

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 944031 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **944031**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07D503/06

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **07.06.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **02.09.1994**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **24.10.1994**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **07.06.1993** PCT/GB1993/001206
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

11.06.1992 GB 9212379 31.10.1992 GB 9222841

14.12.1992 GB 9226061 17.12.1992 GB 9226282

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •SmithKline Beecham p.l.c., New Horizons Court, Brentford, Middlesex TW8 9EP, ISO-BRITANNIA, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Cook, Michael Alan, West Sussex BN14 8HQ, ISO-BRITANNIA, (GB)

2 •Wilkins, Robert Bennett, Ayrshire KA11 5AP, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

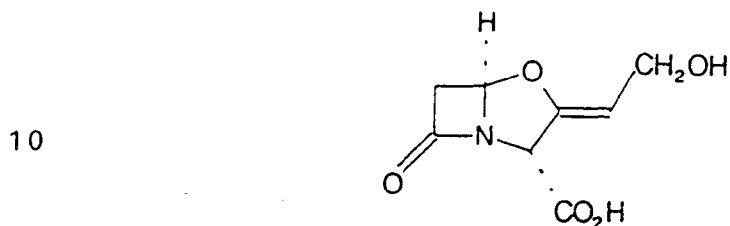
(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä klavulaanihapon valmistamiseksi

Förfarande för framställning av klavulansyra

Menetelmä klavulaanihapon valmistamiseksi - Förfarande för framställning av klavulansyra

- 5 Tämä keksintö kohdistuu uuteen menetelmään klavulaanihapon (I):



ja sen farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen ja estereiden valmistamiseksi.

15

Klavulaanihappoa valmistetaan normaalisti fermentoimalla klavulaanihappoa tuottava mikro-organismi, kuten erilaiset mikro-organismit, jotka kuuluvat erilaisiin Streptomyces-kantoihin, kuten *S. clavuligerus* NRRL 3585, *S. jumoninensis* NRRL 5741, *S. katsurahamanus* IFO 13716 ja *Streptomyces* sp. P 6621 FERM P2804, esim. kuten JP Kokai 80-162993:ssa kuvataan. Saatu vesiliemi voidaan alistaa konventionaalisiin puhdistus- ja konsentroitimenetelmiin, esimerkiksi joihin kuuluu suodattaminen ja kromatografinen puhdistaminen, kuten GB-1508977:ssä ja JP Kokai 80-626993:ssa selostetaan, ennen vesiliuoksen uuttamista orgaanisella liuottimella raa'an klavulaanihapon liuoksen tuottamiseksi orgaanisessa liuottimessa.

30

GB-1508977:ssä selostetaan muun muassa, että klavulaanihapon suolat voidaan saada absorboimalla suodatetussa liemessä oleva klavulanaattianioni anioninvaihtohartsiin, eluomalla siitä elektrolyytillä, suolan poistamisella saadusta liuoksesta, levittämällä liuos, josta on poistettu suola toiseen anioninvaihtohartsiin, eluomalla siitä kromatografisesti elektrolyytillä, poistamalla suola saadusta liuoksesta ja poistamalla sen jälkeen liuotin. Tätä menetelmää voidaan käyttää puhtaan materiaalin hyväksyttävien saantojen saamiseen mutta hartsipylväiden käyttöön liittyy mer-

kittäviä investointeja ja ne voivat johtaa rajoituksiin suuren skaalaan tuotantotoiminnoissa. Siten olisi toivottavaa olla saatavissa vaihtoehtoinen menetelmä, johon liittyy vähän vaihteita, joissa käytetään hartsia.

5

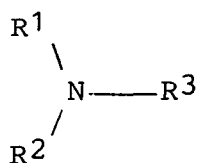
GB-1543563:ssa selostetaan menetelmä klavulaanihapposuolojen valmistamiseksi saostamalla litiumklavulanaatti. GB-1578739:ssä selostetaan erilaisia klavulaanihapon amiinisuoloja farmaseuttisina yhdisteinä. EP-0026044:ssä selostetaan klavulaanihapon tertiaarisen butyyliamiinisuolan käyttöä käyttökelpoisena välituotteena klavulaanihapon valmistuksessa. Suola on selostettu BE-862211:ssä mutta vain sopivana aineosana farmaseuttisiin formulointeihin. PT-94908:ssa selostetaan klavulaanihapon tri- (alempi alkyyli)amiinisuolojen ja dimetyylianiiniinisuolojen käyttö klavulaanihapon puhdistusmenetelmässä, jossa klavulaanihapon trietyyliamiinisuola muodostetaan ja muutetaan sitten klavulaanihapon silyylidiesteriksi. EP-0887178A:ssa selostetaan menetelmä klavulaanihapon puhdistamiseksi, jossa voidaan käyttää orgaanisia amiineja välituoteamiinisuolan muodostamiseksi klavulaanihapon kanssa epäpuhtaassa liuoksessa.

15

20

Esillä oleva keksintö saa aikaan klavulaanihapon suolan käytön amiinin kanssa, jolla on kaava (II):

25



30

(II)

välituotteena menetelmässä klavulaanihapon tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen ja estereiden valmistamiseksi, jolloin R^1 , R^2 ja R^3 on valittu seuraavien optioiden mukaisesti:

35

(1) R^1 :n ollessa optionaalisesti substituoitu syklinen ryhmä, jolla on yleinen kaava:



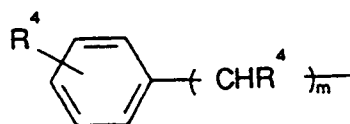
40

jossa m on nolla tai kokonaisluku 1-5, R on optionaalisesti substituoitu alifaattinen hiilivetyrengasjärjestelmä, joka sisältää 3-8 rengashiiliatomia, R⁴ on vety tai alkyyli, amino- tai hydroksisubstituoitu alkyyli tai substituoitu amino-substituoitu alkyyli tai saman yleisen kaavan mukainen ryhmä tai R¹ edellä, R² ja R³ voidaan valita samoista ryhmistä, joista R¹ on valittu, tai vedystä, alkyylistä, alkenyylistä, amino- tai hydroksisubstituoidusta alkyylistä tai alkenyylistä tai substituoitu amino-substituoitu alkyylistä tai alkenyylistä, mutta poikkeuksena sykloheksyyliamiini, tai

(2) jokainen R¹, R² ja R³ ovat samanlaiset tai erilaiset ja ne on valittu itsenäisesti vedystä, alkyylistä, alkenyylistä tai amino- tai hydroksi- tai alkoksisubstituoidusta alkyylistä tai alkenyylistä, tai substituoitu amino-substituoitu alkyylistä tai alkenyylistä mutta poikkeuksena t-butyyliamiini, s-butyyliamiini, N,N-dimetyylietyyliamiini, 1,2-dimetyylipropyliamiini, neopentyyliamiini ja 2-amino-3,3-dimetyylibutaani ja edellyttäen että jos amiini (II) on trimetyyliamiini tai trietyyliamiini, klavulaanihapon suola amiinin (II) kanssa muodostetaan reagoittamalla klavulaanihappo tai sen labiili johdannainen liuoksena orgaanisessa liuottimessa amiinin (II) tai sen labiilin johdannaisen kanssa ja suola eristetään sitten sellaisenaan tai erillisessä vaiheessa orgaanisesta liuottimesta tai

(3) R¹:n ollessa optionaalisesti substituoitu aryyliiryhmä, jolla on yleinen kaava:

30

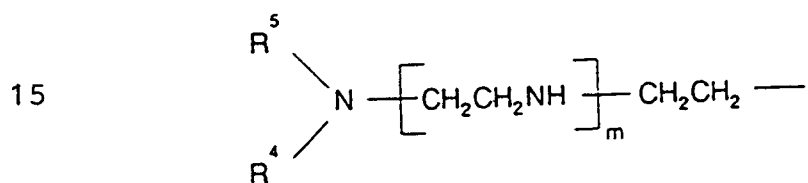


jossa R⁴ on vety tai yksi tai useampi substituentti ja m on nolla tai kokonaisluku 1-5 ja R² ja R³ on valittu itsenäisesti vedystä, alkyylistä, amino- tai hydroksisubstituoidusta alkyylistä tai substituoitu amino-substituoitu alkyylistä tai saman yleisen kaavan ryhmistä kuin R¹ edellyttäen että jos R⁴ on vety ja m on nolla, niin R² ja R³

eivät molemmat ole metyyli mutta poikkeuksena bentsyylliterbutyyliamiini, tai

(4) R^1 :n ja R^2 :n ja optionaalisesti R^3 :n ollessa yhdessä esitetyn typpiatomin kanssa optionaalisesti substituoidun heterosyklisen rengasjärjestelmän tähde käsittäen typpiatomin renkaan jäsenenä ja käsittäen optionaalisesti yhden tai useamman lisärengasheteroatomia, ja jos R^3 ei ole rengasjärjestelmän osa, se valitaan itsenäisesti vedystä, alkyylistä, amino- tai hydroksisubstituoidusta alkyylistä tai substituoitu amino-substituoitu alkyylistä, mutta poikkeuksena piperidiini tai

(5) R^1 :n ollessa yleisen kaavan



mukainen ryhmä, jossa R^4 ja R^5 ovat itsenäisesti vety, alkyyli, aminosubstituoitu alkyyli tai substituoitu amino-- substituoitu alkyyli ja R^2 ja R^3 on valittu itsenäisesti vedystä, alkyylistä, amino- tai hydroksisubstituoidusta alkyylistä tai substituoitu amino-substituoitu alkyylistä ja m on nolla tai kokonaisluku 1-5, tai

(6) toinen tai molemmat R^1 :stä ja R^2 sta ovat vety ja R^3 on aminohapon tähde, jossa aminohapon karboksylaattiryhmä voi olla esteröity tai amidin muodossa.

