

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. August 2008 (07.08.2008)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2008/092928 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:

A61K 31/545 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)

A61K 31/155 (2006.01)

Roland [DE/DE]; Rehfelder Strasse 8b, 12527 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2008/051214

(74) Anwälte: **WEHLAN, Helmut** usw.; Wehlan & Wehlan, Patentanwälte, Möllendorffstrasse 49, 10367 Berlin (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:

31. Januar 2008 (31.01.2008)

(81) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

07101519.2 31. Januar 2007 (31.01.2007) EP

(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) **Anmelder** (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **ERNST-MORITZ-ARNDT-UNIVERSITÄT GREIFSWALD** [DE/DE]; Domstrasse 11, 17487 Greifswald (DE).

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder** (nur für US): **JUELICH, Wolf-Dieter** [DE/DE]; Wollweberstrasse 9, 17489 Greifswald (DE). **LINDEQUIST, Ulrike** [DE/DE]; Lise-Meitner-Strasse 6a, 17491 Greifswald (DE). **MIKOLASCH, Annett** [DE/DE]; Clemens-Brentano-Strasse 8, 17489 Greifswald (DE). **WITT, Sabine** [DE/DE]; Arndtstrasse 11, 17489 Greifswald (DE). **SCHAUER, Frieder** [DE/DE]; Seestrasse 2d, 17509 Lubmin (DE). **OHME,**

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(54) **Title:** NOVEL β -LACTAM ANTIBIOTICS, METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF, AND USE THEREOF

(54) **Bezeichnung:** NEUE β -LACTAM-ANTIBIOTIKA, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG

(57) **Abstract:** The invention relates to novel antimicrobial agents that are based on β -lactam derivatives and are produced by reacting previously known β -lactam derivatives with polyphenol oxidase substrates under the influence of free radicals and by forming salts of any β -lactam derivatives with polyhexamethylene biguanide hydrogen carbonate. Said novel compounds are suitable as an antibiotic.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft neue antimikrobielle Wirkstoffe auf der Basis von β -Lactam-Derivaten, hergestellt einerseits durch Umsetzung von bekannten β -Lactam-Derivaten mit Substraten von Polyphenoloxidasen unter dem Einfluss freier Radikaler und andererseits durch Salzbildung beliebiger β -Lactam-Derivate mit Polyhexamethylenbiguanid-Hydrogencarbonat. Die neuen Verbindungen eignen sich als Antibiotikum.

WO 2008/092928 A2

Neue β -Lactam-Antibiotika, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft neue antimikrobielle Wirkstoffe auf der Basis von β -Lactam-Derivaten und deren Verwendung als Antibiotikum.

5

Stand der Technik

[0002] Die β -Lactam-Antibiotika, insbesondere die Cephalosporine, gehören zu den am meisten angewandten Antibiotika. Die Cephalosporine hemmen wie die strukturell eng verwandten Carbacepheme und die Penicilline die Synthese der Bakterienzellwand und wirken nur in der Wachstumsphase der Bakterien bakterizid. Die Antibiotika-Gruppe der Cephalosporine ist intensiv bearbeitet worden. Die klinisch eingesetzten Derivate leiten sich in der Regel vom Grundkörper 7-Aminocephalosporansäure ab, wobei Veränderungen am Grundkörper als R1-Substitution in Position 7, als R2-Substitution in Position 3 sowie bei den Cephamycinen durch eine zusätzliche Methoxygruppe in Position 7 vorgenommen wurden.

10

[0003] Die Cephalosporine und die Carbacepheme bieten bessere Möglichkeiten zur strukturellen Modifikation und Wirkungsoptimierung als die Penicilline, wie die hohe Zahl der synthetisierten Cephalosporin-Derivate beweist (Gräfe U. Biochemie der Antibiotika. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, New York, 1992).

15

[0004] In jeder Gruppe der β -Lactam-Antibiotika gibt es bewährte Substanzen, die aufgrund ihres Wirkungsspektrums und ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften für bestimmte Indikationen zu bevorzugen sind.

20

[0005] Kein einziges β -Lactam-Derivat kann bisher als universell einsetzbar betrachtet werden. Deshalb ist ein vielseitiges Moleküldesign unverzichtbar, um zu für den beabsichtigten Einsatz geeigneten Derivaten zu kommen.

25

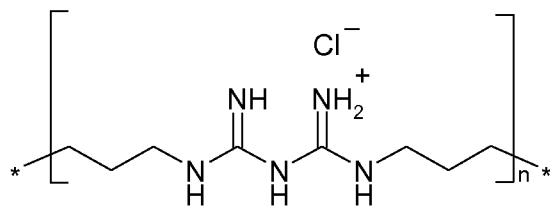
[0006] Aber auch gegenüber diesen zunächst wirksamen Antibiotika haben sich Resistenzen insbesondere bei Staphylokokken (methicillin resistente S.-aureus-Stämme = MRSA) herausgebildet. Der Anteil der resistenten Stämme an den klinischen Isolaten wächst in allen hochindustrialisierten Ländern ständig, in den USA, Japan und China beträgt er z.Z. über 70 %. Hospitalinfektionen mit multiresistenten Staphylokokken sind bei Patienten mit geschwächter Immunantwort zunehmend schwerer beherrschbar. Deshalb ist die Entwicklung

30

von Antibiotika mit Wirksamkeit gegen multiresistente Staphylokokken von großer Bedeutung.

[0007] Eine Veresterung der Carboxylgruppe der Cephalosporine entspricht dem Stand der Technik, z.B.: M. Murakami; M. Hajima; F. Takami; M. Yoshioka (Heterocycles, 1990, 31, 2055-264). Die Veresterung führt u.a. zu besser resorbierbaren Derivaten. Dabei können Enzyme genutzt werden, um eine Umsetzung unter schonenden Bedingungen zu ermöglichen. Lipasen katalysieren die Veresterung mit einer breiten Palette von Substraten (Ching et al., Angew. Chem. 101, 711-724, 1989).

[0008] Poly-hexamethylen-biguanid-Hydrochlorid Formel 1



Formel 1

ist als Microbicid bekannt und unter den Namen *Vantocil IR*, *Polihexanid*, *Lavasept R* oder *PHMB-HCl* in die Praxis der Desinfektion und Antiseptik eingeführt und wird speziell als Wundantiseptikum verwendet, ferner als Adjuvans zur Wundbehandlung bei der chirurgischen Versorgung von akuten und chronischen Knochen- und Weichteilinfektionen. Es handelt sich um ein Polymerengemisch verschiedener Molgewichtsbereiche, dessen Auftrennung bisher nur chromatographisch nachgewiesen, aber präparativ nicht durchgeführt werden konnte. Die bekannten microbiciden Wirkungen beziehen sich daher immer auf das Polymerengemisch und sind nicht optimiert. In der Medizin werden bis jetzt ausschließlich Mischungen aus Polymeren mit einer unterschiedlichen Zahl von Untereinheiten als Hydrochlorid verwendet. Üblich sind Polymere mit 4 bis 7 Einheiten und einem Molekulargewicht von 900 bis 1300 g/mol. Die Gewinnung reiner Polymerfraktionen ist bisher nicht gelungen. Die Reinigung des Polymerengemischs für Zwecke der medizinischen Anwendung ist schwierig und aufwendig.

[0009] Eine Kombination von β -Lactam-Antibiotika und Polyhexamethylen-biguaniden ist bisher nicht bekannt.

[0010] Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass der wichtigste Nachteil der β -Lactam-Antibiotika deren zunehmende Wirkungseinschränkung durch Resistenzbildung der

zu bekämpfenden Bakterien ist. Auch in der Veterinärmedizin werden Infektionen von Nutztieren mit multiresistenten Staphylokokken immer häufiger.

[0011] Durch die zunehmende Resistenzproblematik besteht ein großer Bedarf an neuen antibiotischen Wirkstoffen, der durch die bekannten Wirkstoffe nicht gedeckt wird.

5

Aufgabe der Erfindung

[0012] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, neue Wirkstoffe bereitzustellen. Der Erfindung liegt insbesondere die Aufgabe zugrunde, den durch die zunehmende Resistenzentwicklung von Bakterien gegenüber herkömmlichen Antibiotika bestehenden
10 Bedarf in der Human- und Veterinärmedizin durch struktur- und wirkungsveränderte Antibiotika zu decken, die sich von klinisch bewährten Wirkstoffen ableiten.

Lösung der Aufgabe

[0013] Die Aufgabe wurde gemäß den Merkmalen der Patentansprüche gelöst.
15 Erfindungsgemäß wurden neue, bisher unbekannte Wirkstoffe aus der Gruppe der β -Lactam-Antibiotika, bereitgestellt. Außerdem wurden durch Salzbildung von β -Lactam-Antibiotika mit Kationen, die selbst einen Wirkstoffcharakter haben, sowie durch Weiterentwicklung dieser Wirkstoffe durch anschließende chemische Umsetzungen, neue Verbindungen hergestellt.

20

[0014] In den Formelbildern 4, 7 und 8 sind die neuen erfindungsgemäßen Wirkstoffe abgebildet.

[0015] Gegenstand der Erfindung sind auch Verfahren zur Herstellung der
25 erfindungsgemäßen β -Lactam-Antibiotika, einschließlich von Zwischenprodukten. Zur Lösung der Aufgabe wurden 2 unterschiedliche Wege eingeschlagen, die erfindungsgemäß vorteilhaft kombiniert werden können.

Weg 1:

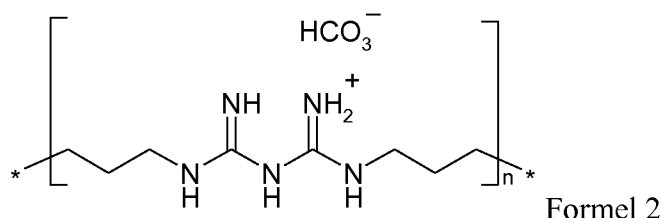
30 [0016] Überraschend erwiesen sich β -Lactam-Antibiotika nach Formelbild 3, die aus einem Derivat der 6-Aminopenicillansäure oder der 7-Aminocephalosporansäure als anionischer Komponente X^- und Derivaten des Polyhexamethylenbiguanids als kationischer Komponenten bestehen, als hoch wirksam. Der erfindungsgemäße Wirkstoff bewirkt bei allen

geprüften multiresistenten Bakterienstämmen eine Hemmung, auch bei den Stämmen bei denen sowohl der kationische Wirkstoff als Hydrochlorid als auch das Anion (d.h. das Antibiotikum ohne kationische Komponente) unwirksam sind.

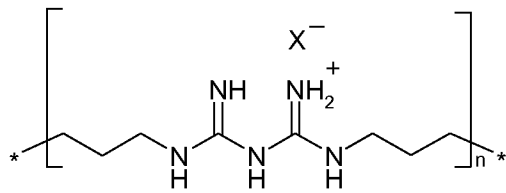
[0017] In mikrobiologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sogar die sehr schwer zu bekämpfenden und in der Klinik oft Probleme bereitenden MRSA-Keime durch die neuen Wirkstoffe inaktiviert werden. Die erfindungsgemäßen Wirkstoffe nach Formel 3 sind deshalb zur antiinfektiven Wundbehandlung akuter und chronischer Wunden einschließlich der Anwendung zur Spül-Saug-Drainage und zur antiinfektiven Lavage von Körperhöhlen geeignet.

[0018] Bei diesen bisher unbekannten Verbindungen nach Formelbild 3 oder 7 werden die hervorragenden microbiciden Eigenschaften der β -Lactam-Antibiotika mit weiteren, für die Praxis hochinteressanten Wirkungen kombiniert. Die Formeln 4 bis 9, sowie die Reaktionsgleichungen 10 und 11 mit den Formeln befinden sich vor den Ausführungsbeispielen. Durch die Kombination mit dem oberflächenaktiven Kation werden Erreger an besonders schwer zugänglichen Stellen erreicht. **In** den erfindungsgemäßen Verbindungen nach Formel 7 stehen hydrophile Guanid- und β -Lactam-Gruppen lipophilen Kohlenwasserstoffketten gegenüber und erklären die tensidischen Eigenschaften der neuen Wirkstoffe. Auf Grund dieser tensidischen Eigenschaften können die erfindungsgemäßen Verbindungen auch in Biofilmen wirken.

[0019] Verbindungen dieses Types sind aus bisher nicht beschriebenen Hydrogencarbonaten des Polyhexamethylenbiguanids nach Formelbild 2 erhältlich. Dabei wird ausgenutzt, dass das Hydrogencarbonat weitaus schwerer in Wasser löslich ist als das handelsübliche Hydrochlorid. Dabei wird zunächst Polyhexamethylenbiguanid-hydrochlorid in wässriger Lösung mit Alkalihydrogencarbonat zu Polyhexamethylenbiguanid-hydrogencarbonat gemäß



der Formel 2 umgesetzt und daraus mit einer Säure ein Polyhexamethylenbiguanid-Derivat gemäß der Formel 3 gebildet:



Formel 3

[0020] Führt man diese Fällung allmählich durch partielle Zugabe von Carbonat oder Hydrogencarbonat aus, fallen die höhermolekularen Fraktionen zuerst aus. Dieses Prinzip führt einerseits zu einem Verfahren zur Trennung von Biguaniden in Molgewichtsbereiche, für das mit dieser Patentschrift ebenfalls Schutz beantragt wird. Die Trennung des Polymerengemisches in Fraktionen verschiedener Molgewichtsbereiche ist für viele Anwendungsbereiche von Vorteil.

[0021] Insbesondere ist dieses Prinzip vorteilhaft nutzbar bei der Herstellung von neuen bisher nicht beschriebenen Derivaten der β -Lactam-Antibiotika. Durch die fraktionierte Ausfällung mit Natriumhydrogencarbonat einerseits und die Substitution der β -Lactame andererseits kann das entstehende Produkt den Erfordernissen verschiedener Anwendungen angepasst werden, insbesondere kann das Verteilungsverhalten systematisch variiert werden. Durch die Substitution der β -Lactame ändert sich das Verteilungsverhalten und damit der logP-Wert. Die Einführung eines parachinoiden Substituenten (logP-Werte $<$ oder $>$ 0) in Antibiotika (logP-Werte $<$ 0) entsprechend den Anwendungsbeispielen ist mit einer Vergrößerung des Verteilungskoeffizienten (logP-Wertes $>$ 0)) verbunden.

[0022] Eine vorteilhafte Anwendung des schwerlöslichen Hydrogencarbonats nach Formelbild 2 und /oder der daraus erhaltenen Salze nach Formelbild 3 mit antimikrobiell wirksamen Fettsäure-Derivaten und/oder β -Lactam-Antibiotika als Anion nach Anspruch ergibt sich bei der antimikrobiellen Ausrüstung des Saugkerns von Wundauflagen. Der besondere Vorteil, der sich bei einer Ausrüstung des Saugkerns mit einer Substanz nach Formelbild 2 in einer Konzentration von 0,01 bis 0,03 % besonders vorteilhaft 0,02% ergibt, ist, dass die Keimtötung auf die Saugauflage beschränkt ist. Dadurch wird trotz antimikrobieller Ausrüstung die Einstufung als Medizinprodukt nicht eingeschränkt.

[0023] Es wird eine vollständige Unterdrückung eines Keimwachstums in und unter der Wundauflage erreicht, auf Grund der Schwerlöslichkeit der bisher nicht beschriebenen Substanz nach Formelbild 2 unterbleibt aber eine Diffusion in die Wunde. Es wurde aber nur ein Hemmhof von $0,93 \pm 0,73\text{mm}$ ($n = 7$) beobachtet, d. h. die Diffusion in Bereiche um die

Wundauflage war minimal. Eine stärkere Diffusion in die Wunde beginnt erst bei Konzentrationen > 0,04 %.

[0024] Damit wird ein Problem gelöst, dass bei unbeschichteten saugfähigen Wundauflagen und bei Wundkompressen mit einem Saugkern auftritt. In den Wundauflagen und insbesondere im Saugkern kommt es zu einer starken Keimvermehrung, die einerseits den Heilungsprozess gefährden und andererseits zu einer Keimverschleppung führen kann.

[0025] Durch Umsetzung des Polyhexamethylenbiguanid-hydrogencarbonats mit Derivaten der 6-Aminopenicillansäure oder der 7-Aminocephalosporansäure werden erfindungsgemäß viele bisher unbekannte Salze des Hexamethylenbiguanids mit antimikrobiell hoch wirksamen Anionen präparativ in einfacher Weise zugänglich. Dabei werden vielfältig einsetzbare antimikrobielle Verbindungen erhalten.

Weg 2:

[0026] Andererseits werden neue β -Lactam-Antibiotika gemäß der allgemeinen 4 oder 8 (Anspruch 1) erhalten, wenn Substrate von Polyphenoloxidasen, insbesondere vorteilhaft Substrate gemäß Formel 6 oder Formel 9, unter dem Einfluss freier Radikale mit β -Lactam-Antibiotika, insbesondere vorteilhaft mit Derivaten gemäß Formel 5 verbunden werden. Die Hydroxygruppen der Substrate der Polyphenoloxidasen können gemäß Formel 6 und Formel 9 *para*- oder *ortho*-ständig angeordnet sein.

[0027] Insbesondere bevorzugt ist für die Synthese der neuen Wirkstoffe die Amination von 2,5-Dihydroxybenzoesäure-Derivaten mit Laccase EC 1-10.3.2. (Klassifizierung gemäß Internationaler Enzym-Nomenklatur; Enzym Nomenclature, academic Press, Inc, 1192, S.24-154), die zu breiten Derivatisationsmöglichkeiten führt.

