



(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **149125 B**

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

-
- (21) Patentansøgning nr.: 1016/82 (51) Int.Cl.⁴: **C 07 D 499/68**
(22) Indleveringsdag: 09 mar 1982
(24) Løbedag: 02 maj 1975
(41) Alm. tilgængelig: 09 mar 1982
(44) Fremlagt: 03 feb 1986
(86) International ansøgning nr.: –
(62) Stamansøgning nr.: 1937/75
(30) Prioritet: 05 jun 1974 GB 24848/74 19 nov 1974 GB 50016/74 19 mar 1975 GB 24848/74
19 mar 1975 GB 50016/74

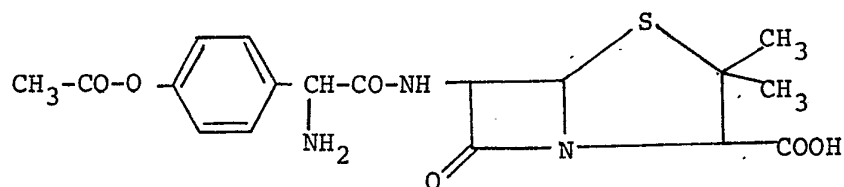
- (71) Ansøger: *BRISTOL-MYERS COMPANY; New York, US.
(72) Opfinder: Daniel *Bouzard; FR, Abraham *Weber; FR.

(74) Fuldmægtig: Th. Ostenfeld Patentbureau A/S

-
- (54) **6-(D-(-)-alfa-amino-alfa-(p-acetoxyphenyl)acet-amido)penicillansyre til anvendelse som mel-lemprodukt**

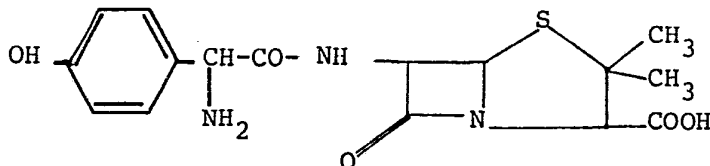
DK 149125 B

Den foreliggende opfindelse angår den hidtil ukendte forbindelse 6-[D-(-)- α -amino- α -(p-acetoxyphehyl)acetamido]penicillansyre med formlen



til anvendelse som mellemprodukt ved fremstilling af 6-[D-(-)- α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]penicillansyre (også kendt som amoxycillin eller p-hydroxyampicillin), hydrat eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

Amoxycillin, som har formelen



er en kendt, antibiotisk aktiv forbindelse, som hidtil er blevet fremstillet ved behandling af 6-aminopenicillansyre med et acyleringsmiddel i form af et reaktionsdygtigt funktionelt derivat af sidekædesyren.

Det har nu vist sig, at denne værdifulde penicillin kan fremstilles ved behandling af den tilsvarende p-acetoxifyorbindelse med visse esteraser, og opfindelsen bygger på denne erkendelse

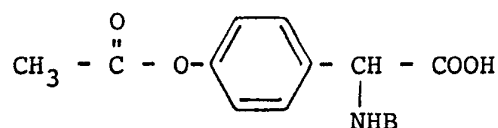
Det er kendt at spalte forskellige kemiske bindingstyper ved hjælp af esteraser, f.eks. en imid-binding i 6-sidekæden i en penicillin, jfr. dansk patentansøgning nr. 534/68, og en oxygen-binding i en O-acetylgruppe i en cephalosporins 3-stilling, jfr. dansk patentansøgning nr. 3338/71 og dansk patent nr. 108.006. Der er imidlertid her tale om bindingstyper, der ikke er kemisk analoge med den binding for en O-acetylgruppe, som fraspaltes i mellemproduktet ifølge den foreliggende opfindelse.

Omdannelsen af mellemproduktet ifølge opfindelsen til amoxycillin, hydrat eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf, sker ved, at man behandler 6-[D-(-)α-amino-α-(p-acetoxifyphenyl)acetamido]-penicillansyre i vandig opløsning med esterase fra menneskeserum eller hvedeklid eller citrusesterase ved en pH-værdi mellem ca. 5,0 og ca. 7,5, isolerer produktet på i og for sig kendt måde, og om ønsket på i og for sig kendt måde omdanner produktet i form af den frie syre eller hydrat til det tilsvarende farmaceutisk acceptable salt deraf.

