

(19)



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(51) Int. Cl.³: C 07 D
C 12 P

499/68
37/00

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



(11)

626 368

(12) PATENTSCHRIFT A5

(21) Gesuchsnummer: 4920/79

(62) Teilgesuch von: 7278/75

(22) Anmeldungsdatum: 05.06.1975

(30) Priorität(en): 05.06.1974 GB 24848/74
19.11.1974 GB 50016/74
19.03.1975 GB 24848/74

(24) Patent erteilt: 13.11.1981

(45) Patentschrift
veröffentlicht: 13.11.1981

(73) Inhaber:
Bristol-Myers Company, New York/NY (US)

(72) Erfinder:
Damiel Bouzard, Franconville (FR)
Abraham Weber, Paris (FR)

(74) Vertreter:
Bovard & Cie., Bern

(54) Verfahren zur Herstellung von
6-D-(-)-alpha-Amino-alpha-(p-hydroxyphenyl)acetamido-penicillansäure.

(57) Die Verbindung wird hergestellt durch Behandeln von 6-D-(-)-alpha-Amino-alpha-(acetoxy-phenyl)acetamido-penicillansäure in wässriger Lösung mit einer Esterase bei einem pH zwischen 5,0 und 7,5, Isolieren des erhaltenen Produktes und gegebenenfalls Überführen der freien Säure oder des Hydrats in das entsprechende pharmazeutisch verträgliche Salz. Die Verbindung hat gute antibiotische Eigenschaften.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von 6-D-(-)- α -Amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido-penicillansäure, eines Hydrats oder eines pharmazeutisch verträglichen Salzes davon, dadurch gekennzeichnet, dass man 6-D-(-)- α -Amino- α -(p-acetoxyphenyl)acetamido-penicillansäure in wässriger Lösung mit einer Esterase bei einem pH zwischen 5,0 und 7,5 behandelt, und das erhaltene Produkt isoliert, wobei gewünschtenfalls die freie Säure oder das Hydrat in das entsprechende pharmazeutisch verträgliche Salz überführt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Citruesterase oder Esterase aus menschlichem Serum, Tiereserum, Weizenkleie, Weizenkeim oder bacillus subtilis in einer Konzentration von 5 bis 10 mg/ml Esterase pro Gesamtvolumen der wässrigen Lösung verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als Esterase Citruesterase oder Esterase aus Weizenkleie oder Weizenkeimen verwendet.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Esterase aus roher Weizenkleie verwendet und die Behandlung bei einem pH zwischen 5,5 und 6,0 oder in Gegenwart eines Puffers bei einem pH von 7,0 und bei einer Konzentration von 10 mg/ml Esterase pro Gesamtvolumen Lösung vornimmt.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von α -Amino- α -(p-hydroxyphenyl)acetamido-penicillansäure, die gute antibakterielle Eigenschaften hat.

Die US-PS 22 985 648 α -Aminobenzylpenicilline und offenbart eine allgemeine Formel für derartige Penicilline, die u. a. niedrige Alkanoylsubstituenten am Benzolring umfasst. Diese Literaturstelle gibt jedoch keine Details über substituierte Verbindungen und es sind keine Beispiele für ihre Herstellung angegeben. Das Dokument zeigt, dass die α -Aminobenzylpenicilline in verschiedenen optischen Formen existieren und es sind Beispiele für die Herstellung sowohl der D- als auch der L-Formen angegeben.

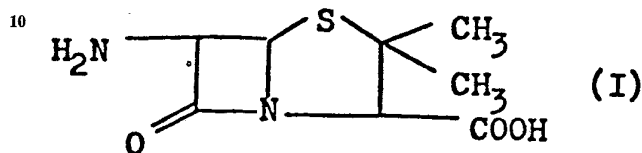
Gegenstand der Erfindung ist ein neues Verfahren zur Herstellung von 6-D-(-)- α -Amino- α -(p-hydroxyphenyl)-acetamidopenicillansäure, eines Hydrats oder eines pharmazeutisch verträglichen Salzes davon, dadurch gekennzeichnet, dass man 6-D-(-)- α -Amino- α -(p-acetoxyphenyl)acetamido-penicillansäure in wässriger Lösung mit einer Esterase bei einem pH zwischen 5,0 und 7,5 behandelt, und das erhaltene Produkt isoliert, wobei gewünschtenfalls die freie Säure oder das Hydrat in das entsprechende pharmazeutisch verträgliche Salz überführt wird.