[0028] Die Amination mit Catecholen ist erfindungsgemäß begrenzt auf Wirkstoffe gemäß Formel 8.

[0029] Die erfindungsgemäßen Wirkstoffe sind dadurch gekennzeichnet, dass die neuen Substituenten die Anwendungseigenschaften verändern, ohne funktionelle Gruppen zu beeinflussen. Die erfindungsgemäßen Wirkstoffe weisen deshalb Vorteile auf wie bislang bekannte β -Lactam-Antibiotika, nämlich hohe bakterizide Wirkung bei geringer Toxizität.

[0030] Die für die erfindungsgemäße Synthese der neuen Wirkstoffe benötigten Radikale können auf biologischem, chemischem und/oder physikalischem Wege erzeugt werden. Besonders bevorzugt werden Radikale, die durch Verwendung von Überständen ligninolytischer Pilze und/oder aus den Überständen isolierter radikalbildender Enzyme

erzeugt werden. Vorzugsweise werden radikalbildende Enzyme der Klassifikation E C 1.10.3.2. und Peroxidasen der Klassifikation EC 1.11.17, Monophenol monooxygenase EC 1.10.3.3 verwendet. Beispielfhaft kann Laccase von *Trametes sp.* für die Synthese der neuen Wirkstoffe eingesetzt werden.

5 **[0031]** Ausgehend von den neuen Wirkstoffen nach Formel 4 und 8 lassen sich weitere neue Antibiotika durch eine aus dem Stand der Technik bekannte Veresterung der Carboxylgruppe erhalten. Dabei können Enzyme genutzt werden (z.B. Lipasen), um eine Umsetzung unter schonenden Bedingungen (niedrige Temperaturen, Normaldruck) zu ermöglichen.

10 **[0032]** Besonders überraschend ist die protektive Wirkung der neuen Wirkstoffe nach Formelbild 4 und 8 im *S. aureus* Sepsis Maus-Modell. Im Überlebensversuch nach i.p. Infektion von Mäusen versterben ohne effektive Behandlung 100% der Tiere. Die zweimalige Applikation der erfindungsgemäßen Wirkstoffe nach 30 min und 6 h führte dagegen zu einer vollständigen Gesundung der Tiere ohne bleibende erkennbare Schädigungen. Ein gleicher
15 Therapieerfolg wird erreicht, wenn das erfindungsgemäße Antibiotikum nach 6 und 20 h verabreicht wird. Durch die erfindungsgemäßen neuen Wirkstoffe werden die Therapiemöglichkeiten bei der Behandlung bakterieller Infektionen erweitert, da auch eine Wirksamkeit gegen multiresistent gewordene Keime nachgewiesen werden konnte.

[0033] Die Wirkstoffe der allgemeinen Formel 3, 4, und 8 können sowohl allein als auch in
20 Kombination mit anderen Wirkstoffen eingesetzt werden.

[0034] Besondere Vorteile werden erreicht, wenn man die neuen Wirkstoffe der allgemeinen Formel 7 verwendet, da in diesem Fall gegen multiresistente Keime sehr wirksame Verbindungen erhalten werden.

25 **[0035]** Darüber hinaus wird durch die Erfindung ein Verfahren zur Reinigung von Polyhexamethylenbiguaniden zur Verfügung gestellt, das dadurch gekennzeichnet ist, dass Polyhexamethylenbiguanid-Hydrochlorid (Formelbild 1) in wässriger Lösung mit Alkalihydrogencarbonat ausgefällt wird, die Fällung von der Mutterlauge getrennt wird und mit Salzsäure in gereinigtes Produkt nach Formelbild 1 zurück überführt wird.

30

[0036] Zur Herstellung weiterer neuer Salze des Polyhexamethylenbiguanids sind praktisch alle anorganischen und organischen Säuren geeignet, deren Säurestärke die des Hydrogencarbonats übertrifft. Damit werden weitere Anwendungen erschlossen.

[0037] Die Anwendung der Wirkstoffe nach Formelbild 3 mit antimikrobiell wirksamen Fettsäure-Derivaten und/oder β -Lactam-Antibiotika als Anion führt zu besonderen Vorteilen bei der lokalen Anwendung. Insbesondere vorteilhaft ist eine Anwendung am Euter zur Mastitisprophylaxe bei Rindern. Durch Verwendung in Zubereitungen für Anwendungen am Euter kann eine Mastitis therapiert und/oder die Übertragung von Staphylokokkeninfektionen verhindert und damit eine Kontamination der Milch vermieden werden.

[0038] Weitere für lokale Anwendungen geeignete Zubereitungen werden erhalten, wenn die neuen β -Lactam-Antibiotika mit Lipiden vermischt und durch Hochdruckspalthomogenisation in Mikro- und Nanopartikel überführt werden.

[0039] Zusammenfassend soll die Erfindung noch einmal kurz dargestellt werden:

[0040] Es wurden β -Lactam-Antibiotika nach Formelbild 3, erhältlich durch Salzbildung aus Derivaten der 6-Aminopenicillansäure oder der 7-Aminocephalosporansäure als anionischer Komponente X und Derivaten des Polyhexamethylenbiguanids als Kation, erstmals bereitgestellt. Außerdem wurden β -Lactam-Antibiotika nach Formelbild 4, erhältlich aus handelsüblichen Wirkstoffen nach Formelbild 5 durch Umsetzung mit Wirkstoffen nach Formelbild 6, hergestellt. Weiterhin sind β -Lactam-Antibiotika nach Formelbild 8, erhältlich aus handelsüblichen Wirkstoffen nach Formelbild 5 durch Umsetzung mit Wirkstoffen nach Formelbild 9, Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

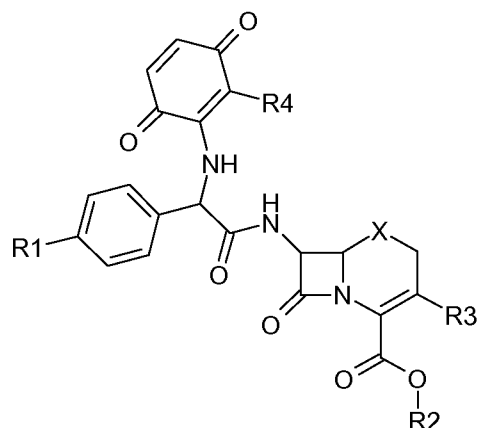
[0041] Es wird ein Verfahren zur Trennung von Polyhexamethylenbiguanid in Molgewichtsbereiche beschrieben, dadurch gekennzeichnet, dass Polyhexamethylenbiguanid-hydrochlorid in wässriger Lösung mit Alkalihydrogencarbonat ausgefällt wird, wobei die Fällung partiell und schrittweise erfolgt und dabei eine Fraktionierung in engere Molgewichtsbereiche des Polymeren erfolgt. Die Wirkstoffe nach Formelbild 3 sind dadurch gekennzeichnet, dass Polyhexamethylenbiguanid-Hydrochlorid in wässriger Lösung mit Alkalihydrogencarbonat zu Polyhexamethylenbiguanid-Hydrogencarbonat fraktioniert gefällt wird und die Fällungsprodukte mit Antibiotika, die in ihrer Säurestärke das Hydrogencarbonat übertreffen, umgesetzt werden. Es ist auch möglich, dass die anionische Komponente eine antimikrobiell wirksame Fettsäure ist. Das Löslichkeits- und Verteilungsverhalten der Wirkstoffe kann durch fraktionierte Fällung der kationischen Komponente variiert werden. Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Reinigung von Poly-

hexamethylenbiguanid, dadurch gekennzeichnet, dass Polyhexamethylenbiguanid-Hydrochlorid (Formelbild 1) in wässriger Lösung mit Alkalihydrogencarbonat ausgefällt, die Fällung von der Mutterlauge getrennt und mit Salzsäure in gereinigtes Produkt nach Formelbild 1 zurück überführt wird. Damit werden neue Salze des Polyhexamethylenbiguanids durch Umsetzung des Polyhexamethylenbiguanidhydrogencarbonats mit anorganischen oder organischen Säuren, erhalten.

[0042] Eine erfindungsgemäße Verwendung ist eine antimikrobiellen Ausrüstung von saugfähigen Wundauflagen, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausrüstung mit einem schwerlöslichen Salz des Hexamethylenbiguanids durch Tauchen und/oder Aufsprühen erfolgt, wobei eine Konzentration eingehalten wird, bei der keine nennenswerte Diffusion des Biguanids in die Wunde erfolgt.

[0043] Die Erfindung soll anhand von Strukturformeln und Beispielen näher erläutert werden, ohne die Erfindung auf diese Beispiele zu reduzieren.

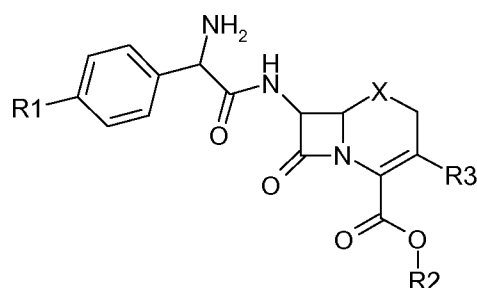
Formel 4:



R1 = H, OH

R2 = H, Na, CH₂OH, CHCH₃OCOOC₂H₅,
CHCH₃OCOOCH(CH₃)₂, CH₂OCOC(CH₃)₃R3 = CH₃, ClR4 = CONHCH₂CH₂OH, CONH₂, COOCH₃,
COOCH₂CH₃, COOH, COCH₃, CHO, CH₃,
CH₂(CH₂)₀₋₂₀CH₃, C(CH₃)₃, C₆H₅, Cl, Br,
OCH₃, O(CH₂)₀₋₂₀CH₃X = S, CH₂

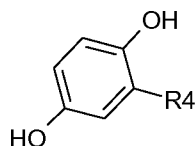
Formel 5:



R1= H, OH

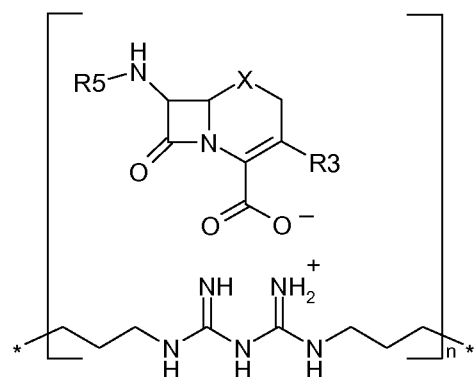
R2= H, Na, CH₂OH, CHCH₃OCOOC₂H₅,
CHCH₃OCOOCH(CH₃)₂, CH₂OCOC(CH₃)₃R3= CH₃, ClX = S, CH₂

Formel 6:

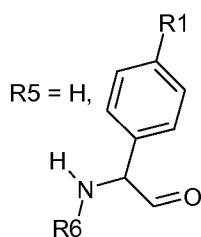


R4 = CONHCH₂CH₂OH, CONH₂, COOCH₃,
COOCH₂CH₃, COOH, COCH₃, CHO, CH₃,
CH₂(CH₂)₀₋₂₀CH₃, C(CH₃)₃, C₆H₅, Cl, Br, OCH₃,
O(CH₂)₀₋₂₀CH₃

Formel 7:



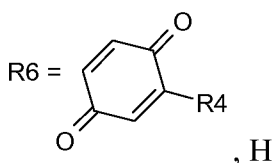
n= vorzugsweise 2-5



R3 = CH₃, Cl

X = S, CH₂

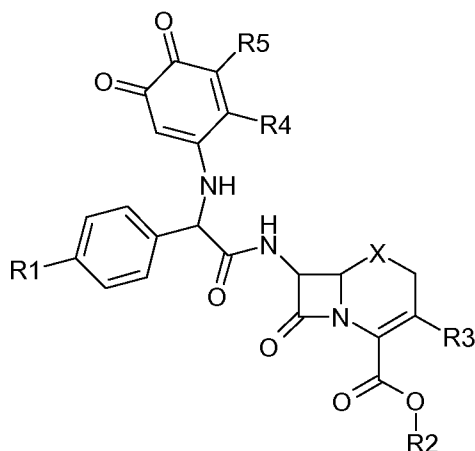
R1 = H, OH



R4 = CONHCH₂CH₂OH, CONH₂, COOCH₃,
COOCH₂CH₃, COOH, COCH₃, CHO, CH₃, CH₂(CH₂)₀₋₂₀
CH₃, C(CH₃)₃, C₆H₅, Cl, Br, OCH₃, O(CH₂)₀₋₂₀CH₃

5

Formel 8:



R1 = H, OH

R2 = H, Na, CH₂OH, CHCH₃OCOOC₂H₅,
CHCH₃OCOOCCH(CH₃)₂, CH₂OCOC(CH₃)₃

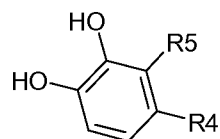
R3 = CH₃, Cl

R4 = CONHCH₂CH₂OH, CONH₂, COOCH₃,
COOCH₂CH₃, COOH, COCH₃, CHO, CH₃,
CH₂(CH₂)₀₋₂₀CH₃, C(CH₃)₃, C₆H₅, Cl, Br,
OCH₃, O(CH₂)₀₋₂₀CH₃

R5 = CONHCH₂CH₂OH, CONH₂, COOCH₃,
COOCH₂CH₃, COOH, COCH₃, CHO, CH₃,
CH₂(CH₂)₀₋₂₀CH₃, C(CH₃)₃, C₆H₅, Cl, Br,
OCH₃, O(CH₂)₀₋₂₀CH₃

X = S, CH₂

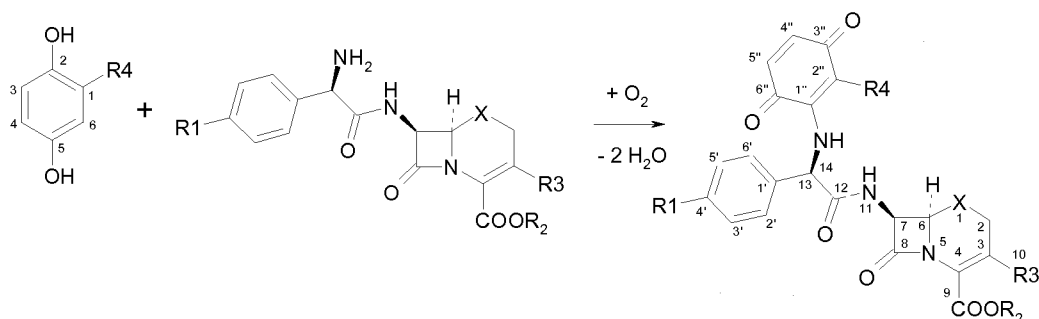
Formel 9:



R4 = CONHCH₂CH₂OH, CONH₂, COOCH₃,
 COOCH₂CH₃, COOH, COCH₃, CHO, CH₃,
 CH₂(CH₂)₀₋₂₀CH₃, C(CH₃)₃, C₆H₅, Cl, Br, OCH₃,
 O(CH₂)₀₋₂₀CH₃

R5 = CONHCH₂CH₂OH, CONH₂, COOCH₃,
 COOCH₂CH₃, COOH, COCH₃, CHO, CH₃,
 CH₂(CH₂)₀₋₂₀CH₃, C(CH₃)₃, C₆H₅, Cl, Br, OCH₃,
 O(CH₂)₀₋₂₀CH₃

Formel 10:



3a - 3d

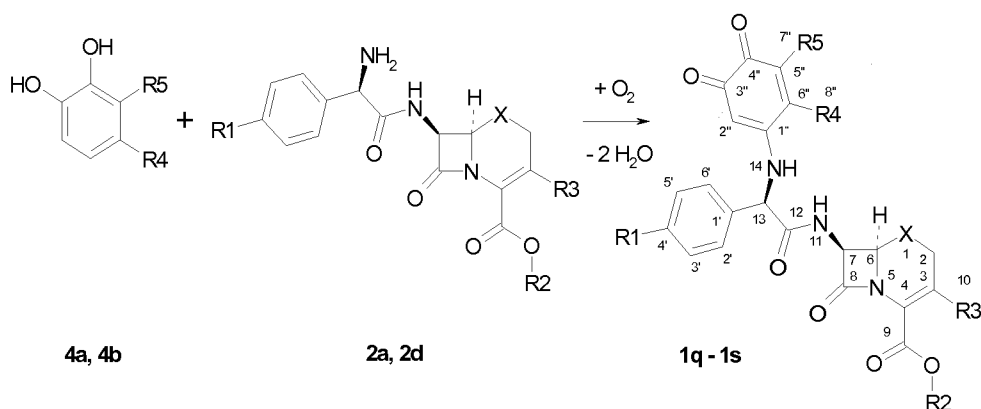
2a - 2d

1a - 1p

5

	R1	R2	R3	R4	X
1a	OH	H	CH ₃		S
1e	H	H	CH ₃	7'' 8'' 9'' 10''	S
1i	H	H	Cl	CO NH CH ₂ CH ₂ OH	S
1m	H	H	Cl		CH ₂
1b	OH	H	CH ₃		S
1f	H	H	CH ₃	7'' 8''	S
1j	H	H	Cl	CO NH ₂	S
1n	H	H	Cl		CH ₂
1c	OH	H	CH ₃		S
1g	H	H	CH ₃	7'' 8''	S
1k	H	H	Cl	COO CH ₃	S
1o	H	H	Cl		CH ₂
1d	OH	H	CH ₃		S
1h	H	H	CH ₃	7'' 8'' 9''	S
1l	H	H	Cl	COO CH ₂ CH ₃	S
1p	H	H	Cl		CH ₂

Formel 11:



	R1	R2	R3	R4	R5	X
1q	OH	H	CH ₃	H	CH ₃	S
1r	OH	H	CH ₃	CH ₃	H	S
1s	H	H	Cl	H	CH ₃	CH ₂

Beispiele5 Allgemeines:

[0044] Der Strukturanalytik und der Testungen auf biologische Aktivität der Beispiele 1-Beispiel 36 liegen die Bezeichnungen der Strukturelemente sowie der Substanzen entsprechend der Formel 10 zugrunde.

