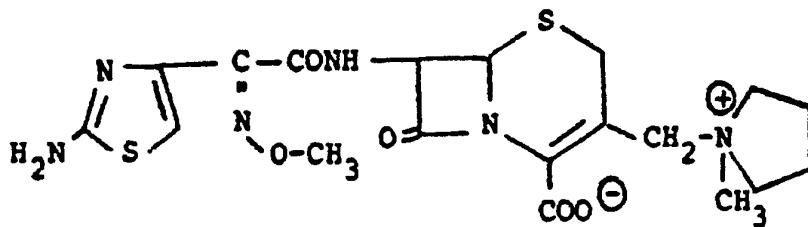
30 Es wurde nun gefunden, daß bestimmte kristalline Säureadditionssalze von 7-[ $\alpha$ -(2-Aminothiazol-4-yl)- $\alpha$ -(Z)-methoxyiminoacetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinio)-methyl]-3-cephem-4-carboxylat als Trockenpulver über eine ausgezeichnete Stabilität bei Raumtemperatur verfügen und verglichen mit der Zwitterionenform bei erhöhter Temperatur stabiler sind. Als "Trockenpulver" wird ein solches bezeichnet, dessen Feuchtigkeitsgehalt geringer als 5 Gew.-% ist.

35 Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung eines Cephalosporinpräparates zur Herstellung einer Injektionslösung unter Zusatz einer Base ist daher dadurch gekennzeichnet, daß ein physikalisches Gemisch aus mindestens einem temperaturstabilen kristallinen Salz des 7-[ $\alpha$ -(2-Aminothiazol-4-yl)- $\alpha$ -(Z)-methoxyiminoacetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinio)-methyl]-3-cephem-4-carboxylats, und zwar des Schwefelsäure-, Di-Salpetersäure, Mono-Chlorwasserstoffsäure- und Di-Chlorwasserstoffsäure-Additionssalzes bzw. des Orthophosphorsäure-Additionssalzes mit 1,5 - 2 Moläquivalenten  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , oder von Solvaten davon und einer pharmazeutisch verträglichen nicht-toxischen organischen oder anorganischen Base hergestellt wird, wobei man die genannten Bestandteile in solchen Anteilen miteinander vermengt, daß nach Verdünnen des Gemisches mit Wasser bis zu einer injizierbaren Konzentration ein pH-Wert von 3,5 bis 7 erzielt wird.

40 Die Orthophosphorsäure-Additionssalze mit 1,5 - 2 Mol Orthophosphorsäure pro Mol Salz entsprechen etwa einem Bereich von den Sesqui- bis zu den Di-Orthophosphorsäuresalzen. Der Ausdruck "kristallin" bringt zum Ausdruck, daß die Moleküle zumindestens teilweise in charakteristischer Weise angeordnet sind.

45 Die Herstellung dieser Salze wird im folgenden einzeln beschrieben und erfolgt nach einem neuen Verfahren. Während die dabei erhaltenen Schwefelsäure-, Di-Salpetersäure-, Di-Chlorwasserstoffsäure- und Orthophosphorsäure-Additionssalze deutlich kristalline Form besitzen (nachgewiesen durch Doppelbrechung unter einem polarisierenden Mikroskop), wobei die Moleküle genau ausgerichtet sind, besitzen die Mono-Chlorwasserstoffsäure-Additionssalze nur eine gewisse Gleichmäßigkeit in der Anordnung ihrer Moleküle (dies zeigt sich an einer nur geringen Doppelbrechung unter dem polarisierenden Mikroskop) und somit keine präzis festgelegte Anordnung, so daß sie als "schwach" -kristallin bezeichnet werden müssen. Der hier benutzte Ausdruck "kristallin" umfaßt somit nicht nur die deutlich kristallinen Salze, sondern auch das "schwach"-kristallin auftretende Mono-Chlorwasserstoffsäure-Additionssalz.

50 Die hier beschriebenen Säureadditionssalze setzen, wenn sie zu wässrigen, injizierbaren Mitteln verarbeitet werden, das Zwitterion in der Lösung frei. Dieses Zwitterion besitzt die folgende Struktur:



15 Die Breitbandwirkung dieses Zwitterions und somit der aus den hier beschriebenen Salzen hergestellten wäßrigen Mitteln gegenüber verschiedenen Organismen geht aus den Daten der US-PS 4 406 899 (Aburaki et al.) hervor.

Die aus den hier beschriebenen Säureadditionssalzen erhaltenen wäßrigen Mittel, die dadurch hergestellt werden, daß man lediglich steriles Wasser zugibt, stellen saure Lösungen dar (pH = 1,8 - 2,5), die nach intravenöser Verabreichung an Kaninchen eine nicht zu akzeptierende Reizung hervorrufen. Nach intramuskulärer Verabreichung dieser Lösungen an Kaninchen stellt man eine nicht zu akzeptierende Schmerzreaktion fest. Die Löslichkeiten der Schwefelsäure- und Disalpetersäureadditionssalze sind außerdem zu gering und für typische injizierbare Mittel unzureichend. Erfindungsgemäß wurde nun gefunden, daß diese unerwünschten Nachteile dadurch überwunden werden können, daß man die hier beschriebenen Salze in Form eines physikalischen Gemisches (es handelt sich um eine Mischung von Feststoffen) mit einer pharmazeutisch verträglichen nicht-toxischen organischen oder anorganischen Base in solchen Anteilen einsetzt, daß nach Verdünnen mit Wasser ein pH-Wert von 3,5 bis 7 erzielt wird. Dabei erhält man eine Zwitterionenaktivität von 1 mg/ml bis 400 mg/ml, üblicherweise 250 mg/ml (bestimmt mittels high performance liquid chromatography, HPLC). Vorzugsweise soll der pH-Wert bei den injizierbaren Konzentrationen bei 4 - 6 liegen.

Ein erfindungsgemäß bevorzugt eingesetztes Salz ist das kristalline Schwefelsäureadditionssalz. Es wird aufgrund seiner geringen Löslichkeit in Wasser (25 mg/ml) bevorzugt, so daß dieses Salz beim Kristallisieren aus einem wäßrigen Medium in hoher Ausbeute erhalten werden kann.

30 Das kristalline Schwefelsäureadditionssalz stellt man nach einem Verfahren her, wobei man

- (a) eine wässrige Mischung herstellt aus
  - (i) mindestens 1 Moläquivalent Schwefelsäure und
  - (ii) aus einer solchen Menge des Zwitterions, daß es in der Mischung in einer Konzentration größer als 25 mg/ml vorliegt.
- (b) das Schwefelsäureadditionssalz kristallisiert und
- (c) das kristalline Schwefelsäureadditionssalz isoliert.

