

Case BE 8588

Int. Cl.:

C07D

435981

CONCEDIDA

20 DIC. 1976

P A T E N T E
D E
I N V E N C I O N

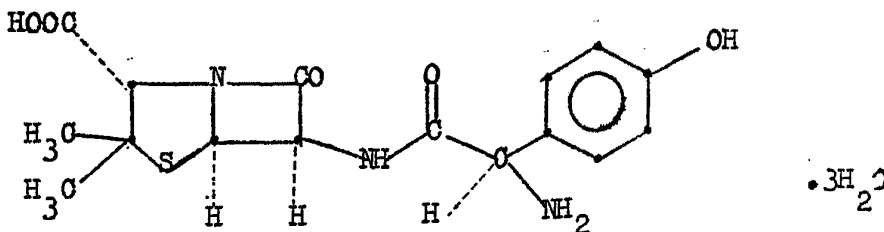
435.981

por "PROCEDIMIENTO PARA LA SINTESIS DE ACIDO 6-[D(-)-ALFA-AMINO-P-HIDROXIFENILACETAMIDO]-PENICILANICO TRIHIDRATO", a favor de la firma italiana ISTITUTO BIOCHIMICO ITALIANO DI LOREDANA LORENZINI S.a.S., residente en Via G. Lorenzini 2 - 4 MILAN (Italia).

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

El trihidrato de ácido 6-[D(-)-alfa-amino-p-hidroxifenilacetamido]-penicilánico (I) es una de las penicilinas semisintéticas más interesantes recientemente descubiertas



(I)

- (A.A.W. Long, J. H. C. Nayler, H. Smith, T. Taylor, N. Ward, J. Chem. Soc. (C) 1971, 1920); ésta se utiliza ampliamente en la actualidad en la terapéutica humana por sus interesantes propiedades biológicas y farmacológicas y se utiliza particularmente como un antibiótico para uso oral ya que es absorbida en un grado considerable en el tracto gastro-intestinal y, por consiguiente, facilita la obtención de elevadas velocidades hemáticas de antibióticos. R.C. Gordon, C. Regamey, W.M.M. Kirby, Antimicrob, Agents Chemother. 1972. 504, R. Sutherland, E.A.P. Croydon, G.N. Rolinson, Brit. Med. J. 3, 13 (1972), H.C. Neu, E.B. Winshell, Antimicrob, Agents Chemother. 1970, 407-423, E.A.P. Croydon, Antimicrob. Agents Chemother. 1970, 427, 15. R. Sutherland, G.N. Rolinson, Antimicrob. Agents Chemother. 1970, 411, P. Acred. Antimicrob. Agents Chemother. 1970, 416, Chem. Eng. News, May 8, 1972. pág. 23, F.G. Middleton, Antimicrob. Agents Chemother. 1973, 25, 20. E.A.P. Croydon, R. Sutherland, Advance Antimicrob. Antineoplastic Chemother. Proc. Int. Congr. Chemother. 7th 1971, pág. 975, A. Acred. P.A. Hunter, L. Mizen Adavan. Antimicrob. Antineoplastic. Chemother. Proc. Int. Congr. Chemother 7th 1971, pág. 969, 25. G.N. Rolinson, Chemotherapy, 1973, 1 K: Lüttecke, Chemotherapy, 1973, 12 H. Burgi, Chemotherapy, 1973, 19 J. Stam, Chemotherapy, 1973, 27

H.H. Vollhaber, *Chemotherapy*, 1973, 34

R. Gómez Luz, *Chemotherapy*, 1973, 47

M. Peromit, *Chemotherapy*, 1973, 52

P. Fiegel, *Chemotherapy*, 1973, 57

5. P. Tan. *Chemotherapy*, 1973, 69,

J.M.C. Guibert, *Chemotherapy*, 1973, 81

M. Kienitz, *Chemotherapy*, 1973, 97,

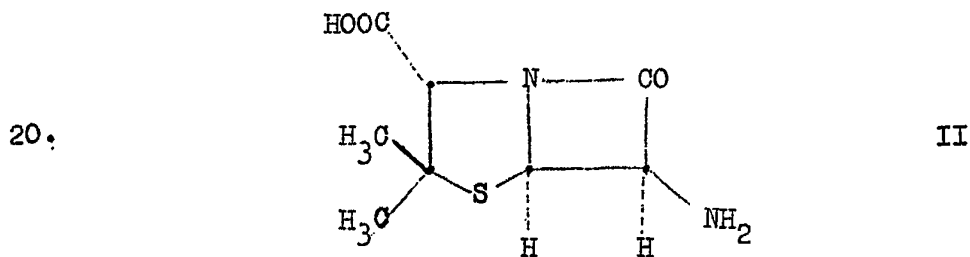
E.A.P. Croydon, *Chemotherapy*, 1973, 112,

G.P. Bodey, *Antimicrob. Agents Chemother*, 1972, 358.

10. EL derivado (I) que contiene la cadena D(-)-p-hidroxifenilglicínica posee mayor actividad antibiótica que los derivados que contienen la cadena L o D, L de p-hidroxifenilglicina.

15. EL trihidrato 6-D(-)-alfa-amino-p-hidroxifenilacetamido-penicilánico (I) se obtiene, de conformidad con el conocimiento actual, según uno de los métodos siguientes:

a) por condensación entre el ácido 6-aminopenicilánico (II)



y uno de los derivados de D(-)-p-hidroxifenilglicina:

25.

1) derivado enamínico (III) o derivado carbobenciloxílico

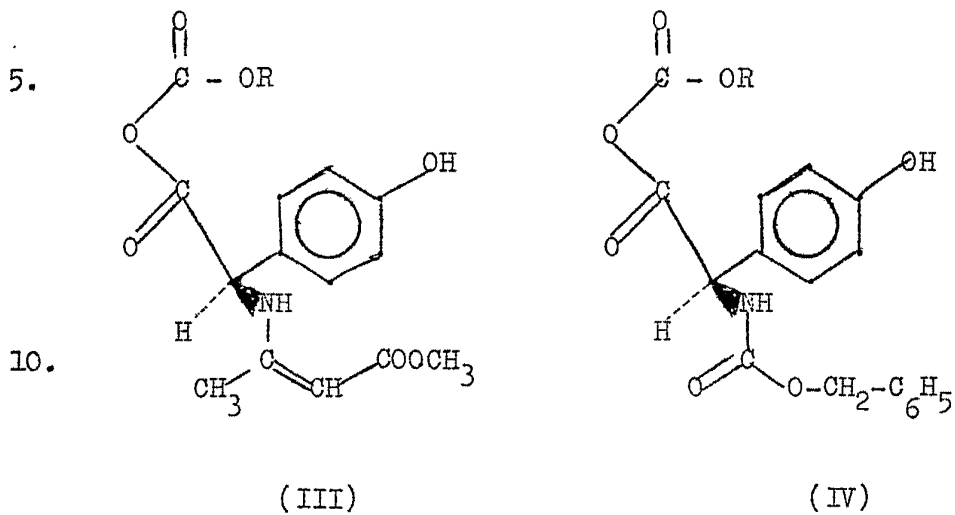
(IV) (A.A.W. Long y col. *J. Chem. Soc.* 1971, 1920;

Beecham Group Ltd., patente U.S.A. 3.674.776 de

4 de julio de 1972; Beecham Group Ltd. Sud-Africa

696.021 de 22 de agosto de 1969; Beecham Group Ltd.

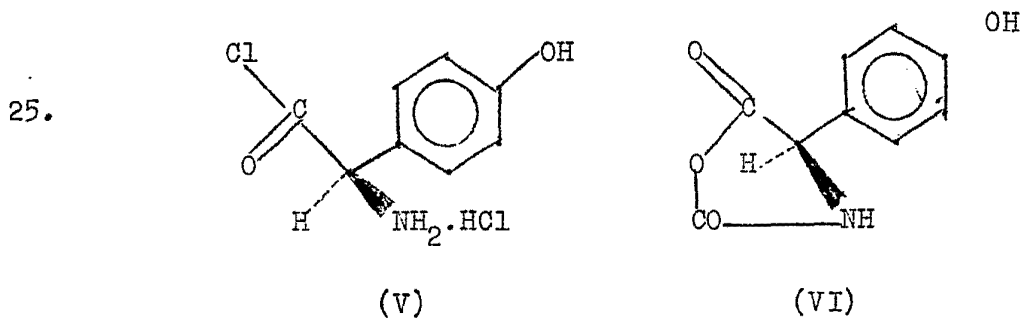
Ger. Offen. 1.942.693 de 26 de febrero de 1970).