10 **Beispiel 1**

7-{2-[2-(2-Hydroxyethylcarbamoyl)-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino]-2-(4-hydroxyphenyl)-acetyl-amino}-desacetoxycephalosporansäure 1a

[0045] Der Wirkstoff wurde durch Umsetzung von Wirkstoffen der allgemeinen Formel 5 (R1 = OH, R2 = H, R3 = CH₃, X = S) mit Stoffen der allgemeinen Formel 6 (R4 = CONHCH₂CH₂OH) erhalten.

Strukturanalytik:

NMR-Spektren wurden bei 300 MHz (¹H) und 75 MHz (¹³C and DEPT-135) in Acetonitril-d₃ aufgenommen. ¹H NMR δ 2.01 (s, 3H, H-10), 3.19 (d, J = 18.3 Hz, 1H, H-2), 3.37 (m, J = 5.7 Hz, 2H, H-9''), 3.43 (d, J = 18.3 Hz, 1H, H-2), 3.57 (t, J = 5.5 Hz, 2H, H-10'), 4.89 (d, J = 4.7 Hz, 1H, H-6), 5.65 (dd, J = 4.7 Hz, J = 8.9 Hz, 1H, H-7), 5.87 (d, J = 6.5 Hz, 1H, H-13), 6.56 (d, J = 10.2 Hz, 1H, H-4''), 6.67 (d, J = 10.1 Hz, 1H, H-5''), 6.82 (d, J = 8.7 Hz, 2H,

H-3', H-5'), 7.39 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.52 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H-11), 9.77 (t, 1H, H-8'), 13.12 (d, 1H, J = 6.2 Hz, H-14). ¹³C NMR δ 19.91 (C-10), 30.34 (C-2), 42.10 (C-9'), 57.97 (C-6), 59.82 (C-7), 61.52 (C-10'), 62.95 (C-13), 101.39 (C-1'), 116.65 (C-3', C-5'), 123.15 (C-4), 129.83 (C-1'), 129.96 (C-2', C-6'), 132.41 (C-3), 133.33 (C-4'), 141.34 (C-5'), 153.46 (C-2'), 158.46 (C-4'), 164.01 (C-8), 165.05 (C-9), 170.12 (C-7'), 171.96 (C-12), 184.60 (C-6'), 185.52 (C-3'). LC/MS *m/z* 557.5 ([M+H]⁺, 597.5 [M+Na]⁺ API-ES pos. mode).

Nachweis der Stabilität

[0046] Der neue Wirkstoff erwies sich über einen Zeitraum > 60 Tage als lagerstabil. Figur 1 zeigt die Lagerstabilität von 7-{2-[2-(2-Hydroxyethylcarbamoyl)-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino]-2-(4-hydroxyphenyl)-acetylamino}-desacetoxycephalosporansäure 1a.

Beispiel 2

7-[2-(2-Carbamoyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino)-2-(4-hydroxyphenyl)-acetylamino]-desacetoxycephalosporansäure 1b

[0047] Der Wirkstoff wurde durch Umsetzung von Wirkstoffen der allgemeinen Formel 5 (R1 = OH, R2 = H, R3 = CH₃, X = S) mit Stoffen der allgemeinen Formel 6 (R4 = CONH₂) erhalten.

Strukturanalytik:

NMR-Spektren wurden bei 300 MHz (¹H) in Acetonitril-d₃ aufgenommen.

¹H NMR δ 2.01 (s, 3H, H-10), 3.15 (d, J = 18.4 Hz, 1H, H-2), 3.44 (d, J = 18.4 Hz, 1H, H-2), 4.89 (d, J = 4.7 Hz, 1H, H-6), 5.65 (dd, J = 4.7 Hz, J = 8.8 Hz, 1H, H-7), 5.89 (d, J = 6.9 Hz, 1H, H-13), 6.58 (d, J = 10.3 Hz, 1H, H-4'), 6.69 (d, J = 10.3 Hz, 1H, H-5'), 6.82 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.30 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.39 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-11), 9.07 (s, 2H, H-8'), 13.13 (d, 1H, J = 6.8 Hz, H-14). LC/MS *m/z* 515.1 ([M+H]⁺, 535.1 [M+Na]⁺ API-ES pos. mode).

Beispiel 3

7-[2-(4-Hydroxyphenyl)-2-(2-methoxycarbonyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino)-acetylamino]-desacetoxycephalosporansäure 1c

[0048] Der Wirkstoff wurde durch Umsetzung von Wirkstoffen der allgemeinen Formel 5 (R1 = OH, R2 = H, R3 = CH₃, X = S) mit Stoffen der allgemeinen Formel 6 (R4 = COOCH₃) erhalten.

5

Strukturanalytik:

NMR-Spektren wurden bei 300 MHz (¹H) in Acetonitril-d₃ aufgenommen.

¹H NMR δ 1.99 (s, 3H, H-10), 3.12 (d, J = 18.1 Hz, 1H, H-2), 3.42 (d, J = 18.1 Hz, 1H, H-2), 3.64 (br s, 3H, H-8''), 4.86 (d, J = 4.6 Hz, 1H, H-6), 5.63 (dd, J = 4.6 Hz, J = 8.8 Hz, 1H, H-7), 5.89 (d, J = 6.9 Hz, 1H, H-13), 6.58 (d, J = 10.0 Hz, 1H, H-4''), 6.67 (d, J = 10.1 Hz, 1H, H-5''), 6.77 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.20 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.52 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-11), 13.17 (d, 1H, J = 6.8 Hz, H-14). LC/MS *m/z* 528.3 ([M+H]⁺, 550.1 [M+Na]⁺ API-ES pos. mode).

15 Beispiel 4

7-[2-(2-Ethoxycarbonyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino)-2-(4-hydroxyphenyl)-acetyl-amino]-desacetoxycephalosporansäure 1d

[0049] Der Wirkstoff wurde durch Umsetzung von Wirkstoffen der allgemeinen Formel 5 (R1 = OH, R2 = H, R3 = CH₃, X = S) mit Stoffen der allgemeinen Formel 6 (R4 = COOCH₂CH₃) erhalten.

20

Strukturanalytik:

NMR-Spektren wurden bei 300 MHz (¹H) in Acetonitril-d₃ aufgenommen.

¹H NMR δ 1.14 (br, 3H, H-9''), 2.01 (s, 3H, H-10), 3.14 (d, J = 18.4 Hz, 1H, H-2), 3.43 (d, J = 18.4 Hz, 1H, H-2), 4.08 (br, 2H, H-8''), 4.87 (d, J = 4.7 Hz, 1H, H-6), 5.66 (dd, J = 4.7 Hz, J = 8.8 Hz, 1H, H-7), 5.89 (d, J = 6.9 Hz, 1H, H-13), 6.58 (d, J = 10.2 Hz, 1H, H-4''), 6.68 (d, J = 10.2 Hz, 1H, H-5''), 6.78 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.20 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.55 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-11), 13.17 (d, 1H, J = 6.7 Hz, H-14). LC/MS *m/z* 543.9 ([M+H]⁺, 564.0 [M+Na]⁺ API-ES pos. mode).

30

Beispiel 5

Antimikrobielle Wirkung der neuen Verbindungen nach Formel 4 *in vitro*

Methoden :**Testsystem I (antimikrobielle Wirkung)**5 Vorkultur:

[0050] Die Testkeime *Escherichia coli* SBUG 1135 und *Bacillus megaterium* SBUG 1152 werden über Nacht (17 Stunden bei 37°C) in 5 ml Nährbouillion II angezogen. Die Inkubation erfolgt in einem Schüttelinkubator (INFORS AG CH 4103, Bottmingen, Schweiz) bei einer Schüttelfrequenz von 180 rpm.

10 [0051] Nach 17 h Inkubationszeit hat *Escherichia coli* eine Zelldichte von ca. $2,4 \times 10^{10}$ Zellen/ml und *Bacillus megaterium* von ca. $2,1 \times 10^8$ Zellen/ml erreicht.

Beimpfung von Nähragar:

15 [0052] Die Einsaat der Bakterien in den Agar wird so gewählt, dass sich nach der Bebrütung dicht stehende, jedoch nicht konfluierende Einzelkolonien entwickeln.

[0053] Folgende Mengen werden eingesetzt:

[0054] *Bacillus megaterium*: 0,1 ml der unverdünnten Übernachtskultur (ÜN) in 10 ml Nähragar entspricht einer Zellzahl von 10^6 .

20 [0055] *Escherichia coli*: die ÜN wird 1:100 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, davon werden 0,1 ml in 10 ml Nähragar überführt. Das entspricht einer Zellzahl von 10^6 .

[0056] Der beimpfte Nähragar wird in sterile Petrischalen gegeben und zum Trocknen einige Minuten stehen gelassen.

Test auf antimikrobielle Wirkung:

25 [0057] Die Prüfsubstanzen werden in abgestuften Mengen (10 µg, 50 µg, 100 µg) auf Wirkstoffträger (sensi-dics) aufgebracht. Die Prüfsubstanzen werden dafür in Methanol oder A. dest., je nach ihrer Löslichkeit, gelöst. Jede beimpfte Platte wird mit 3 Testblättchen bestückt.

30 [0058] Nach einer 20-stündigen Bebrütung bei 37°C können die Hemmhöfe um die einzelnen Testblättchen ausgemessen werden. Der Hemmhofdurchmesser wird in mm angegeben.

Testsystem II (Wirkung gegen multiresistente Keime)

[0059] Die Bakterien werden dazu auf Müller-Hinton-Agar II-Platten kultiviert.

[0060] Mit 1-1,5 ml physiologischer Kochsalzlösung wird eine Bakteriensuspension McFarland 0,5 (das entspricht einer Bakteriendichte von 150×10^6 Keimen) hergestellt. Mit

einem sterilen Glasstab wird dann ein kleiner Tropfen der Bakteriensuspension auf die Müller-Hinton-Agarplatte gegeben und in drei Ebenen (senkrecht, waagrecht und quer) ausgestrichen. Danach werden die sensi-disc mit den neuen halbsynthetischen Prüfsubstanzen aufgelegt. Die bestückten Platten werden für 18-20 Stunden bei 37°C bebrütet. Nach der
5 Inkubation werden die Hemmhofdurchmesser als Maß für die antimikrobielle Aktivität der neuen halbsynthetischen Prüfsubstanzen abgelesen.

Ergebnisse: Die neuen Wirkstoffe wirken stark antimikrobiell (Tabelle 1).

10 **Beispiel 6**

Anpassung der kationischen Komponente der Wirkstoffe nach Formel 2 an biologische Erfordernisse, z.B. antimikrobielle Wirkung durch fraktionierte Fällung

[0061] Durch fraktionierte Fällung von kommerziell erhältlichem Polyhexanid (Fa. Dr.
15 Trippen GmbH, Freiburg) mit Natriumhydrogencarbonat wurde eine Aufspaltung der Polymermischung in einzelne Fraktionen erreicht, die sich in ihrer Löslichkeit und in ihrem Verteilungsverhalten Lipid-Wasser deutlich von einander unterscheiden.

Methode entsprechend der Erfindung

20 [0062] Antimikrobielle Wirksamkeit von Wirkstoffen der allgemeinen Formel 2 bei der das Anion Amoxicillin darstellt.

Methoden vgl. Beispiel 5

25 **Ergebnisse:** Der neue Wirkstoff übertrifft die Wirksamkeit des Handelsproduktes Lavasept® (Desomed AG) beträchtlich (Tabelle 2).

Tab. 1 Antimikrobielle Wirkung der neuen Wirkstoffe 1a bis 1d und 2a.

Stamm	Stoffmenge n [μmol]														
	2a			1a			1b			1c			1d		
	0.019	0.1	0,19	0.019	0.1	0.19	0.019	0.1	0.19	0.019	0.1	0.19	0.029	0.14	0.29
<i>Bacillus megaterium</i> SBUG 1152	36 ¹	38	40	22	30	32	22	30	32	22	30	32	18	30	34
<i>B. subtilis</i> AWD 166	36	38	40	24	30	32	22	30	32	22	30	32	22	30	34
<i>Escherichia coli</i> SBUG 1135	18	22	26	r ²	14	16	r	14	18	r	14	18	r	12	16
<i>Enterococcus faecalis</i> 769	r	10	14	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
<i>E. faecalis</i> 945	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
<i>Staphylococcus aureus</i> 315	r	r	8	r	10	16	r	r	8	r	r	12	r	r	8
<i>S. aureus</i> 33490	16	24	28	r	14	18	r	14	20	r	14	20	r	14	16
<i>S. aureus</i> 34289	r	r	r	r	r	r	r	r	12	r	r	r	r	r	r
<i>S. aureus</i> 36881	r	14	18	r	10	16	r	12	18	r	r	14	r	14	18
<i>S. aureus</i> 38418	30	34	38	14	24	26	16	24	26	10	22	28	10	20	24
<i>S. aureus</i> 39105	16	24	26	r	r	14	r	12	18	r	r	12	r	r	14
<i>S. aureus</i> 520	r	r	8	r	r	12	r	r	r	r	r	r	r	r	r
<i>S. aureus</i> 526	r	r	r	r	r	10	r	r	12	r	r	r	r	r	r
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	32	38	40	20	28	30	16	24	28	18	26	30	14	22	26
<i>S. aureus</i> Nor-deutscher Stamm	r	r	10	r	16	18	r	8	12	r	10	14	r	10	12
<i>S. epidermidis</i> 1068	20	24	26	r	10	16	r	16	20	r	14	20	r	12	14
<i>S. epidermidis</i> 1071	22	28	30	r	18	20	r	18	22	r	14	20	r	14	18
<i>S. epidermidis</i> 125	26	36	40	14	24	28	14	22	26	12	24	28	10	20	24
<i>S. epidermidis</i> 563	24	28	32	r	10	16	r	14	20	r	14	20	r	12	18
<i>S. epidermidis</i> 847	12	26	30	r	16	20	r	10	12	r	14	18	r	10	14

¹ Hemmhofdurchmesser in mm² r = resistent (kein nachweisbarer Hemmhof)5 **Tab. 2**

Antimikrobielle Wirkung von Verbindungen nach Formel 2 mit X⁻ = Amoxicillinanion gegen multiresistente Bakterien im Vergleich zu Lavasept (Stoffmenge 0,09 μmol)

Testkeim	Hemmhofdurchmesser	
	Lavasept	Polyhexamethylenbiguanidkation + Amoxicillinanion

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	12 mm ¹	44 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> 33490	10 mm	34 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> 36881	10 mm	20 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> 38418	10 mm	40 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> 520	r	14 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> 315	r	18 mm
<i>Staphylococcus aureus col.</i>	12 mm	34 mm
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 125	10 mm	32 mm
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 847	10 mm	32 mm
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 535	10 mm	16 mm
<i>Enterococcus faecalis</i> 769	r	36 mm

¹ Hemmhofdurchmesser in mm, ² r = resistent (kein nachweisbarer Hemmhof)

Tab. 3

Antimikrobielle Wirkung von Verbindungen nach Formel 3 mit $X^- = 6\text{-}\{2\text{-}[2\text{-}(2\text{-hydroxyethylcarbamoyl})\text{-}3,6\text{-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino}]\text{-}2\text{-}(4\text{-hydroxyphenyl})\text{-acetylamino}\}\text{-penicillanat}$ gegen multiresistente Bakterien im Vergleich zu $6\text{-}\{2\text{-}[2\text{-}(2\text{-hydroxyethylcarbamoyl})\text{-}3,6\text{-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino}]\text{-}2\text{-}(4\text{-hydroxyphenyl})\text{-acetylamino}\}\text{-penicillansäure}$ (Stoffmenge 0,09 μmol)

Testkeim	Hemmhofdurchmesser		
	Lava-sept	6- $\{2\text{-}[2\text{-}(2\text{-hydroxyethylcarbamoyl})\text{-}3,6\text{-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino}]\text{-}2\text{-}(4\text{-hydroxyphenyl})\text{-acetylamino}\}\text{-penicillansäure}$	Wirkstoff nach Formel 2 mit $X^- = 6\text{-}\{2\text{-}[2\text{-}(2\text{-hydroxyethylcarbamoyl})\text{-}3,6\text{-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino}]\text{-}2\text{-}(4\text{-hydroxyphenyl})\text{-acetylamino}\}\text{-penicillanat}$
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	12 mm ¹	44 mm	42 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> 33490	10 mm	18 mm	34 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> 36881	10 mm	r ²	18 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> 38418	10 mm	34 mm	40 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> 520	r	r	14 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> 315	r	r	18 mm
<i>Staphylococcus aureus col.</i>	12 mm	32 mm	30 mm
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 125	10 mm	28 mm	30 mm
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 847	10 mm	24 mm	28 mm
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 535	10 mm	r	14 mm
<i>Enterococcus faecalis</i> 769	r	28 mm	34 mm

¹ r = resistent (kein nachweisbarer Hemmhof)

[0063] Der neue Wirkstoff bewirkt bei allen geprüften multiresistenten Bakterienstämmen eine Hemmung, auch bei den Stämmen bei denen sowohl das Kation als auch das Antibiotikum ohne kationische Komponente unwirksam sind (Tabelle 3).