Erfindungsgemäss wurde gefunden, dass 6-D-(-)- α -Amino- α -(p-acetoxyphenyl)acetamido-penicillansäure, obgleich es in normaler Kochsalzlösung stabil ist, enzymatisch zur bekannten und wirksamen 6-D-(-)- α -Amino- α -(p-hydroxyphenyl)-acetamido-penicillansäure hydrolysiert wird.

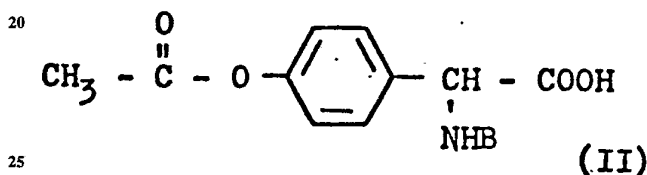
Als Esterase wird vorzugsweise Citruesterase oder aus menschlichem Serum, Tiereserum, Weizenkleie, Weizenkeimen oder bacillus subtilis stammende Esterase verwendet und zwar vorzugsweise bei einer Konzentration von 5 bis 10 mg/ml Esterase pro Gesamtvolumen der wässrigen Lösung. Besonders bevorzugt ist Esterase aus roher Weizenkleie, wobei die Behandlung bei einem pH zwischen 5,5 und 6,0 oder in Gegenwart eines Puffers bei einem pH von 7,0 und bei einer Konzentration von ungefähr 10 mg/ml Esterase pro Gesamtvolumen vorgenommen wird.

Das Produkt wird nach an sich bekannten Verfahren isoliert und gewünschtenfalls in Form einer freien Säure oder eines Hydrats in das entsprechende pharmazeutisch verträgliche Salz überführt.

5 Als Ausgangsprodukt für das erfindungsgemässe Verfahren wird beispielsweise eine 6-D-(-)- α -Amino- α -(p-acetoxyphenyl)acetamido-penicillansäure verwendet, die hergestellt wurde durch Acylierung einer Verbindung der Formel I



oder eines Silylesters oder eines Salzes davon mit einem funktionellen Derivat einer Säure der Formel II



worin B für eine Aminoschutzgruppe steht, Entfernen der Aminoschutzgruppe und wenn die Verbindung der Formel I in Form des Silylesters oder eines Salzes vorliegt, Überführen des erhaltenen Produkts entweder vor oder nach dem Entfernen von B in die entsprechende freie Säure oder in eine pharmazeutisch verträgliche Salz davon.

Es ist bekannt, dass die durch die vorliegende Erfindung hergestellte 6-D-(-)- α -Amino- α -(p-hydroxyphenylacetamido)-penicillansäure (Amoxycillin) ein wirksames antibakterielles Mittel ist, das bei der Behandlung infektiöser Erkrankungen bei Geflügel und Tieren, einschliesslich des Menschen, die durch viele Gram-positive und Gram-negative Bakterien verursacht sind, brauchbar ist.

40 Die nachfolgenden Beispiele erläutern die erfindungsgemässe Herstellung des Amoxycillins.

Beispiel A

Man stellt Lösungen von 0,5 mg/ml 6-D-(-)- α -Amino- α -(p-acetoxyphenylacetamido)-penicillansäure (p-Acetoxy-ampicillin) in normaler Kochsalzlösung und in menschlichem Serum her. Es werden auch Standardlösungen von 0,5 mg/ml 6-D-(-)- α -Amino- α -(p-hydroxyphenylacetamido)-penicillansäure (p-Hydroxyampicillin) sowohl in normaler Kochsalz-
50 lösung als auch in menschlichem Serum hergestellt.