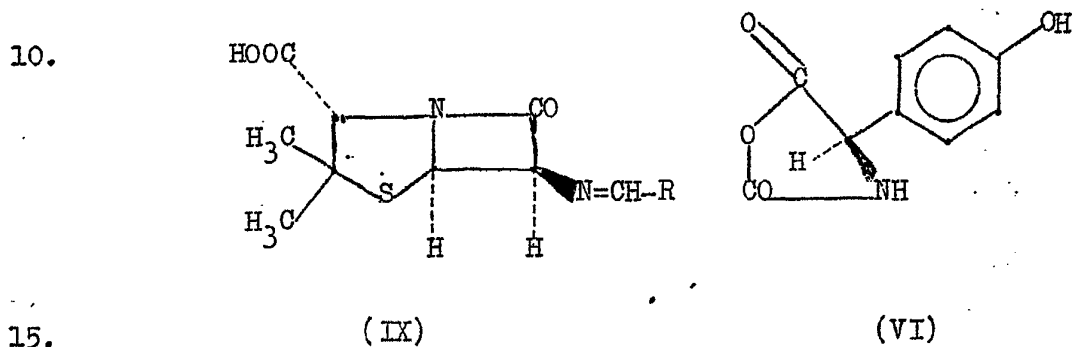
15.

e hidrólisis subsiguiente del grupo enamínico o hidrogenólisis del grupo carbobenciloxílico;

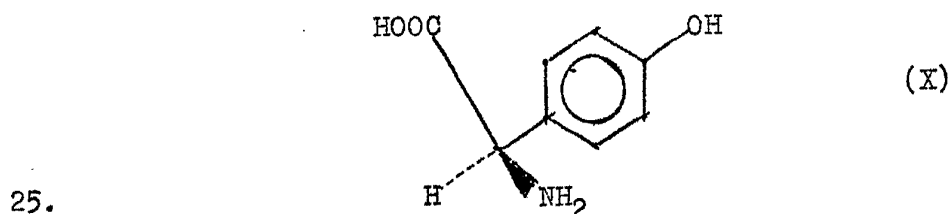
2) clorhidrato de cloruro (V) u oxazolidindiona (VI) (Beecham Group Ltd. patente U.S.A. 3.674.776 de 4 de julio de 1972; Sud-Africa 696.021 de 22 de agosto de 1969; Ger. Offen. 1.942.693 de 26 de febrero de 1970).



- 3) D(-)-p-hidroxifenilglicina en presencia de agentes de condensación tales como dicitclohexilcarbodiimida (Beecham Group Ltd. patente U.S.A. 3.674,776 de 4 de julio de 1972);
5. b) por condensación de una base Schiff de ácido 6-amino-penicilánico (IX) con el derivado de oxazolidindiona de D(-)-p-hidroxifenilglicina (VI) (Squibb and Sons Inc. Ger. Offen. 2.163.279 de 3 de agosto de 1972)



- En todos estos procedimientos, el trahidrato de ácido 6-D(-)-alfa-amino-p-hidroxifenilacetamido-penicilánico I se obtiene utilizando un derivado de la forma
20. D(-)-p-hidroxifenilglicina ópticamente activa (X)



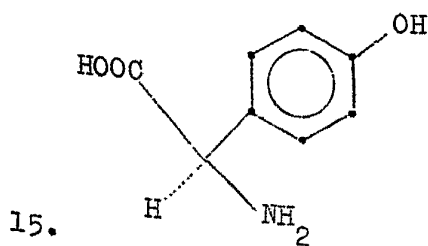
Esta D(-)-p-hidroxifenilglicina (X) se obtiene según procedimientos muy laboriosos y costosos a partir

de D, L-p-hidroxifenilglicina y utilizando:

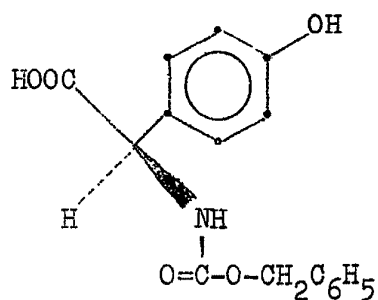
a) la conversión de D, L-p-hidroxifenilglicina (XI) en el derivado N-benciloxicarbonílico (XII), derivado N,O-dibenciloxicarbonílico (XIII) y la separación

5. subsiguiente de los antipódos ópticos de estos compuestos con el empleo de quinina seguido de la separación de los grupos benciloxicarbonílicos, por ejemplo mediante hidrogenación catalítica:

10.

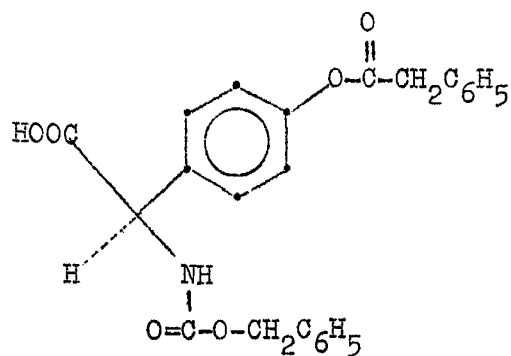


XI



XII

20.



XIII

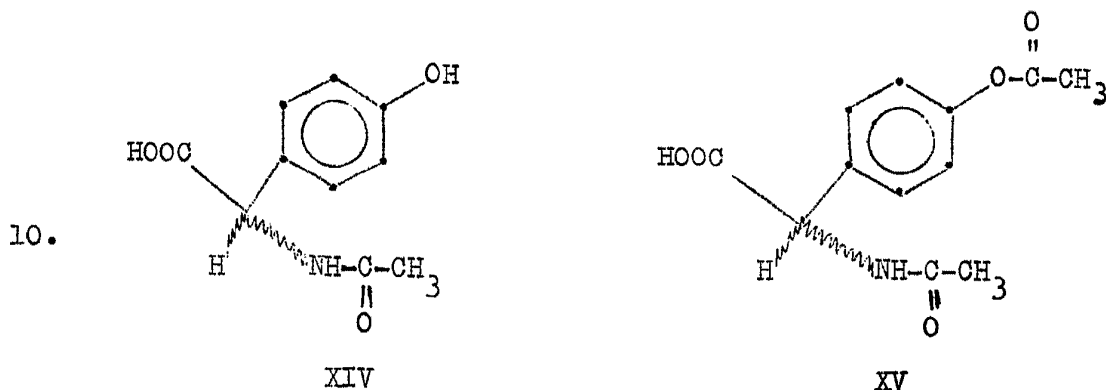
25.

(A.A.W. Long y col. J. Chem. Soc. 1971, 1920), (Beecham Group Ltd. Sud-Africa 696,021 de 22 de agosto de 1969).

b) la conversión de D,L-p-hidroxifenilglicina (XI) en el

N-acetato (XIV) o el N,O-diacetato (XV) y la separación subsiguiente de los antípodas ópticos de estos compuestos utilizando dehidroabietilamina seguido de saponificación de los grupos acéticos:

5.

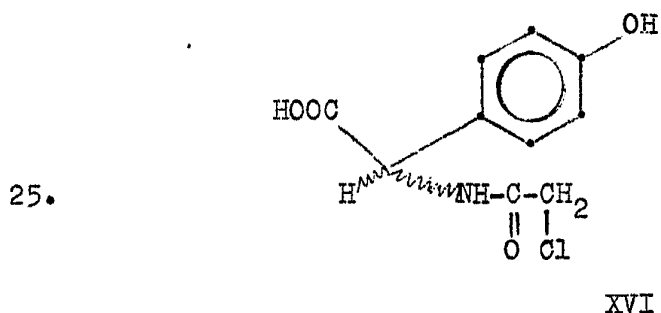


(Beecham Group Ltd., Brit. 1.318.216 de 24 de septiembre de 1970).

14.

c) la conversión de D,L-p-hidroxifenilglicina en el derivado N-cloroacético (XVI), la separación subsiguiente de los antípodas ópticos mediante dehidroabietilamina y la separación subsiguiente del grupo cloroacético:

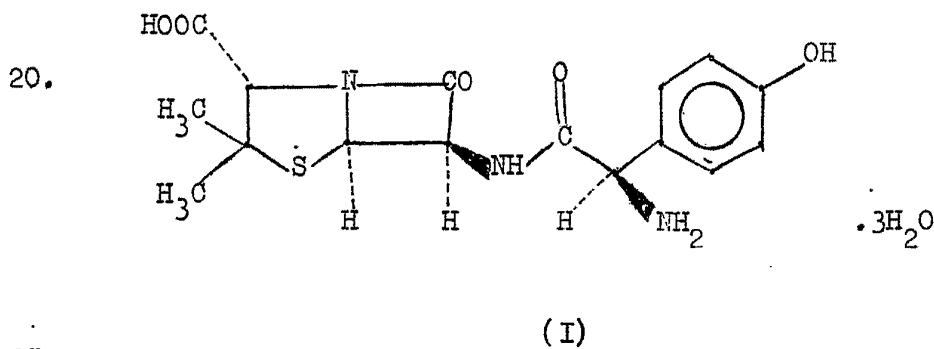
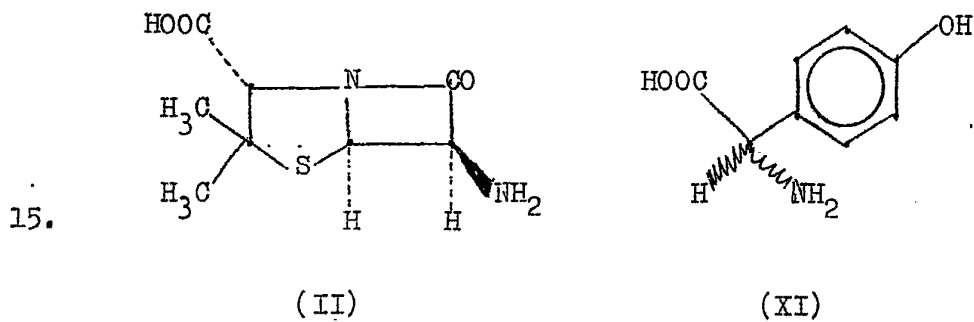
20.