Kun alkyyliryhmät tai substituoidut alkyyliryhmät ovat tässä mainitut, jos muuta ei ole määritetty, ne voivat sisältää sopivasti 1-6 hiiliatomia alkyyliryhmässä. Sopivat substituentit aminoryhmissä käsittävät alkyylin.

Edellä olevassa optiossa (1) amiini (II) on sopivasti muu kuin amiini, jossa R^1 on sykloalkyyliryhmä ja m on nolla ja R^2 ja R^3 on kumpikin valittu sykloalkyylistä tai vedystä tai C_nH_{2n+1} :stä, jossa n on 1-7.

Edellä olevassa optiossa (1) syklinen ryhmä R voi olla sopivasti tyydytetty m :n ollessa sopivasti nolla. Ryhmä R voi

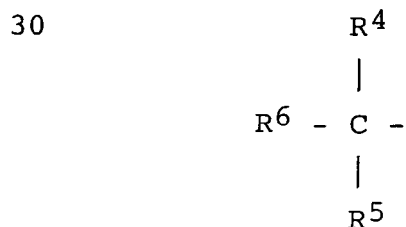
olla monosyklinen tai polysyklinen ja jokainen rengas voi sisältää sopivasti 5, 6 tai 7 rengasatomia mukaan lukien atomit, jotka ovat jakautuneet renkaiden väliin fuusioituneina tai silloittuneina rengasjärjestelminä. Sopiva syklinen ryhmä R voi olla substituomaton.

Sopiva amiini (II) voi sisältää kaksi tai useampia syklisiä ryhmiä R^1 tai fuusioituneen rengasjärjestelmän R, jossa on esimerkiksi yksi tai useampi alkyylisubstituentti, kuten metyyli. Sopiva R^2 ja R^3 voi olla muu kuin vety, esim. toinen tai molemmat voivat olla alkyyli tai substituoitu alkyyli.

Esimerkit tällaisista amiineista käsittävät syklopentyyliamiinin, sykloheptyyliamiinin, NN-dimetyylisykloheksyyliamiinin, disykloheksyyliamiinin, adamantyyliamiinin, NN-dietyylisykloheksyyliamiinin, N-isopropyylisykloheksyyliamiinin, N-metyylisykloheksyyliamiinin, syklopropyyliamiinin, syklobutyliamiinin, norbornyyliamiinin ja dehydroabietyyliamiinin.

Edellä olevassa optiossa (2) amiini (II) on sopivasti muu kuin amiini, jossa R^1 on vety tai C_nH_{2n+1} , jossa n on 1-7 ja R^2 ja R^3 ovat myös kumpikin valittu vedystä tai C_nH_{2n+1} :stä, jossa n on 1-7.

Edellä olevassa optiossa (1) R^1 voi olla sopivasti alkyyli tai substituoitu alkyyliryhmä, jolla on yleinen kaava:



35

jossa R^4 , R^5 ja R^6 ovat itsenäisesti C_{1-10} -alkyyli tai amino- tai hydroksisubstituoitu alkyyli tai substituoitu amino-substituoitu alkyyli.

R⁴, R⁵ ja R⁶ ovat sopivasti alkyyli, sopivasti kahden R⁴:stä, R⁴:stä tai R⁶:sta ollessa metyyli. Esimerkit tällaisista amiineista käsittävät t-oktyyliamiinin (so. 2-amino-2,4,4-trimetyyllipentaani) ja t-amyyliamiinin. Vaihtoehtoisesti kaksi R⁴:stä, R⁴:stä tai R⁶:sta voivat olla alkyyli ja yksi voi olla hydroksisubstituoitu alkyyli. Esimerkit tällaisista amiineista käsittävät 1-hydroksi-2-metyyli-2-propyyliamiinin.

10 Edellä olevassa optiossa (2) R¹ voi olla vaihtoehtoisesti C₁₋₂₀-alkyyli, esim. C₈₋₂₀-alkyyli, C₁₋₂₀-alkenyyl, C₁₋₂₀-hydroksialkyyli tai C₁₋₂₀-aminoalkyyli.

Esimerkit tällaisista amiineista käsittävät tri-n-propyyliamiinin, tri-n-oktyyliamiinin, tri-n-butyliamiinin, dime-
 15 tyyliamiinin, i-propyyliamiinin, di-n-heksyyliamiinin, di-n-butyliamiinin, dietyyliamiinin, 2-aminoetanolin, NN-dietylietanoliamiinin, NN-dimetylietanoliamiinin, etanoli-
 20 amiinin, n-butyliamiinin, n-heksyyliamiinin, n-oktadekyyliamiinin, N-etylietanoliamiinin, 1-hydroksietyyliamiinin, dietanoliamiinin, NN-dimetylietanoliamiinin, N-etyyli-dietanoliamiinin, 1,6-diaminoheksaanin, trietanoliamiinin, di-isobutyliamiinin, di-isopropyyliamiinin, 2-metoksietyyliamiinin, hydroksyyliamiinin, ammoniakkin, metyyliamiinin,
 25 etyyliamiinin, n-propyyliamiinin, n-butyliamiinin, n-pentyliamiinin, n-heksyyliamiinin, n-heptyliamiinin, n-oktyyliamiinin, n-nonyyliamiinin, n-dekyyliamiinin, n-undekyyliamiinin, n-dodekyyliamiinin, n-prop-2-yyliamiinin, n-but-2-yyliamiinin, n-pent-2-yyliamiinin, n-heks-2-yyliamiinin,
 30 nin, n-hept-2-yyliamiinin, n-okt-2-yyliamiinin, n-non-2-yyliamiinin, n-dek-2-yyliamiinin, n-undek-2-yyliamiinin, n-dodek-2-yyliamiinin, n-heks-3-yyliamiinin, n-hept-3-yyliamiinin, n-okt-3-yyliamiinin, n-non-3-yyliamiinin, n-dek-3-yyliamiinin, n-undek-3-yyliamiinin, n-dodek-3-yyliamiinin,
 35 nin, n-okt-4-yyliamiinin, n-non-4-yyliamiinin, n-dek-4-yyliamiinin, n-undek-4-yyliamiinin, n-dodek-4-yyliamiinin, n-non-5-yyliamiinin, n-undek-5-yyliamiinin, n-dodek-5-yyliamiinin ja n-oktadekyyliamiinin.

Edellä olevassa optiossa (3) amiini (II) ei ole sopivasti amiini, jossa R^2 ja R^3 n valittu vedystä tai C_nH_{2n+1} :stä, jossa n on 1-7, tai bentsyyli tai substituoitu bentsyyli.

5 Edellä olevassa optiossa (3) R^1 sopivat substituenttiryhmät R^4 sisältävät C_{1-6} -alkyylin, kuten metyylin, fenyylin tai optionaalisesti substituoidun fenyylin, karboksyyli- tai sulfonihapporyhmän ja tällaisten happoryhmien johdannaiset, kuten esterit (esim. C_{1-6} -alkyyliesterit) ja amidit, nit-
10 ron ja halogeenin, kuten bromin. Sopivasti m voi olla nol-
la, 1 tai 2 ja R^5 voi olla vety tai metyyli. Sopivasti R^2
ja R^3 voi olla vety tai toinen R^2 :sta ja R^3 :sta voi olla
vety ja toinen voi olla saman yleisen kaavan mukainen aro-
maattinen ryhmä kuten R^1 .

15 Esimerkit tällaisista amiineista käsittävät 1-fenyylietyy-
liamiinin, p-toluidiinin, p-aminobentsoehapon, p-bromiani-
liinin, etyyli-4-aminobentsoaatin (so. bentsokaiini), bent-
syyliamiinin, difenyyliamiinin, p-metyyliaminobentseenisul-
20 fonamidin, m-nitroaniliinin, N,N'-dibentsyylietyleenidi-
amiinin (so. bentsatiini), difenyylimetyyliamiinin, 4-me-
tyylibentsyyliamiinin ja 4-fenyylibutyliamiinin.

