



ESPAÑA

(19) ES	(11) NUMERO 436.565	(10) A 1
	(21) FECHA DE PRESENTACION 12-4-75	

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO 24848/74 50016/74	5-6-74 19-11-74	Gran Bretaña Gran Bretaña
presentadas provisionalmente y complementadas el 19-3-75		

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL C07D; A61K	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
--------------------------	--	--

(54) TITULO DE LA INVENCION UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE ACIDOS ACETAMIDOPENICILANICOS
--

(71) SOLICITANTE (S) BRISTOL-MYERS COMPANY

DOMICILIO DEL SOLICITANTE 345 Park Avenue, NEW YORK, New York 10022, Estados Unidos.

(72) INVENTOR (ES) Abraham Weber, Danile Bouzard, ambos de nacionalidad francesa, los cuales han cedido sus derechos a la entidad solicitante.

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU
--

1 Esta invención se refiere a un nuevo ácido α -amino- α -
(p-aciloxifenil)acetamidopenicilánico que es útil como agen-
te antibacteriano y también a un nuevo procedimiento para la
producción de ácido 6-D-(-)- α -amino- α -(p-hidroxifenilacetami-
5 do)penicilánico (también conocido por amoxicilina).

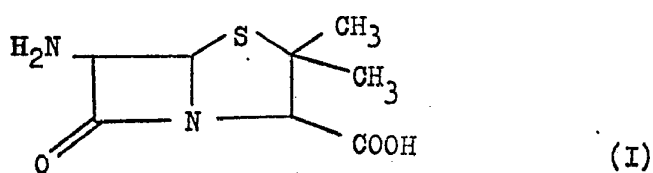
La patente estadounidense nº 2.985.648 se refiere a las
 α -aminobencilpenicilinas y describe una fórmula general para
estas penicilinas que incluye, entre otros, los sustituyen-
tes alcanoil(inferior)oxi en el anillo bencénico. Este documen-
10 to no da más detalles específicos sobre los compuestos así
sustituídos y no se dan ejemplos específicos para su prepa-
ración. El documento indica que las α -aminobencilpenicilinas
existen en varias formas ópticas y se dan ejemplos específi-
cos de preparación de las formas D y L.

15 La patente estadounidense nº 3.520.876 se refiere tam-
bién a la misma fórmula general de las α -aminobencilpenicili-
nas dada en la patente estadounidense nº 2.985.648 y describe,
en una lista de veintiún compuestos, el ácido 6- α -amino-4-ace-
20 toxi-bencilpenicilánico (o ácido 6- α -amino- α -(p-acetoxifenil-
acetamido)penicilánico). La patente estadounidense número
3.520.876 no da ninguna indicación de si se prepara algún isó-
mero óptico particular de este compuesto y no se dan detalles
de su actividad antibacteriana.

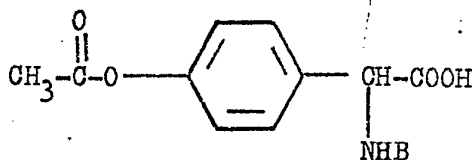
25 Ahora hemos descubierto que el compuesto ácido 6-D-(-)-
 α -amino- α -(p-acetoxifenilacetamido)penicilánico tiene especial
valor para uso como agente antibacteriano y, en un aspecto de
la invención, se proporciona el compuesto ácido 6-D-(-)- α -ami-
no- α -(p-acetoxifenilacetamido)penicilánico, o una sal farma-
30 céticamente aceptable del mismo, en forma prácticamente li-
bre del isómero L-(+).

1 Las sales farmacéuticamente aceptables citadas compren
den las sales no tóxicas del ácido carboxílico, v.g. sales me-
tálicas no tóxicas tales como las de sodio, potasio, calcio
y aluminio, la sal amónica y las sales con aminos no tóxicas,
5 v.g. triálquilaminas, procaína, dibencilamina, N-bencil-β-fe-
netilamina, 1-efenamina, N,N'-dibenciletilendiamina, N-álquil-
piperidina y otras aminos que han sido utilizadas para formar
sales con las penicilinas. También están incluidas dentro de
la definición de sales farmacéuticamente aceptables las sales
10 no tóxicas de adición de ácido (sales amónicas), v.g. sales
con ácidos minerales como clorhídrico, bromhídrico, yodhídri-
co, fosfórico y sulfúrico y sales con ácidos orgánicos como
maleico, acético, cítrico, oxálico, succínico, benzoico, tar-
tárico, fumárico, mandélico, ascórbico y málico.