(Bristol Meyers Co., U.S.A. 3.796.748 del 12 de mayo de 1974).

De este modo la D-(-)-p-hidroxifenilglicina es un reactivo muy costoso.

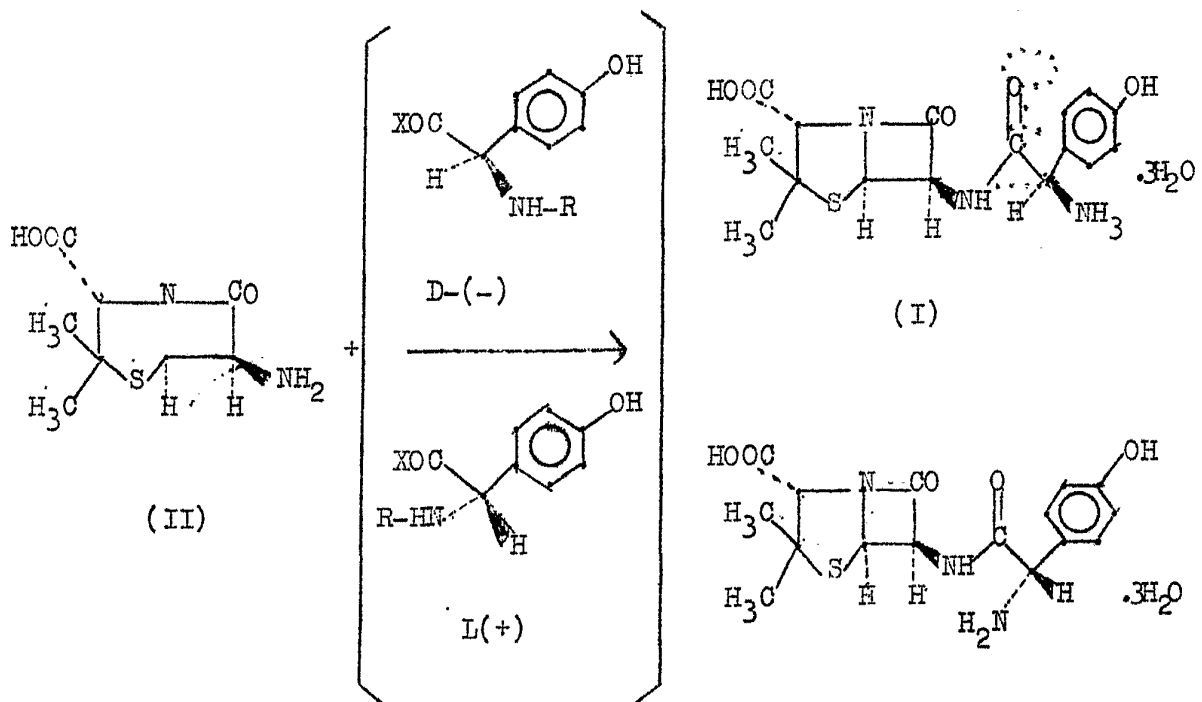
Ahora se ha descubierto, sorprendentemente, que es posible obtener directamente el trihidrato de ácido 6-D-(-)-alfa-amino-p-hidroxifenilacetamido-7-penicilánico (I) mediante condensación, bajo condiciones particulares, del ácido 6-aminopenicilánico (II) con un derivado de D,L-p-hidroxifenilglicina (XI) (o sea, sin tener que separar previamente el enantiómero (D(-)-p-hidroxifenil-glicina) ópticamente activo



25.

Las suposiciones teóricas sobre las que se basa el presente invento se derivan del hecho de que en la sín-

- tesis del trihidrato de ácido 6- $\underline{D(-)}$ -alfa-amino-p-hidroxifenilacetamido- $\underline{7}$ -penicilánico (I) se utiliza ácido 6-amino-penicilánico (II) que es ópticamente activo y, por consiguiente, cabe suponer que haciendo reaccionar ácido 6-aminopenicilánico (II) con un derivado apropiado de D,L-p-hidroxifenilglicina (XI) se obtendrá una diferente velocidad de formación para una de las dos formas de ácido 6- $\underline{D(-)}$ -alfa-amino-p-hidroxifenilacetamido- $\underline{7}$ -penicilánico (I) y ácido 6- $\underline{L(+)}$ -alfa-amino-p-hidroxifenilacetamido- $\underline{7}$ -penicilánico (XVI)

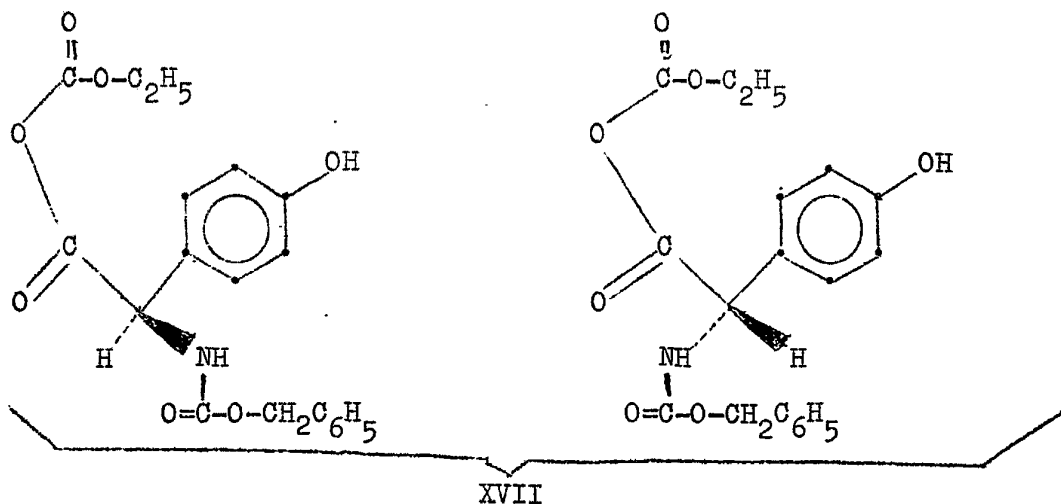


(en donde R es un grupo protector para el grupo amínico, por ejemplo un grupo enamínico o un grupo carbobenciloxílico y X es cualquier grupo activador para el grupo carboxílico, por ejemplo un anhídrido mixto o un éster activo).

5. Se ha descubierto sorprendentemente que es posible aislar el trihidrato de ácido 6-[D(-)-alfa-amino-p-hidroxifenil-acetamido]-penicilánico (I) en forma pura por medio de una de las condensaciones siguientes:

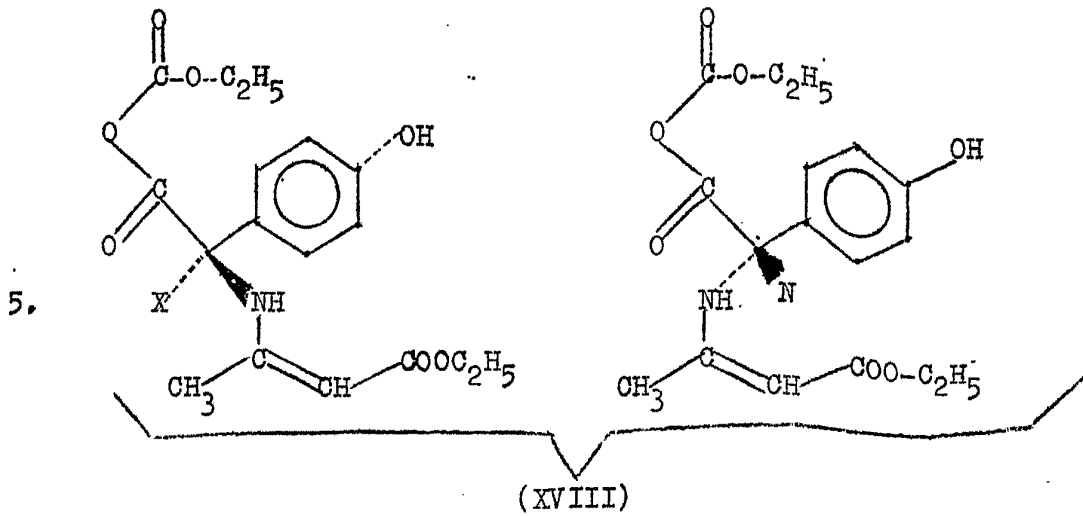
a) reacción entre ácido 6-aminopenicilánico (II) y el anhídrido mixto (XVII) obtenido haciendo reaccionar

10. N-carbobenciloxi-D,L-p-hidroxifenil-glicina con clorocarbonato de etilo



seguido de hidrogenólisis del grupo carbobenciloxílico;