Edellä olevassa optiossa (4) rengasjärjestelmä voi olla
25 aromaattinen tai alifaattinen ja monosyklinen tai polysyk-
linen. Sopivasti jokainen rengas järjestelmässä voi sisäl-
tää 5 tai 6 rengasatomia mukaan lukien rengastyyppiatomit
ja mukaan lukien atomit, jotka ovat jakautuneet renkaiden
väliin. Sopivat optionaaliset substituentit rengasjärjes-
30 telmässä käsittävät lisärengasheteroatomit esitettyyn typ-
piatomiin, tällaiset heteroatomit voidaan valita sopivasti
typestä ja hapesta.

Esimerkit tällaisten amiinien luokista käsittävät substitu-
35 oidut piperidiinit ja optionaalisesti substituoidut piperi-
diinit, esimerkiksi jolloin substituentit on valittu alkyy-
listä, hydroksialkyylistä, halogeenistä, aminosta, substi-
tuoidusta aminosta ja aminosubstituoidusta alkyylistä. Täl-
laisten amiinien spesifiset esimerkit käsittävät N-etyyli-

piperidiinin, 2,6-dimetyylipiperidiinin, 2-metyyli-N-hydroksipropyylipiperidiinin (so. syklo-methykaani), 4-metyylipiperatsiinin, 1-metyyli-4-fenyylipiperatsiinin, N-etyylimorfolamiinin, heksametyleeni-imiinin, pyridiinin, 2-propyyliipyridiinin, 3-kloori-2-aminopyridiinin, morfolamiinin, 5 1,5-diatsabisyklo[4,3,0]non-5-eenin, 1,4-diatsabisyklo[2,2,2]oktaanin, pyrrolidonin, kvinuklidiinin ja ksantino-

10 Edellä olevassa optiossa (5) R^4 ja R^5 voivat olla sopivasti vety tai toinen voi olla vety ja toinen alkyyli. R^2 ja R^3 voivat olla sopivasti vety tai alkyyli.

Esimerkit tällaisista amiineista käsittävät etyleenidiamiinin, NN-dietyylietyleenidiamiinin, NN'-di-isopropyylietyleenidiamiinin ja trietyleenitetramiinin. 15

Edellä olevassa optiossa (6) aminohappo voi olla luonnollisesti esiintyvä aminohappo. Aminohappoesterit voivat olla 20 alkyyliiryhmien tai substituoitujen alkyyliiryhmien, kuten bentsyyli, kanssa.

Esimerkit tällaisista amiineista käsittävät arginiinin, ornitiinin, histidiinin, lysiinin, bentsyyliiglysiinin, 3-amino-3-metyylivoihapon, L-etyylilyysiinin L-metyylihistidinaatin, metyyli-N-karbobentsyylioksi-L-lysiinin, metyyli-L-fenyylialanaatin, etyyliiglysyliiglysiinin, etyyli-p-hydroksifenyyliglysiinin, etyyli-p-hydroksi-fenyyliglysiinin, etyyli-L-tyrosiinin, p-metoksibentsyyli-alfa-aminofenyyliasetaatin, n-butyylialfa-aminofenyyliasetaatin, metyyliarginiinin, bentsyyliiglysiinin, bentsyylifenyyliglysiinin, 1-nitrobentsyylifenyyliglysiinin, n-butyylifenyyliglysiinin, p-metoksibentsyylifenyyliglysiinin, etyylifenyyliglysiinin, p-nitrobentsyyli-p-hydroksifenyyliglysiinin, p-nitrobentsyyliiseriinin, n-butyyliseriinin, metyyliarginiinin, dimetyyliglutamaatin, p-nitrobentsyylietyrosiinin, p-nitrobentsyyliiglysiinin, bentsyyliiglysiinin, p-nitrobentsyyli-alfa-amino-p-hydroksifenyyliasetaatin, p-nitrobentsyyli-alfa-aminofenyylia-

taatin, etyyli-alfa-amino-p-hydroksifenyyliasetaatin, etyyli-L-tyrosinaatin.

5 Kun amiini (II) sisältää useamman kuin yhden typpiatomin, klavulaanihappo voi muodostaa suolan yhden tai useamman typpiatomin kanssa, esimerkiksi NN'-di-isopropylietyleenidiamiinidiklavulanaatissa.

10 Edellä mainituista amiineista edullisia amiineja ovat: fenyylietyyliamiini, t-amyyliamiini, t-oktyyliamiini, 1-hydroksi-2-metyyli-2-propyyliamiini, syklopentyyliamiini, sykloheptyyliamiini, 1-adamantaaniamiini, N-etyylipiperidiini, N'N'-di-isopropyleenietyleenidiamiini ja NN-dimetyylisykloheksyyliamiini.

15 Lisäkohteessa esillä oleva keksintö saa aikaan menetelmän klavulaanihapon tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan tai esterin valmistamiseksi ja/tai puhdistamiseksi, joka menetelmä käsittää:

- 20
- i) epäpuhtaan klavulaanihapon tai sen labiilin johdannaisen saattamiseen kosketukseen liuoksena orgaanisessa liuottimessa kaavan (II) mukaisen amiinin tai sen labiilin johdannaisten kanssa,
 - 25 ii) kaavan (II) mukaisen amiinin kanssa muodostetun klavulaanihapon suolan eristämisen ja
 - iii) täten muodostuneen suolan muuttamisen klavulaanihapoksi tai sen farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi tai esteriksi.

30 Esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä klavulaanihapon suolaa amiinin (II) kanssa voidaan käyttää epäpuhtaan klavulaanihapon puhdistamiseen sen valmistuksen aikana. Siksi suola voidaan muodostaa klavulaanihapon tai sen labiilin johdannaisen liuoksessa, joka sisältää epäpuhtauksia, eristämällä suola erillisenä vaiheena, esim. kiinteänä sakkana, liuoksesta, joka sisältää jäännösepäpuhtauksia, 35 muodostamalla sitten uudestaan klavulaanihappo tai muodos-

tamalla sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola tai esteri.

Sopivat klavulaanihapon labiilit johdannaiset käsittävät
5 suolat, esim. alkalimetallisuolan, kuten litium- tai natriumklavulanaatin, tai esterit, kuten silyyliesterit. Sopivat amiinin (II) labiilit johdannaiset käsittävät suolat, kuten fosfaatin, boraatin, kloridin, kloraatin, perkloraatin, bromidin, tolueenisulfonaatin tai alkanooatit, kuten
10 asetaatti- tai etyyliheksanoaatin. Sopivasti amiini (II) itsessään saatetaan kosketuksiin epäpuhtaan klavulaanihapon itsensä kanssa liuoksena orgaanisessa liuottimessa.

Edellä oleva menetelmä suoritetaan sopivasti orgaanisessa
15 liuottimessa, joka vaikkakin se on edullisesti kuivaa, esimerkiksi sisältää alle 6 g/l, esim. 0,25-0,6 g/l vettä, se voi sisältää hieman vettä liuottimena klavulaanihapolle ja amiinille (II). Sopiva kuivuusaste saavutetaan konventionaalaisella vedenpoistomenetelmällä, kuten sentrifugoimalla.
20 Liuottimessa oleva vesi voidaan liuottaa tai se voi olla tippojen muodossa erillisenä faasina.

Klavulaanihapon liuos orgaanisessa liuottimessa voidaan saada uuttamalla happamaksi tehty klavulaanihapon vesiliuos,
25 os, kuten edellä mainittu fermentointineste. Klavulaanihapon alkulähde on liemi, joka saadaan klavulaanihappoa tuottavan mikro-organismien, kuten aiemmin mainittujen, fermentoinnista, sitten klavulaanihapon sopivan konsentraation liuotinuutteen saamiseksi käytettäväksi tässä menetelmässä
30 voi olla toivottavaa, ettei lientä itseään uuteta vaan poistetaan vähintään joitakin liemeen suspendoituneista kiintoaineista, esim. suodattamalla ennen uuttamista. Lisäksi voi olla myös toivottavaa esikonsentroida fermentoinnissa saatu klavulaanihapon vesiliuos siten, että esimerkiksi klavulaanihapon vesiliuos on useita kertoja useammin
35 konsentroitua klavulaanihapolta kuin aloitusliemi, esimerkiksi esikonsentroitua konsentraatioon noin 10-100 mg/ml, esim. 10-40 mg/ml, kuten 10-25 g/l klavulaanihappoa.

Sopivat esikonsentroidintimenetelmät käsittävät klavulaanihapon absorboinnin anioninvaihtohartsiin, mitä seuraa klavulaanihapon eluointi siitä elektrolyytin, kuten natriumkloridin, vesiliuoksella ja optionaalisesti suolanpoisto.