Alle obigen Lösungen werden bei 37°C unter Schütteln inkubiert und es werden in Zeitabständen von 0, 2, 4, 8 und 24 Stunden Proben für die Chromatographie entnommen. Die Lösungen, angenähert 5 Mikroliter/Streifen werden auf
55 Whatman Nr. 1 1,27-cm-Streifen (1-half-inch-strips) aufgetupft, die getrocknet und in einem Lösungsmittelsystem entwickelt werden, das 80 Teile Butylacetat, 15 Teile n-Butanol, 40 Teile Essigsäure und 24 Teile Wasser enthält. Die Streifen werden dann auf Platten bioautographiert, die mit bacillus subtilis bei einem pH von 6,0 besät sind.

Die Biochromatogramme zeigen, dass p-Acetoxyampicillin in menschlichem Serum schnell zur p-Hydroxyform hydrolysiert wird, es erscheint jedoch in normaler Kochsalzlösung stabil zu sein.

Beispiel B

Man stellt die nachfolgenden Lösungen her:
0,5 mg/ml 6-D-(-)- α -Amino- α -(p-acetoxyphenylacet-

amido)-penicillansäure (p-Acetoxyampicillin) in Kochsalzlösung;

0,5 mg/ml p-Acetoxyampicillin in einer Lösung von Citrus-esterase, die mit 0,1 m Kaliumphosphatpuffer auf ein Zehntel verdünnt ist, um den pH bei 7,0 zu halten; und

0,5 mg/ml p-Acetoxyampicillin in einer 10 mg/ml-Lösung roher Weizenkleie (Shiloh), die 0,1 m Kaliumphosphatpuffer enthält.

Alle obigen Lösungen werden unter Schütteln bei 37 °C inkubiert und es werden – wie in Beispiel A beschrieben – Proben für die Chromatographie entnommen.

Diese Biochromatogramme zeigen, dass p-Acetoxyampicillin in Kochsalzlösung stabil ist, jedoch sowohl von Zitrus-esterase als auch von Kleieesterase schnell zur p-Hydroxyform hydrolysiert wird.

Beispiel C

Die nachfolgenden Reaktionsmischungen werden hergestellt, bei 28 °C geschüttelt und man entnimmt Proben in Intervallen von 0, 1/2, 1, 2, 3, 4 und 6 Stunden, wie in Beispiel A beschrieben.

1. 25 mg entfettete Kleie (Weizenkleie von Shiloh erhalten, mit Aceton behandelt und getrocknet), 4,5 ml 0,1 m Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0, und 0,5 ml 5 mg/ml 6-D-(–)-α-Amino-α-(p-acetoxyphenylacetamido)-penicillansäure (p-Acetoxyampicillin) in demselben Puffer.

2. 25 mg entfettete Kleie, 4,5 ml 0,1 m Kaliumphosphatpuffer von pH 7,0 und 0,5 ml 5 mg/ml p-Acetoxyampicillin in demselben Puffer.

3. 25 mg entfettete Kleie, 4,5 ml 0,1 m Kaliumphosphatpuffer von pH 7,5 und 0,5 ml 5 mg/ml p-Acetoxyampicillin in demselben Puffer.

4. 50 mg entfettete Kleie, 4,5 ml 0,1 m Kaliumphosphatpuffer von pH 6,0 und 0,5 ml 5 mg/ml p-Acetoxyampicillin in demselben Puffer.

5. 50 mg entfettete Kleie, 4,5 ml 0,1 m Kaliumphosphatpuffer von pH 7,0 und 0,5 ml 5 mg/ml p-Acetoxyampicillin in demselben Puffer.

6. 50 mg entfettete Kleie, 4,5 ml 0,1 m Kaliumphosphatpuffer von pH 7,5 und 0,5 ml 15 mg/ml p-Acetoxyampicillin in demselben Puffer.

Die Ergebnisse der Biochromatogramme sind in der Tabelle IV gezeigt:

Tabelle IV
% Umwandlung zu p-Hydroxyampicillin

Reaktion Nr.	Reaktionszeiten (Stunden)						
	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%

Man erhält somit optimale Ergebnisse, indem man die Reaktionsmischung Nr. 5 verwendet; die völlige Umwandlung zu p-Hydroxyampicillin ist bei einer Enzymkonzentration von 10 mg/ml und einem pH von 7,0 in 2 Stunden beendet.