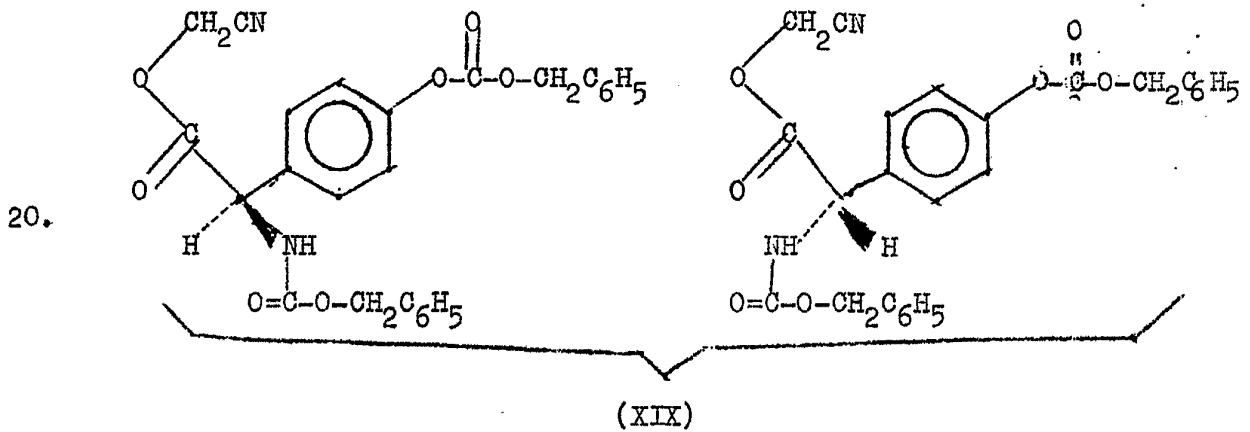
20. b) reacción del ácido 6-aminopenicilánico (II) con el anhídrido mixto (XVIII) obtenido haciendo reaccionar N-(2-etoxicarbonil-1-metilvinil)-D,L-p-hidroxifenilglicina con clorocarbonato de etilo



10. seguido de hidrólisis ácida del grupo N-(2-etoxi-carbonil-1-metilvinílico); operando bajo condiciones apropiadas;

c) reacción de ácido 6-aminopenicilánico (II) con el éster cianometílico (XIX) de N,O-dicarbobenciloxi-D,L-p-hidroxifenilglicina

15.

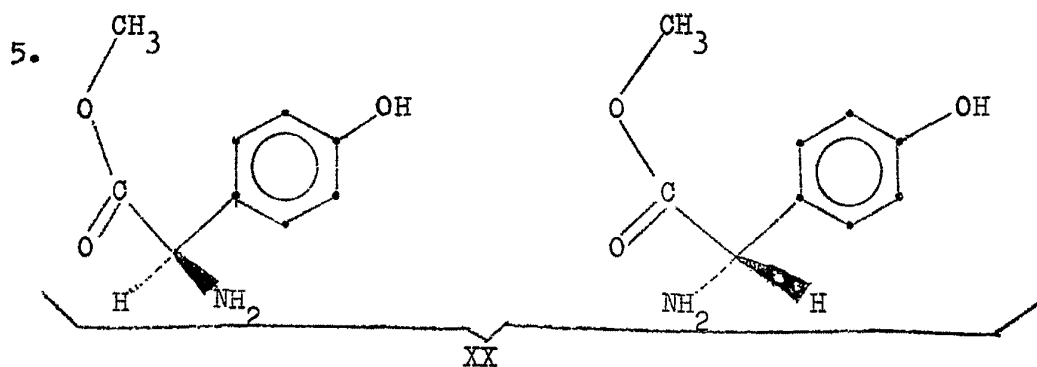


25.

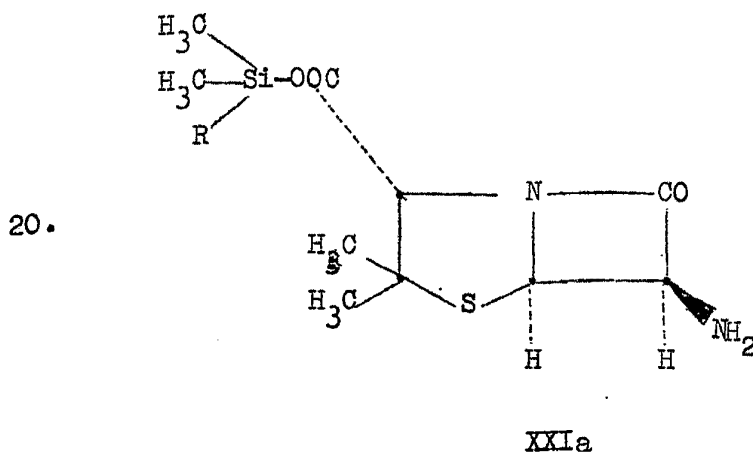
seguido de hidrogenólisis de los grupos carbobenciloxílicos;

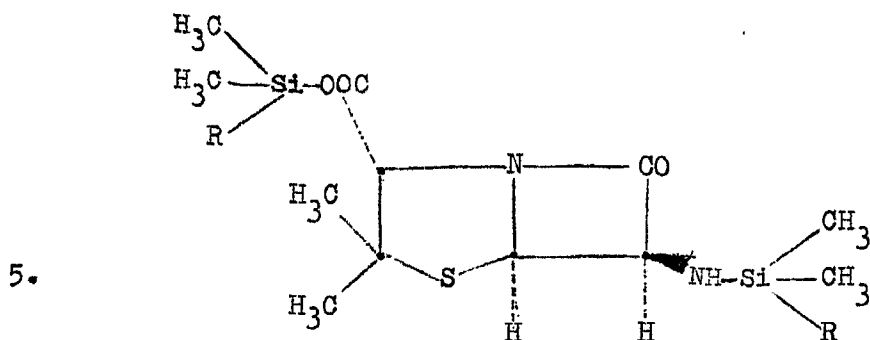
d) reacción del ácido 6-aminopenicilánico(II) y con el

éster metílico (XX) de D,L-p-hidroxifenilglicina en presencia de células de Escherichia Coli ATCC 11105



10. Se ha descubierto también que es posible obtener trihidrato 6-[D(-)-alfa-amino-p-hidroxifenilacetamido]-penicilánico (I) con rendimientos químicos moderados y en forma pura mediante condensación de un derivado silílico de ácido 6-aminopenicilánico (XXI-a-b) con el clorhidrato del cloruro de D-p-hidroxifenilglicina (V)
- 15.

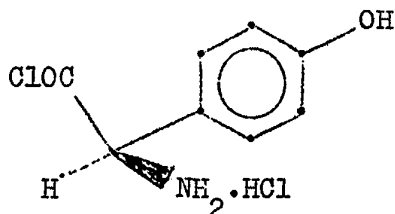




XXIIb

10. (en donde R puede ser CH₃ cuando se utiliza la reacción de ácido 6-aminopenicilánico con trimetilclorosilano o hexametildisilazano, o cloro cuando se utiliza la reacción de ácido 6-aminopenicilánico con dimetildiclorosilano)

15.



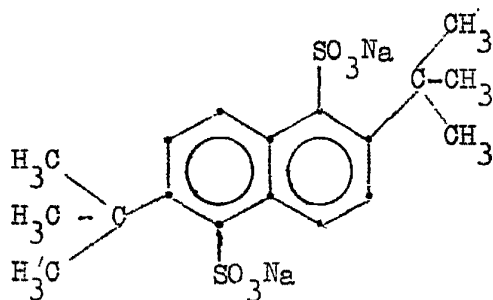
V

20.

25. Por último se ha descubierto que puede obtenerse una forma particularmente pura de trihidrato de ácido 6-[D(-)-alfa-amino-p-hidroxifenilacetamido]-penicilánico (I) (con una diferencia del valor de la función yodométrica, acidimétrica y amínica inferior a 6%, tal como requiere el código de Federal Regulations of the Food and Drugs Administration of the United States) mediante precipitación del antibiótico I de las soluciones acuosas con ciertos derivados de ácidos naftalen-sulfónicos (y en

particular con la sal disódica del ácido 2,6-ditercibutil-naftalen-1,5-disulfónico (XXII) con lo que se forma una sal prácticamente insoluble en agua).

5.



10.

XXII

suspensión de estas sales naftalensulfónicas en agua y su tratamiento con bases tales como amoníaco acuoso y dietilamina o trietilamina.

15.

Los ejemplos que siguen se ofrecen a título de ilustración no limitativa.

EJEMPLO 1.

20.

a) En este ejemplo y en los siguientes la D,L-p-hidroxifenilglicina se obtiene a partir de p-oxibenzaldehído utilizando modificaciones al método de E.K. Harvil, R.M. Herbst, J. Org. Chem. 2, 21, 1944.

25.

b) Se disuelven 60 g de D,L-p-hidroxifenilglicina (360 moles) en 720 cc de NaOH acuoso N/1 a 0°C con vigorosa agitación durante 45 minutos y se trata con 51,2 cc de clorocarbonato bencílico (360 mmoles). La mezcla se agita durante 30 minutos a 0°C y durante 30 minutos sin enfriamiento. Se filtra la suspensión a través de celite, se extrae el filtrado con 2 x 300 cc de cloroformo y luego con 300 cc de éter etílico. Se acidifica la fase acuosa a 0°C con

HCl acuoso al 15% durante 2 horas, se filtra el sólido, se lava con agua y se seca bajo vacío a 45°.