15 Esta invención también incluye un procedimiento para
la preparación de ácido 6-D-(-)-α-amino-α-(p-acetoxifenilace-
tamido)penicilánico, o una sal farmacéuticamente aceptable
del mismo, esencialmente exento del isómero L-(+), cuyo proce-
20 dimiento consiste en hacer reaccionar un compuesto de fórmula



25 o un éster silílico o una sal del mismo, con un agente acilan-
te de fórmula:



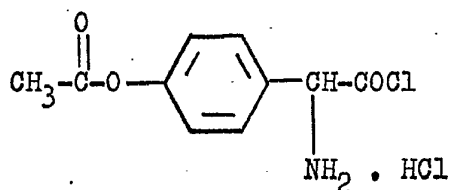
1 donde B es un grupo protector del amino, y separar el grupo
protector del amino para producir el compuesto citado o una
sal farmacéuticamente aceptable del mismo y, si se desea,
antes o después de la separación de B, convertir por métodos co-
5 nocidos el producto en forma de ácido libre, éster silílico
o sal, en el correspondiente ácido libre o sal farmacéutica-
mente aceptable del mismo; encontrándose dicho compuesto de
fórmula (II) en la forma D-(-), esencialmente exenta del isó-
mero L-(+).

10 En la preparación de los nuevos compuestos de penici-
lina de esta invención, el correspondiente compuesto de ácido
6-aminopenicilánico de fórmula (I), su éster silílico o una
de sus sales, es acilado por métodos conocidos con el agente
acilante apropiado de fórmula (II).

15 Si se desea, el compuesto (I) puede ser convertido,
antes de la reacción de acilación, en un éster silílico o una
sal de adición de ácido del mismo. Los ésteres silílicos pue-
den ser preparados por métodos descritos en la bibliografía,
v.g. en la patente estadounidense 3.249.622. El grupo éster
20 silílico puede ser separado después de la reacción de acila-
ción por hidrólisis.

25 Antes de la reacción de acilación, el grupo amino del
agente acilante II puede ser protegido mediante un grupo B
convencional de bloqueo de grupos amino, que pueda ser fácil-
mente separado una vez terminada la reacción por métodos co-
nocidos. Son ejemplos de grupos protectores del grupo amino
o de bloqueo adecuados el grupo terc-butoxicarbonilo, carbo-
benciloxi, 2-hidroxi-1-naftocarbonilo, tricloroetoxicarboni-
lo, 2-etoxicarbonil-1-metilvinilo y 2-metoxicarbonil-1-metil-
30 vinilo. Un grupo de bloqueo especialmente útil es un protón,

1 como en el compuesto de fórmula:



Por ejemplo, después de la reacción de copulación con acilación, puede ser fácilmente separado por neutralización. Evidentemente, pueden utilizarse otros grupos de bloqueo funcionalmente equivalentes para el grupo amino y estos grupos están considerados dentro de los límites de esta invención.

10 La acilación del grupo 6-amino de una penicilina es una reacción muy conocida y puede emplearse cualquiera de los equivalentes funcionales de fórmula (II) comúnmente utilizados como agentes acilantes de los grupos amino primarios. Son ejemplos de derivados acilantes del ácido de fórmula (II) adecuados los correspondientes anhídridos de ácido, anhídridos mixtos, v.g. anhídridos alcoxifórmicos, haluros de ácido, azidas, ésteres activos y tioésteres activos. El ácido libre de fórmula (II) puede ser copulado con el compuesto (I) después de hacer reaccionar primero dicho ácido libre con cloruro de N,N'-dimetilcloroforminio o mediante el uso de enzimas, de un N,N'-carbonildiimidazol, un N,N'-carbonilditriazol o un reactivo de carbodiimida, v.g. N,N-di-isopropilcarbodiimida, N,N'-d ciclohexilcarbodiimida, N-ciclohexilcarbodiimida o N-ciclohexil-N'-(2-morfolinoetil)carbodiimida, un reactivo de alquililamina o un reactivo de sal de isoxazolio. Otro equivalente del ácido libre es la azolida correspondiente, es decir, una amida del ácido correspondiente cuyo nitrógeno amídico pertenece a un anillo de cinco miembros casi aromático, que contiene por lo menos dos átomos de nitrógeno, es decir,