5

Beispiel 7

Herstellung von neuen Cephalosporinen durch Salzbildung mit Kationen, die selbst einen Wirkstoffcharakter haben

10

[0064] Die Fraktionen nach Beispiel 6 wurden mit 7-Aminocephalosporinsäure sowie mit Wirkstoffen nach Formel 4 ($R_1 = OH$, $R_2 = H$, $R_3 = CH_3$, $R_4 = CONHCH_2CH_2OH$, $X = S$) und mit Wirkstoffen nach Formel 5 ($R_1 = OH$, $R_2 = H$, $R_3 = CH_3$, $X = S$) umgesetzt. Dabei wurden stark antimikrobiell wirkende Produkte erhalten.

15

Beispiel 8

Antimikrobielle Wirkung *in vitro* der Stoffe nach Formel 7 (Beispiel 7)

20

Methode

[0065] Es wurde ein Reihenverdünnungstest durchgeführt. Die Konzentration in Gewichts-Prozent, die eine absolute Wachstumshemmung bewirkt (Minimale Hemmkonzentration, MHK), wurde bestimmt.

25

Ergebnisse

Die Wirkstoffe nach Formel 7 sind gegen ein breites Keimspektrum wirksam (Tab. 4).

Tab. 4 MHK von Wirkstoffen der allgemeinen Formel 7 in $\mu\text{mol/l}$

	<i>Staphylococcus aureus</i> SBUG 11	<i>Bacillus subtilis</i> SBUG 14s	<i>Proteus mirabilis</i> SBUG 47	<i>E. coli</i> SBUG 17	<i>Serratia marcescens</i> SBUG 9
Wirkstoff nach Formel 7	0,06	0,06	0,12	0,5	0,5

Beispiel 9

5 **Nachweis der antimikrobiellen Wirkung der Verbindungen nach Beispiel 6 bei lokaler Anwendung**

Methode

[0066] Der Nachweis erfolgte am Modell „Mäuseohr-Test“:

- 10 [0067] Nach Tötung der Tiere werden die Mäuseohren abgeschnitten und in eine spezielle Haltevorrichtung eingespannt. Die Kontamination der Ohren erfolgt mit 5 μl einer 1:10 verdünnten Suspension des MRSA-Stammes „Norddeutscher Epidemie Stamm“ mit einer optischen Dichte entsprechend dem McFarlandstandard 0,5. Nach einer Bebrütung von 1,5 h bei 30°C erfolgt bei der Hälfte der Ohren die Behandlung mit den erfindungsgemäßen
- 15 Wirkstoffen nach Beispiel 6, die andere Hälfte bleibt unbehandelt. Die Auswertung der wachsenden Bakterienkolonien erfolgt nach 24 h Bebrütung bei 37°C.

Ergebnisse

- [0068] Bei den unbehandelten Ohren wurden Keimzahlen zwischen 1.000 und 10.000
- 20 beobachtet. Dagegen war bei den untersuchten Wirkstoffen nach Beispiel 6 das Keimwachstum vollständig gehemmt.

Beispiel 10

25 **Einarbeitung der Wirkstoffe in Lipide und Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln**

Methode

Rezeptur

Erfindungsgemäßer Wirkstoff	Menge in g
Wirkstoff nach Beispiel 1	0,1
Lipidmischung	10,00
Emulgator (Plantacare 2000)	0,1
Demineralisiertes Wasser	ad 100,00

[0069] Die Lipide werden auf eine Temperatur von 50°C erwärmt und anschließend der verwendete Wirkstoff nach Beispiel 1 darin dispergiert. Davon getrennt wird eine wässrige Emulgatorlösung auf die entsprechende Temperatur (50°C) erwärmt. Danach werden beide Phasen bei der gewünschten Homogenisierungstemperatur vereint. Anschließend wird das Gemisch mit Hilfe eines Ultra Turax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet.

[0070] Die Suspension wird danach mit einem Kolbenspalt-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV-Gaulin, Lübeck) bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 50°C viermal homogenisiert. Die entstehende Formulierung wurde wie im Beispiel 9 beschrieben auf antimikrobielle Wirksamkeit bei Einsatz auf der Haut geprüft.

Ergebnis

[0071] Auf der behandelten Haut wurde das Keimwachstum vollständig gehemmt.

Beispiel 11

Antimikrobielle Wirksamkeit *in vivo* der neuen Stoffe nach Formel 4 (Beispiel 1 - Beispiel 4)

Methode zur Wirksamkeit *in vivo* mit dem Modell *Staphylococcus aureus* infizierte Maus

Vorbehandlung der Mäuse:

[0072] Am Tag 0 werden mindestens 3 BALB/c Mäuse pro Testsubstanz (Tab. 8) bzw. Kontrollen mit Cyclophosphamid (250mg/kg) in 250 µl PBS *inta peritoneal* (i.p.) vorbehandelt.

[0073] Am Tag 2 erhalten die Tiere nochmals 100 mg/kg i.p.

Bakterienvorkultur:

[0074] Am Tag 2 wird eine Kolonie des Testkeims von einer bewachsenen Agarplatte (Müller-Hinton-Agar, Beckton Dickinson) in ein Kölbchen mit 10 ml CASO Bouillon (CASO-B., Sojapepton-Caseinpepton-Bouillon, SIFIN, 30 g/l) überführt und über Nacht bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 250U/min kultiviert.

[0075] Am Tag 3 wird die Vorkultur (Vk) 1:50 mit CASO-B. verdünnt und ca. 2 Stunden weiterkultiviert bis eine Extinktion im Medium von 0,6 bei einer Wellenlänge von 550 nm erreicht ist. Dann wird 1x mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen und erneut auf eine Extinktion von 0,6 eingestellt.

Infektion:

[0076] Mindestens 3 Tiere für eine Testsubstanz bzw. Kontrollen werden mit 10 µl/g Körpergewicht gewaschenen Keimen einer Bakteriensuspension mit der Extinktion 0,6 (ca. 10^{10} - 10^{12} CFU, Colony forming units) i.p. infiziert.

Testsubstanzen:

Variante 1:

[0077] Nach ca. 30 Minuten wird den Mäusen Antibiotikumlösung in einem Volumen von 200 µl PBS mit 3% DMSO i.p. injiziert. 6 Stunden später erfolgt die zweite Antibiotikuminjektion in der gleichen Konzentration.

Variante 2:

[0078] Nach 6 und 20 Std wird den Mäusen Antibiotikumlösung in einem Volumen von 200 µl PBS mit 3% DMSO i.p. injiziert.

Ergebnis

[0079] Im Infektionsmodell „mit *Staphylococcus aureus* infizierte Maus“ sterben die Tiere ohne wirksame Behandlung zu 100 %. Nach Therapie mit dem erfindungsgemäßen Wirkstoff nach Formel 4 überleben alle Tiere (Tabelle 5).

Tab. 5

Effektivität von *in vitro* aktiven Wirkstoffen im Infektionsmodell „mit *Staphylococcus aureus* infizierte Maus“

Erfindungsgemäßer Wirkstoff	getestete Konzentrationen	Überleben/ getestete Mäuse n/n	Überleben/ Kontrollen n/n
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538		
2a	2 x 0.5 mg (25 mg/kg)	10/10	0/10 ⁵
1a	2 x 0.5 mg (25 mg/kg)	9/9	0/13
1b	2 x 1.0 mg (50 mg/kg)	6/6	0/10
1d	2 x 0.5 mg (25 mg/kg)	4/6	2/10 ¹⁰

Beispiel 12

- 15 **Gezielte Erhöhung der Lipophilie des handelsüblichen Antibiotikums Cefadroxil (Formel 5, R1 = OH, R2 = H, R3 = CH₃, X = S) durch radikalvermittelte Einführung neuer Substituenten**

20 **[0080]** Um eine ausreichende Fixierung auf einer lipophilen Oberfläche zu erreichen, sollte die Lipophilie des handelsüblichen Antibiotikums Cefadroxil (Formel 5, R1 = OH, R2 = H, R3 = CH₃, X = S) durch radikalvermittelte Einführung paradihydroxylierter Substituenten gezielt erhöht werden. Zunächst wurde das Verteilungsverhalten von Cefadroxil zwischen einer wässrigen und einer lipophilen Phase nach folgender Methode bestimmt.

25 **Methode**

[0081] Bestimmung des Verteilungsverhaltens durch Ermittlung des logP-Wertes nach der Methode von Donovan et al., (Journal of Chromatography A, 952, 2002, 47-61) mittels HPLC.

30 Chromatographie-Bedingungen:

- Betriebstemperatur 18-24 °C
- Fluss 1,5 mL/min
- Linearer Gradient (Methanol / 0,1% Phosphorsäure pH 2) von 10% auf 100% Methanol in 9,4 min, Equilibrierzeit zwischen 2 Läufen 6 min

35

Probenbereitung:

[0082] Zu 0,5 ml einer Standardlösung (440 mg Methylphenylsulfon und 380 µL Toluol in 150 mL Methanol) werden ca. 0,5 mg des Analyten gegeben. 2 µL dieser Probenlösung werden injiziert.

Berechnung:

- 5 [0083] Da die Verteilungskoeffizienten der beiden Standards, die bei jedem Versuch mitlaufen, bekannt sind, lässt sich der Verteilungskoeffizient des Analyten aus den Verhältnissen der Retentionszeiten Analyt/Standard ermitteln.

Ergebnis:

- 10 [0084] Der bestimmte logP-Wert des handelsüblichen Antibiotikums Cefadroxil (Formel 5, R1 = OH, R2 = H, R3 = CH₃, X = S) beträgt -3,50. Um eine ausreichende Bindung an eine lipophile tragende Matrix zu erreichen, sollte die Lipophilie gezielt erhöht werden.

- [0085] Die Aufgabe wurde erfindungsgemäß durch radikalvermittelte Umsetzungen entsprechend dem Beispiel 1 mit 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)benzamid (logP-Wert = -1,21; Formel 6, R4 = CONHCH₂CH₂OH), entsprechend dem Beispiel 2 mit 2,5-Dihydroxybenzamid (logP-Wert = -0,4; Formel 6, R4 = CONH₂), und entsprechend dem
15 Beispiel 4 mit 2,5-Dihydroxybenzoesäureethylester (logP-Wert = 2,65; Formel 6, R4 = COOCH₂CH₃) gelöst.

- [0086] Es wurden Antibiotika mit deutlich höherer Lipophilie (Tabelle 6) bei Erhaltung der
20 antimikrobiellen Aktivität (Tabelle 1) gewonnen.

Tab. 6

logP-Werte

Erfindungsgemäßer Wirkstoff	logP-Wert
1a	1,00
1b	1,33
1d	1,76

25 **Beispiel 13**

7-{2-[2-(2-Hydroxyethylcarbamoyl)-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino]-2-phenyl-acetyl-amino}-desacetoxycephalosporansäure **1e**

[0087] Der Wirkstoff wurde durch Umsetzung von Wirkstoffen der allgemeinen Formel 5 ($R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = CH_3$, $X = S$) mit Stoffen der allgemeinen Formel 6 ($R_4 = CONHCH_2CH_2OH$) erhalten.

Strukturanalytik

5 NMR-Spektren wurden bei 300 MHz (1H) und 75 MHz (^{13}C and DEPT-135) in Acetonitril- d_3 aufgenommen. 1H NMR δ 2.01 (s, 3H, H-10), 3.15 (d, $J = 18.4$ Hz, 1H, H-2), 3.37 (m, $J = 5.7$ Hz, 2H, H-9'), 3.44 (d, $J = 18.4$ Hz, 1H, H-2), 3.57 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, H-10'), 4.90 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-6), 5.69 (dd, $J = 4.6$ Hz, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-7), 6.00 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, H-13), 6.59 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H, H-4'), 6.71 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, H-5'), 7.46 (m, 6H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6', H-11), 9.79 (t, 1H, H-8'), 13.29 (d, 1H, $J = 6.2$ Hz, H-14). ^{13}C NMR δ 19.93 (C-10), 30.35 (C-2), 42.10 (C-9'), 57.95 (C-6), 59.81 (C-7), 61.50 (C-10'), 63.15 (C-13), 101.42 (C-1'), 123.15 (C-4), 128.41 (C-2', C-6'), 129.84 (C-4'), 130.09 (C-3', C-5'), 132.41 (C-3), 133.33 (C-4'), 138.36 (C-1'), 141.34 (C-5'), 153.39 (C-2'), 161.46 (C-8), 165.01 (C-9), 170.12 (C-7'), 171.96 (C-12), 184.60 (C-6'), 185.52 (C-3'). LC/MS m/z 543.1 ($[M+H]^+$, 563.0 $[M+Na]^+$ API-ES pos. mode).

Beispiel 14

7-[2-(2-Carbamoyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino)-2-phenyl-acetylamino]-desacetoxycephalosporansäure 1f

[0088] Der Wirkstoff wurde durch Umsetzung von Wirkstoffen der allgemeinen Formel 5 ($R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = CH_3$, $X = S$) mit Stoffen der allgemeinen Formel 6 ($R_4 = CONH_2$) erhalten.

Strukturanalytik

NMR-Spektren wurden bei 300 MHz (1H) in Acetonitril- d_3 aufgenommen.

1H NMR δ 2.02 (s, 3H, H-10), 3.15 (d, $J = 18.4$ Hz, 1H, H-2), 3.44 (d, $J = 18.4$ Hz, 1H, H-2), 4.90 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, H-6), 5.69 (dd, $J = 4.5$ Hz, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-7), 6.00 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-13), 6.59 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H, H-4'), 6.71 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H, H-5'), 7.46 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 7.59 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-11), 9.09 (s, 2H, H-8'), 13.29 (d, 1H, $J = 6.7$ Hz, H-14). LC/MS m/z 497.0 ($[M+H]^+$, 519.0 $[M+Na]^+$ API-ES pos. mode).

Beispiel 15**7-[2-(2-Methoxycarbonyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino)-2-phenyl-acetylamino]-desacetoxycephalosporansäure 1g**

[0089] Der Wirkstoff wurde durch Umsetzung von Wirkstoffen der allgemeinen Formel 5 ($R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = CH_3$, $X = S$) mit Stoffen der allgemeinen Formel 6 ($R_4 = COOCH_3$) erhalten.

Strukturanalytik

NMR-Spektren wurden bei 300 MHz (1H) in Acetonitril- d_3 aufgenommen.

1H NMR δ 2.01 (s, 3H, H-10), 3.14 (d, $J = 18.2$ Hz, 1H, H-2), 3.43 (d, $J = 18.2$ Hz, 1H, H-2), 3.65 (br s, 3H, H-8''), 4.88 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, H-6), 5.65 (dd, $J = 4.6$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-7), 5.92 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, H-13), 6.57 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H, H-4''), 6.69 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, H-5''), 7.47 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 7.52 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-11), 13.18 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz, H-14). LC/MS m/z 510.0 ($[M-H]^-$ API-ES neg. mode), 534.0 ($[M+Na]^+$ API-ES pos. mode).

Beispiel 16**7-[2-(2-Ethoxycarbonyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino)-2-phenyl-acetylamino]-desacetoxycephalosporansäure 1h**

[0090] Der Wirkstoff wurde durch Umsetzung von Wirkstoffen der allgemeinen Formel 5 ($R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = CH_3$, $X = S$) mit Stoffen der allgemeinen Formel 6 ($R_4 = COOCH_2CH_3$) erhalten.

Strukturanalytik

NMR-Spektren wurden bei 300 MHz (1H) in Acetonitril- d_3 aufgenommen.

1H NMR δ 1.12 (br, 3H, H-9''), 2.01 (s, 3H, H-10), 3.12 (d, $J = 18.2$ Hz, 1H, H-2), 3.40 (d, $J = 18.2$ Hz, 1H, H-2), 3.99 (br, 2H, H-8''), 4.86 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-6), 5.67 (dd, $J = 4.6$ Hz, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-7), 6.19 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-13), 6.58 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, H-4''), 6.68 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H, H-5''), 7.37 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 7.46 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-11). LC/MS m/z 426.3 ($[M+H]^+$), 548.1 ($[M+Na]^+$ API-ES pos. mode).

Beispiel 17

Antimikrobielle Wirkung der neuen Verbindungen nach Formel 4 (Beispiel 13 - Beispiel 16) *in vitro*

5

Methoden vgl Beispiel 5

Ergebnisse:

[0091] Die neuen Wirkstoffe wirken stark antimikrobiell (Tabelle 7).

10

Beispiel 18

Herstellung von neuen Cephalosporinen durch Salzbildung mit Kationen, die selbst einen Wirkstoffcharakter haben

15

[0092] Die Fraktionen nach Beispiel 6 wurden mit 7-Aminocephalosporinsäure sowie mit Wirkstoffen nach Formel 4 ($R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = CH_3$, $R_4 = CONHCH_2CH_2OH$, $X = S$) und mit Wirkstoffen nach Formel 5 ($R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = CH_3$, $X = S$) umgesetzt. Dabei wurden stark antimikrobiell wirkende Produkte erhalten.

20

Beispiel 19

Antimikrobielle Wirksamkeit *in vivo* der neuen Stoffe nach Formel 4 (Beispiel 13, Beispiel 14)

25 **Methoden** vgl. Beispiel 11

Ergebnis

[0093] Im Infektionsmodell „mit *Staphylococcus aureus* infizierte Maus“ sterben die Tiere ohne wirksame Behandlung zu 100 %. Nach Therapie mit dem erfindungsgemäßen Wirkstoff nach Formel 3 überleben alle Tiere (Tabelle 8).