- Se obtienen 43 g de N-carbobenciloxi-D,L-p-hidroxi-fenilglicina que se purifica mediante suspensión en 300 cc de benceno hirviente, filtración en caliente y cristalización subsiguiente en etanol-agua 10:15.
5. Se obtienen 39 g de N-carbobenciloxi-D,L-p-hidroxi-fenilglicina con un punto de fusión de 184-187°C.
- c) Se suspenden 20 g de N-carbobenciloxi-D,L-p-hidroxi-fenilglicina (66,5 mmoles) en 140 cc de acetona;
10. 10 cc de trietilamina a -10° seguido de 6,4 cc (66,5 mmoles) de clorocarbonato de etilo. Se agita durante 5 minutos a -10° y luego se adiciona 0,1 cc de N-metilmorfolina. Se agita la suspensión por 30' a una temperatura comprendida entre -10° y -5°.
15. Se obtiene una solución de 14,4 g de ácido 6-aminopenicilánico (66,6 mmoles) en 90 cc de agua y 9 cc de trietilamina con subsiguiente dilución con 70 cc de acetona y se adiciona a -10° a la suspensión.
20. Se agita la mezcla durante 1 hora a -10°, se evapora la acetona bajo vacío, se adicionan 100 cc de metilisobutilcetona y se ajusta el pH a 2 mediante acidificación con HCl acuoso al 15%. Se separa la fase orgánica y se extrae de nuevo la fase acuosa con 2 x 50 cc de metilisobutilcetona.
25. Se combinan las fases orgánicas y se lavan con agua, se secan con Na₂SO₄ y se extraen 4 veces con 65,5 mmoles en total de NaHCO₃ al 5,5% en agua, lo que da soluciones de pH 7.

Se combinan los extractos acuosos, se lavan con éter y luego se liofilizan. Se obtienen 34 g del producto sólido blanco.

- d)
5. Se disuelven 20 g del producto liofilizado en 70 cc agua y se adiciona a una suspensión de 18 g de Pd sobre BaSO_4 al 10% en 150 cc de agua (prehidrogenada durante 1 hora); la mezcla se hidrogena a la presión y temperatura del ambiente durante 1 hora. Después
10. de filtración a través de celite, lavado con 3 x 50 cc de agua y acidificación con HCl al 15% a pH 1,9 durante 30 minutos, se extrae la mezcla con 3 x 50 cc de metilisobutilcetona y 50 cc de éter etílico. Se trata la fase acuosa con NH_4OH acuoso al 25% a pH 5,1-5,6 y se concentra bajo vacío a 150 cc.
15. Después de una noche a 0° se separa por filtración el producto sólido y se lava en agua y acetona; se obtienen 3,7 g de trihidrato de ácido 6-[D(-)-alfa-amino-p-hidroxifenilacetamido]-penicilánico con 11,33% de humedad (K. Fisher), título yodométrico * 100%, título microbiológico 95%, $[\alpha]_D^{20} + 294^{\circ}\text{C}_1$ en agua, título acidimétrico * 98%; el trihidrato de ácido (6-[L(+)-alfa-amino-p-hidroxifenilacetamido]-penicilánico y el trihidrato de ácido 6-[D,L-alfa-amino-p-hidroxifenilacetamido]-penicilánico obtenido por otros medios dá los
- 20.
25. resultados analíticos siguientes:
-

	D(-)	L(+)	D,L
5.	[alfa] _D ²⁰ como ácido anhídrido sobre producto anhídrido		
	+ 294 ^a	+ 161 ^a	+ 227 ^a
	títulos microbiológico como ácido anhídrido sobre producto anhidro		
	100%	10%	53%
10.	* Los títulos se expresan como ácido 6-[D(-)-alfa-amino-p-hidroxifenilacetamido]-penicilánico anhidro sobre el producto anhidro de conformidad con los métodos del CFR de la FDA.		
	<u>EJEMPLO 2.</u>		
15.	a) <u>Sal potásica de N-(2-etoxicarbonil-1-metilvinil)-D,L-p-hidroxi-fenilglicina</u>		
20.	Se disuelven 59,25 g de KOH al 85% en 960 cc de metanol y se adicionan, bajo agitación y a una temperatura comprendida entre +50 y +60°C, 150 g de D,L-p-hidroxifenilglicina y luego se adicionan a +60°C 128,4 g de etilacetoacetato diluido con 516 cc de metanol. Al cabo de unos pocos minutos se forma una suspensión que se mantiene al punto de ebullición durante 30 minutos. Se concentra bajo vacío hasta volumen reducido y se adicionan 360 cc de alcohol isopropílico. Se evapora de nuevo hasta un volumen reducido, se adicionan 360 cc de alcohol isopropílico y se evapora de nuevo bajo vacío hasta volumen reducido. Se diluye con 1620 cc de alcohol isopropí-		
25.			

- lico. Se agita durante 90 minutos a $+10^{\circ}\text{C}$, se filtra el producto sólido, se lava con 2 x 300 cc de alcohol isopropílico. Se seca el producto sólido a 50° bajo vacío; se obtienen 260 g de la sal potásica de
5. N-(2-etoxicarbonil-1-metilvinil)-D,L-p-hidroxifenilglicina: humedad (K. Fischer) 0,7%; pérdida de peso (al cabo de 3 horas a 60°C a 1 mm) 0,8%; peso equivalente 316 (teórico 318); cuando una solución de 5 g en 70 cc de agua se acidifica a pH 2 con HCl al 15%, se le adiciona luego NH_4OH al 25% a pH 5,
10. se filtra la mezcla y se seca, se obtienen 2 g de D,L-p-hidroxifenilglicina con características químico-físicas idénticas al producto puro.
- b) Reacción de ácido 6-aminopenicilánico con anhídrido mixto (obtenido de la sal potásica de N-(2-etoxicarbonil-1-metilvinil)-D,L-p-hidroxifenilglicina) en la relación molar 1:2
15. Se disuelven 25 g de ácido 6-aminopenicilánico (115,7 mmoles) en 41 cc de agua con 15 cc de dietilamina (pH 9,2) a 0° , se diluye la solución con 41 cc de acetona y se enfría a -5° , lo que da una solución A.
20. Se suspenden 73,5 g de sal potásica de N-(2-etoxicarbonil-1-metilvinil)-D,L-p-hidroxifenilglicina (231,8 mmoles) en 400 cc de acetona; se adicionan 26 g de clorocarbonato etílico (239,6 mmoles) a -40°C . Después de 10 minutos a -40°C , se adicionan 0,205 cc de N-metilmorfolina y luego se agita la suspensión durante 45 minutos a -35°C . Después de enfriar a -45° , se adiciona de una vez la solución
- 25.

- A. Se agita la suspensión durante 1 hora a -40°C , se filtra a través de 5 g de celite y se lava con 2 x 20 cc de acetona (residuo sobre el filtro 29,6 g). Se acidifica el filtrado límpido con HCl acuoso al 15 % hasta pH 1,3-1,5 en 90 minutos a 0°C y luego se extrae, primero con 400 cc de cloroformo y luego con 300 cc. Se lavan las fases orgánicas combinadas con 36 cc de agua acidificada a pH 1,5.
- 5.

- La fase acuosa contiene 75 g/l de alfa-amino-p-hidroxi-bencil-penicilina (sobre la base del título yodométrico) y 53 g/l de D-alfa-amino-p-hidroxi-bencil-penicilina (sobre la base del título microbiológico).
- 10.

- c) Reacción de ácido 6-aminopenicilánico con anhídrido mixto (obtenido de la sal potásica de N-(2-etoxicarbonil-1-metilvinil)-D,L-p-hidroxifenilglicina) en la relación molar 1:1.
- 15.

- Se disuelven 25 g de ácido 6-aminopenicilánico (115,7 mmoles) en 41 cc de agua con 15 cc de dietilamina a una temperatura comprendida entre 0° y 5° hasta que se obtiene una solución límpida (pH 9,5). Se diluye la solución con 41 cc de acetona y se enfría a -5°C , lo que da una solución A. Se suspenden 36,75 g de la sal potásica de N-(2-etoxicarbonil-1-metilvinil)-D,L-p-hidroxifenilglicina (115,8 mmoles) en 305 cc de acetona. Se adiciona 13 g de clorocarbonato etílico (119,8 mmoles) a -40° y se agita la suspensión durante 10 minutos a -40° . Se adiciona 0,1 cc de N-metil-morfolina y se agita la mezcla vigorosamente a -35° durante 45 minutos.
- 20.
- 25.

Se enfría la suspensión a -45° y se trata con la solución de ácido 6-aminopenicilánico (solución A).

5. Se agita durante 1 hora a -40° y se filtra a través de 5 g de celite (residuo 7,3 g). Se acidifica el filtrado limpio (pH 6) a pH 1,3 - 1,5 con HCl acuoso al 15% durante 90 minutos a una temperatura comprendida entre 0 y $+5^{\circ}$. Se agita durante 30 minutos a pH 1,3 a -10° , se extrae con 400 cc de cloroformo y luego con 200 cc de cloroformo. Se lavan las fases orgánicas combinadas con 36 cc de agua acidificada a pH 1,5.

10. La fase acuosa contiene 70 g/l de alfa-amino-p-hidroxibencilpenicilina (sobre la base del título yodométrico) y 60 g/l de D-alfa-amino-p-hidroxibencilpenicilina (sobre la base del título microbiológico.).

EJEMPLO 3.

- a) Derivado N,O-di-carbenciloxílico de D,L-p-hidroxifenil-glicina.