40 Hierauf wird weiter unten noch näher eingegangen.

Die hier beschriebenen kristallinen Salze sind bei Raumtemperatur ausgezeichnet stabil. Ihr Wirksamkeitsverlust (bestimmt mittels HPLC) nach 1-monatiger Lagerung bei Raumtemperatur beträgt weniger als 1 %. Diese Salze sind auch bei erhöhten Temperaturen ausgezeichnet stabil; ihr Wirksamkeitsverlust (bestimmt mittels HPLC) nach 1-monatiger Lagerung bei 45 - 56 °C beträgt weniger als 15 %.

45 Das Schwefelsäureadditionssalz wird wie bereits gesagt bevorzugt eingesetzt. Der Wirksamkeitsverlust dieses Salzes beträgt nach 1-monatiger Lagerung bei 45 - 56 °C weniger als 10 %. Sehr bedeutsam ist, daß dieses Salz über eine geringe Löslichkeit in Wasser verfügt, i. e. etwa 25 mg/ml. Die Verluste beim Kristallisieren dieses Salzes aus Wasser sind daher sehr gering.

50 Auch das hier beschriebene Di-Salpetersäureadditionssalz verfügt über eine niedrige Löslichkeit in Wasser, i. e. etwa 60 mg/ml. Somit sind auch bei diesem Salz die Verluste beim Kristallisieren aus Wasser gering.

Die Löslichkeiten der Monochlorwasserstoff-, Dichlorwasserstoff und Sesqui- oder Diorthophosphorsäure-Additionssalze sind größer als 200 mg/ml. Diese Salze kristallisiert man daher nicht aus Wasser, sondern vorzugsweise aus organischen Lösungsmitteln, um eine gute Ausbeute zu erzielen.

55 Vorzugsweise setzt man bei der Herstellung des Schwefelsäureadditionssalzes das Zwitterion in der Stufe (a) in einer solchen Menge ein, daß es in der Mischung in einer Konzentration von 100 mg/ml bis etwa 200 mg/ml vorliegt. Die Stufe (b) führt man vorzugsweise in einem wäßrigen Medium durch, das kein organisches Lösungsmittel enthält. Üblicherweise setzt man nicht mehr als 2 Moläquivalente Schwefelsäure in Stufe (a) ein. Das Zwitterion setzt man

normalerweise in Stufe (a) in einer solchen Menge ein, daß es in der Mischung in einer Konzentration von weniger als 500 mg/ml vorliegt.

Die Stufe (a) führt man durch, indem man entweder das feste Zwitterion zu einer Schwefelsäurelösung (z. B. 1N  $H_2SO_4$ ) unter heftigem Rühren unter Bildung einer Lösung zugibt. In alternativer Weise kann man die Stufe (a) durchführen, indem man das feste Zwitterion in Wasser löst und langsam unter Rühren Schwefelsäure zugibt, wobei man eine Lösung erhält.

Die Stufe (b) führt man durch, indem man die Kristallisation induziert, beispielsweise durch Animpfen. Dann schlammmt man auf, vorzugsweise 15 min bis 2 h. Diese Kristallisationsstufe führt man vorzugsweise in einem wäßrigen Medium durch, das kein organisches Lösungsmittel aufweist. In diesem Fall ist die erzielte Reinheit normalerweise höher als 98 %. Obgleich die Anwesenheit eines organischen Lösungsmittels, beispielsweise Aceton, die Kristallisation fördert und die Ausbeute erhöht, indem die Löslichkeit des gebildeten Schwefelsäureadditionsalzes im Kristallisationsmedium herabgesetzt wird, kann dadurch auch die Präzipitation von Verunreinigungen begünstigt werden, was sich in einer verminderten Reinheit niederschlägt. Setzt man das Zwitterion in der Stufe (a) in einer so großen Menge ein, daß es in der Mischung in einer Menge von weniger als 25 mg/ml vorliegt, dann muß man ein organisches Lösungsmittel, vorzugsweise Aceton, dem Kristallisationsmedium einverleiben, um annehmbare Ausbeuten zu erzielen. Setzt man Aceton ein, dann verwendet man dieses in Mengen von etwa 0,5 - 10 Volumeneinheiten/Volumeneinheit an wäßrigem Kristallisationsmedium.

Die Stufe (c) führt man durch, indem man die Kristalle vom Kristallisationsmedium abtrennt, vorzugsweise mittels Vakuumfiltration. Anschließend wäscht man die Kristalle, beispielsweise mit Aceton/Wasser und dann mit Aceton alleine oder mit 0,1 N Schwefelsäure (z. B. 1/10 Volumen) und dann mit Aceton (z. B. 1/4 Volumen). Dann trocknet man, beispielsweise durch Trocknen im Vakuum bei 30 - 50 °C während eines Zeitraums von 4 - 20 h.

Das hier beschriebene Verfahren zur Herstellung des Schwefelsäureadditionsalzes führt aufgrund der begrenzten Löslichkeit des Schwefelsäureadditionsalzes, verglichen mit der Zwitterionenform, zu einer Reinigung der Zwitterionenform. Dieses Verfahren kann somit dazu eingesetzt werden, das Zwitterion zu reinigen, ohne es als Feststoff zu isolieren. Soll aus dem gebildeten Schwefelsäureadditionsalz ein im wesentlichen reines Zwitterion (freie Base) gewonnen werden, dann kann man dies dadurch erreichen, daß man das Salz in Wasser löst,  $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$  in einer Menge von 90 - 100 % der Theorie bei einem pH-Wert von weniger als 6,5 zur Ausfällung von  $BaSO_4$  zugibt, das  $BaSO_4$  abfiltriert und das Filtrat gewinnt, indem das Zwitterion gelöst ist, und es als Lösung verwendet oder das feste Zwitterion (freie Base) daraus durch Lyophilisieren isoliert. Es ist auch möglich, Aceton hinzuzugeben, um das amorphe Zwitterion auszufällen. Anschließend isoliert man das Zwitterion als Feststoff mittels Vakuumfiltration, wäscht z. B. mit Aceton und trocknet im Vakuum. In alternativer Weise kann man das Schwefelsäureadditionsalz in die freie Base überführen, indem man Ionenaustauschharze, beispielsweise Dowex WGR (ein schwach-basisches Anionenaustauschharz) und Dowex XU-40090.01 (ein stark saures Kationenaustauschharz) einsetzt und anschließend lyophilisiert.