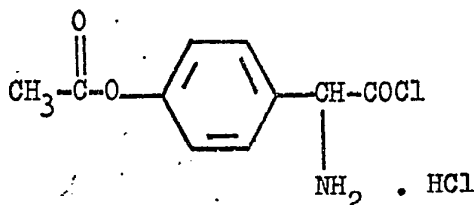
15

20

25

30

1 imidazol, pirazol, los triazoles, bencimidazol, benzotriazol
y sus derivados sustituidos. Otro derivado reactivo del ácido
fenilglicínico de fórmula (II) es el N-carboxianhídrido (anhí
5 drido de Leuch). En esta estructura, el grupo que activa al
grupo carboxilo también sirve para proteger al grupo amino.
Un agente acilante especialmente preferido es el isómero D-
(-) del hidrocloreto de cloruro de ácido de fórmula



15 que también realiza una doble función de activación del car-
boxilo y protección del amino. Antes se ha mencionado el uso
de enzimas para copular el ácido libre con su grupo amino
bloqueado con el compuesto (I). Incluidos en estos procedi-
mientos se encuentra el uso de un éster, v.g. el éster metí-
lico, de ese ácido libre con enzimas proporcionados por di-
versos microorganismos, v.g. los descritos por T. Takahashi
y colaboradores, J.Amer.Chem.Soc., 94 (11), 4035-4037 (1972)
20 y por T. Nara y colaboradores, J.Antibiotics (Japón), 24 (5),
321-323 (1971) y la patente de Alemania Occidental número
2.216.113.

25 Las condiciones particulares del proceso, v.g. tempe-
ratura, disolvente, tiempo de reacción, etc, seleccionadas
para la reacción de copulación están determinadas por la na-
turaleza del método de acilación empleado y son conocidos
por los expertos en esta técnica. En general, es útil agre-
gar una amina terciaria orgánica, v.g. trietilamina, N,N-di-
metilanilina, etilpiperidina, 2,6-lutidina o quinoleína, que
30 sirve como aceptor de protones o agente formador de sal.

1 Los compuestos de esta invención pueden ser aislados
por cualquiera de los métodos habitualmente empleados para el
aislamiento de penicilinas similares. Así, puede obtenerse
5 el producto en forma de molécula neutra aunque probablemente
deba ser representada con más precisión en forma de zwitterión,
o puede ser aislado en forma de sal. La formación del ácido
carboxílico o de la sal de adición de ácido farmacéuticamen-
te aceptable deseados se realiza por métodos conocidos, v.g.
10 reacción del ácido con una base o un ácido apropiados.

10 Una vez terminada la reacción de acilación, el produc-
to obtenido puede ser convertido (antes o después de separar
el grupo protector del amino), por métodos conocidos, en la
forma deseada del nuevo producto. Por ejemplo, el producto en
15 forma de éster silílico o de sal puede ser convertido en el
ácido libre o en una sal farmacéuticamente aceptable del mis-
mo por separación del grupo éster silílico, v.g. por hidró-
lisis.

20 Los compuestos farmacéuticamente activos de esta inven-
ción son potentes agentes antibacterianos, útiles en el tra-
tamiento de las enfermedades infecciosas en el ganado aviar
y en los animales, incluido el hombre, causadas por muchas
bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Los compuestos
activos también son valiosos como suplementos nutritivos en
25 los piensos para animales y como agentes para el tratamiento
de la mastitis en el ganado vacuno. También se ha encontrado
inesperadamente que los compuestos preferidos son eficazmen-
te absorbidos por administración oral.

30 Los nuevos medicamentos proporcionados por esta inven-
ción pueden ser formulados como composiciones farmacéuticas
que comprenden, además del ingrediente activo, un vehículo o

1 diluyente farmacéuticamente aceptable. Los compuestos pueden
ser administrados por vía oral y parenteral. Los preparados
farmacéuticos pueden encontrarse en forma sólida como cápsu-
5 las, tabletas o emulsiones. En el tratamiento de las infeccio-
nes bacterianas del hombre, los compuestos de esta invención
pueden ser administrados parenteralmente en una proporción
comprendida aproximadamente entre 5 y 200 mg/kg/día en dosis
fraccionadas, v.g. 3 a 4 veces al día. Son administrados en
10 dosis unitarias que contienen, por ejemplo, 125, 250 o 500 mg
de ingrediente activo, con vehículos o excipientes adecuados,
fisiológicamente aceptables.