Ifølge et foretrukket udførelseseksempel anvender man som esterase kommercielt, groft hvedeklid, hvorhos behandlingen i vandig opløsning gennemføres ved en pH-værdi mellem 5,5 og 6,0 eller eventuelt i nærværelse af en puffer ved en pH-værdi på 7,0 ved en koncentration på ca. 10 mg/ml esterase pr. samlet volumen af opløsning.

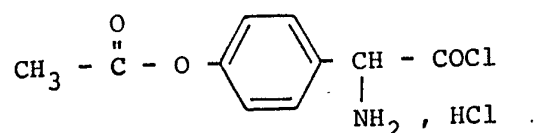
De ovennævnte farmaceutisk acceptable salte omfatter de ikke-toxiske carboxylsyresalte, f.eks. ikke-toxiske metalsalte, såsom natrium-, kalium-, calcium- og aluminiumsaltet, ammoniumsaltet og -saltene med ikke-toxiske aminer, f.eks. trialkylaminer, procain, dibenzylamin, N-benzyl-β-phenethylamin, l-ephenamin, N,N'-dibenzylethylendiamin, N-alkylpiperidin og andre aminer, der anvendes til at danne salte af penicilliner. Endvidere omfatter definitionen af farmaceutisk acceptable salte de ikke-toxiske syreadditionssalte (aminsalte), f.eks. salte med mineralsyrer, såsom hydrogenchlorid-, hydrogenbromid-, hydrogeniodid-, phosphor- og svovlsyre samt salte med organiske syrer, såsom malein-, eddike-, citron-, oxal-, rav-, benzoe-, vin-, fumar-, mandel-, ascorbin- og æblesyre.

6-[D-(-)α-amino-α-(p-acetoxyphenyl)acetamidol]penicillansyre kan fremstilles ved, at man omsætter 6-D-aminopenicillansyre eller en silylester eller et salt deraf med et acylerende middel med formlen



hvor B betegner en aminobeskyttende gruppe, og fjerner den amino-beskyttende gruppe. Silylestrene kan fremstilles ved hjælp af metoder, der er beskrevet i litteraturen, f.eks. USA patentskrift nr. 3.249.622. Silylestergruppen kan fjernes efter acyleringsreaktionen ved hydrolyse.

Eksempler på egnede aminobeskyttende grupper omfatter t-butoxycarbonyl, carbobenzyloxy, 2-ethoxycarbonyl-1-methylvinyl og 2-methoxycarbonyl-1-methylvinyl. En særligt værdifuld blokerende gruppe er en proton, som i forbindelsen med formlen



F.eks. kan denne gruppe let fjernes efter acyleringen ved neutralisering.

De særlige reaktionsbetingelser, f.eks. temperatur, opløsningsmiddel, reaktionstid, o.s.v., som udvælges til acyleringen, bestemmes af den anvendte acyleringsmetodes art og er velkendte for fagmanden. I almindelighed er det værdifuldt at tilsætte en organisk tertiær amin, f.eks. triethylamin, N,N-dimethylanilin, ethylpiperidin, 2,6-lutidin eller quinolin, der tjener som proton-acceptor eller saltdannende middel.

De følgende eksempler belyser fremstillingen af mellemproduktet ifølge opfindelsen og dets omdannelse.

Udgangsmaterialer

I. Fremstilling af D(-)α-amino-α-(p-acetoxyphenyl)eddikesyre Fremgangsmåde A (i eddikesyre som opløsningsmiddel)

203,5 g (1 mol) D(-)p-hydroxyphenylglycinhydrochlorid, 800 ml eddikesyre og 314 g (4 mol) acetylchlorid omrørtes i 48 timer ved stuetemperatur. Det faste stof opsamledes, udvaskedes 3 gange med acetone (3 x 250 ml) og 2 gange med ethanol (2 x 250 ml) og tørredes ved 40°C. Udbytte 210 g (85,4%). Dette hydrochlorid opløstes i 3,0 liter vand; opløsningen afkøledes til +5 - 10°C, og pH-værdien indstilledes på 4,5 med 20% NH₄OH. Suspensionen omrørtes i 1 time ved 5°C, og det faste stof opsamledes, udvaskedes 2 gange med vand og 2 gange med acetone og tørredes ved 40°C. Udbytte 133 g (64% fra D(-)p-hydroxyphenylglycin). α_D (1% HCl N/10 = -104,5.