Das kristalline Di-Salpetersäureadditionsalz stellt man her, indem man

- (i) mindestens 2 Moläquivalente Salpetersäure mit
- (ii) dem Zwitterion

vermischt, das in der Mischung in einer Konzentration größer als 100 mg/ml vorliegt, und dann eine Kristallisation durch Animpfen oder Reiben mit einem Glasstab induziert, mit 2-Propanol verdünnt und kühl. Das kristalline Disalpetersäureadditionsalz gewinnt man beispielsweise durch Filtrieren, Waschen nacheinander mit beispielsweise 2-Propanol- $H_2O$  (50 % V/V), 2-Propanol und Trocknen im Vakuum während eines Zeitraums von 2 h bei 50 °C.

Das Mono-Chlorwasserstoffsäureadditionsalz stellt man her, indem man das Zwitterion in etwa 1 Moläquivalent Chlorwasserstoffsäure löst und kristallisiert, indem man Aceton unter Rühren zugibt und weiterführt. Die gebildeten Kristalle isoliert man anschließend, beispielsweise mittels Vakuumfiltration. Dann wäscht man mit Aceton und trocknet im Vakuum. In alternativer Weise kann man das Mono-Chlorwasserstoffsäureadditionsalz aus dem Di-Chlorwasserstoffsäureadditionsalz erhalten, indem man das Di-Chlorwasserstoffsäureadditionsalz in Methylenechlorid aufschlämmt und 1 Moläquivalent Triethylamin zugibt. Anschließend schlammmt man auf, wobei sich das Mono-Chlorwasserstoffsäureadditionsalz bildet, das man isoliert, beispielsweise durch Vakuumfiltration. Anschließend wäscht man mit Methylenchlorid und trocknet im Vakuum.

Das kristalline Di-Chlorwasserstoffsäureadditionsalz stellt man her, indem man das Zwitterion in mindestens 2 Moläquivalenten Chlorwasserstoffsäure löst, durch Zugabe von Aceton eine Kristallisation herbeiführt, die gebildeten Kristalle isoliert, beispielsweise durch Vakuumfiltration, mit Aceton wäscht und im Vakuum trocknet.

Das kristalline Di-orthophosphorsäure-Additionsalz stellt man her, indem man das Zwitterion in mindestens 2 Moläquivalenten Phosphorsäure löst, durch Zugabe von Aceton eine Kristallisation herbeiführt, die gebildeten Kristalle isoliert, beispielsweise mittels Vakuumfiltration, anschließend zuerst mit Aceton und dann mit Ether wäscht

und dann im Vakuum trocknet. Das kristalline Sesqui-Orthophosphorsäure-Additionssalz erhält man nach dem gleichen Verfahren, wobei man jedoch 1,5 Moläquivalente Phosphorsäure einsetzt.

Aus den hier beschriebenen Salzen stellt man injizierbare Mittel her, die eine injizierbare Konzentration von 1 mg/ml bis zu 400 mg/ml an dem Zwitterion aufweisen, indem man das erfindungsgemäß hergestellte, gepufferte physikalische Gemisch mit steriles Wasser verdünnt (pH-Wert: 3,5 - 7). Als geeignete Puffer kann man beispielsweise nennen: Trinatriumorthophosphat, Natriumbicarbonat, Natriumcitrat, N-Methylglucamin, L(+)-Lysin und L(+)-Arginin. Für eine intramuskuläre oder intravenöse Verabreichung an einen erwachsenen Patienten ist eine Gesamtdosierung von 750 bis 3000 mg/Tag, aufgeteilt auf mehrere Dosen, normalerweise ausreichend.

Die exakten Anteile der Bestandteile in dem erfindungsgemäß hergestellten physikalischen Gemisch variieren von Charge zu Charge des Salzes, da die Reinheit des Salzes von Charge zu Charge variiert. Die Anteile an Bestandteilen bestimmt man für eine bestimmte Charge, indem man vortitriert und mit einer Probe vergleicht, um einen gewünschten pH-Wert innerhalb des oben genannten Bereichs zu erhalten.

Das physikalische Gemisch kann man ohne Schwierigkeiten lagern und in fester Form vertreiben, wobei man die Vorteile der Stabilität der Salze ausnutzt. Das physikalische Gemisch kann zudem ohne Schwierigkeiten in ein injizierbares Mittel überführt werden, indem man lediglich Wasser zugibt. Dies kann von einer Krankenschwester oder einem Arzt kurz vor der Anwendung vorgenommen werden.

Das physikalische Gemisch stellt man her, indem man das Salz und die Base zu einer gleichmäßigen Mischung verarbeitet beispielsweise unter Verwendung eines Standardmischers in einer trockenen Atmosphäre. Dann füllt man in Vials oder andere Behälter ab. Alle diese Handlungen müssen unter aseptischen Bedingungen vorgenommen werden.

Zu den Basen, die in dem Gemisch eingesetzt werden können, zählen beispielsweise Trinatriumorthophosphat, Natriumbicarbonat, Natriumcitrat, N-Methylglucamin, L(+)-Lysin und L(+)-Arginin. L(+)-Lysin und L(+)-Arginin sind bevorzugt, da die diese Verbindungen enthaltende Gemische zu injizierbaren Mitteln rekonstituiert werden können, die nach Injektion bei den Tieren eine geringere Schmerzreaktion hervorrufen als diejenigen Mittel, die sich von den Gemischen ableiten, welche die anderen Basen enthalten. Das L(+)-Lysin setzt man vorzugsweise in einem solchen Anteil ein, daß nach Verdünnen des Gemisches mit Wasser zu einem Mittel mit einer Zwitterionenaktivität von 250 mg/ml (bestimmt mittels HPLC) ein pH-Wert von 3,5 - 6 erreicht wird.

Die erwähnten Salze und die diese Salze enthaltenden trockenen physikalischen Gemische können ohne Kühlen und ohne Verwendung einer isolierenden Verpackung gelagert werden und behalten dennoch ihre hohe Wirksamkeit.

Bei verschiedenen der in der Folge beschriebenen Herstellungsvorschriften der erfindungsgemäß eingesetzten Säureadditionssalze setzt man das instabile Zwitterion als Ausgangsverbindung ein. Die Herstellung dieses Zwitterions ist beschrieben in den Beispielen 1 bis 3 der US-PS 4 406 899 (Aburaki et al.). Das Zwitterion wird dort wie folgt bezeichnet: 7-[(Z)-2-Methoxyimino-2-(2-aminothiazol-4-yl)-acetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinium)-methyl]-3-cephem-4-carboxylat.

Die Herstellung der verwendeten Salze wird anhand der folgenden Vorschriften erläutert.