Lo que sigue ilustra la preparación de los materiales
de partida empleados en la producción de los nuevos compues-
tos de la invención, como se describe en el siguiente Ejem-
15 plo 1.

MATERIALES DE PARTIDA

Preparación del ácido D-(-)- α -amino- α -(p-acetoxifenil)acético

Método A (en ácido acético como disolvente)

20 Se agitan 203,5 g (1 mol) de hidrocloreuro de D-(-)-p-
hidroxifenilglicina, 800 ml de ácido acético y 314 g (4 mo-
les) de cloruro de acetilo, durante 48 horas, a la temperatu-
ra ambiente. Se recoge el sólido, se lava tres veces con
250 ml de acetona cada vez y dos veces con 250 ml de etanol
y se seca a 40°. Rendimiento: 210 g (85,4 %). Este hidroclo-
25 ruro se disuelve en 3,0 litros de agua; la solución se enfría
entre 5 y 10°C y el pH se ajusta a 4,5 con NH₄OH al 20 %. La
suspensión se agita durante una hora a 5°C y el sólido se re-
coge, se lava dos veces con agua y dos veces con acetona y
se seca a 40°C. Rendimiento: 133 g (64 % a partir de D-(-)-
30 p-hidroxifenilglicina). $\alpha_D(1\% \text{ HCl N/10}) = -104,5$.

1 Método B (en cloruro de metileno)

Se agitan durante 48 horas, a la temperatura ambiente, 4,07 g (0,02 moles) de hidrocloreuro de D-(-)-p-hidroxifenilglicina, 30 ml de cloruro de metileno y 6,28 g (0,08 moles) de cloruro de acetilo. Se recoge el sólido, se lava dos veces con acetona y dos veces con etanol. Rendimiento: 4,17 g (84,5%).

Análisis: Cl = 14,8 (ácido calculado).

Método C (en ácido trifluoracético)

10 Se añaden 1,67 g (0,01 moles) de D-(-)-p-hidroxifenilglicina, con agitación, a 10 ml de ácido trifluoracético a la temperatura ambiente. Después de producirse la disolución, se añaden 1,57 g (0,02 moles) de cloruro de acetilo. Después de una ligera reacción isotérmica, aparece un sólido. La suspensión se agita durante hora y media a la temperatura ambiente y el ácido trifluoracético se separa a vacío. Se recoge el sólido residual y se lava con cloruro de metileno y con etanol. El ácido D-(-)- α -amino- α -(p-acetoxifenil)acético es idéntico al preparado por los Métodos A o B.

Rendimiento: 1,9 g (75 %).

20 Preparación de hidrocloreuro de cloruro de D-(-)- α -amino- α -(p-acetoxifenil)acetilo

25 Se enfrían a -5°C , con agitación, 83,6 g (0,40 moles) de ácido D-(-)- α -amino- α -(p-acetoxifenil)acético y 1,25 l de cloruro de metileno anhidro. Después se añaden muy lentamente 152 g de pentacloruro de fósforo, seguidos de 4 ml de dimetilformamida. La mezcla se agita durante 4 horas a 0°C . Se recoge el sólido, se lava con cloruro de metileno anhidro y se seca a vacío a la temperatura ambiente.

Rendimiento: 61 g (57,5 %).

30 Análisis: cloro total = 27,2 % (teórico: 26,9 %).

1 El siguiente ejemplo se da como ilustrativo pero no limitativo de esta invención. Todas las temperaturas se dan en grados centígrados. El ácido 6-aminopenicilánico es abreviado a 6-APA.

5 EJEMPLO 1

Acido 6-D-(-)- α -amino- α -(p-acetoxifenilacetamido)penicilánico
o acetoxi-ampicilina o RN 1395