Tab. 7 Antimikrobielle Wirkung der neuen Wirkstoffe **1e** bis **1h** und **2b**.

Stamm	Stoffmenge n [μ mol]														
	2b			1e			1f			1g			1h		
	0.019	0.1	0.19	0.029	0.14	0.29	0.02	0.1	0.2	0.029	0.14	0.29	0.019	0.09	0.19
<i>Bacillus megaterium</i> SBUG 1152	32 ¹	38	40	20	28	32	20	30	32	20	30	34	18	28	32
<i>B. subtilis</i> AWD 166	30	36	38	22	30	32	24	30	32	24	30	32	22	30	32
<i>Escherichia coli</i> SBUG 1135	20	26	30	r ²	16	18	r	14	18	r	16	22	r	14	18
<i>Enterococcus faecalis</i> 769	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
<i>E. faecalis</i> 945	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
<i>Staphylococcus aureus</i> 315	r	10	14	r	r	12	r	r	10	r	r	12	r	r	10
<i>S. aureus</i> 33490	20	26	30	8	16	20	r	14	16	r	20	24	r	16	20
<i>S. aureus</i> 34289	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
<i>S. aureus</i> 36881	r	20	24	r	r	14	r	r	14	r	r	12	r	r	12
<i>S. aureus</i> 38418	26	36	38	14	26	30	14	24	30	16	26	30	12	22	28
<i>S. aureus</i> 39105	14	24	28	r	r	14	r	r	12	r	10	18	r	8	14
<i>S. aureus</i> 520	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
<i>S. aureus</i> 526	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	30	36	40	20	30	32	20	30	34	20	28	32	20	28	30
<i>S. aureus</i> Nordeutscher Stamm	r	8	12	r	10	16	r	r	10	r	10	14	r	8	12
<i>S. epidermidis</i> 1068	16	24	28	r	14	16	r	12	16	r	14	18	r	10	16
<i>S. epidermidis</i> 1071	22	28	30	10	18	20	8	16	18	r	18	22	r	14	20
<i>S. epidermidis</i> 125	24	34	38	r	24	28	10	22	28	14	24	28	12	24	28
<i>S. epidermidis</i> 563	26	32	34	r	18	24	r	18	24	r	8	14	r	14	18
<i>S. epidermidis</i> 847	20	28	30	r	16	20	r	16	20	r	14	18	r	12	18

¹ Hemmhofdurchmesser in mm; ² r = resistent (kein nachweisbarer Hemmhof)

Tab. 8

Effektivität von *in vitro* aktiven Wirkstoffen im Infektionsmodell „mit *Staphylococcus aureus* infizierte Maus“

Erfindungsgemäßer Wirkstoff	getestete Konzentrationen	Überleben/ getestete Mäuse n/n	Überleben/ Kontrollen n/n
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538		
2a	2 x 0.5 mg (25 mg/kg)	10/10	0/10 ₁₀
1e	2 x 0.5 mg (25 mg/kg)	3/3	0/5
1f	2 x 0.5 mg (25 mg/kg)	3/3	0/5

15

Beispiel 20

Gezielte Erhöhung der Lipophilie des handelsüblichen Antibiotikums Cefalexin (Formel 5, R1 = H, R2 = H, R3 = CH₃, X = S) durch radikalvermittelte Einführung neuer Substituenten

20

[0094] Um eine ausreichende Fixierung auf einer lipophilen Oberfläche zu erreichen, sollte die Lipophilie des handelsüblichen Antibiotikums Cefalexin (Formel 5, R1 = H, R2 = H, R3 = CH₃, X = S) durch radikalvermittelte Einführung paradihydroxylierter Substituenten gezielt erhöht werden. Zunächst wurde das Verteilungsverhalten von Cefadroxil zwischen einer wässrigen und einer lipophilen Phase bestimmt.

25

Methode vgl. Beispiel 12

30

Ergebnis:

[0095] Der bestimmte logP-Wert des handelsüblichen Antibiotikums Cefalexin (Formel 5, R1 = H, R2 = H, R3 = CH₃, X = S) beträgt -2,63. Um eine ausreichende Bindung an eine lipophile tragende Matrix zu erreichen, sollte die Lipophilie gezielt erhöht werden.

[0096] Die Aufgabe wurde erfindungsgemäß durch radikalvermittelte Umsetzung entsprechend dem Beispiel 13 mit 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)benzamid (logP-Wert = -1,21; Formel 6, R4 = CONHCH₂CH₂OH) gelöst.

35

[0097] Es wurde ein Antibiotikum mit deutlich höherer Lipophilie (Tabelle 9) bei Erhaltung der antimikrobiellen Aktivität (Tabelle 7) gewonnen.

Tab. 9

5 logP-Wert

Erfindungsgemäßer Wirkstoff	logP-Wert
1e	1,61

Beispiel 21

10 **3-Chlor-7-{2-[2-(2-hydroxyethylcarbamoyl)-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino]-2-phenyl-acetyl-amino}-8-oxo-1-thia-5-azabicyclo[4.2.0]oct-3-en-4-carbonsäure 1i**

[0098] Der Wirkstoff wurde durch Umsetzung von Wirkstoffen der allgemeinen Formel 5 ($R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = Cl$, $X = S$) mit Stoffen der allgemeinen Formel 6 ($R_4 = CONHCH_2CH_2OH$) erhalten.

15

Strukturanalytik

NMR-Spektren wurden bei 300 MHz (1H) und 75 MHz (^{13}C and DEPT-135) in Acetonitril- d_3 aufgenommen. 1H NMR δ 3.36 (m, $J = 5.7$ Hz, 2H, H-9'), 3.38 (d, $J = 18.2$ Hz, 1H, H-2), 3.57 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, H-10'), 3.75 (d, $J = 18.2$ Hz, 1H, H-2), 4.99 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, H-6), 5.72 (dd, $J = 4.8$ Hz, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-7), 5.94 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-13), 6.56 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, H-4'), 6.71 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, H-5'), 7.42 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 7.66 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-11), 9.76 (t, 1H, H-8'), 13.25 (d, 1H, $J = 6.2$ Hz, H-14). ^{13}C NMR δ 31.27 (C-2), 42.11 (C-9'), 58.09 (C-6), 60.04 (C-7), 61.48 (C-10'), 63.48 (C-13), 101.40 (C-1'), 124.60 (C-4), 128.41 (C-2', C-6'), 129.13 (C-3), 129.84 (C-4'), 130.09 (C-3', C-5'), 133.36 (C-4'), 138.69 (C-1'), 141.89 (C-5'), 153.55 (C-2'), 162.30 (C-8), 165.83 (C-9), 170.10 (C-7'), 171.37 (C-12), 184.75 (C-6'), 185.51 (C-3'). LC/MS m/z 562.2 ($[M+H]^+$, 584.1 $[M+Na]^+$ API-ES pos. mode).

20
25

Nachweis der Stabilität

30 [0099] Der neue Wirkstoff erwies sich über einen Zeitraum > 60 Tage als lagerstabil. Figur 2 zeigt die Lagerstabilität der 3-Chlor-7-{2-[2-(2-hydroxyethylcarbamoyl)-3,6-dioxocyclohexa-

1,4-dienylamino]-2-phenyl-acetylamino}-8-oxo-1-thia-5-azabicyclo[4.2.0]oct-3-en-4-carbonsäure 1i.

Beispiel 22

5

3-Chlor-7-[2-(2-carbamoyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino)-2-phenyl-acetylamino]-8-oxo-1-thia-5-azabicyclo[4.2.0]oct-3-en-4-carbonsäure 1j

10

[0100] Der Wirkstoff wurde durch Umsetzung von Wirkstoffen der allgemeinen Formel 5 (R1 = H, R2 = H, R3 = Cl, X = S) mit Stoffen der allgemeinen Formel 6 (R4 = CONH₂) erhalten.

Strukturanalytik

15

NMR-Spektren wurden bei 300 MHz (¹H) in Acetonitril-d₃ aufgenommen.

¹H NMR δ 3.41 (d, J = 18.4 Hz, 1H, H-2), 3.77 (d, J = 18.4 Hz, 1H, H-2), 5.01 (d, J = 4.9 Hz, 1H, H-6), 5.74 (dd, J = 4.9 Hz, J = 8.5 Hz, 1H, H-7), 5.96 (d, J = 6.7 Hz, 1H, H-13), 6.60 (d, J = 10.3 Hz, 1H, H-4''), 6.71 (d, J = 10.3 Hz, 1H, H-5''), 7.45 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 7.61 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-11), 9.09 (s, 2H, H-8''), 13.27 (d, 1H, J = 6.7 Hz, H-14).

20

LC/MS *m/z* 518.2 ([M+H]⁺, 540.0 [M+Na]⁺ API-ES pos. mode).

Beispiel 23

25

3-Chlor-7-[2-(2-methoxycarbonyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino)-2-phenyl-acetylamino]-8-oxo-1-thia-5-azabicyclo[4.2.0]oct-3-en-4-carbonsäure 1k

30

[0101] Der Wirkstoff wurde durch Umsetzung von Wirkstoffen der allgemeinen Formel 5 (R1 = H, R2 = H, R3 = Cl, X = S) mit Stoffen der allgemeinen Formel 6 (R4 = COOCH₃) erhalten.

Strukturanalytik

NMR-Spektren wurden bei 300 MHz (¹H) in Acetonitril-d₃ aufgenommen ¹H NMR δ 3.23 (d, J = 18.4 Hz, 1H, H-2), 3.38 (d, J = 18.4 Hz, 1H, H-2), 3.83 (br s, 3H, H-8''), 4.92 (d,

J = 4.6 Hz, 1H, H-6), 5.65 (dd, J = 4.6 Hz, J = 7.5 Hz, 1H, H-7), 5.96 (d, J = 6.7 Hz, 1H, H-13), 6.68 (d, J = 10.2 Hz, 1H, H-4''), 6.74 (d, J = 10.1 Hz, 1H, H-5''), 7.42 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 7.61 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H-11), 13.27 (d, 1H, J = 6.7 Hz, H-14). LC/MS m/z 532.5 ($[M+H]^+$), 554.5 ($[M+Na]^+$) API-ES pos. mode).

5

Beispiel 24

3-Chlor-7-[2-(2-ethoxycarbonyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino)-2-phenyl-acetyl-amino]-8-oxo-1-thia-5-azabicyclo[4.2.0]oct-3-en-4-carbonsäure 11

10

[0102] Der Wirkstoff wurde durch Umsetzung von Wirkstoffen der allgemeinen Formel 5 ($R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = Cl$, $X = S$) mit Stoffen der allgemeinen Formel 6 ($R_4 = COOCH_2CH_3$) erhalten.

Strukturanalytik

15

NMR-Spektren wurden bei 300 MHz (1H) in Acetonitril- d_3 aufgenommen. 1H NMR δ 1.14 (br, 3H, H-9''), 3.35 (d, J = 18.2 Hz, 1H, H-2), 3.73 (d, J = 18.2 Hz, 1H, H-2), 4.16 (br, 2H, H-8''), 4.95 (d, J = 4.6 Hz, 1H, H-6), 5.69 (dd, J = 4.6 Hz, J = 8.8 Hz, 1H, H-7), 6.59 (d, J = 10.2 Hz, 1H, H-4''), 6.70 (d, J = 10.2 Hz, 1H, H-5''), 7.38 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 7.55 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-11). LC/MS m/z 547.0 ($[M+H]^+$), 569.0 ($[M+Na]^+$) API-ES pos. mode).

20

Beispiel 25

Antimikrobielle Wirkung der neuen Verbindungen nach Formel 4 (Beispiel 21 – Beispiel 24) *in vitro*

25

Methoden vgl Beispiel 5

Ergebnisse:

[0103] Die neuen Wirkstoffe wirken stark antimikrobiell (Tabelle 10).

30

Beispiel 26

Herstellung von neuen Cephalosporinen durch Salzbildung mit Kationen, die selbst einen Wirkstoffcharakter haben

[0104] Die Fraktionen nach Beispiel 6 wurden mit 7-Aminocephalosporinsäure sowie mit Wirkstoffen nach Formel 4 (R1 = H, R2 = H, R3 = Cl, R4 = CONHCH₂CH₂OH, X = S) und mit Wirkstoffen nach Formel 5 (R1 = H, R2 = H, R3 = Cl, X = S) umgesetzt. Dabei wurden stark antimikrobiell wirkende Produkte erhalten.

Beispiel 27

Antimikrobielle Wirksamkeit *in vivo* der neuen Stoffe nach Formel 4 (Beispiel 21 - Beispiel 24)

Methoden vgl. Beispiel 11

Ergebnis

[0105] Im Infektionsmodell „mit *Staphylococcus aureus* infizierte Maus“ sterben die Tiere ohne wirksame Behandlung zu 100 %. Nach Therapie mit dem erfindungsgemäßen Wirkstoff nach Formel 4 überleben alle Tiere (Tabelle 11).

Tab. 10 Antimikrobielle Wirkung der neuen Wirkstoffe **1i** bis **1l** und **2c**.

Stamm	Stoffmenge n [μmol]														
	2c			1i			1j			1k			1l		
	0.01 9	0.1	0.19	0.02 9	0.14	0.29	0.02	0.1	0.2	0.02 9	0.14	0.29	0.01 9	0.09	0.19
<i>Bacillus megaterium</i> SBUG 1152	36 ¹	38	40	26	32	34	28	36	40	30	36	38	30	34	38
<i>B. subtilis</i> AWD 166	36	38	40	30	36	38	30	38	40	30	36	38	30	34	38
<i>Escherichia coli</i> SBUG 1135	24	30	32	18	24	28	18	26	28	18	24	28	18	24	28
<i>Enterococcus faecalis</i> 769	r ²	8	14	r	r	r	r	8	12	r	8	14	r	r	r
<i>E. faecalis</i> 945	r	8	12	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
<i>Staphylococcus aureus</i> 315	r	10	12	r	10	14	r	8	12	r	12	14	r	10	14
<i>S. aureus</i> 33490	24	30	32	14	22	26	16	24	26	16	24	26	14	20	24
<i>S. aureus</i> 34289	r	r	10	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
<i>S. aureus</i> 36881	r	12	18	r	12	18	r	12	16	r	14	18	r	8	18
<i>S. aureus</i> 38418	26	34	38	20	30	34	22	30	34	22	30	34	18	28	30
<i>S. aureus</i> 39105	22	24	28	r	18	22	r	16	18	8	20	22	r	18	22
<i>S. aureus</i> 520	r	10	14	r	r	r	r	8	12	r	r	10	r	r	10
<i>S. aureus</i> 526	r	8	12	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	30	38	40	26	34	36	28	34	38	28	36	38	24	30	34
<i>S. aureus</i> Nordeutscher Stamm	r	10	14	r	12	16	r	12	16	r	14	18	r	10	16
<i>S. epidermidis</i> 1068	22	24	30	12	18	22	16	22	26	14	22	24	14	20	22
<i>S. epidermidis</i> 1071	28	30	32	14	22	26	18	26	28	18	24	28	16	24	28
<i>S. epidermidis</i> 125	26	34	36	20	28	32	22	30	32	20	30	32	18	26	28
<i>S. epidermidis</i> 563	30	34	36	12	22	24	20	26	32	18	28	30	16	28	30
<i>S. epidermidis</i> 847	14	24	28	12	20	24	10	20	24	8	24	28	r	20	22

¹ Hemmhofdurchmesser in mm; ² r = resistent (kein nachweisbarer Hemmhof)

Tab. 11

Effektivität von *in vitro* aktiven Wirkstoffen im Infektionsmodell „mit *Staphylococcus aureus* infizierte Maus“

Erfindungsgemäßer Wirkstoff	getestete Konzentrationen	Überleben/ getestete Mäuse n/n	Überleben/ trollen n/n Kon- 5
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538		
2a	2 x 0.5 mg (25 mg/kg)	10/10	0/10
1i	2 x 0.5 mg (25 mg/kg)	12/12	0/20 ¹⁰
1j	2 x 0.5 mg (25 mg/kg)	3/3	0/5
1k	2 x 1.5 mg (75 mg/kg)	3/3	0/5
1l	2 x 1.0 mg (50 mg/kg)	3/3	0/5 ¹⁵

Beispiel 28

Gezielte Erhöhung der Lipophilie des handelsüblichen Antibiotikums Cefaclor (Formel 5, R1 = H, R2 = H, R3 = Cl, X = S) durch radikalvermittelte Einführung neuer Substituenten

[0106] Um eine ausreichende Fixierung auf einer lipophilen Oberfläche zu erreichen, sollte die Lipophilie des handelsüblichen Antibiotikums Cefaclor (Formel 5, R1 = H, R2 = H, R3 = Cl, X = S) durch radikalvermittelte Einführung paradihydroxylierter Substituenten gezielt erhöht werden. Zunächst wurde das Verteilungsverhalten von Cefaclor zwischen einer wässrigen und einer lipophilen Phase bestimmt.

Methode vgl. Beispiel 12

Ergebnis:

[0107] Der bestimmte logP-Wert des handelsüblichen Antibiotikums Cefaclor (Formel 5, R1 = H, R2 = H, R3 = Cl, X = S) beträgt -3,28. Um eine ausreichende Bindung an eine lipophile tragende Matrix zu erreichen, sollte die Lipophilie gezielt erhöht werden.

[0108] Die Aufgabe wurde erfindungsgemäß durch radikalvermittelte Umsetzung entsprechend dem Beispiel 21 mit 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)benzamid (logP-Wert = -1,21; Formel 5, R4 = CONHCH₂CH₂OH) gelöst.