Beispiel D

Man stellt die nachfolgende Reaktionsmischung her, die

50 mg entfettete Kleie (Shiloh), 2,5 mg 6-D-(–)-α-Amino-α-(p-acetoxyphenylacetamido)-penicillansäure (p-Acetoxyampicillin) und 5,0 ml Wasser enthält. Die Mischung wird bei ungefähr 28 °C geschüttelt und durch Chromatographie wie in Beispiel 2 beschrieben, nach 1, 2 und 3 Stunden überwacht.

Die Ergebnisse der Biochromatogramme zeigen eine 100%ige Umwandlung von p-Acetoxyampicillin zu p-Hydroxyampicillin in 3 Stunden an. Der pH der Reaktionsmischung bleibt trotz der Abwesenheit von Puffer konstant bei ungefähr 5,7.

Beispiel E

Man vereinigt die nachfolgenden Materialien: 20 g entfettete Kleie (Shiloh), 1,0 g 6-D-(–)-α-Amino-α-(p-acetoxyphenylacetamido)-penicillansäure (p-Acetoxyampicillin) und 2 Liter einer 0,01 m wässrigen Lösung von pH 7,0 Kaliumphosphatpuffer. Die erhaltene Mischung wird bei ungefähr 28 °C gerührt und es wird jede Stunde wie in Beispiel A beschrieben, eine Probe entnommen.

Die Biochromatogrammuntersuchungen zeigen eine 100%ige Umwandlung in 3 Stunden an. Dann wird die Mischung zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird gesammelt, mit Chlorwasserstoffsäure auf pH 4,0 eingestellt und lyophilisiert. Das Lyophilat wird wie oben beschrieben nochmals untersucht, und man stellt fest, dass es angenähert 900 mg p-Hydroxyampicillin enthält.

6,0 g des Lyophilats werden in 20 ml Wasser aufgeschlämmt. Zur erhaltenen Mischung gibt man 6n Chlorwasserstoffsäure zu, um den pH allmählich auf 2,0 zu erniedrigen. Man rührt noch weitere 15 Min., gefolgt vom Abfiltrieren der Feststoffe. Das Filtrat wird mit 1,0 g entfärbender Aktivkohle behandelt, filtriert und das klare Filtrat wird auf einen pH von 4,5 eingestellt. Beim Kratzen der Lösung erfolgt Kristallisation; man lässt diese 1 Stunde erfolgen. Die Kristalle werden auf einem Filter gesammelt, mit Wasser und Aceton gewaschen und dann getrocknet, wobei man 180 mg 6-D-(–)-α-Amino-α-(p-hydroxyphenylacetamido)-penicillansäure-trihydrat mit Zersetzungspunkt 201 °C erhält.

Analyse für C₁₆H₁₉N₃O₅S:

	C	H	N	K.F. H ₂ O
Berechnet:	45,82%	6,01%	10,02%	12,89%
Gefunden:	45,87%	5,71%	10,48%	13,68%

Biologische Daten

In Vivo-Aktivitätsdaten

Es wurden die mittleren heilenden Dosen (CD₅₀) bei Mäusen gegen einen überwältigend lethalen Insult durch verschiedene pathogene Organismen bei 6-[D-(–)-α-Amino-α-(4-hydroxyphenyl)-acetamido]-penicillansäure bestimmt. Die erhaltenen CD₅₀-Daten sind nachfolgend in mg/kg aufgeführt:

Organismus	Verabreichungsweg	CD ₅₀ (mg/kg)
S. aureus Smith	intramuskulär	0,2
	oral	0,9
Sal. enteritidis	intramuskulär	5,4
	oral	4,0
K. pneumoniae	intramuskulär	7
	oral	7
S. enteritidis	oral	3,5

Orale Absorptionsdaten

Es wurden die bei der oralen Verabreichung von 6-[D-(-)- α -Amino- α -(4-hydroxyphenyl)-acetamido]-penicillansäure an Mäuse erhaltenen Blutspiegel bestimmt. Bei der Unter-

suchung wurde an 4 Mäuse oral 30 mg/kg Verbindung verabreicht. Die erhaltenen mittleren Blutspiegel sind nachfolgend aufgeführt:

Zeit (Stunden)	Blutspiegel (γ /ml)
0,5	8,1
1,0	4,0
2,0	1,40
3,5	1,1