20. Se disuelven 60 g de D,L-p-hidroxifenilglicina (360 mmoles) en 1080 cc de NaOH acuoso N/1 a 0° y se trata bajo vigorosa agitación durante 45 minutos a 0° con 102,4 cc de bencilclorocarbonato (720 mmoles). Se agita la mezcla durante 30 minutos a 0° y luego durante 25. 2 horas sin enfriamiento. Se extrae la suspensión con 2 x 300 cc de cloroformo y luego con 300 cc de éter etílico. Se acidifica la fase acuosa a 0° con HCl acuoso al 15% durante 2 horas, se filtra el sólido, se lava con agua y se seca bajo vacío a 45° . Se extrae el

- sólido con 3 litros de benceno hirviendo y se filtra. Se evapora la solución bencénica límpida hasta sequedad bajo vacío y se cristaliza el residuo en benceno. Se obtienen 60 g del derivado N,O-dicarbobenciloxílico de D,L-p-hidroxifenilglicina con un punto de fusión de 142-143°C.
- 5.
- b) Ester cianometílico del derivado dicarbobenciloxílico de D,L-p-hidroxifenilglicina.
10. Se tratan 43,5 g del derivado N,O-dicarbobenciloxílico de D,L-p-hidroxifenilglicina (100 mmoles) en 1000 cc de acetato etílico con 11,35 g (150 mmoles) de cloroacetónitrilo y 15 g de trietilamina. Se mantiene la mezcla en ebullición bajo agitación durante 8 horas; después de enfriarse a 0°C, se lava rápidamente con NaHCO₃ acuoso al 2% a 0°C y luego con agua. Después
15. de secado sobre sulfato sódico y de evaporar el disolvente a 30°C bajo vacío se obtiene el éster cianometílico y se utiliza en la condensación siguiente.
- c) Condensación de ácido 6-aminopenicilánico con éster cianometílico del derivado N,O-dicarbobenciloxílico de D,L-hidroxifenilo.
20. Se tratan 47,5 g del éster cianometílico del derivado N,O-dicarbobenciloxílico de D,L-p-hidroxifenilglicina (100 mmoles), obtenido como se ha indicado anteriormente, en 1 litro de acetato de etilo a 20°C con una solución obtenida a 0°C durante 10,8 g
25. (50 mmoles) de ácido 6-aminopenicilánico en 1 litro de cloruro de metileno y 10,1 g (100 mmoles) de trietilamina.

Se agita la mezcla durante 8 horas a 20°C, se

enfria a 0° y se extrae con NaHCO_3 acuoso al 3%.

- Se acidifica la solución acuosa a pH 2 con HCl a 0° y se extrae con 1 litro de éter etílico y luego con 2 litros de cloroformo. Se vuelven a
5. extraer las soluciones orgánicas combinadas con NaHCO_3 acuoso al 3% hasta que se obtiene un pH 7 y se hidrogena la fase acuosa (después de evaporar los vestigios de disolvente bajo vacío) a la temperatura y presión del ambiente en presencia de 10 g
10. de Pd/ CaCO_3 .

Después de filtrar el catalizador se acidifica la solución con HCl acuoso concentrado hasta un pH de 1.

- Se adicionan 50 cc de acetato de etilo y a ello se adiciona la solución obtenida de 10 g de ácido
15. beta-naftalensulfónico en 30 cc de agua, y se adiciona, simultáneamente NaOH acuoso para mantener el pH entre 1,5 y 1,8. Se agita la mezcla durante 60 minutos a 10°. Se lava el producto sólido con agua,
20. luego con acetato de etilo y se seca.

- Se suspenden el beta-naftalensulfonato de D-alfa-amino-p-hidroxibencilpenicilina así obtenido en 50 cc de agua y se trata a 10° con NH_4OH acuoso al 10% con agitación a pH 7. Se agita durante 1 hora a 20°, se ajusta su pH a 5 con HCl acuoso, se agita de nuevo durante 1 hora a 10°C y se adicionan 60 cc
25. alcohol isopropílico. Después de agitarse durante 15 minutos se filtra, se lava con agua, con alcohol isopropílico y con acetona y luego se seca bajo

vacío a 50° hasta que la humedad es del 14% (K. Fischer).

Se obtienen 7 g de trihidrato de D-alfa-amino-p-hidroxi-benzilpenicilina con un título yodométrico Σ de 98%, un título microbiológico Σ 92%, $[\alpha]_D^{20} = +290^{\circ}$ y un título acidimétrico Σ del 98%.

5.

Σ - Los títulos se expresen como anhídrido de ácido 6- $[\alpha]$ -D(-)-alfa-amino-p-hidroxi-fenil-acetamido- Σ -penicilánico en el producto anhidro, de conformidad con los métodos indicados por el CFR de la FDA.

10.

EJEMPLO 4.

Condensación del éster metílico de D,L-p-hidroxi-fenil-glicina con ácido 6-aminopenicilánico en presencia de células de Escherichia Coli ATCC 11105.

15.

Se tratan 60 g de D,L-p-hidroxi-fenil-glicina (359 mmoles) en 240 cc de metanol con 47,4 cc de H_2SO_4 concentrado. Se hierve la mezcla durante 150 minutos, luego se deja en reposo a la temperatura del ambiente durante una noche y se trata con 73 cc de NH_4OH para obtener un pH de 7-7,5. Se agita durante 15 minutos a 20°, se filtra, se lava con 3 x 30 cc de metanol y luego con agua hasta que se obtiene una reacción de sulfato negativa y luego se seca a 45°-50°. Se obtienen 61,15 g del éster metílico de D,L-p-hidroxi-fenil-glicina con un punto de fusión de 188-190°.

20.

25.

Se inoculan 200 cc de un medio de cultivo obtenido de 25 g/l de extracto de levadura y 0,9 g/l de ácido fenilacético en un matraz Erlenmeyer con células de Escherichia Coli ATCC 11105 obtenidas de agar nutriente inclinado.

Se incuba a 25° sobre un agitador recíproco durante 28 horas. Se separan las células así obtenidas del caldo

mediante centrifugación, se lavan con agua y se adicionan a una suspensión obtenida de 10 g/l de ácido 6-aminopenicilánico y 30 g/l de éster metílico de D,L-p-hidroxifenilglicina a pH 6 en agua.

5. Se incuba la mezcla a 37° manteniendo el pH constante (a 6) mediante la adición de hidrato sódico acuoso.

Después de 2 horas de incubación se forman 2 g/l de D-alfa-amino-p-hidroxibencilpenicilina (sobre la base del título yodométrico y microbiológico). La D-alfa-amino-p-hidroxibencilpenicilina se identifica también mediante comparación con un patrón por autobiografía (papel Whatman nº 4 eluyendo con acetonitrilo-agua 8:2; tiempo de revelado 2 horas, detección con medio TSA y utilizando microorganismo *Stahilococcus aureus* ATCC 6538 P, 20 horas a 34°C).

15. Luego se aísla la D-alfa-amino-p-hidroxibencilpenicilina mediante precipitación con ácido beta-naftalensulfónico tal como se ha indicado en el ejemplo 3.

EJEMPLO 5.

20. Condensación de cloruro de clorhidrato de D-p-hidroxifenilglicina con el derivado silílico de ácido 6-aminopenicilánico.

Se tratan 167 g de D(-)-p-hidroxifenilglicina disueltos en 5 litros de cloruro de acetilo con 416 g de PCl_5 .

25. Después de adicionar 10 cc de dimetilformamida se insufla ácido clorhídrico anhidro gaseoso a su través durante 2 horas y a 0°C.

Luego se hace pasar nitrógeno durante 2 horas, se filtra el sólido y se lava con éter etílico y se seca. Se obtienen 100 g de cloruro de clorhidrato de D(-)-p-hidroxifenil-

glicina y en este estado se utilizan para la siguiente reacción.

Se tratan 64 g de ácido 6-aminopenicilánico en 666 cc de cloruro de metileno con 43,4 g de dietilamina, 39,55 g de dimetilnilina y, a +3°, con 64,45 g de trimetilclorosilano. Se hierve la mezcla durante 90 minutos y luego se enfría a 20°C. Se adicionan 11,12 cc de una solución molar 3,3 de diclorhidrato de dimetilnilina en CH₂Cl₂.

Después de enfriar a -20° se adicionan 67 g de cloruro de clorhidrato de D(-)-p-hidroxifenilglicina.

Se agita la mezcla durante 30 minutos a -10° y durante 1 hora a 20°, luego se enfría a 0° y se trata con 259 cc de agua.

Después de agitarse a 0° a un pH de 1,3 durante 10 minutos se ajusta a pH 5 con dietilamina y +5°, se filtra el sólido, se lava con un poco de agua y luego con acetona y se seca bajo vacío a 45°C. Se obtiene trihidrato de D-alfa-amino-p-hidroxibencilpenicilina con una humedad (K. Fischer) del 13%; título yodométrico* de 98%; título microbiológico* del 97%; título acidimétrico* del 102%, [alfa]_D* + 292°; título amínico* del 98%.

* Los títulos se expresan como ácido 6-[D(-)-alfa-amino-p-hidroxifenil-acetamido]-penicilánico anhidro en el producto anhidro, de conformidad con los métodos indicados en el CFR de la FDA.

25. EJEMPLO 6.

Se repite la reacción del ejemplo 5, pero en lugar de trimetilclorosilano se utiliza una cantidad equivalente de dimetildiclorosilano, lo que da 60 g de trihidrato de D-alfa-

--amino-p-hidroxibencipenicilina.

EJEMPLO 7.

5. Se repite la reacción del ejemplo 5, pero después de tratamiento con 259 cc de agua se separa la fase acuosa y se adicionan 150 cc de acetato etílico. Se adiciona a 10² la solución obtenida de 60 g de la sal disódica de ácido 2,5-ditercibutil-naftalen-1,5-disulfónico en 200 cc de agua.