#### Vorschrift 1

Herstellung des Schwefelsäureadditionssalzes

1,5 g Zwitterion gibt man langsam zu 10 ml schnellgerührter 1N  $H_2SO_4$  (1,59 Moläquivalente) bei 20 - 26 °C. Man erhält eine Lösung. Man induziert eine Kristallisation, indem man mit kristallinem Schwefelsäureadditionssalz animpft und die kristalline Masse 0,5 h aufschlämmt. Die Kristalle trennt man dann durch Vakuumfiltration ab, wäscht sie mit 3 ml 50 % Aceton/Wasser (V/V) und mit zwei 5 ml-Portionen Aceton. Anschließend trocknet man im Vakuum bei 40 - 50 °C über Nacht.

Die typische Ausbeute an Schwefelsäureadditionssalz beträgt 1,3 g.

Elementaranalyse für  $C_{19}H_{24}N_6O_5S_2H_2SO_4$ :

	C	H	N	S	$H_2O$
ber.:	39,44	4,53	14,52	16,62	- %
gef.:	38,91	4,57	14,64	16,71	1,42 %

#### Vorschrift 2

Herstellung des Schwefelsäureadditionssalzes

1,5 g Zwitterion löst man in 5 ml Wasser. Man gibt 5 ml 1M  $H_2SO_4$  langsam unter Rühren zu dieser Lösung. Man induziert die Kristallisation, indem man mit kristallinem Säureadditionssalz animpft und die kristalline Masse

0,5 h aufschlämmt. Man trennt die Kristalle durch Vakuumfiltration ab, wäscht sie mit 3 ml 50 % Aceton/Wasser (V/V) und zweimal mit 5 ml Aceton und trocknet im Vakuum über Nacht bei 40 - 50 °C.

Das Schwefelsäureadditionssalz erhält man üblicherweise in einer Ausbeute von 1,3 g.

5 Vorschrift 3

Herstellung des  $(\text{HNO}_3)_2$ -Säureadditionssalzes

300 mg des Zwitterions löst man in 2N Salpetersäure (0,5 ml). Die Lösung reibt man mit einem Glasstab, verdünnt mit 0,4 ml 2-Propanol und kühlt. Man sammelt die kristalline Titelverbindung und wäscht nacheinander mit 0,4 ml 2-Propanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1), 2-Propanol und dann mit Ether, wobei man 127 mg des Dinitratsalzes erhält.

10 Elementaranalyse für  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}_2 \cdot 2\text{HNO}_3$ :

	C	H	N	S	
Ber.:	37,62	4,32	18,47	10,57 %	
Gef.:	36,92	4,10	18,08	10,67	
( $\text{H}_2\text{O}$ -Gehalt 0,90 %)					

15 Vorschrift 4

Herstellung des Monohydrochlorid-Säureadditionssalzes

20 1 g des Zwitterions löst man in 2,08 ml 1N HCl (1 Moläquivalent) bei 20 - 25 °C. Man gibt unter heftigem Rühren während eines Zeitraums von 15 min 30 ml Aceton zu, wobei sich Kristalle bilden. Man röhrt eine weitere Stunde. Man isoliert die Kristalle durch Vakuumfiltration, wäscht mit 10 ml Aceton und trocknet im Vakuum 2 h bei 50 °C. Eine typische Ausbeute an dem kristallinen Monohydrochloridsalz beträgt 0,9 g.

25 Elementaranalyse für  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}_2 \cdot \text{HCl}$ :

	C	H	N	S	Cl	$\text{H}_2\text{O}$	%
Ber.:	41,37	4,75	15,2	11,63	12,86		
Gef.:	39,32	4,88	13,95	11,28	12,44		4,5 %
(Korrigiert für $\text{H}_2\text{O}$ ):	41,17		14,61	11,82	13,03 %)		

30 Vorschrift 5

Herstellung des Dihydrochlorid-Säureadditionssalzes und Herstellung des Monohydrochlorid-Säureadditionssalzes aus ersterem Salz.

35 Man löst 350 mg Zwitterion in 2 ml 1N HCl. Man gibt unter heftigem Rühren während eines Zeitraums von 5 min 10 ml Aceton zu der erhaltenen Lösung, wobei sich Kristalle bilden. Man röhrt weitere 5 min, gibt dann weitere 10 ml Aceton zu und röhrt weitere 0,5 h. Man entfernt die Kristalle durch Vakuumfiltration, wäscht zweimal mit 5 ml Aceton und trocknet 24 h im Vakuum bei 40 - 45 °C.

Eine typische Ausbeute an kristallinem Dihydrochlorid-Säureadditionssalz beträgt 300 mg.

40 Elementaranalyse für  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}_2 \cdot 2\text{HCl}$ :

	C	H	N	S	Cl	$\text{H}_2\text{O}$	%
Ber.:	41,38	4,75	15,2	11,62	12,8		
Gef.:	40,78	4,98	14,7	11,25		1,25 %	
(Korrigiert für $\text{H}_2\text{O}$ ):	41,1		14,88	11,39	11,94 %)		

50 Man schlämmt 1 g des so hergestellten Dihydrochloridsalzes in 20 ml Methylenchlorid von 20 - 25 °C in einem verschlossenen Kolben auf und gibt während eines Zeitraums von 15 min 0,28 ml Triethylamin zu. Man schlämmt die kristalline Masse dann 5 h auf. Man isoliert die erhaltenen Monohydrochloridkristalle dann durch Vakuumfiltration, wäscht sie zweimal mit 5 ml Methylenchlorid und trocknet 2 h im Vakuum bei 50 °C. Eine typische Ausbeute beträgt 800 mg.

55 Vorschrift 6

Herstellung des Di-Orthophosphorsäure-Additionssalzes

1 g Zwitterion löst man in 3,4 ml von 144 mg/ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (2,2 Moläquivalente) bei 15 °C. Man filtriert die Lösung in geeigneter Weise, um sie zu klären. Unter heftigem Rühren und während eines Zeitraums von 10 min gibt man

AT 393 452 B

12 ml Aceton zu der geklärten Lösung, wobei sich Kristalle bilden. Man röhrt weitere 10 min, gibt dann 30 ml Aceton während eines Zeitraums von 10 min zu und röhrt weitere 15 min. Man sammelt die Kristalle mittels Vakuumfiltration, wäscht sie zweimal mit 5 ml Aceton und zweimal mit 5 ml Ether und trocknet 16 h im Hochvakuum.

Eine typische Ausbeute an kristallinem Diorthophosphorsäure-Additionssalz bei dieser Art der Herstellung beträgt 1,1 g.