[0109] Es wurde ein Antibiotikum mit deutlich höherer Lipophilie (Tabelle 12) bei Erhaltung der antimikrobiellen Aktivität (Tabelle 10) gewonnen.

Tab. 12

5 logP-Wert

Erfindungsgemäßer Wirkstoff	logP-Wert
1i	1,81

Beispiel 29

10 **3-Chlor-7-{2-[2-(2-hydroxyethylcarbamoyl)-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino]-2-phenyl-acetyl-amino}-8-oxo-5-azabicyclo[4.2.0]oct-3-ene-4-carbonsäure 1m**

[0110] Der Wirkstoff wurde durch Umsetzung von Wirkstoffen der allgemeinen Formel 5 (R1 = H, R2 = H, R3 = Cl, X = CH₂) mit Stoffen der allgemeinen Formel 6 (R4 = CONHCH₂CH₂OH) erhalten.

15

Strukturanalytik

NMR-Spektren wurden bei 300 MHz (¹H) und 75 MHz (¹³C and DEPT-135) in Acetonitril-d₃ aufgenommen. ¹H NMR δ 1.33 (m, 2H, H-1), 2.40 (m, 2H, H-2), 3.37 (m, J = 5.6 Hz, 2H, H-9''), 3.58 (t, J = 5.5 Hz, 2H, H-10''), 3.74 (m, J = 5.0 Hz, 1H, H-6), 5.31 (m, J = 5.0 Hz, J = 8.3 Hz, 1H, H-7), 5.90 (d, J = 6.7 Hz, 1H, H-13), 6.55 (d, J = 10.2 Hz, 1H, H-4'), 6.66 (d, J = 10.2 Hz, 1H, H-5'), 7.41 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 7.54 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-11), 9.76 (t, 1H, H-8''), 13.23 (d, 1H, J = 6.3 Hz, H-14). ¹³C NMR δ 22.19 (C-1), 31.70 (C-2), 42.12 (C-9''), 53.13 (C-6), 59.24 (C-7), 61.51 (C-10''), 63.62 (C-13), 101.65 (C-1'), 124.74 (C-4), 128.33 (C-2', C-6'), 129.03 (C-3), 129.79 (C-4'), 130.07 (C-3', C-5'), 133.34 (C-4'), 138.96 (C-1'), 141.92 (C-5'), 153.47 (C-2'), 162.22 (C-8), 165.73 (C-9), 170.09 (C-7'), 171.37 (C-12), 184.69 (C-6''), 185.49 (C-3'). LC/MS *m/z* 544.2 ([M+H]⁺, 566.1 [M+Na]⁺ API-ES pos. mode).

25

Nachweis der Stabilität

30

[0111] Der neue Wirkstoff erwies sich über einen Zeitraum > 60 Tage als lagerstabil. Figur 3 zeigt die Lagerstabilität der 3-Chlor-7-{2-[2-(2-hydroxyethylcarbamoyl)-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino]-2-phenyl-acetylamino}-8-oxo-5-azabicyclo[4.2.0]oct-3-ene-4-carbonsäure **1m**.

Beispiel 30

3-Chlor-7-[2-(2-carbamoyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino)-2-phenyl-acetylamino]-8-oxo-5-aza-bicyclo[4.2.0]oct-3-ene-4-carbonsäure 1n

[0112] Der Wirkstoff wurde durch Umsetzung von Wirkstoffen der allgemeinen Formel 5 ($R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = Cl$, $X = CH_2$) mit Stoffen der allgemeinen Formel 6 ($R_4 = CONH_2$) erhalten.

Strukturanalytik

NMR-Spektren wurden bei 300 MHz (1H) in Acetonitril- d_3 aufgenommen.

1H NMR δ 1.34 (m, 2H, H-1), 2.40 (m, 2H, H-2), 3.72 (m, $J = 4.8$ Hz, 1H, H-6), 5.35 (m, $J = 4.8$ Hz, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-7), 5.90 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-13), 6.55 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H, H-4'), 6.66 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H, H-5'), 7.41 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 7.54 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-11), 9.07 (s, 2H, H-8'), 13.14 (d, 1H, $J = 6.7$ Hz, H-14). LC/MS m/z 500.3 ($[M+H]^+$, 521.1 $[M+Na]^+$ API-ES pos. mode).

Beispiel 31

3-Chlor-7-[2-(2-methoxycarbonyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino)-2-phenyl-acetylamino]-8-oxo-5-aza-bicyclo[4.2.0]oct-3-ene-4-carbonsäure 1o

[0113] Der Wirkstoff wurde durch Umsetzung von Wirkstoffen der allgemeinen Formel 5 ($R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = Cl$, $X = CH_2$) mit Stoffen der allgemeinen Formel 6 ($R_4 = COOCH_3$) erhalten.

Strukturanalytik

NMR-Spektren wurden bei 300 MHz (^1H) in Acetonitril- d_3 aufgenommen. ^1H NMR δ 1.34 (m, 2H, H-1), 2.42 (m, 2H, H-2), 3.63 (br s, 3H, H-8''), 3.71 (m, $J = 4.9$ Hz, 1H, H-6), 5.32 (m, $J = 4.9$ Hz, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-7), 6.57 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, H-4''), 6.67 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, H-5''), 7.34 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 7.91 (br d, 1H, H-11). LC/MS m/z 514.7 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 535.9 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$ API-ES pos. mode).

Beispiel 32

3-Chlor-7-[2-(2-ethoxycarbonyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino)-2-phenyl-acetyl-amino]-8-oxo-5-azabicyclo[4.2.0]oct-3-ene-4-carbonsäure 1p

[0114] Der Wirkstoff wurde durch Umsetzung von Wirkstoffen der allgemeinen Formel 5 ($\text{R}_1 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{H}$, $\text{R}_3 = \text{Cl}$, $\text{X} = \text{CH}_2$) mit Stoffen der allgemeinen Formel 6 ($\text{R}_4 = \text{COOCH}_2\text{CH}_3$) erhalten.

Strukturanalytik

NMR-Spektren wurden bei 300 MHz (^1H) in Acetonitril- d_3 aufgenommen. ^1H NMR δ 1.13 (br, 3H, H-9''), 1.33 (m, 2H, H-1), 2.46 (m, 2H, H-2), 3.75 (m, $J = 5.1$ Hz, 1H, H-6), 4.02 (br, 2H, H-8''), 5.34 (m, $J = 5.1$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-7), 6.59 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H, H-4''), 6.70 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, H-5''), 7.38 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 7.61 (br d, 1H, H-11). LC/MS m/z 529.8 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 550.2 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$ API-ES pos. mode).

Beispiel 33

Antimikrobielle Wirkung der neuen Verbindungen nach Formel 4 (Beispiel 29 – Beispiel 32) *in vitro*

Methoden vgl Beispiel 5

Ergebnisse:

[0115] Die neuen Wirkstoffe wirken stark antimikrobiell (Tabelle 13).

Tab. 13 Antimikrobielle Wirkung der neuen Wirkstoffe 1m bis 1p und 2d.

Stamm	Stoffmenge n [μ mol]														
	2d			1m			1n			1o			1p		
	0.019	0.094	0.19	0.018	0.092	0.18	0.019	0.096	0.19	0.019	0.094	0.19	0.019	0.094	0.19
<i>Enterococcus faecalis</i> 769	r ²	r	8 ¹	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
<i>Staphylococcus aureus</i> 315	r	r	10	r	r	8	r	r	12	r	r	10	r	r	10
<i>S. aureus</i> 36881	r	20	22	r	16	20	r	r	8	r	r	12	r	12	20
<i>S. aureus</i> 38418	18	30	>30	20	30	>30	14	26	30	14	14	28	18	28	>30
<i>S. aureus</i> 520	r	10	14	r	r	8	r	r	8	r	r	r	r	r	8
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	28	34	38	22	>30	>30	22	28	32	22	28	30	22	30	32
<i>S. aureus</i> Nordeutscher Stamm	r	r	8	r	r	12	r	r	14	r	r	12	r	r	12
<i>S. epidermidis</i> 125	18	24	32	20	26	28	14	22	26	14	20	24	16	26	28
<i>S. epidermidis</i> 847	14	22	24	r	14	18	r	16	20	r	14	18	r	16	20

¹ Hemmhofdurchmesser in mm, ² r = resistent (kein nachweisbarer Hemmhof)

Beispiel 34

5

Herstellung von neuen Cephalosporinen durch Salzbildung mit Kationen, die selbst einen Wirkstoffcharakter haben

[0116] Die Fraktionen nach Beispiel 6 wurden mit 7-Aminocephalosporinsäure sowie mit
 10 Wirkstoffen nach Formel 4 (R1 = H, R2 = H, R3 = Cl, R4 = CONHCH₂CH₂OH, X = CH₂)
 und mit Wirkstoffen nach Formel 5 (R1 = H, R2 = H, R3 = Cl, X = CH₂) umgesetzt. Dabei
 wurden stark antimikrobiell wirkende Produkte erhalten.

Beispiel 35

15 **Antimikrobielle Wirksamkeit *in vivo* der neuen Stoffe nach Formel 4 (Beispiel 29 – Beispiel 32)**

Methoden vgl. Beispiel 11

Ergebnis

[0117] Im Infektionsmodell „mit *Staphylococcus aureus* infizierte Maus“ sterben die Tiere ohne wirksame Behandlung zu 100 %. Nach Therapie mit dem erfindungsgemäßen Wirkstoff nach Formel 4 überleben alle Tiere (Tabelle 14).

5

Tab. 14

Effektivität von *in vitro* aktiven Wirkstoffen im Infektionsmodell „mit *Staphylococcus aureus* infizierte Maus“

Erfindungsgemäßer Wirkstoff	getestete Konzentrationen	Überleben/ getestete Mäuse n/n	Überleben/ trollen n/n	Kon- 10
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538			
2a	2 x 0.5 mg (25 mg/kg)	10/10	0/10	
1m	2 x 0.5 mg (25 mg/kg)	9/9	0/15	15
1n	2 x 1.0 mg (50 mg/kg)	3 / 3	0/5	
1o	2 x 1.0 mg (50 mg/kg)	2/3	0/5	
1p	2 x 1.0 mg (50 mg/kg)	2/3	0/5	20

Beispiel 36

Gezielte Erhöhung der Lipophilie des handelsüblichen Antibiotikums Loracarbef (Formel 5, R1 = H, R2 = H, R3 = Cl, X = CH₂) durch radikalvermittelte Einführung neuer Substituenten

25

[0118] Um eine ausreichende Fixierung auf einer lipophilen Oberfläche zu erreichen, sollte die Lipophilie des handelsüblichen Antibiotikums Loracarbef (Formel 5, R1 = H, R2 = H, R3 = Cl, X = CH₂) durch radikalvermittelte Einführung paradihydroxylierter Substituenten gezielt erhöht werden. Zunächst wurde das Verteilungsverhalten von Loracarbef zwischen einer wässrigen und einer lipophilen Phase bestimmt.

30

Methode vgl. Beispiel 12

35

Ergebnis:

[0119] Der bestimmte logP-Wert des handelsüblichen Antibiotikums Loracarbef (Formel 5, $R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = Cl$, $X = CH_2$) beträgt -3,13. Um eine ausreichende Bindung an eine lipophile tragende Matrix zu erreichen, sollte die Lipophilie gezielt erhöht werden.

[0120] Die Aufgabe wurde erfindungsgemäß durch radikalvermittelte Umsetzung entsprechend dem Beispiel 29 mit 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)benzamid (logP-Wert = -1,21; Formel 6, $R_4 = CONHCH_2CH_2OH$) gelöst.

[0121] Es wurde ein Antibiotikum mit deutlich höherer Lipophilie (Tabelle 12) bei Erhaltung der antimikrobiellen Aktivität (Tabelle 15) gewonnen.

Tab. 15

logP-Wert

Erfindungsgemäßer Wirkstoff	logP-Wert
1m	1,62

[0122] Der Strukturanalytik und der Testungen auf biologische Aktivität der Beispiel 37 - Beispiel 41 liegen die Bezeichnungen der Strukturelemente sowie der Substanzen entsprechend der Formel 11 zugrunde.

Beispiel 37

7-[2-(5-Methyl-3,4-dioxocyclohexa-1,5-dienylamino)-2-(4-hydroxyphenyl)-acetylamino]-cephalosporansäure 1q

[0123] Der Wirkstoff wurde durch Umsetzung von Wirkstoffen der allgemeinen Formel 5 ($R_1 = OH$, $R_2 = H$, $R_3 = CH_3$, $X = S$) mit Stoffen der allgemeinen Formel 9 ($R_4 = H$, $R_5 = CH_3$) erhalten.

Strukturanalytik

NMR-Spektren wurden bei 300 MHz 1H und HMBC und HSQC in DMSO- d_6 aufgenommen. 1H NMR δ (DMSO- d_6) 1.86 (s, 3H, $H_{7''}$), 1.99 (s, 3H, H_{10}), 3.29 (d, $J = 18.4$ Hz, 1H, H_2), 3.49 (d, $J = 18.4$ Hz, 1H, H_2), 4.89 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H_6), 5.19 (d(s), $J = 1.5$ Hz, 1H, $H_{2''}$), 5.31 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H_{13}), 5.65 (dd, $J = 4.7$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 1H, H_7), 6.76 (d, $J = 8.2$ Hz,

2H, H3', H5'), 7.14 (d(s), J = 1.5 Hz, 1H, H6''), 7.27 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H2', H6'), 8.71 (d, J = 7.1 Hz, 1H, H14), 9.29 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H11). ¹³C NMR δ (DMSO-d₆) 15.6 (C7''), 19.7 (C10), 29.1 (C2), 57.1 (C6), 58.8 (C7), 59.5 (C13), 95.1 (C2''), 115.7 (C3', C5'), 122.9 (C4), 126.8 (C1'), 128.9 (C2', C6'), 129.6 (C3), 133.7 (C6''), 140.0 (C5''), 155.2 (C1''), 157.8 (C4'), 163.8 (C9), 164.1 (C8), 170.0 (C12), 174.7 (C3''), 183.6 (C4''). LC/MS *m/z* 483.4 ([M]⁺, 504.8 [M+Na]⁺ API-ES pos. mode)

Beispiel 38

7-[2-(6-Methyl-3,4-dioxocyclohexa-1,5-dienylamino)-2-(4-hydroxyphenyl)-acetylamino]-cephalosporansäure 1r

[0124] Der Wirkstoff wurde durch Umsetzung von Wirkstoffen der allgemeinen Formel 5 (R1 = OH, R2 = H, R3 = CH₃, X = S) mit Stoffen der allgemeinen Formel 9 (R4 = CH₃, R5 = H) erhalten.

Strukturanalytik

NMR-Spektren wurden bei 300 MHz ¹H und HMBC und HSQC in DMSO-d₆ aufgenommen.

¹H NMR δ (DMSO-d₆) 1.99 (s, 3H, H10), 2.32 (s, 3H, H8''), 3.29 (d, J = 18.1 Hz, 1H, H2), 3.48 (d, J = 18.4 Hz, 1H, H2), 4.99 (d, J = 4.4 Hz, 1H, H6), 5.12 (s, 1H, H2''), 5.25 (d, J = 6.1 Hz, 1H, H13), 5.69 (dd, J = 4.9 Hz, J = 7.8 Hz, 1H, H7), 6.32 (s, 1H, H5''), 6.76 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H3', H5'), 7.11 (d, J = 6.1 Hz, 1H, H14), 7.34 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H2', H6'), 9.29 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H11). ¹³C NMR δ (DMSO-d₆) 17.5 (C7''), 19.5 (C10), 28.6 (C2), 56.8 (C6), 58.8 (C7), 59.5 (C13), 97.7 (C2''), 115.9 (C3', C5'), 123.0 (C4), 126.7 (C1'), 128.7 (C2', C6'), 129.4 (C5''), 129.6 (C3), 147.2 (C6''), 154.3 (C1''), 158.0 (C4'), 163.6 (C9), 163.9 (C8), 170.2 (C12), 175.6 (C3''), 182.8 (C4''). LC/MS *m/z* 483.4 ([M]⁺, 504.9 [M+Na]⁺ API-ES pos. mode).

Beispiel 39

3-Chlor-7-[2-(5-methyl-3,4-dioxocyclohexa-1,5-dienylamino)-2-phenyl-acetylamino]-8-oxo-5-azabicyclo[4.2.0]oct-3-ene-4-carbonsäure 1s

[0125] Der Wirkstoff wurde durch Umsetzung von Wirkstoffen der allgemeinen Formel 5 ($R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = Cl$, $X = CH_2$) mit Stoffen der allgemeinen Formel 9 ($R_4 = CH_3$, $R_5 = H$) erhalten.

5 Strukturanalytik

NMR-Spektren wurden bei 300 MHz 1H und HMBC und HSQC in DMSO- d_6 aufgenommen.

1H NMR δ (DMSO- d_6) 1.35 (m, 2H, H1), 1.86 (s, 3H, H7''), 2.48 (m, 2H, H2), 3.72 (m, J = 7.8 Hz, 1H, H6), 5.16 (s, 1H, H2''), 5.25 (dd, J = 7.9 Hz, J = 5.6 Hz, 1H, H7), 5.33 (s, 1H, H13), 7.19 (s, 1H, H6''), 7.35 (dd, J = 7.4 Hz, 1H, H4'), 7.40 (dd, J = 7.4 Hz, 2H, H3', H5'), 7.49 (d, J = 7.6 Hz, 2H, H2', H6'), 8.88 (broad, 1H, H14), 9.39 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H11). ^{13}C NMR δ (DMSO- d_6) 21.5 (C1), 28.0 (C2), 51.4 (C6), 57.7 (C7), 60.1 (C13), 95.0 (C2''), 120.2 (C4), 127.2 (C4'), 127.6 (C2', C6'), 128.5 (C3), 128.7 (C3', C5'), 133.5 (C6''), 136.5 (C1'), 163.9 (C8), 169.1 (C12), 183.0 (C4''). LC/MS m/z 469.5 ($[M]^+$), 491.3 ($[M+Na]^+$ API-ES pos. mode).