Fremgangsmåde B (i methylenchlorid)

4,07 g (0,02 mol) D(-)p-hydroxyphenylglycinhydrochlorid, 30 ml methylenchlorid og 6,28 g (0,08 mol) acetylchlorid omrørtes i 48 timer ved stuetemperatur. Det faste stof opsamledes, udvaskedes 2 gange med acetone og 2 gange med ethanol. Udbytte 4,17 g (84,5%).
Analyse beregnet Cl = 14,8 (beregnet syre)

Fremgangsmåde C (i trifluoreddikesyre)

1,67 g (0,01 mol) D(-)p-hydroxyphenylglycin sættes under omrøring til 10 ml trifluoreddikesyre ved stuetemperatur. Efter opløsning tilsættes 1,57 g (0,02 mol) acetylchlorid. Efter en let exoterm reaktion kom et fast stof. Suspensionen omrørtes 1,5 time ved stuetemperatur, og trifluoreddikesyren fjernedes i vakuum. Det tilbageblevne faste stof opsamledes, udvaskedes med methylenchlorid og med ethanol. D(-)α-

amino- α -(p-acetoxyphenyl)eddikesyre var identisk med den ifølge fremgangsmåderne A og B fremstillede.

Udbytte: 1,9 g (75%).

II Fremstilling af D(-) α -amino- α -(p-acetoxyphenyl)acetylchloridhydrochlorid

83,6 g (0,40 mol) D(-) α -amino- α -(p-acetoxyphenyl)eddikesyre og 1,25 liter vandfri methylenchlorid afkøledes til -5°C under omrøring. Dernæst tilsattes langsomt 152 g phosphorpentachlorid efterfulgt af 4 ml dimethylformamid. Blandingen omrørtes i 4 timer ved 0°C . Det faste stof opsamledes, udvaskedes med vandfri methylenchlorid og vakuumtørredes ved stuetemperatur.

Udbytte: 61 g (57,5%)

Analyse. Total chlor = 27,2% (teoretisk 26,9%)

III Fremstilling af 6-[D(-) α -amino- α -(p-acetoxyphenyl)acetamido]-penicillansyre

Fremgangsmåde A. Vandfri proces.

15,27 g (0,071 mol) 6-APA omrørtes i 500 ml vandfri methylenchlorid, 120 ml methylenchlorid afdestilleredes og 11,8 ml hexamethyldisilan tilsattes. Blandingen omrørtes og tilbagesvales i 20 timer (efter ca. 10 til ca. 15 timers forløb var al 6-APA gået i opløsning). Ovennævnte opløsning afkøledes til 0°C , og 120 ml methylenchlorid tilsattes efterfulgt af 9,5 ml dimethylanilin og 7 ml af en opløsning af dimethylanilinhydrochlorid i methylenchlorid (30%). Dernæst tilsattes 20 g (0,0756 mol) D(-) α -amino- α -(p-acetoxyphenyl)acetylchloridhydrochlorid i små portioner (ca. 1 1/2 time) ved $+20^{\circ}\text{C}$ og henstod i ca. 12 til ca. 18 timer ved $+5^{\circ}\text{C}$. Dernæst tilsattes 5 ml methanol efterfulgt af 240 ml vand. pH-værdien indstilledes på 2,5 med triethylamin, og blandingen filtreredes gennem en "Celite"-pude; pH-værdien kontrolleredes dernæst, og den vandige fase fraskiltes, udvaskedes 2 gange (2 x 150 ml) med methylenchlorid og behandledes med trækul. Opløsningen indstilledes på pH-værdi 4,5 og vakuumkoncentreredes til et volumen på ca. 150 ml. Suspensionen henstod i ca. 12 til ca. 18 timer ved $+5^{\circ}\text{C}$, og det faste stof opsamledes og udvaskedes med vand og acetone og tørredes ved 40°C til opnåelse af titelforbindelsen, i det væsentlige uden indhold af L-(+) isomeren.

Udbytte = ca. 30% (af et 85-90% rent materiale).

α_D (0,5% HCl N/10) = +205,5

Elementæranalyse for et trihydrat

	<u>Teoretisk</u>	<u>Fundet</u>
C	46,85	47,17
H	5,89	5,72
N	9,10	9,02
S	6,93	7,27
H ₂ O	11,7	11,33 (KF) og 10,77 (T G A)

NMR er i overensstemmelse med den formodede struktur.

Iodometrisk afprøvning (overfor ampicillinstandard) = 738 μ g/ml

Fremgangsmåde B. Våd proces.

10,8 g (0,05 mol) 6-APA opløstes i 45 ml vand og 11,7 ml HCl 6N; 300 ml acetone tilsattes, og blandingen afkøledes til -5°C. Dernæst tilsattes 7,4 g (0,028 mol) D(-) α -amino- α -(p-acetoxyphenyl)acetylchloridhydrochlorid i små portioner, og pH-værdien holdtes konstant på 1,4 - 1,6 ved tilsætning af triethylamin.