5 Elementaranalyse für  $C_{19}H_{24}N_6O_5S_2 \cdot 2H_3PO_4$ :

	C	H	N	$H_2O$
Ber.:	33,72	4,47	12,42	%
Gef.:	33,43	4,65	12,02	1,82 %
(Korrigiert für $H_2O$ ):	34,0		12,2 %)	

10 Das Sesqui-orthophosphorsäure-Additionssalz erhält man wie oben beschrieben, wobei man jedoch 1,5 Moläquivalente  $H_3PO_4$  statt der 2,2 Moläquivalente einsetzt.

15 Stabilitätsuntersuchungen bei erhöhten Temperaturen

Die Stabilitätsuntersuchungen bei erhöhter Temperatur wurden durchgeführt, indem die Säureadditionssalze in Trockenbehältern bei den in der Tabelle angeführten Temperaturen für die ebenfalls in der Tabelle angeführten Zeiträume gelagert wurden. Die Wirksamkeitszunahmen bzw. -verluste wurden mittels HPLC bestimmt. Eine Wirksamkeitszunahme wird durch ein Pluszeichen vor der Zahl angezeigt. Ein Wirksamkeitsverlust von weniger als 10 % während eines Zeitraums von 2 - 4 Wochen bei 45 - 56 °C zeigt normalerweise an, daß der Wirksamkeitsverlust bei einer 2- bis 3-jährigen Lagerung bei Raumtemperatur weniger als 10 % beträgt.

20

25 Tabelle

30 Prozentualer Verlust

	Substanz	45 °C (Wochen)				56 °C (Wochen)				100 °C (Tage)	
		1	2	4	6	1	2	4	1	1	
35	Zwitterion	37	51	71	-	57	-	-	-	100	
40	$H_2SO_4$ -Salz	2,4 - +5	3	+5	1,4	5 - +6	+3	0 - +6	0 - 10		
	$(HNO_3)_2$ -Salz	8,8	3,4	0,68	10,3	3,7	2,4	-	-		
	HCl-Salz	4,8	2,3	6,0	6,4	6,4	-	-	-		
45	$(HCl)_2$ -Salz	0	-	7,4	-	0	-	7,2	12,4		
	$(H_3PO_4)_2$ -Salz	0	3,0	1,0	-	2,7	5,0	-	-		

50 Die Figur 1 zeigt das Infrarot-Absorptionsspektrum des kristallinen 7-[ $\alpha$ -(2-Aminothiazol-4-yl)- $\alpha$ -(Z)-methoxyiminoacetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinio)-methyl]-3-cephem-4-carboxylat-Sulfatsalzes (hergestellt gemäß den Vorschriften 1 oder 2). Das Spektrum wurde mit einem KBr-Preßling aufgenommen.

55 Die Figur 2 zeigt das Infrarot-Absorptionsspektrum des kristallinen Sesquiphosphatsalzes von 7-[ $\alpha$ -(2-Aminothiazol-4-yl)-3-(Z)-methoxyiminoacetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinio)-methyl]-3-cephem-4-carboxylat (KBr-Preßling).

Die Figur 3 zeigt das Infrarot-Absorptionsspektrum des kristallinen Diphosphatsalzes von 7-[ $\alpha$ -(2-Aminothiazol-4-yl)-3-(Z)-methoxyiminoacetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinio)-methyl]-3-cephem-4-carboxylat (KBr-Preßling).

Das Röntgenbeugungs-Pulverdiagramm des kristallinen Sulfatsalzes von 7-[ $\alpha$ -(2-Aminothiazol-4-yl)- $\alpha$ -(Z)-methoxyiminoacetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinio)-methyl]-3-cephem-4-carboxylat (hergestellt gemäß den Beispielen 1 oder 2) wurde mit einem Rigaku-Pulverdiffraktometer unter Verwendung einer Kupfer-Röntgenröhre und eines Nickelfilters aufgenommen, wobei sich die Probe in einer Glasschale befand. Die Scangeschwindigkeit betrug 2°/min über einen Bereich von 5 - 40°. Zur Bestimmung der Winkel der maximalen Beugung wurde ein Diagramm mechanisch aufgezeichnet. Daraus wurden die Abstände (d) und die relativen Intensitäten ( $I/I_0$ ) berechnet. Diese Daten sind nachstehend aufgelistet.

10	d Abstand (Å)	$I/I_0$ (%)
	9,20	100
	6,80	50
	5,50	28
15	5,09	22
	4,50	38
	4,41	44
	4,19	63
	3,78	38
20	3,64	44
	3,39	25
	3,31	31
	3,15	47

25

### Vorschrift 7

#### Herstellung des Sesquiphosphatsalzes

Man löst 0,70 g Zwitterion unter heftigem Rühren in 2,2 - 2,4 ml 85%iger Phosphorsäure (2,8 - 2,2 Moläquivalente), die 1:1 (V/V) mit Wasser verdünnt ist. Zum Klären der Lösung filtriert man sie durch ein Membranfilter mit einer Porengröße von 0,22 - 0,45 µm. Zum Filtrat gibt man unter heftigem Rühren während eines Zeitraums von 30 - 60 min 5 - 7 Vol. -Teile (15 - 20 ml) Methanol. Dabei bilden sich Kristalle. Man röhrt weitere 1,5 - 2 h heftig. Man gewinnt das kristalline Produkt mittels Vakuumfiltration, wäscht es auf dem Filter zuerst mit 6 - 8 ml Methanol/Aceton (1:1 V/V), wobei man darauf achtet, daß der Filterkuchen eng zusammenbleibt, und dann mit Aceton und trocknet das Produkt 2 h bei 50 °C im Vakuum; typische Ausbeute: 0,7 - 0,75 g.

Interpretation des Infrarot-Spektrums (vgl. Fig. 2) (IR, KBr-Preßling)

40	Lage des Peaks (cm <sup>-1</sup> )	Funktionelle Gruppe
	2800 - 3400	NH, NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , Carboxyl OH
	1780	β-Lactam C=O
	1680	Carboxyl C=O
45	1660	Amid C=O
	1630	C=N, C=C
	1550	Amid OH
	980, 1040	

50

#### Verhalten beim Erhitzen:

Beim Untersuchen im Differential-Kalorimeter findet man bei 171,8 °C ein Exotherm.