5 On myös edullista tehdä vesiliuos happamaksi, esimerkiksi liemi tai esikonsentroituu vesiliuos ennen liuotinuuttoa, esim. pH:hon 1-3, esim. noin pH:hon 1,5-2,5. On myös edullista kuivata orgaaninen liuotin tai poistaa siitä vesi ennen suolan muodostamista amiinin (II) kanssa, esim. alle
10 6 gl:aan vettä. Uuttaminen suodatetaan edullisesti lämpötilassa 5-15 °C.

Sopivat orgaaniset liuottimet, joissa klavulaanihappo voidaan saattaa kosketuksiin amiinin (II) kanssa, käsittävät
15 hiilivetyliuottimet, kuten tolueenin ja heksaanin, eetterit, kuten tetrahydrofuraanin, dioksaanin, dietyylieetterin, halogenoidut liuottimet, kuten dikloorimetaanin ja kloroformin, ketonit, kuten asetonin ja metyyli-isobutyylketonin, ja esterit, kuten etyyliasetaatin. Liuottimet,
20 jotka käsittävät karbonyyliryhmät, esimerkiksi ne, joilla on kaava (III):



(III)

jossa R⁸ on C₁₋₆-alkyyliiryhmä tai C₁₋₆-alkoksiiryhmä ja R⁹ on C₁₋₆-alkyyliiryhmä, ovat esimerkkejä sopivien liuottimien,
30 en, esimerkiksi ketonien tai orgaanisten alkanoaattiesterien alaluokasta. Esillä oleva keksintö käsittää myös tällaisten liuottimien seokset.

Sopivimmin orgaaninen liuotin on sellainen, jota voidaan
35 käyttää suoraan happamaksi tehdyn, vesipitoisen uuttamiseen, esimerkiksi orgaaniset alkyylialkanoaattiesterit, ketonit ja tietyt alifaattiset alkoholit tai niiden seokset, kuten etyyliasetaatin, metyyliasetaatin, propyyliasetaatin, n-butyliasetaatin, metyylietyyliketoni, metyyli-isobutyliketoni, tetrahydrofuraani, butanoli ja tällai-
40

set. Sopivat amiinin (II) liuottimet käsittävät ne edellä mainitut, joihin klavulaanihappo voidaan liuottaa tai uut-
taa, esimerkiksi asetonin, etyyliasetaatin, metyyli-isobu-
tyyliketonin ja metyylietyyliketonin.

5

Näyttää olevan erityisen toivottavaa sisällyttää liuotin-
järjestelmään ketoneja, kuten asetoni, koska ne näyttävät
estävän klavulaanihapon suolan muodostumisen amiinin (II)
kanssa muodostumisen öljynä.

10

Yleensä klavulaanihapon suolan valmistamiseen käytetään
yksi ekvivalentti amiinia (II) tai lievä ylimäärä sitä moo-
lia klavulaanihappoa kohti. Klavulaanihapon ja amiinin (II)
liuokset voidaan esimerkiksi sekoittaa hitaasti sekoitta-
malla ja seosta sekoitetaan jonkin aikaa lisäämisen loppu-
misen jälkeen. Klavuliinihapon tai sen labiilin johdannai-
sen välinen reaktio suoritetaan sopivasti lämpötilassa,
joka on alle ympäristön lämpötilan, esimerkiksi 0-15 °C,
esim. 0-10 °C, esim. -5 °C. Sopiva klavulaanihapon tai sen
labiilin johdannaisen konsentraatio liuoksessa on vähintään
1,0 g/l, esimerkiksi alueella 1,0-4,0 g/l klavulaanihappoa.
Voi olla edullista konsentroida liuotinuute edelleen kon-
sentraatioon sen ylimääränä, esim. yli 20 g/l.

25 Esimerkiksi toisessa menetelmässä amiini (II) voidaan si-
sällyttää sekoittamalla klavuliinihapon liuoksen virtaan
liuottimessa siten, että suola muodostuu virtaan joko suo-
lan liuoksena tai partikkeleina tai suspendoituna liuonneen
suolan tippoina suspensiossa. Tällä tavalla sisällytetty
30 amiini (II) voi olla sisällytetty sekoittamattomana tai se
voidaan sisällyttää liuoksena liuottimessa, esimerkiksi
samassa orgaanisessa liuottimessa kuin johon klavulaanihap-
po on liuotettu.

35 Sitten haluttu klavulaanihapon suola amiinin (II) kanssa
voidaan eristää. Tällä tavalla klavulaanihapon suola amii-
niin (II) kanssa erotetaan melkein kaikista tai kaikista
epäpuhtauksista. Eristäminen voidaan suorittaa konventio-

naalisella tavalla, esimerkiksi sentrifugoimalla tai suodattamalla.

Vaihtoehtoisessa erotusmenetelmässä klavulaanihapon suola
5 amiinin (II) kanssa voidaan eristää orgaanisesta liuottimesta, jos liuotin on kokonaan tai osittain veteen liukenevatonta, saattamalla liuotin kosketukseen veden kanssa suolan uuttamiseksi, joka voi olla liuoksena tai suspensiossa, orgaanisesta liuottimesta ja suolan vesiliuoksen muodostamiseksi. Koska klavulaanihapon suolat amiinin (II) kanssa
10 ovat melko veteen liukenevia, tällainen vesiliuos voi olla hyvin konsentroitunutta, esim. noin 20-30 prosenttia paino:paino.

15 Tällä tavoin klavulaanihapon orgaanisessa liuottimessa oleva orgaanisten epäpuhtauksien massa jää orgaaniseen liuottimeen, kun taas klavulaanihappo, joka on suolansa muodossa amiinin (II) kanssa, saadaan suhteellisen puhtaassa tilassa vesiliuoksena. Siten muodostuneen klavulaanihapon vesiliuos
20 voidaan alistaa konventionaaliseen lisäkäsittelyyn, kuten puhdistus, tai klavulaanihapoksi tai sen farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi tai esteriksi muuttamiseen jäljempänä kuvatusti.

25 Toisessa vaihtoehtoisessa tai lisämenetelmässä klavulaanihappo ja amiini voidaan sekoittaa liuoksena ensimmäiseen orgaaniseen liuottimeen, sitten aiheutetaan suolan eroaminen liuoksesta lisäämällä toista orgaanista liuotinta. Ensimmäinen orgaaninen liuotin voi olla sopivasti orgaaninen
30 esteri, kuten etyyliasettaatti, ja toinen liuotin voi olla esimerkiksi halogenoitu liuotin, kuten klororoformi, eetteri, kuten dietyylieetteri, hiilivety, kuten tolueni, alkoholi, kuten etanoli, tai edellä olevan kaavan (III) mukainen liuotin, kuten asetoni tai metyyli-isobutyylilike-
35 toni.

Joidenkin edellä mainittujen klavulaanihapon suolojen uskotaan olevan uusia yhdisteitä ja ne ovat sellaisenaan tämän keksinnön lisäkohde, esimerkiksi klavulaanihapon suolat

fenyylietyyliamiinin, t-amyyliamiinin, 1-hydroksi-2-metyyli-2-propyyliamiinin, syklopentyyliamiinin, sykloheksyyliamiinin, 1-adamataaniamiinin, N-etyylipiperidiinin, NN-dimetyylisykloheksyyliamiinin ja NN'-di-isopropylietyleenidiamiinin kanssa.

Tämän keksinnön eräässä suoritusmuodossa klavulaanihapon suolaa amiinin (II) kanssa voidaan käyttää asetonisolvaattina. Asetonisolvaateilla on joissakin tapauksissa edulliset stabiilius- ja puhtauspiirteet verrattuna klavulaanihapon suoloihin amiinien itsensä kanssa. Tällaiset solvaattit ovat erityisen käyttökelpoisia esillä olevassa keksinnössä, koska ne voidaan eristää usein erittäin puhtaana ja vakaana kiteisenä yhdisteenä.

Näin ollen esillä oleva keksintö saa aikaan myös klavulaanihapon suolan amiinin (II) kanssa asetonisolvaatin muodossa. Eristämisen ja/tai kuivaamisen aikana hieman asetonia voi kadota, koska liuottamisen voimakkuus ei voi olla suuri, mutta asetonin määrä tuotteessa ei ole kriittinen.

Asetonisolvaatti voidaan muodostaa saattamalla klavulaanihappo kosketukseen amiinin (II) kanssa asetonin läsnäollessa. Yleensä klavulaanihappoa sisältävään liuokseen voidaan sekoittaa vähintään sama tilavuus asetonia yhdessä amiinin (II) kanssa, jos suola saostetaan.

Amiini (II) voidaan liuottaa asetoniin ja siihen voidaan sekoittaa klavulaanihapon liuosta orgaanisessa liuottimessa. Edulliset orgaaniset liuottimet käsittävät etyyliasetaatin, tetrahydrofuraanin, metyylietyyliketonin, metyyli-siobutyliketonin ja tällaisten liuottimien seokset, joista etyyliasetaatti on edullinen. Vaihtoehtoisesti klavulaanihapon suolan vesiliuokseen amiinin (II) kanssa, joka on saatu edellä kuvatusti vesiuuttona, voidaan sekoittaa asetonia solvaatin muodostamiseksi. Konsentroituu suolan vesiliuokseen voidaan sekoittaa sopivasti ylimäärä asetonia solvaatin muodostamiseksi.