Den anden fraktion af chloridhydrochlorid tilsattes ved pH-værdi 1,2 - 1,4. Efter 1 times forløb ved -5°C fjernedes acetonen i vakuum, og opløsningens pH-værdi indstilledes på 4,3 - 4,5. Det faste materiale opsamledes og kasseredes. Modervæskerne podedes og henstod til udkrystallisation ca. 12 til ca. 18 timer ved +5°C. RN 1395 opsamledes, udvaskedes grundigt med en lille smule vand og med acetone og tørredes ved 40°C. Udbytte: 2,0 g (9%). Det opnåede produkt var identisk med det ved fremgangsmåde A fremstillede.

Eksempel 1

Opløsninger af 0,5 mg/ml 6-[D(-) α -amino- α -(p-acetoxyphenyl)acetamido]penicillansyre (p-acetoxyampicillin) i normal saltopløsning og i menneskeserum fremstilledes. Standardopløsninger af 0,5 mg/ml 6-[D(-) α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]penicillansyre (p-hydroxyampicillin) fremstilledes ligeledes i såvel normal saltopløsning som menneskeserum.

Alle de ovennævnte opløsninger inkuberedes ved 37°C med omrystning og prøver udtoges til kromatografering efter 0, 2, 4, 8 og 24 timers forløb. Opløsningerne i en mængde på ca. 5 mikroliter pr. strimmel anbragtes i form af pletter på Whatman nr. 1 strimler (ca. 12,7 mm), der tørredes og udvikledes i et opløsningsmiddelsystem indeholdende 80 dele butylacetat, 15 dele n-butanol, 40 dele eddikesyre og 24 dele vand. Dernæst bioautograferedes strimlerne på plader podet med bacillus subtilus ved en pH-værdi på 6,0.

Biokromatogrammerne viste, at p-acetoxyampicillin hydrolyseres hurtigt til p-hydroxyformen i menneskeserum, men synes at være stabil i normal saltopløsning.

Eksempel 2

Følgende opløsninger fremstilledes:

0,5 mg/ml 6-[D-(-) α -amino- α -(p-acetoxyphenyl)acetamido]penicillansyre (p-acetoxyampicillin) i saltopløsning;

0,5 mg/ml p-acetoxyampicillin i en opløsning af citrus-esterase fortyndet 10 gange med 0,1 M kaliumphosphatpuffer til opretholdelse af en pH-værdi på 7,0; og

0,5 mg/ml p-acetoxyampicillin i en 10 mg/ml opløsning af groft hvedeklid (Shiloh) indeholdende 0,1 M kaliumphosphatpuffer.

Alle de ovennævnte opløsninger inkuberedes ved 37°C med omrystning, og prøver udtoges til kromatografering som beskrevet i eksempel 1.

Disse biokromatogrammer viste, at p-acetoxyampicillin er stabil i saltopløsning, men hydrolyseres hurtigt til p-hydroxyformen med både citrus-esterase og klid-esterase.

Eksempel 3

Følgende reaktionsblandinger fremstilledes, omrystedes ved 28°C og prøver udtoges efter 0, 1/2, 1, 2, 3, 4 og 6 timer som beskrevet i eksempel 1.

1. 25 mg affedt klid (hvedeklid opnået fra Shiloh, behandlet med acetone og tørret), 4,5 ml 0,1 M, pH 6,0, kaliumphosphatpuffer og 0,5 ml 5 mg/ml 6-[D-(-) α -amino- α -(p-acetoxyphenyl)acetamido]penicillansyre (p-acetoxyampicillin) i samme puffer.

2. 25 mg affedt klid, 4,5 ml 0,1 M, pH 7,0, kaliumphosphatpuffer og 0,5 ml 5 mg/ml p-acetoxyampicillin i samme puffer.

3. 25 mg affedt klid, 4,5 ml 0,1 M, pH 7,5, kaliumphosphatpuffer og 0,5 ml 5 mg/ml p-acetoxyampicillin i samme puffer.

4. 50 mg affedt klid, 4,5 ml 0,1 M, pH 6,0, kaliumphosphatpuffer og 0,5 ml 5 mg/ml p-acetoxyampicillin i samme puffer.

5. 50 mg affedt klid, 4,5 ml 0,1 M, pH 7,0, kaliumphosphatpuffer og 0,5 ml 5 mg/ml p-acetoxyampicillin i samme puffer.