10. Se agita durante 90 minutos a 0², se filtra y se lava con agua a 0² y luego con acetato de etilo. Después de secado se vuelve a suspender el producto sólido en 150 cc de agua y se trata a 20² con NH₄OH hasta un pH de 7 - 7,5. Se agita la suspensión a 20² durante una hora y luego se trata con HCl a pH 5.

15. Después de agitación a 0² durante 1 hora, se filtra, se lava con agua a 0² y luego con alcohol isopropílico. Se seca el producto a 45² bajo vacío. Se obtienen 70 g de trihidrato de D-alfa-amino-p-hidroxibencil-penicilina, con una humedad (K. Fischer) del 14,3% y título yodométrico del 96%; título microbiológico del 98%; título acidimétrico del 100%, título amínico del 97% [alfa]_D²⁰ + 294².

20. * Los títulos se expresan como ácido 6-[D(-)-alfa-amino-p-hidroxi-fenilacetamido]-penicilánico anhidro en producto anhidro, de conformidad con los métodos indicados por el CFR y la FDA.

EJEMPLO 8.

25. Se repite la reacción del ejemplo 5, pero después del tratamiento con 259 cc de agua, se separa la fase acuosa y se adicionan 200 cc de acetato de etilo. Se adiciona a 10² la solución obtenida de 73 g de monohidrato de ácido beta-

-naftalensulfónico en 200 cc de agua, manteniéndose el pH a 1,5 - 1,8 con NaOH.

5. Se agita a 0° durante 60 minutos, se filtra, se lava con agua a 0° y con acetato de etilo y luego se seca a 40° bajo vacío.

Se suspende el producto sólido así obtenido en 200 cc de agua y se trata a 20°C con NH_4OH hasta que se alcanza el pH 7.

10. Se agita la suspensión a 20° durante 1 hora, luego se diluye con 100 cc de alcohol isopropílico y se ajusta a pH 5 con HCl.

15. Después de agitar a 0° durante 90 minutos se filtra, se lava con agua y luego con alcohol isopropílico, lo que da 50 g de trihidrato de D-alfa-amino-p-hidroxibencilpenicilina con una humedad (K. Fischer) del 13,8%; título yodométrico[±] del 98%; título microbiológico[±] del 96%; título acidimétrico[±] del 100%, título amínico[±] del 97%; $[\alpha]_D^{20} +293^\circ$.

20. ± - Los títulos se expresan como ácido 6-[D(-)-alfa-amino-p-hidroxi-fenilacetamido]-penicilánico anhidro en producto anhidro, de conformidad con los métodos indicados por el CFR de la FDA.

EJEMPLO 9.

25. Se suspenden en 1760 cc de acetona 185 g de la sal potásica de N-(2-etoxicarbonil-1-metilvinil)-D-p-hidroxifenilglicina (obtenida como se ha indicado en el ejemplo 2a pero partiendo de D-p-hidroxifenilglicina en lugar del producto racémico).

Se adicionan a -30° 63,4 g de etilbromocarbonato y 0.5 cc de N-metil-morfolina.

Después de agitar durante 45 minutos a -30° se adiciona la solución obtenida de 120 g de ácido 6-aminopenicilánico en 200 cc de agua, 58 cc de dietilamina y 240 cc de acetona.

5. Se mantiene la solución a -40° durante 1 hora, se filtra sobre celite y se diluye con 400 cc de agua.

Después de acidificar a pH 1,5 con HCl al 10% durante 90 minutos se extrae con 2 litros de cloroformo.

10. Se trata la fase acuosa con 650 cc de acetato de etilo y se trata con la solución obtenida de 145,5 g de monohidrato de ácido beta-naftalensulfónico en 400 cc de agua, manteniendo el pH a 1,5-1,8 con NaOH acuoso al 30%.

15. Después de agitar durante 60 minutos se filtra el producto sólido, se lava con agua a 0° y acetato de etilo y se seca. Se obtienen 200 g de beta-naftalensulfonato de D-alfa-amino-p-hidroxibencilpenicilina.

20. Se suspenden 200 g de este beta-naftalensulfonato en 500 cc de agua y se trata con NH_4OH a pH 7. Después de agitar a 20° durante 1 hora se diluye con 200 cc de alcohol isopropílico y se ajusta a pH 5 con HCl. Se agita la suspensión a 0° durante 90 minutos, se filtra y se lava con agua y alcohol isopropílico. Se obtienen 100 g de trihidrato de D-alfa-amino-p-hidroxibencilpenicilina con una humedad del 13,16%; título yodométrico[≠] 98,4%; título acidimétrico[≠] 100,8%; título amínico[≠] 97%; $[\alpha]_D^{25} + 286^{\circ}$; título microbiológico[≠] 98%.

≠ Los títulos se expresan como ácido 6-[D(-)-alfa-amino-p-hidroxifenil-acetamido]-penicilánico anhidro en producto anhidro, de conformidad con los métodos indicados por el CFR

de la FDA.

EJEMPLO 10.

- Se tratan 267 g de la sal potásica de N-(2-etoxi-carbonil-1-metilvinil)-D-p-hidroxifenilglicina en 2280 cc
5. de acetona a -40° con 91,49 g de clorocarbonato etílico y 0,73 cc de N-metilmorfolina. Después de agitar durante 45 minutos a -40° , se adiciona la solución obtenida de 180 g de ácido 6-aminopenicilánico en 300 cc de agua, 90 cc de dietilamina y 360 cc de acetona. Después de agitar durante 1 hora
10. a -40° se filtra sobre celite; se diluye el filtrado límpido con 600 cc de agua y se trata a pH 1,5 con HCl acuoso a 0° . Después de extracción con 3 litros de cloroformo se trata la fase acuosa con 500 cc de acetato de etilo y con la solución obtenida de 190 g de la sal sódica de ácido 2,6-ditercibutil-naftalen-1,5-disulfónico en 600 cc de agua.
- 15.

Se agita la suspensión a 0° durante 90 minutos, se filtra, se lava con agua fría y con acetato de etilo. Después de secado a 40° bajo vacío se obtienen 300 g de la sal.

- Se adiciona este producto a 450 cc de agua y se
20. trata a la temperatura del ambiente con NH_4OH a pH 7. Se agita durante 1 hora a 20° y se trata con HCl a pH 5.

- Después de agitar durante 1 hora a 0° , se filtra, se lava con agua a 0° y con alcohol isopropílico y se seca a 45° bajo vacío. Se obtienen 160 g de trihidrato de D-alfa-amino-p-hidroxibencilpenicilina con humedad (K. Fischer)
25. del 13,8%; título yodométrico [■] 99%; título microbiológico [■] 96%; título acidimétrico [■] 97%; título amínico [■] 96%; $[\alpha]_D + 290^{\circ}$.

* Los títulos se expresan como ácido 6-[D(-)-alfa-amino-p-

-hidroxi-fenilacetamido]-penicilánico anhidro en producto anhidro, de conformidad con los métodos indicados por el CFR de la FDA.

EJEMPLO 11.

5. Se suspenden en 600 cc de agua 125,7 g de trihidrato de D-alfa-amino-p-hidroxibencilpenicilina con humedad (K. Fischer) del 12,75%; título yodométrico[≠] 93%; título microbiológico[≠] 90%; título acidimétrico[≠] 108%; título amínico[≠] 100%, y se disuelve con 25,4 cc de ácido clorhídrico acuoso a un pH de 1 y a una temperatura inferior a 10°. Se divide la solución en 2 partes iguales.
 - a) una mitad de la solución se trata con 200 cc de acetato de etilo y luego con una solución obtenida de 37,5 g de monohidrato de ácido beta-naftalensulfónico en 150 cc de agua, manteniendo el pH a 1,5 - 1,8 con hidrato sódico. Después de agitar durante 60 minutos a una temperatura inferior a 10°, se filtra el sólido y se lava con agua y acetato de etilo y se seca bajo vacío a 45°.
15. El producto así obtenido se suspende en 150 cc de agua y se trata a pH 7 con NH₄OH acuoso al 10%. Se agita durante 1 hora a 20°, se ajusta el pH con HCl a 5, se agita durante 1 hora a una temperatura inferior a 10° y se diluye con 120 cc de alcohol isopropílico.
20. Se filtra, se lava el sólido con agua, alcohol isopropílico y acetona y luego se seca. Se obtienen 53 g de trihidrato de D-alfa-amino-p-hidroxibencilpenicilina puro con humedad (K. Fischer) del 12,27 %; título yodométrico[≠] del 99,1 %; título microbiológico[≠]
- 25.

del 98,7%; título acidimétrico^{xx} del 101,5 %; título amínico^{xx} del 98,5%; $[\alpha]_D^{20} + 292^\circ$

5. b) una mitad de la solución se trata con 200 cc de acetato etílico a una temperatura inferior a 10° con la solución obtenida de 90 g de la sal disódica de ácido 2,6-ditercibutil-naftalen-1,5-disulfónico en 300 cc de agua.

Se agita la suspensión a 0° durante 90 minutos, se filtra y se lava el sólido con agua y acetato de etilo. Después de secado a 40° bajo vacío se suspende el producto sólido en 200 cc de agua y se trata a la temperatura del ambiente con NH_4OH acuoso al 10% a pH 7.