Klavulaanihapon suolan tai asetonisolvaatin uudelleenkiteyttämisen voi olla edullista epäpuhtaustason vähentämiseksi edelleen. Uudelleenkiteyttämiseen sopiva liuotin on asetonin vesiliuos. Tällainen uudelleenkiteyttämisen suoritetaan konventionaalilla tavalla, esimerkiksi suola tai solvaatti liuotetaan veteen, se käsitellään pienellä määrällä asetonia, suodatetaan ja käsitellään sitten suuremmilla tilavuuksilla asetonia sekoittaen ja/tai jäähdyttäen optionaalisesti uudelleenkiteytyneen tuotteen saamiseksi.

10

Eräässä kohteessa esillä oleva keksintö saa aikaan menetelmän klavulaanihapon tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan tai esterin valmistamiseksi, joka menetelmä käsittää klavulaanihapon suolan kaavan (II) mukaisen amiinin kanssa muuttamisen klavulaanihapoksi tai sen farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi tai esteriksi.

Tämän keksinnön mukaisella menetelmällä valmistetut klavulaanihapon farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat ja esterit käsittävät ne, jotka on kuvattu GB-1508977:ssä ja 1508978:ssa ja jotka sisällytetään tähän viitteeksi.

Erityisen sopivat farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat käsittävät farmaseuttisesti hyväksyttävät alkali- ja maalkalimetallisuolat, esimerkiksi, natrium-, kalium-, kalsium- ja magnesiumsuolat. Näistä suoloista natrium- ja kaliumsuolat ovat sopivimpia ja kalium on edullinen.

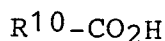
Sopivat esterit klavulaanihapon tai sen suolan aikaansaamiseksi käsittävät ne, jotka ovat kemiallisilla menetelmillä, kuten vetyhajotuksella tai biologisilla menetelmillä pilkkoutuvia.

Klavulaanihapon suola amiinin (II) kanssa, joka on optionaalisesti asetonisolvaattinsa kanssa, voidaan muuttaa klavulaanihapoksi tai sen farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi tai esteriksi esimerkiksi ionikorvauksella vapaiden happojen tai suolojen tapauksessa tai esteröimällä.

Ionikorvaus voidaan suorittaa käyttämällä ioninvaihtohartseja, esimerkiksi viemällä suolaliuos natrium- kalium- tai kalsiummuodossa olevan kationinvaihtohartsinpatjan läpi. Sopivat kationinvaihtohartsit käsittävät Amberlite IR120:n ja ekvivalenttihartsit.

Vaihtoehtoisesti ionikorvaus voidaan suorittaa reagoittamalla protonoitu amiinikationi suolaprekursoriyhdisteen kanssa, joka voi olla emäs, esimerkiksi farmaseuttisesti hyväksyttävän alkali- tai maa-alkalimetaalin karbonaatti, bikarbonaatti tai hydroksidi, tai orgaanisen karboksyylihapon suola farmaseuttisesti hyväksyttävän kationin kanssa, kuten alkali- tai maa-alkalimetaali, esimerkiksi alkaanihapon suola, jolla on kaava (IV):

15



jossa R^{10} on alkyyliryhmä, joka sisältää esimerkiksi 1-20 hiiliatomia, edullisesti noin 1-8 hiiliatomia. Esimerkit sopivista suoloista käsittävät asetaatti-, propionaatti- tai etyyliheksanoaattisuolat kalium-2-etyyliheksanoaatin ja natrium-2-etyyliheksanoaatin ollessa edullinen. Tyypillisesti klavulaanihapon suola amiinin (II) kanssa liuoksena voidaan reagoittaa alkalimetallin suolan kanssa, jossa on happoa (IV), liuoksena tai suspensiona sopivassa liuottimessa, joka voi olla esimerkiksi orgaaninen liuotin, vesi tai veden ja orgaanisen liuottimen, kuten isopropanoli, seos. Klavulaanihapon suolan, jossa on amiinia (II), ja suolaprekursoriyhdisteen sopivat liuokset voidaan sekoittaa ja farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan annetaan kiteytyä. Sopiva reaktio voidaan suorittaa lämpötilassa, joka on alle ympäristön lämpötilan, esim. 0-15 °C, esim. 0-10 °C, sopivasti 0-0,5 °C. Jos klavulaanihapon suola amiinin (II) kanssa muodostetaan sopivasti vesiliuoksena, se voidaan saostaa sekoittamalla vesiliuokseen ylimäärä asetonia.

Sopivat esteröintimenetelmät käsittävät:

a) klavulaanihapon suolan, jossa on amiinia (II), reagoittamisen kaavan $Q-R^{11}$ mukaisen yhdisteen kanssa, jossa Q on

helposti syrjäytyvissä oleva ryhmä ja R¹¹ on orgaaninen ryhmä.

- b) klavulaanihapon suolan, jossa on amiinia (II), reagoittamisen alkoholin tai tiolin kanssa kondensaatiota edistävään aineeseen, kuten karbodiimidin, läsnäollessa, ja
- 5 c) klavulaanihapon suolan, jossa on amiinia (II) reagoittamisen diatsoyhdisteen kanssa.

Edellä olevat menetelmät kattavat ne kohteet, joissa klavulaanihapon suola amiinin (II) kanssa muutetaan klavulaanihapoksi tai sen toiseksi suolaksi ja sen jälkeen se muutetaan halutuksi esteriksi. Esteriröintimenetelmien lisäyksityiskohtia on selostettu GB-1508977:ssä ja 1508978:ssa. Esillä olevan keksinnön käyttö mahdollistaa klavulaanihapon suolojen ja estereiden saamisen helpommin puhtaassa muodossa kuin GB-1508977:n ja 1543563:n menetelmien toiminnossa.

Keksintöä selostetaan nyt esimerkin avulla.

20 Esimerkki 1

Jokainen seuraava menetelmä oli sama, amiini sekoitettiin klavulaanihappoon liuoksena THF:ssä ja havaittiin nopea kiteytyminen kiintoaineen muodostumiseksi.

25	Amiini	Komentit	Suolan stabiilius
	D-(+)-alfafenylietyyliamiini	kiteinen	vakaa > 70 h, 20 °C,
	t-oktyyliamiini	kiintoaine	50 % huoneenlämpötila,
		kiteinen	vakaa >70 h, 20 °C
			50 % huoneenlämpötila
30	1-hydroksi-2-metyyli-2-propyyliamiini	kiteinen	
	syklopentyyliamiini	suola	
		kiteinen suola	50 % huoneenlämpötila, tummuu 72 h kuluttua
	sykloheptyyliamiini	kiteinen suola	50 % huoneenlämpötila, tummuu 72 h kuluttua
35	1-adamantaaniamiini	kiteinen suola	50 % huoneenlämpötila, 20 °C:ssa vakaa >70 h
	N-etyylipiperidiini	kiteinen suola	50 % huoneenlämpötila, 20 °C:ssa vakaa >70 h

	N,N-dimetyylisykloheksyyliamiini	kiteinen suola	50 % huoneenlämpötila, 20 °C:ssa vakaa >90 h
	ammoniakki	kiteinen suola	>70 h, 50 % huoneen
5			haalistumista
	ksantinoli	valkea kiintoaine	hygroσκοoppinen
	trietyleenitetramiini	kalpea keltainen kiintoaine	pieni analyysi
10	p-metoksibentsyyli- alfa-aminofenyli- asettaatti	kiinteä suola	valkoinen 16 h kuluttua kuivassa ilmakehässä, huoneenlämpötilassa, keltainen 16 h kuluttua, 50 % huoneenlämpötila
15	n-butyylialfa-amino- fenyyliasettaatti	kiinteä suola	valkoinen 16 h kuluttua kuivassa ilmakehässä, oranssi 16 h kuluttua 50 % huoneenlämpötilassa
20	metyyliarginaatti	kiinteä suola	valkoinen 16 h kuluttua kuivassa ilmakehässä, 100 ° lämpötilassa, oranssi 16 kuluttua 50 % huoneenlämpötilassa

Esimerkki 2

25 Seuraavassa muodostettiin klavulaanihapon suola amiinin kanssa liuoksena ensimmäisessä liuottimessa ja sitten se saatettiin eroamaan liuoksesta kiinteänä sakkana sekoittamalla toista orgaanista liuotinta.