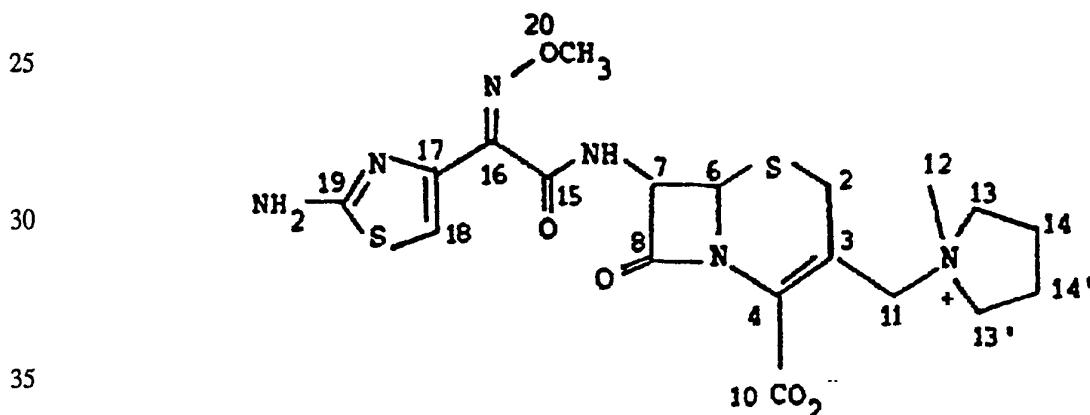
55

#### Röntgenbeugungsdiagramm:

Das Röntgenbeugungs-Pulverdiagramm des zuvor beschriebenen Sesquiphosphatsalzes wurde auf die gleiche Weise mit einem Rigaku-Pulverdiffraktometer bestimmt, wie das vorstehend beim Sulfatsalz beschrieben ist. Das Ergebnis ist nachstehend wiedergegeben:

	d	I/I <sub>0</sub>
5	11,04	32
	9,2	16
	7,89	24
	7,02	42
	6,7	32
10	5,5	26
	4,64	100
	4,456	53
	4,3	58
	3,88	26
15	3,75	89
	3,56	21
	3,31	26
	3,05	16

20 Interpretation des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums (90 MHz, D<sub>2</sub>O-Lösung) von:



Chemische Verschiebung (ppm in δ gegenüber TSP)	Beschreibung	Integral	Zuordnung
---	--------------	----------	-----------

45	2,0 - 2,4	Multiplett	4	14CH <sub>2</sub> , 14'CH <sub>2</sub>
	3,04	Singulett	3	12CH <sub>3</sub>
50	3,3 - 3,6	Multiplett	5	2CH, 13CH <sub>2</sub> , 13'CH <sub>2</sub>
	3,94	Dublett	1	2CH
	4,12	Singulett	3	20CH <sub>3</sub>
	4,12	Dublett	1	11CH
	4,8	Dublett	1	11CH
55	5,42	Dublett	1	6CH
	5,88	Dublett	1	7CH
	7,21	Singulett	1	18CH

## Stabilität:

	Zeit	Temperatur	prozentualer Verlust
5	1 Tag	100 °C	10,9
	3 Tage	70 °C	0
	7 Tage	70 °C	1,9
10	1 Woche	56 °C	1,0
	2 Wochen	56 °C	1,4
	4 Wochen	56 °C	0
	1 Woche	45 °C	0
	2 Wochen	45 °C	1,4
	4 Wochen	45 °C	0,7
15	8 Wochen	45 °C	1,6
	1 Monat	37 °C	2,5

20

## Elementaranalyse (Gew.-%):

	Gefunden	Auf Trockenbasis	Theorie (Sesquiphosphat)
25	C	35,44	36,4
	H	4,66	4,7
	N	12,88	13,4
30	$\text{H}_2\text{O}$	2,29*	Monohydrat = 2,8 % $\text{H}_2\text{O}$
	$\text{H}_3\text{PO}_4$	23,06	

bestimmt nach Karl Fischer

35

Das folgende Beispiel dient zur Erläuterung der Erfindung.

Beispiel40 Untersuchungen der physikalischen Gemische  
Es wurden physikalische Gemische des kristallinen Schwefelsäuresalzes mit

- 45 (a) Trinatriumorthophosphat,  
 (b) Natriumbicarbonat,  
 (c) L(+)-Lysin und  
 (d) L(+)-Arginin

50 hergestellt. Die Basen wurden in solchen Mengen zugegeben, daß nach Verdünnen des Gemisches mit Wasser bis zu einer Zwitterionenaktivität von 250 mg/ml (bestimmt mittels HPLC-Assay) die folgenden pH-Werte erhalten wurden:

- 55 Trinatriumorthophosphat (pH-Wert von 6,0);  
 Natriumbicarbonat (pH-Wert von 6,0);  
 L(+)-Lysin (pH-Wert von 6,0);  
 L(+)-Arginin (pH-Wert von 6,0).

Durch Rekonstitution mit steriles Wasser bis zu einer Zwitterionenaktivität von 250 mg/ml (bestimmt mittels HPLC-Assay) wurden injizierbare Mittel hergestellt. Dabei treten keine Löslichkeitsprobleme auf. Kaninchen wurden Injektionen (100 mg/kg) intramuskulär verabreicht, wobei sich die Schmerzreaktionen in Grenzen hielten. Die geringste Schmerzreaktion trat bei dem Arginin enthaltenden Mittel auf.

5 Setzt man die anderen hier beschriebenen Salze in den physikalischen Gemischen mit den oben beschriebenen Basen ein, dann erhält man ähnliche Ergebnisse. Die Löslichkeit ist ähnlich gut und der nach der intramuskulären Injektion auftretende Schmerz liegt im ertragbaren Rahmen.

10

## PATENTANSPRÜCHE

- 15 1. Verfahren zur Herstellung eines Cephalosporinpräparates zur Herstellung einer Injektionslösung unter Zusatz einer Base, dadurch gekennzeichnet, daß ein physikalisches Gemisch aus mindestens einem temperaturstabilen, kristallinen Salz des 7-[ $\alpha$ -(2-Aminothiazol-4-yl)- $\alpha$ -(Z)-methoxyiminoacetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinio)-methyl]-3-cephem-4-carboxylats, und zwar des Schwefelsäure-, Di-Salpetersäure, Mono-Chlorwasserstoffsäure- und Di-Chlorwasserstoffsäure-Additionssalzes bzw. des Orthophosphorsäure-Additionssalzes mit 1,5 bis 2 Mol-äquivalenten  $H_3PO_4$ , oder von Solvaten davon und einer pharmazeutisch verträglichen nicht-toxischen organischen oder anorganischen Base hergestellt wird, wobei man die genannten Bestandteile in solchen Anteilen miteinander vermengt, daß nach Verdünnen des Gemisches mit Wasser bis zu einer injizierbaren Konzentration ein pH-Wert von 3,5 bis 7 erzielt wird.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Bestandteile in solchen Anteilen vermengt, daß man nach Verdünnen des Gemisches mit Wasser bis zu einer injizierbaren Konzentration einen pH-Wert von 4 bis 6 erhält.
- 25 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man kristallines 7-[ $\alpha$ -(2-Aminothiazol-4-yl)- $\alpha$ -(Z)-methoxyiminoacetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinio)-methyl]-3-cephem-4-carboxylat-sulfatsalz mit dem nachstehenden Röntgenbeugungs-Pulverdiagramm

	d (Abstand in Å)	I/I <sub>0</sub> (%)
35	9,20	100
	6,80	50
	5,50	28
	5,09	22
40	4,50	38
	4,41	44
	4,19	63
	3,78	38
	3,64	44
45	3,39	25
	3,31	31
	3,15	47