Beispiel 40

Antimikrobielle Wirkung der neuen Verbindungen nach Formel 8 (Beispiel 37 – Beispiel 39) *in vitro*

Methoden vgl Beispiel 5

Ergebnisse: Die neuen Wirkstoffe wirken stark antimikrobiell (Tabelle 16).

Tab. 16 Antimikrobielle Wirkung der neuen Wirkstoffe **1q** bis **1r**, **2a**, **2b** und **4a**, **4b**.

Wirkstoff	Stoffmenge n [μ mol]	<i>Enterococcus faecalis</i> 769	<i>Staphylo- coccus aureus</i> 315	<i>S. aureus</i> 36881	<i>S. aureus</i> 38418	<i>S. aureus</i> 520	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. aureus</i> Nord- deutscher Stamm	<i>S. epider- midis</i> 125	<i>S. epider- midis</i> 535	<i>S. epider- midis</i> 847
1q	0.02	r ¹	r	r	10 ²	r	16	r	12	r	r
	0.1	r	10	r	18	r	20	10	20	r	14
	0.2	10	14	10	22	10	26	12	26	10	16
1r	0.02	r	r	r	12	r	18	r	16	r	r
	0.1	r	r	r	22	r	30	r	26	r	16
	0.2	r	10	12	26	r	>30	12	28	r	18
1s	0.02	r	r	r	14	r	20	r	14	r	r
	0.1	r	8	r	24	r	30	8	22	r	14
	0.2	r	12	10	28	10	>30	14	26	10	18
2a	0.02	r	r	r	20	r	30	r	22	r	10
	0.1	10	r	14	30	r	>30	r	30	r	22
	0.2	16	r	20	>30	12	>30	r	>30	r	26
2d	0.02	r	16	r	24	r	28	r	22	r	10
	0.1	r	20	20	30	8	>30	r	30	r	20
	0.2	12	22	28	>30	14	>30	8	>30	r	24
4a	0.02	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
	0.1	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
	0.2	r	r	r	r	r	r	10	8	r	10
4b	0.02	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
	0.1	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
	0.2	r	r	r	r	r	r	10	r	r	r

¹ r = resistent (kein nachweisbarer Hemmhof)² Hemmhofdurchmesser in mm

Beispiel 41**Antimikrobielle Wirksamkeit *in vivo* der neuen Stoffe nach Formel 8 (Beispiel 37)**

Methoden vgl. Beispiel 11

Ergebnis

[0126] Im Infektionsmodell „mit *Staphylococcus aureus* infizierte Maus“ sterben die Tiere ohne wirksame Behandlung zu 100 %. Nach Therapie mit dem erfindungsgemäßen Wirkstoff nach Formel 8 überleben mindestens 50% der Tiere (Tabelle 17).

Tab. 17

Effektivität von *in vitro* aktiven Wirkstoffen im Infektionsmodell „mit *Staphylococcus aureus* infizierte Maus“

Erfindungsgemäßer Wirkstoff	getestete Konzentrationen	Überleben/ getestete Mäuse n/n	Überleben/ Kontrollen n/n	Kon- trollen n/n 15
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538			
2a	2 x 0.5 mg (25 mg/kg)	10/10	0/10	
1q	2 x 0.5 mg (25 mg/kg)	3/6	0/10	20
	2 x 1.0mg (50 mg/kg)	1/3	0/5	

Beispiel 42

Ausrüstung des hydrophilen Saugkerns einer Wundauflage mit Wirkstoffen nach Formelbild 3

[0127] Eine Schicht des Saugkerns wurde in 1cm² große Stücke zerschnitten. Diese wurden mit unterschiedlich konzentrierten Suspensionen des Wirkstoffes nach Formelbild 3 getränkt und im Agartest auf Keimminderung überprüft. Dazu wurde die Keimsuspensionen mit Hilfe des Whitley Automatic Spiral-Plater (WASP) linear ausplattiert. So ergaben sich Agarplatten mit einem gleichmäßigen Bakterienbewuchs. Nach 30min wurden die Bereiche, auf die die Wundauflagen aufgebracht werden sollten, markiert und die Kontrollflächen genau festgelegt. Diese Bereiche wurden mit jeweils 25µl Kochsalzlösung betropft. In diese Tropfen wurden unbeschichtetes Kompressenmaterial und mit den erfindungsgemäßen Substanzen beschichteten Wundauflagen gelegt und leicht angedrückt. Die Platten wurden 15min zur

Vordiffusion bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis sie in den Brutschrank (37°C) gestellt wurden. Nach 24h wurden die Flächen der Wundauflagen markiert. Es erfolgte eine Auszählung der Bakterien auf den Flächen unterhalb der Wundauflagen und in den Kontrollbereichen, die nur mit Kochsalzlösung versetzt worden waren. Die Wundauflagen wurden auf frischen Agar überführt, um eventuell überlebende Keime auszuzählen.

[0128] Bei Auslegen des Saugkerns auf eine unbeimpfte Agarplatte. Bei diesen geringen Keimzahlen war die Besiedlung nur durch statistische Verfahren zu berechnen. Unter Annahme einer Poisson-Verteilung errechnete sich die im Mittel zu erwartende Zahl überlebender Keime m nach der Formel

$$m = -\ln p/p_0$$

(p = Anzahl der Versuche ohne Keimnachweis, p_0 = Gesamtzahl der Versuche).

Ergebnisse

[0129] Bei unbeschichteten Wundauflagen kommt es, wie zu erwarten zu einer starken Keimvermehrung.

[0130] Dagegen wurde bei den mit dem Wirkstoffe nach Formelbild 3 beschichteten Wundauflagen in einer Konzentration von 0,02 % das Bakterienwachstum unter der Auflage vollständig unterdrückt. Es wurde aber nur ein Hemmhof von $0,93 \pm 0,73$ mm ($n = 7$) um die Wundaufgabe herum beobachtet, d. h. die Diffusion in Bereiche um die Wundaufgabe war minimal.

Nach Überführung auf frischen Agar in 3 Fällen wurde ein geringes und in 7 Fällen kein Bakterienwachstum beobachtet, d.h. es waren im Mittel nur 0,35 überlebende Keime bei dieser Konzentration des neuen Polyhexanid-Wirkstoffes nach Formelbild 3 zu erwarten.

[0131] Bei einer Verringerung der Konzentration des Wirkstoffs auf 0,01 % waren im statistischen Mittel 0,2KBE unter den Wundauflagen zu erwarten ($n = 5$). Nach dem Ausbringen des Saugkerns auf unbeimpften Agar wurde in 2 Fällen geringes und in 3 Fällen starkes Wachstum beobachtet, d.h. bei dieser Konzentration wurde nur eine Bakteriostase und kein bakterizider Effekt erreicht.

[0132] Bei einer Erhöhung der Konzentration auf 0,04 % trat erwartungsgemäß unter der Wundaufgabe kein Wachstum auf. Bei Übertragung auf unbeimpften Agar wurde im statistischen Mittel eine Keimzahl von 0,22 ($n = 5$) beobachtet. Der Hemmhof um den Saugkern stieg aber auf 3 mm, d.h. bei dieser Konzentration begann eine Diffusion in das umgebende Medium.

Beispiel 43**Prüfung der mit Wirkstoffen nach Formelbild 2 oder 3 beschichteten Wundauflage im Filterversuch**

5

[0133] Verschieden große Stücke der unterschiedlichen Wundauflagen wurden in einen Trichter gegeben und die Keimsuspension (200 000 KbE/ml) mit einer Geschwindigkeit von etwa 20 Tropfen/min aufgetropft (Abb.). Die ersten 2ml des Filtrates wurden aufgefangen. Im Filtrat wurde nach dem Verdünnen die Keimzahl mit dem Spiralplater WASP bestimmt und mit der Ausgangskeimzahl verglichen. Die Verdünnung wurde dabei jeweils der Ausgangskeimzahl angepasst.

10

[0134] Figur 4 zeigt die schematische Darstellung des Filter-Versuchsaufbaus

15

Ergebnis

[0135] Bei unbeschichteten Wundauflagen werden die Keime fast vollständig wiedergefunden. Dagegen waren bei den mit dem Wirkstoff nach Formelbild 2 oder 3 beschichteten Wundauflagen alle Keime inaktiviert, in dem aufgefangenen Filtrat lies sich kein Keimwachstum nachweisen

20

Beispiel 44

[0136] Der Wirkstoff nach Formelbild 2 wurde mit einem Gemisch verschiedener Fettsäuren (Tetradecansäure, Pentadecansäure, Hexadecansäure, cis-9-Hexadecensäure, Octadecansäure, cis-9-Octadecensäure, cis-9,12-Octadecadiensäure, erhalten durch n-Hexan-Extraktion aus Mikroalgen Extraktor DIONEX ASE 200) versetzt. Mit dem erhaltenen Produkt wurden Saugkompressen mit einer Konzentration von 0,01 % beschichtet.

25

Ergebnisse

[0137] Das Keimwachstum konnte vollständig unterbunden werden. Mischungen natürlicher Fettsäuren können gemäß Anspruch 11 als Säuren bei der Umwandlung der Substanz nach Formelbild 2 eingesetzt werden. Das erhaltene Produkt zeichnet sich durch eine starke antimikrobielle Wirksamkeit aus.

30

Beispiel 45 Prüfung auf der Schweinehaut**Methodik**

In eine W/O-Emulsionsgrundlage wurden der handelsübliche Wirkstoff nach Formelbild 1, Amoxicillin und das Salz gemäß Anspruch 2 mit Amoxicillin als Anion, jeweils in
5 Konzentration 1 % eingearbeitet.

Die Untersuchungen mit diesen Formulierungen wurden an der Haut von einem vietnamesischen Hängebauchschwein sofort nach der Schlachtung durchgeführt.

Die Haut wurde mit Staph. aureus (Norddeutscher Epidemiestamm kolonisiert. Danach wurden die Salben mit den entsprechenden Wirkstoffen auf gekennzeichnete Hautareale
10 aufgetragen. Nach 24 h wurden die entsprechenden Hautareale abgespült und die Keimzahl in der Spüllösung bestimmt.

Ergebnisse

Während bei beiden Einzelsubstanzen noch Keime nachweisbar waren, führte das erfindungsgemäße Produkt zu einer vollständigen Inaktivierung der Keime.

15 Tab. 18

Salbe	Koloniebildende Einheiten
Grundlage W/O	> 100 000
Grundlage W/O +Wirkstoff nach Formel 1	23
Grundlage W/O +Amoxicillin	52
Grundlage W/O +Wirkstoff nach Anspruch 2	0

Beispiel 46 Einarbeitung in ein Cellulose-Gel**Methodik**

In ein alkoholfreies Cellulose-Gel wurden der handelsübliche Wirkstoff nach Formelbild 1, Amoxicillin und das Salz gemäß Anspruch 2 mit Amoxicillin als Anion, jeweils in
20 Konzentration von 0,1 und 1 % eingearbeitet.

Die Prüfung erfolgte gemäß Beispiel 45

Ergebnisse

25 Die Erfindungsgemäßen Formulierungen sind stabil.

Im Gegensatz zu den Einzelsubstanzen lässt sich mit der erfindungsgemäßen Formulierung eine vollständige Inaktivierung des multiresistenten Staph. aureus –Stammes erreichen

Tab. 19

Salbe	Koloniebildende Einheiten	
Wirkstoffgehalt	0,1 %	1 %
Grundlage Cellulose-Gel	507	403
Grundlage +Wirkstoff nach Formel 1	77	15
Grundlage +Amoxicillin	57	64
Grundlage W/O +Wirkstoff nach Anspruch 2	24	0

Beispiel 47**Prüfungen der Formulierungen nach Beispiel 46 an der Mundschleimhaut**5 **Methodik**

s.Beispiel 45, jedoch wurde Mund- und Rachenschleimhaut verwendet.

Ergebnisse

Auch auf Schleimhäuten zeigt die erfindungsgemäße Formulierung die beste Wirksamkeit.

10

Tab. 20

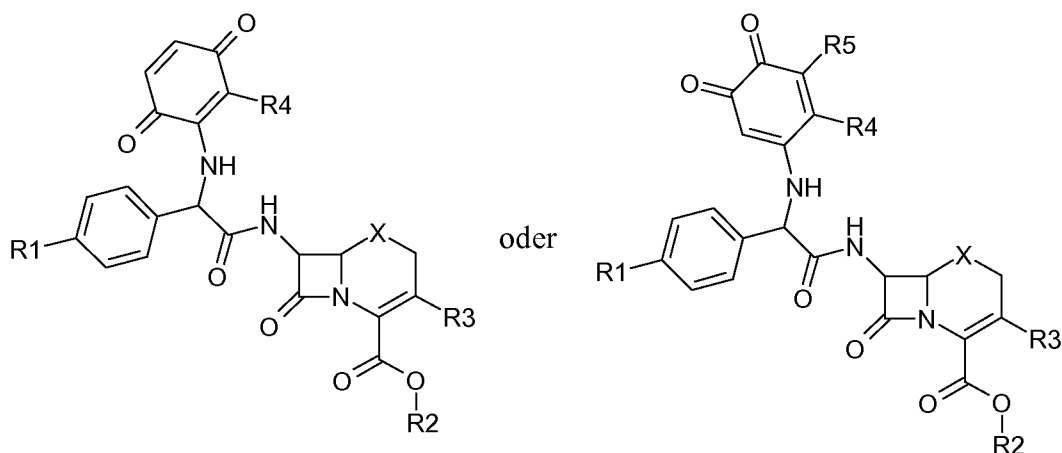
Salbe	Koloniebildende Einheiten	
Wirkstoffgehalt	0,1 %	1 %
Grundlage Cellulose-Gel	149	170
Grundlage +Wirkstoff nach Formel 1	23	45
Grundlage +Amoxicillin	117	28
Grundlage W/O +Wirkstoff nach Anspruch 2	2	0

15

20

Patentansprüche

1. β -Lactam-Derivate der allgemeinen Formel



mit:

R1 = H, OH

R2 = H, Na, CH₂OH, CHCH₃OCOOC₂H₅,
CHCH₃OCOOCH(CH₃)₂, CH₂OCOC(CH₃)₃

R3 = CH₃, Cl

R4 = CONHCH₂CH₂OH, CONH₂, COOCH₃, COOCH₂CH₃, COOH, COCH₃, CHO, CH₃,
CH₂(CH₂)₀₋₂₀CH₃, C(CH₃)₃, C₆H₅, Cl, Br, OCH₃, O(CH₂)₀₋₂₀CH₃

R5 = CONHCH₂CH₂OH, CONH₂, COOCH₃, COOCH₂CH₃, COOH, COCH₃, CHO, CH₃,
CH₂(CH₂)₀₋₂₀CH₃, C(CH₃)₃, C₆H₅, Cl, Br, OCH₃, O(CH₂)₀₋₂₀CH₃

X = S, CH₂.

5

2. Salze, deren anionische Komponente aus einem

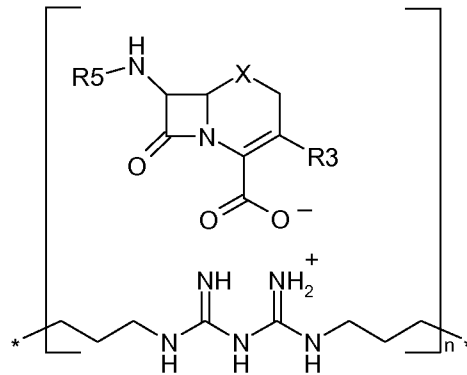
- a) β -Lactam-Derivat nach Anspruch 1 oder
- b) handelsüblichen β -Lactam-Derivat oder
- c) Derivat von 6-Aminopenicillansäure oder
- d) Derivat von 7-Aminocephalosporansäure

10

stammt und deren kationische Komponente Polyhexamethylenbiguanid ist.

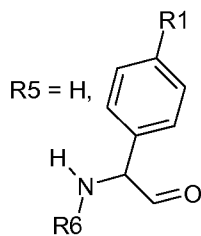
3. Salze nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Substanzen der allgemeinen Formel

50

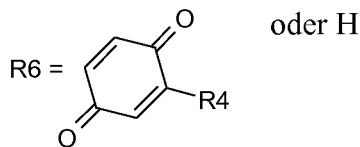


handelt, wobei

$R3 = CH_3, Cl$; $X = S, CH_2$



$R1 = H, OH$;



oder H

$R4 = CONHCH_2CH_2OH, CONH_2, COOCH_3, COOCH_2CH_3, COOH, COCH_3, CHO, CH_3, CH_2(CH_2)_{0-20}CH_3, C(CH_3)_3, C_6H_5, Cl, Br, OCH_3, O(CH_2)_{0-20}CH_3$

5

4. Salze nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass $n = 2-5$ ist.

5. Polyhexamethylenbiguanid-Hydrogencarbonat als Zwischenprodukt bei der Herstellung der Polyhexamethylenbiguanid-Salze gemäß Anspruch 2 oder 3.