30 2a. t-oktyyliamiini

Klavulaanihapon varastoliuos etyyliasetaatissa, joka sisältää noin 8 g/l klavulaanihappoa epäpuhtaassa muodossa, valmistettiin uuttamalla epäpuhdas *S. clavuligerus* -fermentointiliemi etyyliasetaatilla. 46 ml:aan tätä lisättiin t-oktyyliamiinia (0,84 g). Kymmenen minuutin kuluttua seos tuli sameaksi ja suolan hienoja kiteitä kiteytyi pois. Liuoksen alikvoottiin lisättiin kloroformia, mikä sai aikaan suurempien neulasten muodostumisen. Toiseen alikvoottiin lisättiin asetonia, mikä sai aikaan edelleen neulaskiteiden

muodostumisen, mutta pienempien ja vähemmän nopeasti kuin kloroformilla. Loppulioukseen lisättiin noin 20 ml kloroformia, sitten asetonia tilavuus, joka on suunnilleen yhtäläinen liouksen alkumassan kanssa, joka saatiin aikaan neulaskiteiden oleellisen määrän saostuksessa.

2b. Disykloheksyyliamiini

46 ml:aan varastoliuosta, joka valmistettiin kuten edellä 2a:ssa, lisättiin disykloheksyyliamiinia (1,18 g). Tämä sai aikaan kirkkaan liouksen. Asetonia lisättiin yhteen alikvoottiin muodostaen hieno amorfinen kerrostuma.

2c. Ammoniakki

500 ml:aan varastoliuosta, joka valmistettiin kuten edellä 2a:ssa, lisättiin ammoniakkia (21,1 ml 2,5 M ammonium-2-etyylioksanoattia etyyliasetaatissa, so. noin 1 ekvivalentti). 50 ml:n teollista metyloitua pirtua (IMS) lisääminen sai aikaan hienojen neulasten saoksen helpon muodostumisen. Huomattiin, että käytettäessä klavulaanihapon epäpuhdasta liuosta, joka ilmeni liouksen väristä, lioukseen jäi värillisiä epäpuhtauksia huomattava määrä. Saanto 75 %:

2d. N,N-dimetyylisykloheksyyliamiini

500 ml:aan varastoliuosta, joka valmistettiin kuten edellä 2b:ssä, lisättiin N,N-dimetyylisykloheksyyliamiinia (6,7 ml). Lisäämisen alussa muodostui öljy. Asetonia lisättiin asteittain, mikä sai aikaan samean liouksen. Tämän samean liouksen alikvootti otettiin ja siihen lisättiin dietyylieetteriä, mikä sai aikaan kiteytymisen. Dietyylieetteriä (100 ml) lisättiin liouksen päämassaan, mikä sai aikaan välittömän kiteytymisen. Kiteet (13,4 g) suodatettiin ja pestiin asetonilla.

2e. t-oktyyliamiini

500 ml:aan varastoliuosta, joka valmistettiin kuten edellä 2a:ssa, lisättiin t-oktyyliamiinia (6,7 g). Liuos tuli hie-man utuiseksi. Asetonia (20 ml) lisättiin, mikä kirkasti liouksen. Liuoksen alikvoottiin lisättiin dietyylieetteriä,

mikä sai aikaan välittömän kiteytymisen. Dietyylieetteriä (55 ml) lisättiin liuoksen päämassaan, mikä sai aikaan kiteytymisen. Kiteet suodatettiin ja pestiin asetonilla. Saanto (12,9 g) on klavulaanihapon 77 % talteenotto liuok-
5 sesta.

2f. Bentsatiini

Bentsatiinidiasetaattiin (9,16 g) sekoitettiin natriumhydroksidin vesiliuosta (5N, 10,15 ml). Vesiliuos uutettiin
10 etyyliasetaatilla (55 ml) ja uutu lisättiin klavulaanihapon varastoliuokseen, joka valmistettiin kuten edellä 2a:ssa (1,0 l). Aluksi muodostui öljy. Asetonia (600 ml) lisättiin ja muodostui kiteitä (Noin 10 ml dietyylieetteriä lisättiin jäännöksenä testiputkikokeesta). Sitten lisättiin
15 metyyli-isobutyryliketonia (200 ml) ja sitten seos tehtiin 2 l:ksi asetonilla. Muodostuneet kiteet suodatettiin ja pestiin asetonilla. Saanto oli 11,5 g, joka on klavulaanihapon 59,1 % talteenotto liuoksesta.

20 Esimerkki 3

Klavulaanihapon liuos etyyliasetaatissa (noin 20 µg/ml) laimennettiin yhtäläisellä tilavuudella asetonia. t-oktyyliamiinin asetoniliuos (1,25 moolin ekvivalentit) lisättiin sitten tipoittain yli puolessa tunnissa 10 °C:ssa. 1 tunnin
25 lisäsekoittamisen jälkeen saostuneet kiteet kerättiin, pestiin asetonilla ja kuivattiin tyhjiössä.

Sakka muodostui melko helposti ja se oli väriltään valkoista. Saanto (korjattu puhtaudeltaan) 0 75 %.

30

Esimerkki 4

0,012 M bentsyyliklavulanaatin liuos THF:ssä hydrattiin katalyyttisesti klavulaanihapon liuoksen muodostamiseksi THF:ssä. Tähän liuokseen (100 ml) lisättiin 1-aminoadama-
35 taania (25 ml 0,012 M THF:ssä) ympäristön lämpötilassaa. Esiintyi nopea kiteytyminen. Liuosta sekoitettiin ympäristön lämpötilassa 30 minuuttia, sitten 5 °C:ssa kaksi tuntia. Sitten liuos suodatettiin ja kiteet pestiin ja kuivat-

tiin. Saanto = 83 %. Suolan sulamispiste oli 190-192 °C (d).

Esimerkki 5

5 Bentsyyliklavulanaatti (puhdistettu Sephadex-kromatografi-
alla, 20 g, 0,07 moolia) liuotettiin tetrahydrofuraaniin
(tislattu kalsiumhydridistä, 400 ml) ja 10-%:ista palladi-
umia hiilikatalyytillä (5,7 g) lisättiin. Seosta hydrattiin
sekoittaen ympäristön lämpötilassa noin 103,42 kPa:ssa noin
10 20-30 minuuttia. Reaktion tila arvioitiin ohutkerroskroma-
tografialla käyttäen piidioksidilevyjä, jotka kehitettiin
etyyliasetaatilla ja visualisoitiin käyttäen trifenyylitet-
ratsoliumkloridisprayreagenttia. Klavulaanihappo Rf 0,0,
bentsyyliesteri 0,4.

15

Reaktioseos suodatettiin ja suodatustyyny pestiin hyvin.
Yhditetyt filtraatit (~500 ml), jotka sisältävät klavulaa-
nihappoa, käsiteltiin sekoittamalla 2-amino-2,4,4-trimetyy-
lipentaanilla (9,0 g, 0,07 moolia) kuivassa tetrahydrofu-
raanissa (50 ml). Kiteytyminen havaittiin yhdessä minuutis-
sa. Seosta sekoitettiin 0,5 tuntia ympäristön lämpötilassa
ja sitten 2 tuntia 5 °C:ssa. Tuote suodatettiin pois, pes-
tiin kuivalla tetrahydrofuraanilla (100 ml) ja kuivattiin
20 tyhjässä 12 tuntia 23,0 g:n 100 % otsikkosuolaa tuottami-
25 seksi, jonka sulamispiste on 160-170 ° (d).

Esimerkki 6

Saostaminen suoritettiin kuten esimerkissä 5 käyttäen bent-
syyliklavulanaattia (0,9 g, 0,003 moolia) ja käsittelemällä
30 saatu klavulaanihappoliuos 2-amino-2-metyyllipropaanilla
(0,22 g, 0,003 moolia) kuivassa tetrahydrofuraanissa (10
ml). Otsikkosuolan 0,6 g, 73 % saanto, sulamispiste oli
150-152 °(d).

35 Esimerkki 7

Valmistaminen suoritettiin kuten esimerkissä 5 käyttäen
bentsyyliklavulanaattia (0,9 g, 0,003 moolia) ja käsitte-
lemällä saatu klavulaanihappoliuos D(+)-1-metyyllibentsyyli-
amiinilla kuivassa tetrahydrofuraanissa (10 ml). Seosta

varastoitiin 5 °C:ssa kaksi päivää, jona aikana esiintyi hidas kiteytyminen. Suodattaminen tuotti otsikkosuolan 0,6 g, 62 % saanto, sulamispiste oli 125 °(d).