6. 50 mg affedt klid, 4,5 ml 0,1 M, pH 7,5, kaliumphosphatpuffer og 0,5 ml 5 mg/ml p-acetoxyampicillin i samme puffer.

Resultaterne af biokromatogrammerne er vist i tabel I.

Tabel I
% omdannelse til p-hydroxyampicillin

Reaktionsnummer	Reaktionstid (timer)						
	0	1/2	1	2	3	4	6
1	12	23	32	64	100	91	95 %
2	11	34	45	68	120	75	77 %
3	11	32	39	45	68	75	98 %
4	9	32	55	59	80	80	77 %
5	14	34	64	109	131	104	104 %
6	16	66	66	91	98	116	86 %

Optimale resultater opnås således ved anvendelse af reaktionsblanding nr. 5, hvor den totale omdannelse til p-hydroxyampicillin er afsluttet på 2 timer ved en enzymkoncentration på 10 mg/ml og ved en pH-værdi på 7,0.

Eksempel 4

Følgende reaktionsblanding fremstilledes indeholdende 50 mg affedt klid (Shiloh) 2,5 mg 6-[D-(-) α -amino- α -(p-acetoxyphenyl)acetamid]penicillansyre (p-acetoxyampicillin) og 5,0 ml vand. Blandingen rystedes ved ca. 28°C og bestemtes kromatografisk efter 1, 2 og 3 timer, som beskrevet i eksempel 1.

Resultaterne af biokromatogrammerne viste 100% omdannelse af p-acetoxyampicillin til p-hydroxyampicillin på 3 timer. ReaktionsblandingspH-værdi holdt sig konstant på ca. 5,7 trods den manglende tilstedeværelse af puffer.

Eksempel 5

Følgende materialer forenedes: 20 g affedt klid (Shiloh) 1,0 g 6-[D-(-) α -amino- α -(p-acetoxyphenyl)acetamid]penicillansyre (p-acetoxyampicillin) og 2 liter af en 0,01 M vandig opløsning af pH 7,0 kaliumphosphatpuffer. Den resulterende blanding omrørtes ved ca. 28°C, og prøver udtoges hver time som beskrevet i eksempel 1.

Biokromatogramundersøgelserne viste 100% omdannelse på 3 timer. Dernæst centrifugeredes blandingen. Den ovenstående væske opsamledes, indstilledes på en pH-værdi 4,0 med saltsyre og lyofiliseredes. Lyofilatet undersøgtes igen som beskrevet ovenfor og viste sig at indeholde ca. 900 mg p-hydroxyampicillin.

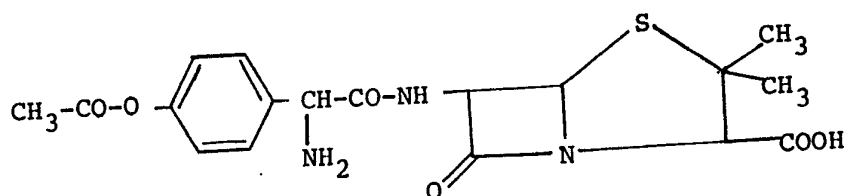
6,0 g af lyofilatet opslæmmedes i 20 ml vand. Til den resulterende blanding sættes 6N saltsyre til gradvis sænkning af pH-værdien til 2,0. Omrøringen fortsattes i yderligere 15 minutter, efterfulgt af

fracfiltrering af de faste stoffer. Filtratet behandledes med 1,0 g affarvningscarbon, filtreredes, og det klare filtrat indstilledes på en pH-værdi på 4,5. Udkrystallisation skete ved skrabning af opløsningen, og den henstod til fortsat udkrystallisation i 1 time. Krystallerne opsamledes på et filter, udvaskedes med vand og acetone og tørredes dernæst til opnåelse af 180 mg 6-D-(-) α -amino- α -(p-hydroxyphenylacetamido)penicillansyre trihydrat, dekomponeringspunkt 201°C .

		<u>% teoretisk</u>	<u>% fundet</u>
Analyse beregnet for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$:	C	45,82	45,87
	H	6,01	5,71
	N	10,02	10,48
	K.F. H_2O	12,89	13,68

Patentkrav

6-[D-(-) α -amino- α -(p-acetoxyphenyl)acetamido]penicillansyre
med formelen



til anvendelse som mellemprodukt ved fremstillingen af 6-[D-(-) α -amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido]penicillansyre, hydrat eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

Fremdragne publikationer:

DK ansøgninger nr. 534/68, 3338/71
DK patent nr. 108006.