10

6. Verfahren zur Herstellung von β -Lactam-Derivaten gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, dass β -Lactam-Antibiotika mit einer freien Aminogruppe gemäß Formel 5 mit Substraten von Polyphenoloxidasen, deren Hydroxygruppen ortho-ständig angeordnet sind, unter dem Einfluss von

15

- Enzymen der Klassifikation EC 1.10.3.2. und / oder
 - Peroxidasen der Klassifikation EC 1.11.17 und/oder
 - Monophenolmonooxygenasen EC 1.10.3.2. und/oder
 - Ascorbat-Oxidasen EC 1.10.3.3
- an der Aminogruppe substituiert werden

7. Verfahren zur Herstellung von β -Lactam-Derivaten gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, dass Cephalosporine mit einer freien Aminogruppe gemäß Formel 5 mit Substraten von Polyphenoloxidasen unter dem Einfluss von
- 5 a) Enzymen der Klassifikation EC 1.10.3.2. und / oder
b) Peroxidasen der Klassifikation EC 1.11.17 und/oder
c) Monophenolmonooxygenasen EC 1.10.3.1 und/oder
d) Ascorbat-Oxidasen EC 1.10.3.3
an der Aminogruppe substituiert werden
- 10 8. Verfahren zur Herstellung von Salzen nach Anspruch 2, gekennzeichnet durch folgende Schritte:
- Umsetzung eines löslichen Salzes von Polyhexamethylenbiguanid mit einem Alkali- oder Ammoniumhydrogencarbonat, wobei Polyhexamethylenbiguanid-Hydrogencarbonat ausfällt
 - Umsetzung des Polyhexamethylenbiguanid-Hydrogencarbonat mit einem β -Lactam-Derivat gemäß Anspruch 2a) bis 2d).
- 15 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, die Ausfällung des Polyhexamethylenbiguanid-Hydrogencarbonat fraktioniert erfolgt und so Polyhexamethylenbiguanid-Hydrogencarbonat unterschiedlicher Molgewichtsbereiche erhalten werden.
- 20 10. Verfahren zur Herstellung von Polyhexamethylenbiguanid-Hydrogencarbonat als Zwischenprodukt und dessen Trennung in Molgewichtsbereiche, dadurch gekennzeichnet, dass Polyhexamethylenbiguanid-hydrochlorid in wässriger Lösung mit Alkalihydrogencarbonat ausgefällt wird, wobei die Fällung partiell und schrittweise erfolgt und dabei eine Fraktionierung in enge Molgewichtsbereiche des Polymeren erfolgt.
- 25 11. Verfahren zur Herstellung von antimikrobiell wirksamen Fettsäure-Derivaten, gekennzeichnet durch Umsetzung von Polyhexamethylenbiguanid-Hydrogencarbonat mit Fettsäuren.
- 30 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass als Fettsäuren
- a) Tetradecansäure und / oder
 - b) Pentadecansäure und / oder
 - c) Hexadecansäure und / oder
 - d) cis-9-Hexadecensäure und / oder
- 35

- e) Octadecansäure und / oder
 - f) cis-9-Octadecensäure und / oder
 - g) cis-9,12-Octadecadiensäure
- eingesetzt werden.

5

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Fettsäuren durch n-Hexan-Extraktion aus Mikroalgen gewonnen werden.

10

14. Mikro- und Nanopartikel, die aus mindestens einem der β -Lactam-Derivate gemäß Anspruch 1 oder mindestens einem Salz gemäß einem der Ansprüche 2 bis 5 hergestellt wurden.

15. Saugfähige Wundauflagen, die mindestens ein Salz gemäß einem der Ansprüche 2 bis 5 enthalten.

15

16. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als wirksame Komponente ein oder mehrere β -Lactam-Derivate gemäß Anspruch 1 und/oder ein oder mehrere Salze gemäß einem der Ansprüche 2 bis 5 enthält.

20

17. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich pharmazeutisch verträgliche Hilfs- und/oder Trägerstoffe enthält.

25

18. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 16 oder 17 in Form eines Gels, einer Salbe, einer Creme, einer Tinktur, eines Fluids, einer Tablette, eines Pulvers, einer Kapsel oder einer Wundspüllösung.

19. Verwendung der pharmazeutischen Zusammensetzungen nach den Ansprüchen 16 bis 18 zur Prophylaxe und Therapie der Mastitis.

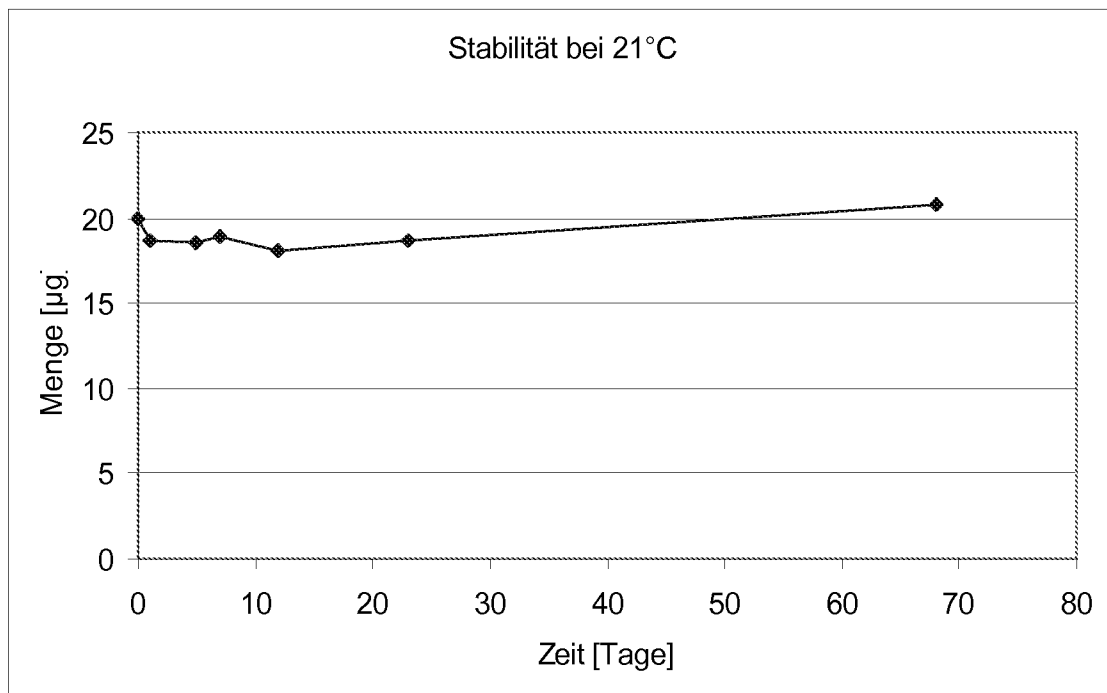
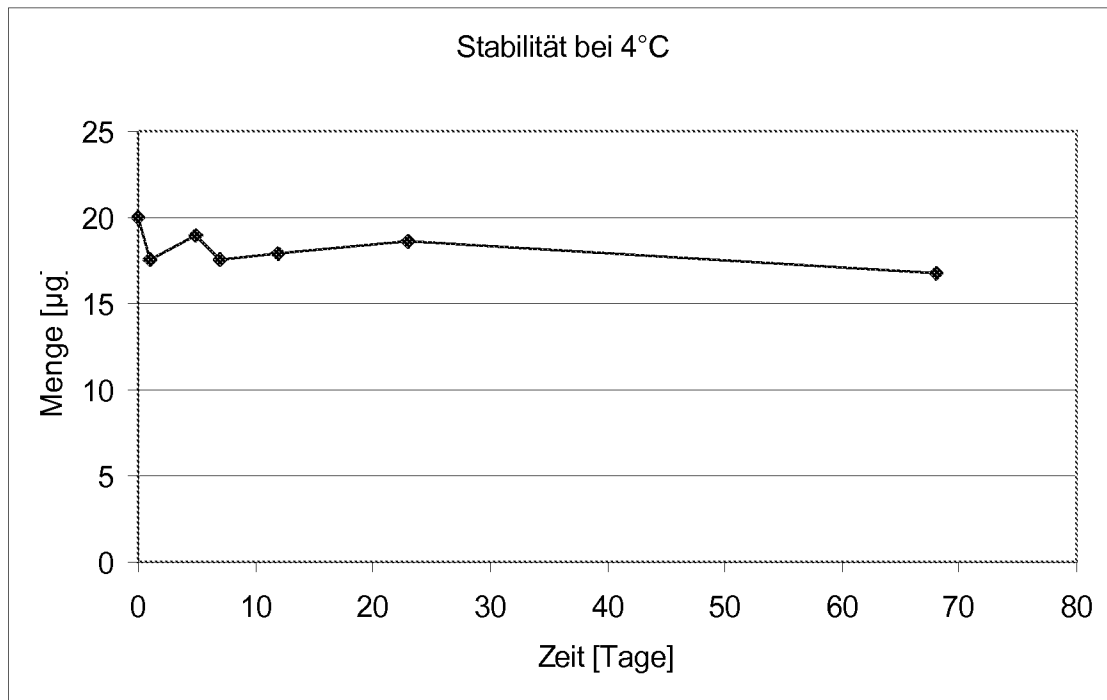
30

20. Arzneimittel, die einen oder mehrere der Wirkstoffe gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 umfassen.

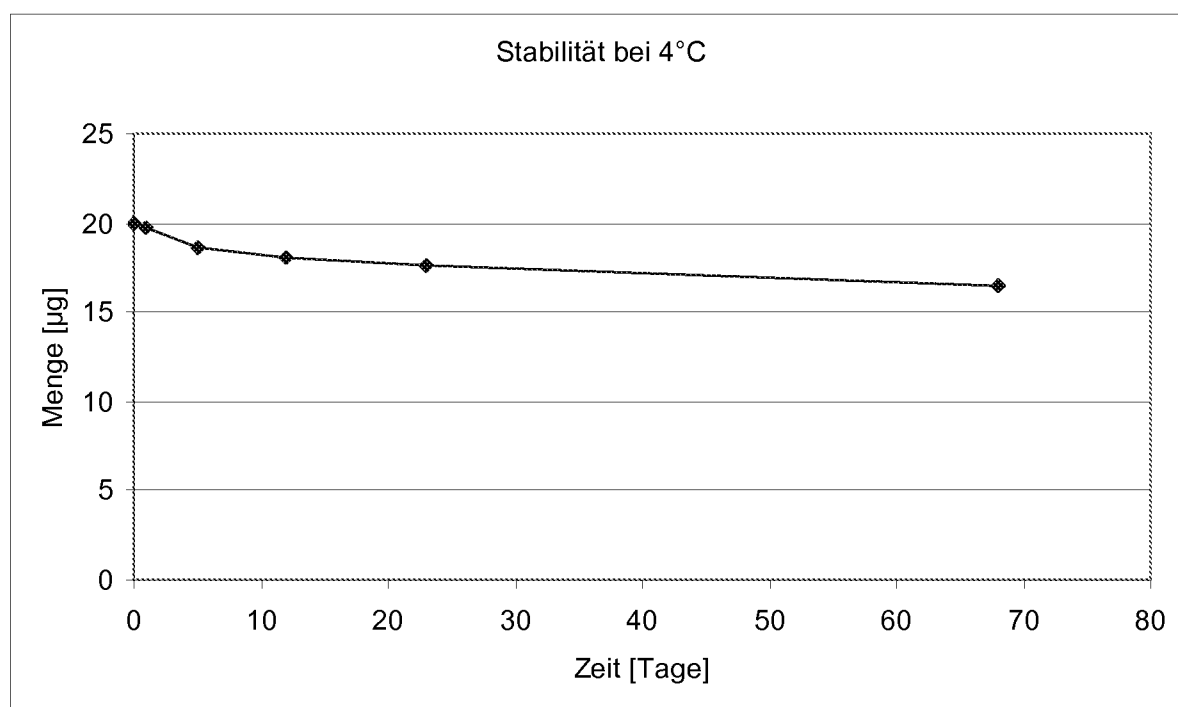
35

21. Verwendung der Arzneimittel gemäß Anspruch 20 zur Prophylaxe und/oder zur lokalen und/oder systemischen Behandlung von Infektionen in der Human- und Veterinärmedizin.

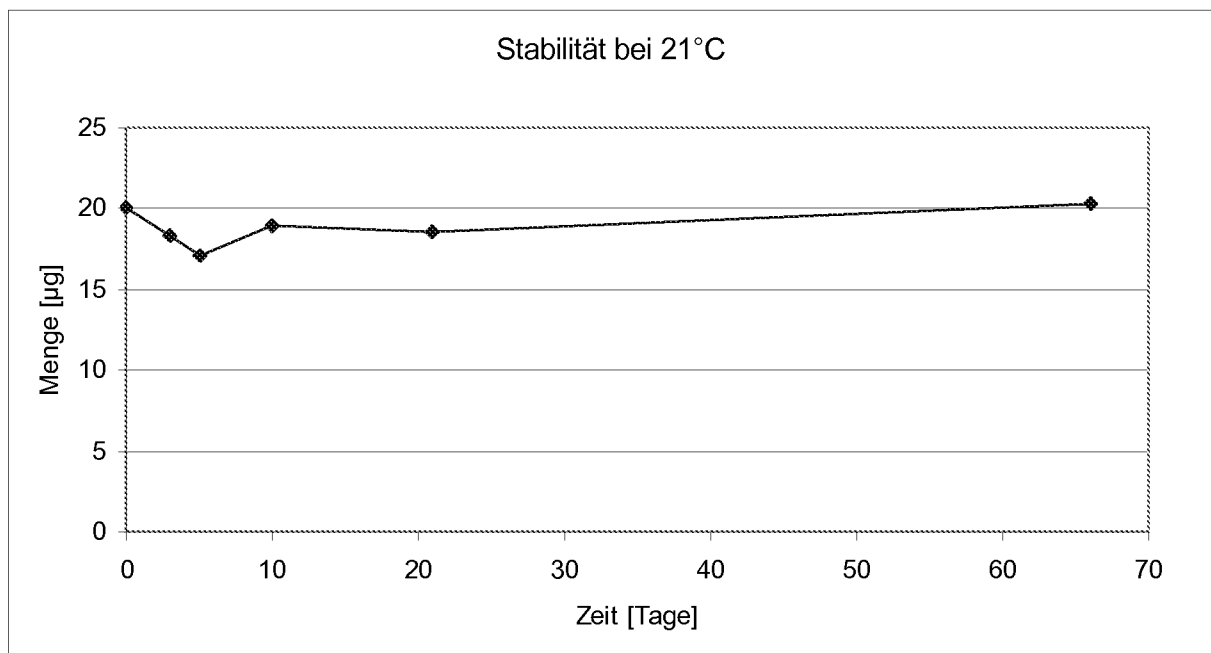
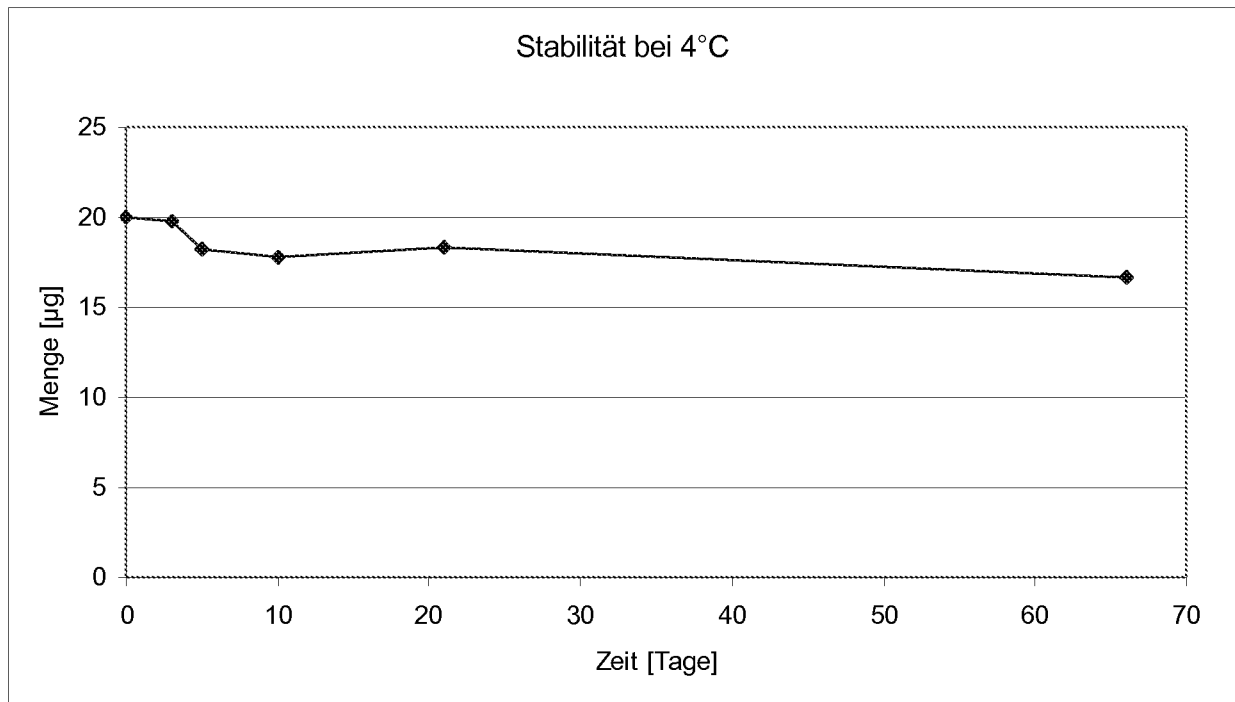
Figur 1



Figur 2



Figur 3



Figur 4