5 Esimerkki 8

Litiumklavulanaatin vesiliuokseen sekoitettiin alkyylimoniumfosfaatin vesiliuosta. Saostunut litiumfosfaatti suodatettiin pois ja amiiniklavulanaattisuola saostettiin lisäämällä asetonia. Havaittiin, että voidaan käyttää myös
 10 natriumklavulanaattia, mutta silloin täytyy lisätä etanolia natriumfosfaatin erottumisen edistämiseksi. Myös amiinihydroklorideja voidaan käyttää. 2

Tällä tavalla käytetään litiumklavulanaattia N-etyylipiperidiiniklavulanaatin valmistamiseen.
 15

Esimerkki 9

Klavulaanihapon epäpuhtaaseen liuokseen, joka on raakauute *S. clavuligerus*-fermentointiliemestä vähäisen esipuhdistuksen ioninvaihdolla jälkeen (500 ml, 21 µg/ml etyyliasetaatissa) sekoitettiin asetonia (150 ml) ja sitä käsiteltiin asteittain N,N-dimetyylisykloheksyyliamiinin (6,7 ml) liuoksella asetonissa (25 ml). Alikvootti poistettiin ja sitä käsiteltiin dietyylieetterillä ja ilmeni välitön kiteytyminen.
 25 Päämassan ympääminen johti nopeaan valkeiden hiutaleiden kiteytymiseen, joka tehtiin täydellisemmäksi lisäämällä eetteriä (110 ml). Amiinisuolet suodatettiin pois ja pestiin asetonilla (3 x 100 ml) ja ilmakeivattiin. Saanto = 13,4 g, 82 % talteenotto, 64,9 % pfa (teoreettinen 61,0
 30 %).

Esimerkki 10

Esimerkissä 9 käytettyyn klavulaanihapon epäpuhtaaseen liuokseen (500 ml, 21 µg/ml), joka sisälsi lisäksi asetonia
 35 (20 ml), lisättiin t-oktyyliamiinia (7,6 g, 1,0 e.g.), mikä tuotti lievän utuisuuden. Dietyylieetterin (55 ml) lisääminen aiheutti amiinisuolet erottumisen hienoina valkoisina kiteinä, jotka suodatettiin pois ja pestiin asetonilla.

Saanto = 12,9 g, 77,2 % talteenotto, 62,9 % pfa (teoreettinen 62,8 %).

Esimerkki 11

5 Klavulaanihapon epäpuhtaaseen liuokseen etyyliasetaatissa (1 l, 10,14 µg/ml), joka saatiin uuttamalla *S. clavuligerus*-fermentointiliemi etyyliasetaatilla ja esipuhdistamalla hieman ioninvaihdolla, sekoitettiin asetonia (600 ml) ja sitä käsiteltiin bentsatiinilla (6,15 g) etyyliasetaatissa
 10 (55 ml). Seos alkoi kiteytyä, kun bentsatiinin lisäys läheni loppua. Metyyli-isobutyryliketonia (200 ml) lisättiin sitten saostumisen tekemiseksi täydellisemmäksi. Kiteet suodatettiin pois ja pestiin asetonilla (3 x 100 ml). Saanto = 11,5 g, 67 % talteenotto.

15

Esimerkki 12

Esimerkin 11 menetelmä toistettiin käyttämällä epäpuhdasta, märkää (noin 1 % vettä) klavulaanihapon liuosta etyyliasetaatissa. Tämän liuoksen 1 litran erien erottamiseksi lisättiin sekoittamalla ylimäärä puhdasta etyleenidiamiinia,
 20 NN'-dietyylietyleenidiamiinia ja NN'-di-isopropylietyleenidiamiinia kunkin amiinin ollessa määrän ylimääränä, jota tarvitaan diammoniumsuolan muodostamiseksi klavulaanihapon kanssa. Jatkuvan sekoittamisen jälkeen muodostui suolan
 25 saos. Toinen kidesato saatiin lisäämällä ylimäärä asetonia. Saostunut diammoniumsuola suodatettiin pois ja pestiin asetonilla.

Jokaisen täten muodostuneen diammoniumsuolan kiteet muutettiin kaliumklavulanaatiksi liuottamalla suola minimimäärään
 30 vettä, mitä seurasi kalium-2-etyyliheksanoatin ylimäärän liuoksen isopropyylialkoholissa lisääminen. Jatkuvan sekoittamisen jälkeen muodostui kaliumklavulanaatin sakka ja se suodatettiin, pestiin isopropyylialkoholilla ja kuivatettiin.
 35

Esimerkki 13

Klavulaanihapon liuosta (0,0046 moolia) tetrahydrofuraanis-
 sa (30 ml) käsiteltiin trimetyyliamiinin liuoksella (1,0 ml

25-%:ista paino/til. liuosta, noin 0,0042 moolia), mikä tuotti kalpean keltaisen liuoksen. Kiteyttäminen indusoi-
tiin ymppeämällä ja se päätettiin seisottamalla yön ajan
+4 °C:ssa. Tuote suodatettiin pois, pestiin pienellä tila-
5 vuudella tuoretta liuotinta (noin 5 ml) ja kuivattiin tyh-
jössä. Saanto 0,9 g (75 %), sp. >310°, muuttuu hitaasti
ruskeaksi yli 130 °C:ssa.

Testi B 24641: Havaittu C, 51,32, H, 7,15, N, 10,68 %
10 $C_{11}H_{18}N_2O_5$ edellyttää C, 51,16, H, 7,02, N, 10,94 %
Testi A 15230: Imidatsoli 77,2, 76,4 % (laskettu 77,1 %,
noin 99,5 % puhtaus)
Vesi 1,18, 1,34 %

15 Yhdiste (kerman väriset hienot neulaset) pilaantuu seiso-
tettaessa ilmassa useita päiviä, ottaen vettä ja muuttuen
hitaasti keltaiseksi.

Esimerkki 14

20 Edellä olevan yhdisteen kaksi valmistetta sisällytettynä
kumpikin tuotti hieman erilaisen tuloksen. Ensimmäinen
tuotti vettä sisältävän tuotteen saannon laajuudessa, joka
vastaa hemihydraattia, kun taas toinen tuotti oleellisesti
vedettömän materiaalin vaikkakin alhaisena saantona.

25

14A

Klavulaanihappoa (0,00346 moolia) tetrahydrofuraanissa (25
ml) käsiteltiin trimetyyliamiinilla (0,4 g, 0,00346 mooli-
a) ja sekoitettiin homogeenisen kirkkaan liuoksen saamiseksi.
30 Kiteyttäminen pantiin alkuun ymppeämällä ja se päätet-
tiin seisottamalla yön ajan +4 °C:ssa. Tuote suodatettiin
pois ja kuivattiin tyhjössä. Saanto 0,9 g (63 %) suurina
kellertävän valkoisina neulasina.

35 Testi B 24639: Havaittu C, 54,74, H, 7,95, N, 8,94 %
 $C_{14}H_{24}N_2O_5$ edellyttää C, 56,05 H, 8,00, N, 9,33 %
 $C_{14}H_{24}N_2O_5 \cdot 1/2 H_2O$ edellyttää C, 54,36 H, 8,14, N, 9,05 %
Testi A 15220: Imidatsoli 61,0, 61,1 % (laskettu 64,4 %,
noin 95,0 % puhtaus)

Vesi 2,64 % (hemihydraatti edellyttää 12,91 %)

14B

Klavulaanihappoa (0,021 moolia) tetrahydrofuraanissa (60
5 ml) käsiteltiin trimetyyliamiinilla (2,1 g, 0,021 moolia)
ja sekoittaminen tuotti kirkkaan liuoksen, joka ympättiin
autenttisella suolalla. Tuote alkoi kiteytyä pitkinä neula-
sina huoneenlämpötilassa ja prosessi päätettiin +4 °C:ssa.
Tuote kerättiin suodattamalla, pestiin suodattimessa tuo-
10 reella liuottimella (noin 10 ml) ja dietyylieetterillä
(noin 20 ml) ja kuivattiin lopuksi tyhjöissä. Saanto 1,7 g
(27 %).

Testi B 24676: Havaittu C, 56,07, H, 7,83, N, 9,32 %
15 $C_{14}H_{24}N_2O_5$ edellyttää C, 56,05 H, 8,00, N, 9,33 %
 $C_{14}H_{24}N_2O_{5\frac{1}{2}}H_2O$ edellyttää C, 54,36 H, 8,14, N, 9,05 %
Testi A 15268: Imidatsoli 65,1, 65,1 % (laskettu 66,3 %,
noin 98,2 % puhtaus)

Vesi 0,9
20 $[\alpha]_D^{24} +47,0^\circ$ (c=0,2 % vedessä)

Kuten trimetyyliamiinisuolet, tuote pilaantuu seisotettaessa
ilmassa useita päiviä.

25 Nämä kaksi esimerkkiä valaisevat erittäin puhtaiden klavu-
laanihapposuolojen muodostamista orgaanisissa liuottimissa.

Esimerkki 15

Erilliset näytteet esimerkkien 13 ja 14 trimetyyliamiini-
30 klavulanaattia ja trietyyliamiiniklavulanaattia liuotetaan
minimimäärään kylmää vettä. Näihin liuoksiin lisätään ka-
lium-2-etyyliheksanoatin voimakasta liuosta isopropanolis-
sa sekoittamalla. Jatkuvan sekoittamisen jälkeen kaliumkla-
vulanaatin kiteet eroavat ja ne voidaan suodattaa pois,
35 pestä kylmällä isopropanolilla ja kuivata.