Se agita durante 1 hora a 20°, se corrige el pH con HCl, se agita durante 1 hora a 0°, se filtra y se lava el sólido con agua y alcohol isopropílico.

15. Después de secado bajo vacío a 50°, se obtienen 50 g de trihidrato de D-alfa-amino-p-hidroxibencilpenicilina pura con humedad (K. Fischer) del 12,8%; título yodométrico^{xx} del 99,8%; título microbiológico^{xx} del 99,7%; título acidimétrico^{xx} del 100,3%; título amínico del 99%; $[\alpha]_D^{20} + 294^\circ +$

20. [†]Los títulos se expresan como ácido 6-[D(-)-alfa-amino-p-hidroxifenilacetamido]-penicilánico anhidro en el producto anhidro, de conformidad con los métodos indicados por el CFR de la FDA.

25.

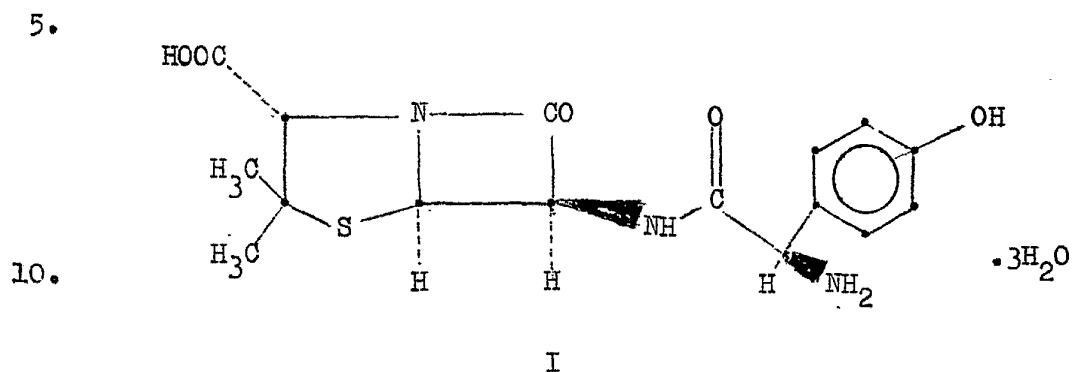
= . =

REIVINDICACIONES

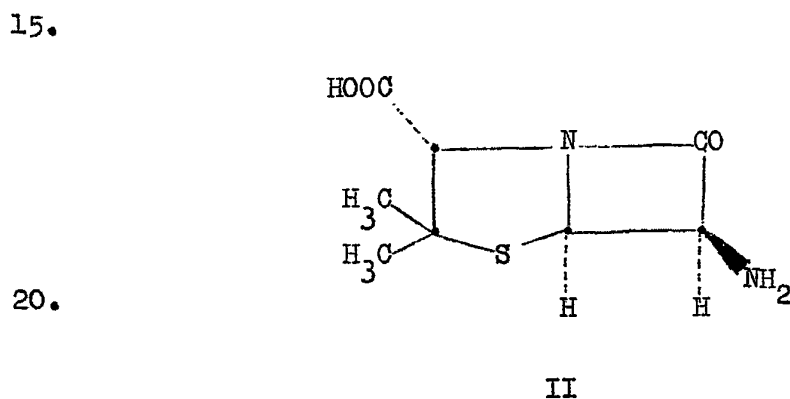
Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la solicitud de patente italiana n°

30978 A/74 del 23 de Diciembre de 1974.

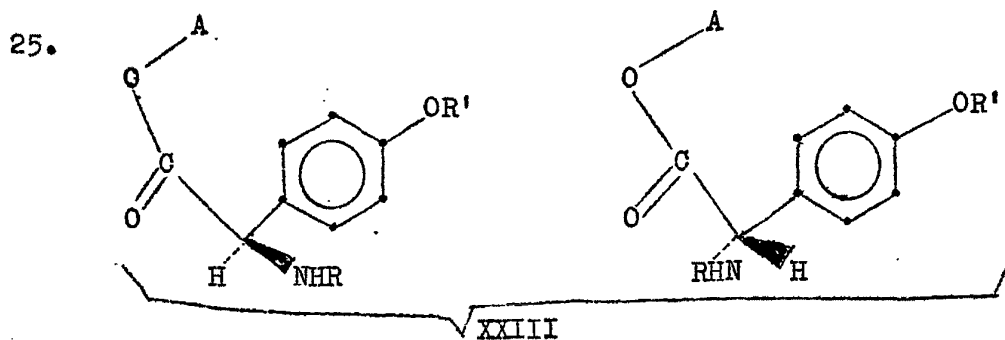
1.- Procedimiento para la síntesis de ácido 6-[D(-)-
-alfa-amino-p-hidroxifenilacetamido]-penicilínico trihidrato,
de la fórmula (I)



caracterizado porque se hace reaccionar ácido 6-aminopeni-
cilínico de fórmula (II)



con un derivado de D,L-p-hidroxifenilglicina de fórmula
(XXIII)



en la que

A es igual a $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{CH}_2-\text{CN}$, $-\text{CH}_3$,

R es igual a $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$, $\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}=\text{CH}-\text{COOC}_2\text{H}_5$

5.

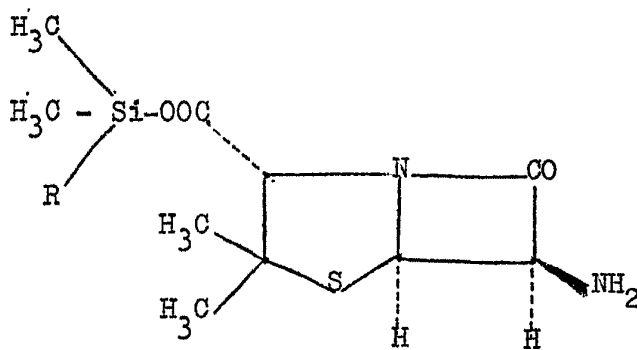
R' es igual a H, $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$,

y particularmente en el caso de que A represente $-\text{CH}_3$, según se ha indicado, utilizando la reacción enzimática en presencia de células de *Escherichia Coli* ATCC 11105.

10.

2.- Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado en una alternativa de su realización porque se hace reaccionar un derivado silílico de ácido 6-amino-penicilánico de fórmulas (: XXI a-b)

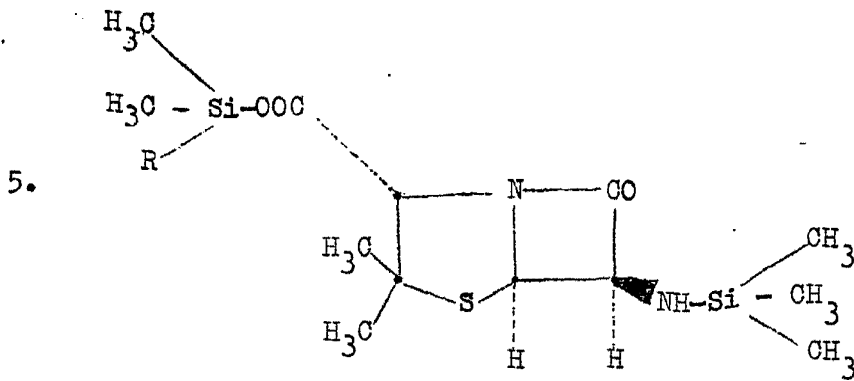
15.



20.

(XXIa)

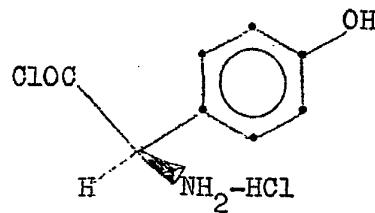
25.



10.

con el clorhidrato del cloruro de D-p-hidroxifenilglicina de la fórmula (V)

15.



20.

en cuyas fórmulas XXI a-b,

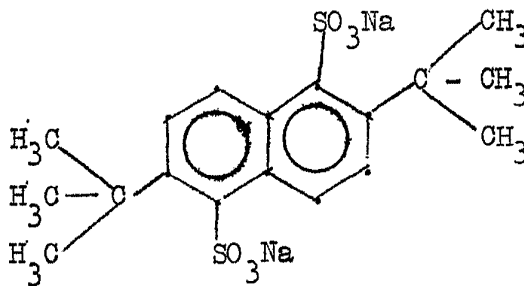
R puede ser CH_3 cuando el ácido 6-aminopenicilánico de fórmula II, según se ha definido en la reivindicación 1, se hace reaccionar previamente con trimetilclorosilano o hexametildisilazano o cloro cuando se hace reaccionar previamente el citado ácido 6-aminopenicilánico con dimetildiclorosilano.

25.

3.- Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque, en otra alternativa de su realización, se constituye el compuesto de fórmula (I), definido en la reivin-

dicación 1, en su forma pura por precipitación de sus soluciones acuosas con ciertos naftalensulfonatos y en particular con la sal disódica de ácido 2,6-diterbutilnaftalen-1,5-disulfónico de fórmula (XXII),

5.



10.

(XXII)

4.- Procedimiento para la síntesis de ácido
15. 6-[D(-)-alfa-amino-p-hidroxifenilacetamido]-penicilánico trihidrato.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 35 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

20.

Madrid, a 25 de marzo de 1975.

p.a.

JAIMÉ ISERN

p. p.

Firmado: JOSE L. MOR*