- 50 einsetzt.
4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man das kristalline Orthophosphorsäure-Additionssalz oder ein Hydrat desselben einsetzt.
- 55 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß man kristallines 7-[ $\alpha$ -(2-Aminothiazol-4-yl)- $\alpha$ -(Z)-methoxyimino-acetamido]-3-[(1-methylpyrrolidinio)-methyl]-3-cephem-4-carboxylat-phosphat mit dem nachstehenden Röntgenbeugungs-Pulverdiagramm

AT 393 452 B

	d	I/I <sub>0</sub>
5	11,04	32
	9,2	16
	7,89	24
	7,02	42
	6,7	32
	5,5	26
10	4,64	100
	4,456	53
	4,3	58
	3,88	26
	3,75	89
	3,56	21
15	3,31	26
	3,05	16

einsetzt.

20

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man als Base L(+)-Lysin einsetzt.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man als Base L(+)-Arginin einsetzt.

25

Hiezu 3 Blatt Zeichnungen

30

35

40

45

50

55

Ausgegeben

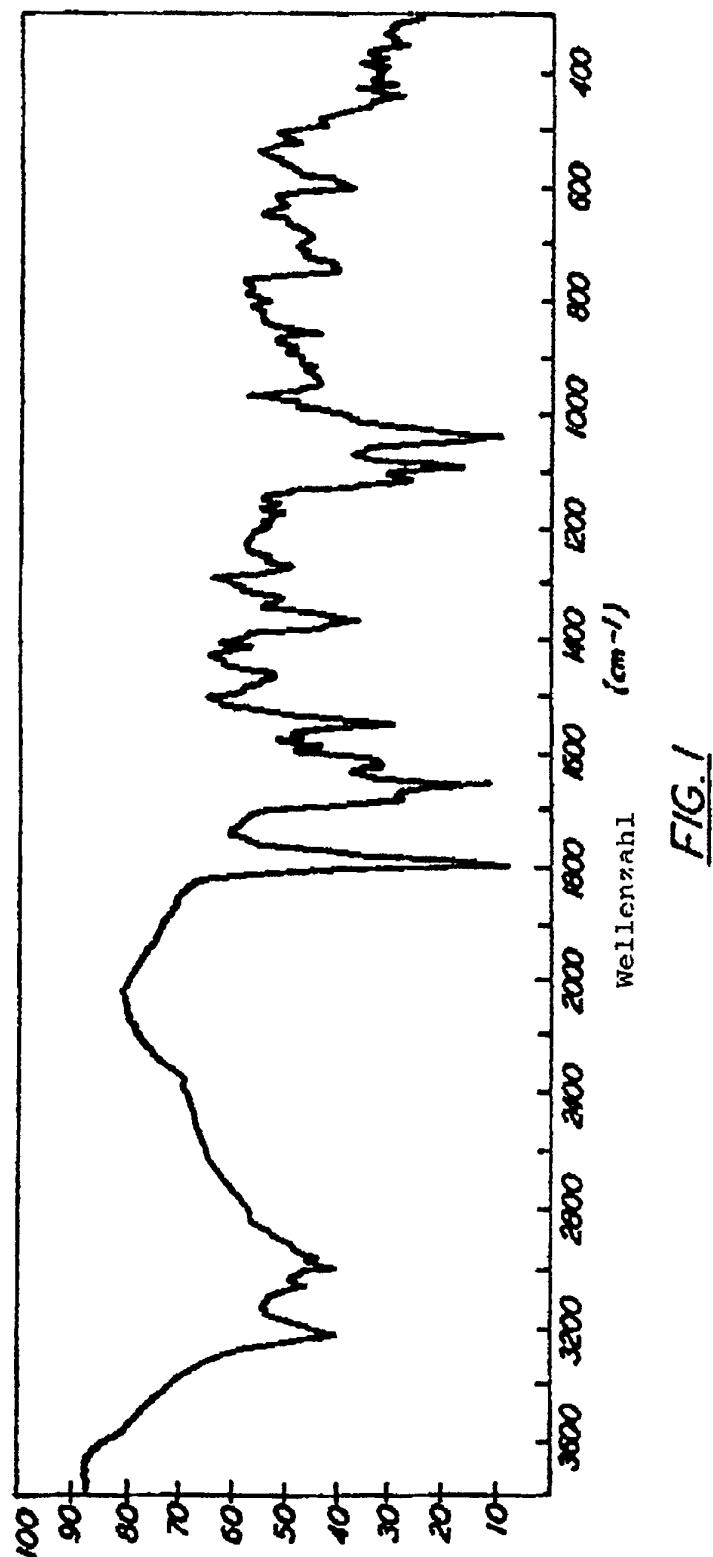
25. 10.1991

Blatt 1

Int. Cl.<sup>5</sup>: A61K 31/545

A61K 47/16

//A61K 9/08



Ausgegeben

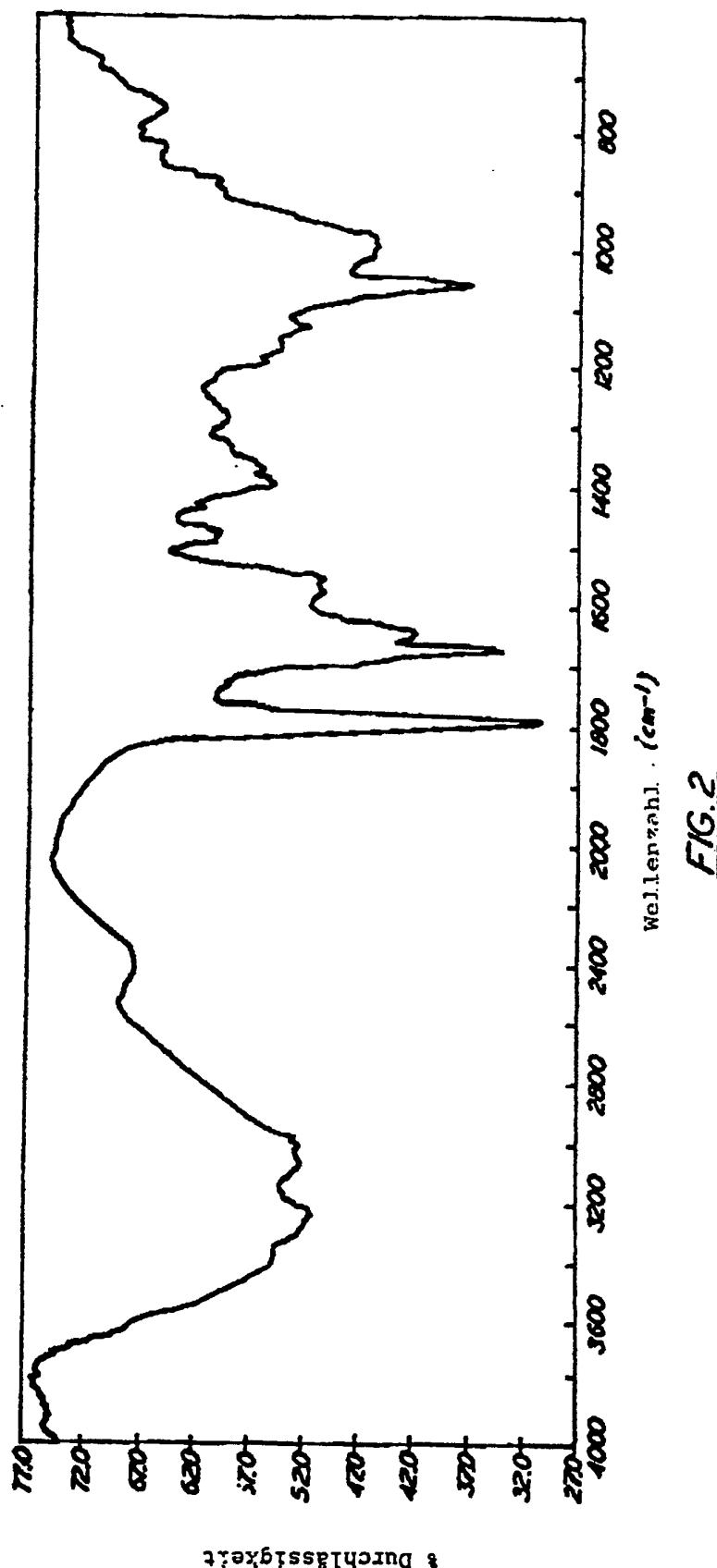
25. 10.1991

Blatt 2

Int. Cl.<sup>5</sup>: A61K 31/545

A61K 47/16

//A61K 9/08



Ausgegeben

25. 10.1991

Blatt 3

Int. Cl.<sup>5</sup>: A61K 31/545

A61K 47/16

//A61K 9/08

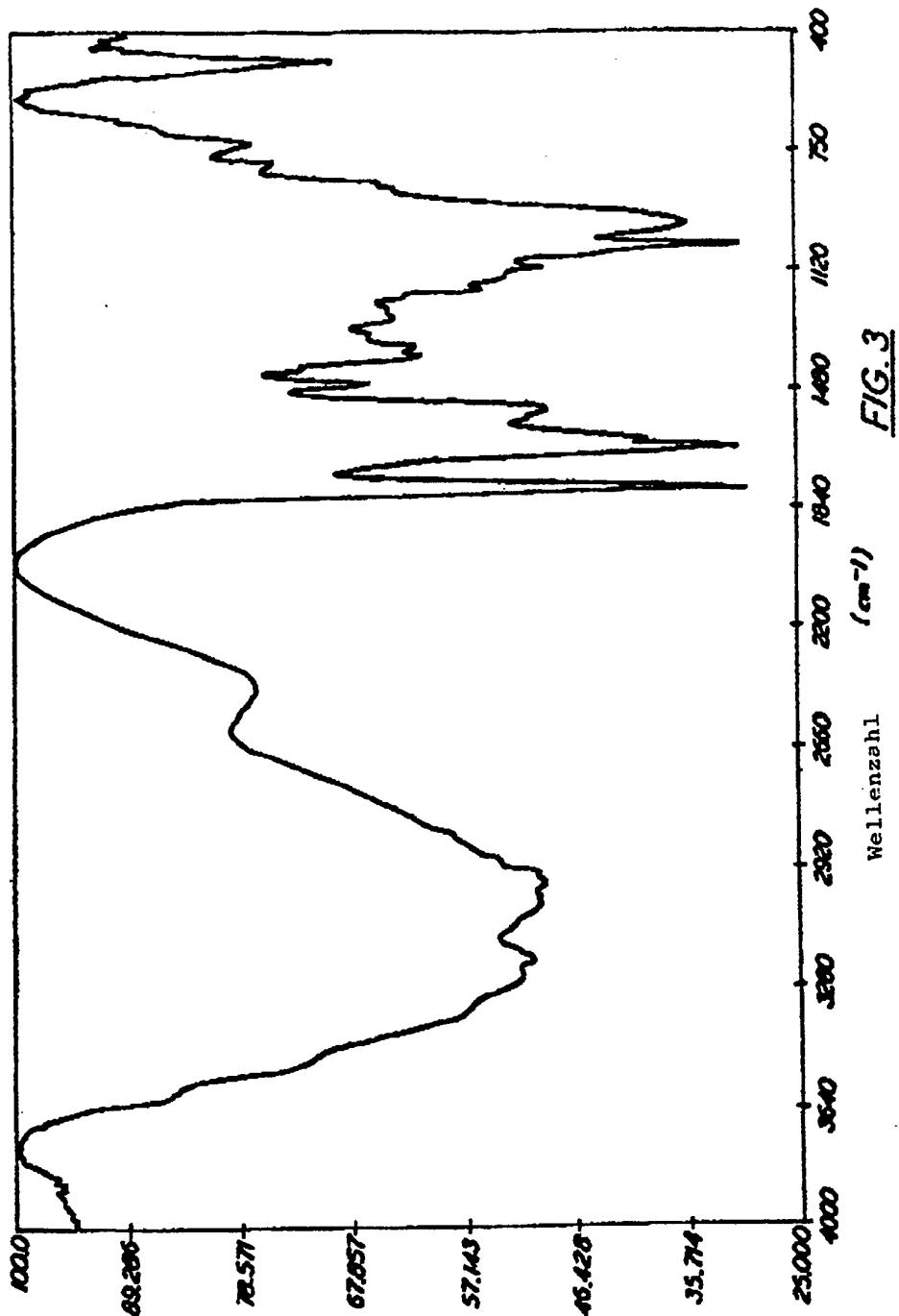


FIG. 3