Esimerkki 16

Klavulaanihapon epäpuhdas liuos, joka saatiin S. clavulige-
rus-fermentointiliemestä esipuhdistamalla ioninvaihtokroma-

tografiialla tai yleensä edellä kuvatusti, ja joka sisältää noin 17,1 g/l, tehtiin happamaksi pH:hon 2,0 25-%:isella til./til. rikkihapolla, ja sitä uutettiin sitten jatkuvasti etyyliasetaattiin. Etyyliasetattiinute jäädytettiin 2
5 °C:een, siitä poistettiin vesi sentrifugoimalla ja sitten se kuivattiin MgSO₄:llä, sitten se vietiin CPG-hiilipylvään läpi. Tässä vaiheessa etyyliasetaattiinute sisälsi 6,02 g/l klavulaanihappoa ja sitten se konsentroidiin haihduttamalla konsentraatioon 25,7 g/l klavulaanihappoa ja se käytettiin
10 tässä konsentraatiossa. Konsentraatin kosteustaso oli noin 0,26 % til./til.

7,8 ml:aan t-oktyyliamiinia sekoitettiin 25 ml tuoretta etyyliasetaattia. Tämä seos lisättiin hitaasti 2 litraan
15 klavulanaattirikasta etyyliasetaattiinutetta, joka laimennettiin takaisin 23,0 g/l:n tiitteriin tuoreella etyyliasetaatilla nopeasti sekoittaen. Lietettä sekoitettiin edelleen tunti 5 °C:ssa. t-oktyyliamiiniklavulanaatti eristettiin sitten suodattamalla ja pestiin etyyliasetaatilla.
20 Lopullinen kuivaaminen suoritettiin yön ajan tyhjöuunissa 20 °C:ssa typpivuodolla. Tuotepaino 6,13 g.

Esimerkki 17

5 g esimerkissä 16 tuotettua amiinisuolaa liuotettiin 97
25 ml:aan isopropanolia. Tuote ei liennut helposti ja havaittiin tarpeelliseksi käyttää vähäistä lämmitystä 24 °C:een kokonaisliukenemisen aikaansaamiseksi. 14 ml 1,5 N kalium-2-etyyliheksanoaattia isopropanolissa lisättiin 10 minuutin aikana. Sitten lietettä sekoitettiin 1,5 h 5 °C:ssa. Tuote
30 kaliumklavulanaatti suodatettiin sitten pois, pestiin pienillä määrillä isopropanolia, sitten asetonia ja kuivattiin tyhjössä yön ajan typpivuodolla 20 °C:ssa. Tuotepaino - 3,16 g.

35 Esimerkki 18

Suodatettu (RFV) *S. clavuligerus*-fermentointiliemi, joka sisältää 2 g/l klavulaanihappoa, tehtiin happamaksi pH:hon 1,6 25-%:isella til./til. rikkihapolla, ja sitä uutettiin jatkuvasti etyyliasetaattiin. Liuotinuute jäädytettiin 3

°C:een, siitä poistettiin vesi sentrifugoimalla ja sitten se kuivattiin MgSO₄:llä, sitten se vietiin CPG-hiilipylvään läpi. Hiilellä käsitelty uute konsentroidiin haihduttamalla konsentraatioon noin 20 g/l kosteustason ollessa noin 0,06
5 % til./til.

13,5 ml:aan t-oktyyliamiinia sekoitettiin 43 ml tuoretta etyyliasetaattia. Tämä seos lisättiin hitaasti 400 ml:aan klavulanaattirikasta etyyliasetaattiuutetta 20 g/l:n klavulaanihappoa tiitterissä nopeasti sekoittaen. Lietettä sekoitettiin edelleen tunti 5 °C:ssa. t-oktyyliamiiniklavulanaatti eristettiin sitten suodattamalla ja pestiin etyyliasetaatilla. Lopullinen kuivaaminen suoritettiin yön ajan tyhjöuunissa 20 °C:ssa typpivuodolla. Tuotepaino 12,44 g.

15

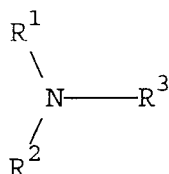
Esimerkki 19

11 g esimerkissä 18 tuotettua amiinisuolaa liuotettiin 213 ml:aan isopropanolia. Tuote ei liuennut helposti edes vähäisen lämmittämisen 24 °C:een jälkeen. Vettä (3,75 ml) lisättiin liukenemisen mahdollistamiseksi. Kun saatiin liuos,
20 lisäisopropanolia lisättiin vesipitoisuuden vähentämiseksi ennen kiteyttämistä. 30 ml 1,5 N 2-etyyliheksanoaattia lisättiin 15 minuutin aikana. Sitten lietettä sekoitettiin 1,5 h 5 °C:ssa. Kaliumklavulanaattituote suodatettiin siten pois, pestiin pienillä määrillä isopropanolia, sitten
25 asetonia ja kuivattiin tyhjössä yön ajan typpivuodolla 20 °C:ssa. Tuotepaino - 7,29 g.

Patenttivaatimukset

1. Klavulaanihapon ja kaavan (II) mukaisen amiinin muodostaman suolan käyttö

5



10

(II)

välituotteena menetelmässä klavulaanihapon tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen ja estereiden puhdistamiseksi, jolloin R^1 , R^2 ja R^3 on valittu seuraavasti:

R^1 on optionaalisesti substituoitu syklinen ryhmä, jolla on yleinen kaava:

15



jossa m on nolla tai kokonaisluku 1-5, R on optionaalisesti substituoitu alifaattinen hiilivetyrengasjärjestelmä, joka sisältää 3-8 rengashiiliatomia, R^4 on vety tai alkyyli, amino- tai hydroksisubstituoitu alkyyli tai substituoitu aminosubstituoitu alkyyli tai saman yleisen kaavan mukainen ryhmä tai R^1 edellä, R^2 ja R^3 voidaan valita samoista ryhmistä, joista R^1 on valittu, tai vedystä, alkyylistä, alkenyylistä, amino- tai hydroksisubstituoidusta alkyylistä tai alkenyylistä tai substituoidusta aminosubstituoidusta alkyylistä tai alkenyylistä, mutta poikkeuksena sykloheksyyliamiini.

30

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että amiini (II) on muu kuin amiini, jossa R^1 on sykloalkyyli-ryhmä ja m on nolla ja R^2 ja R^3 on kumpikin valittu sykloalkyylistä tai vedystä tai C_nH_{2n+1} :stä, jossa n on 1-7.

35

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että amiini (II) käsittää kaksi tai useampia syklisiä ryhmiä R^1 tai fuusioituneen rengasjärjestelmän R^1 tai

substituoituneen rengasjärjestelmän R; tai R² ja R³ ovat muu kuin vety.

4. Patenttivaatimuksen 2 tai 3 mukainen menetelmä, **tun-**
5 **nettu** siitä, että amiini (II) on valittu syklopentyyliamiinista, sykloheptyyliamiinista, NN-dimetyylisykloheksyyliamiinista, disykloheksyyliamiinista, adamantyyliamiinista, NN-dietyylisykloheksyyliamiinista, N-isopropyyliisykloheksyyliamiinista, N-metyylisykloheksyyliamiinista, syklopropyyliamiinista, syklobutyyliamiinista, norbornyyliamiinista ja dehydroabietyyliamiinista.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä klavulaanihapon tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan tai esterin puhdistamiseksi, **tunnettu** siitä, että menetelmä käsittää:

- i) epäpuhtaan klavulaanihapon tai sen labiilin johdannaisen saattamisen kosketukseen liuoksena orgaanisessa liuottimessa kaavan (II) mukaisen amiinin tai sen labiilin johdannaisen kanssa,
- ii) kaavan (II) mukaisen amiinin kanssa muodostetun klavulaanihapon suolan eristämisen ja
- iii) täten muodostuneen suolan muuttamisen klavulaanihapoksi tai sen farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi tai esteriksi.

6. Menetelmä klavulaanihapon tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan tai esterin puhdistamiseksi, **tunnettu** siitä, että menetelmä käsittää klavulaanihapon suolan kaavan (II) mukaisen amiinin kanssa muuttamisen farmaseuttisesti hyväksyttäväksi kaliumklavulanaattisuolaksi.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että farmaseuttisesti hyväksyttävä suola muodostetaan reagoittamalla protonoitu amiinikationi kalium-2-etyyliheksanoaatin tai natrium-2-etyyliheksanoaatin kanssa.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI 67222 Cor D498/04

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB 1578739 Cor D498/04

NO _____

SE _____

US _____

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP 26044 Cor D 498/04 382178 C12p 17/18

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

05.01.98

Elli Mäntikari

Allekirjoitus