Método A. Proceso anhidro

10 Se agitan 15,27 g (0,071 moles) de 6-APA en 500 ml de cloruro de metileno anhidro; se separan por destilación 120 ml de cloruro de metileno y se añaden 11,8 ml de hexametildisilazano. La mezcla se agita y se calienta a reflujo durante 20 horas (al cabo de unas 10-15 horas todo el 6-APA ha pasado a solución). La solución anterior se enfría a 0°C y se añaden 15 120 ml de cloruro de metileno seguidos de la adición de 9,5 ml de dimetilanilina y 7 ml de una solución de hidrocioruro de dimetilanilina en cloruro de metileno (30 %). Después se añaden poco a poco (alrededor de hora y media) 20 g (0,0756 moles) de hidrocioruro de cloruro de D-(-)- α -amino- α -(p-acetoxifenil)acetilo, a +20°C y se deja en reposo durante la noche 20 a +5°C. Después se añaden 5 ml de metanol seguido de 240 ml de agua. El pH se ajusta a 2,5 con trietilamina y la mezcla se filtra a través de una capa de Celite; después se comprueba el pH y la fase acuosa se separa, se lava dos veces con 25 150 ml cada vez de cloruro de metileno y se trata con carbón activo. La solución se ajusta a pH 4,5 y se concentra a vacío hasta un volumen de \approx 150 ml aproximadamente. Se deja la suspensión en reposo durante la noche a +5°C y el sólido se recoge, se lava con agua y acetona y se seca a 40°C para dar 30 el producto del título esencialmente exento del isómero L-(+).

1 Rendimiento = aproximadamente ≈ 30 % (de un material con una pureza del 85-90 %).

α_D (0,5 % HCl N/10) = +205,5

Análisis elemental del trihidrato:

5

	<u>Teórico</u>	<u>Encontrado</u>
C	46,85	47,17
H	5,89	5,72
N	9,10	9,02
S	6,93	7,27
10 H ₂ O	11,7	11,33 (KF) y 10,77 (TGA)

El espectro RMN concuerda con la estructura atribuida.

Ensayo yodométrico (frente a un patrón de ampicilina)
= 738 mcg/ml.

15 Método B. Proceso húmedo

Se disuelven 10,8 g (0,05 moles) de 6-APA en 45 ml de agua y 11,7 ml de HCl 6N; se añaden 300 ml de acetona y la mezcla se enfría a -5°C . Después se añaden poco a poco 7,4 g (0,028 moles) de hidrocloreuro de cloruro de D-(-)- α -amino- α -(p-acetoxifenil)acetilo y el pH se mantiene constante a 1,4-1,6 por adición de trietilamina.

20 Se añade la segunda fracción del hidrocloreuro de cloruro a pH 1,2-1,4. Al cabo de una hora a -5°C , la acetona se separa a vacío y el pH de la solución se ajusta a 4,3-4,5.

25 El material sólido se recoge y desprecia. Las aguas madres se siembran y se dejan cristalizar durante la noche a $+5^{\circ}\text{C}$. Se recoge el RN 1395, se lava cuidadosamente con un poco de agua y con acetona y se seca a 40°C . Rendimiento: 2,0 g (9%). El producto obtenido es idéntico al preparado por el Método A.

30 Datos biológicos

La Tabla I contiene los datos comparativos de la CMI.

1 para la amoxicilina (BL-P1410: análogo p-hidroxi de la ampicilina) y la p-acetoxiampicilina (RN-1395). Las concentraciones mínimas de inhibición fueron determinadas por el método de dilución al doble del caldo, utilizando concentraciones equimoleculares de cada compuesto.

5 La Tabla II y las Figuras I y II que acompañan a esta memoria muestran los datos comparativos de los niveles en sangre en ratas y perros cuando se administra amoxicilina (BL-P1410) y p-acetoxiampicilina (RN-1395). La Tabla III contiene los resultados obtenidos de las Figuras I y II.

10 Como podrá observarse en los datos biológicos, la p-acetoxiampicilina y la amoxicilina presentan propiedades similares de CMI pero la p-acetoxiampicilina presenta propiedades de niveles en sangre sorprendentemente superiores.

15

TABLA I

CMI (mg/ml).

Caldo nutriente		Amoxicilina (BL-P1410)	p-acetoxiampicilina RN 1395
Organismos			
20	D. pneumoniae* (10-3)** A9585	0,008	0,008
	Str. pyogenes* (10-3)** A9604	0,008	0,008
	S. aureus Smith (10-4) A9537	0,06	0,13
	S. aureus + 50 % de suero (10-4) A9537	0,06	0,13
	S. aureus BX 1633 (10-3) A9606	8	8
25	S. aureus BX 1633 (10-2) A9606	>125	>125
	S. aureus Meth-Res (10-3) A15097	63	63
	Sal. enteritidis (10-4) A9531	0,13	0,13
	E. coli Juhl (10-4) A15119	2	4
	E. coli (10-4) A9675	32	32
30	K. pneumoniae (10-4) A9977	0,3	0,3

1

TABLA I (continuación)

Organismos		Amoxicilina (BL-P1410)	p-acetoxiampici- lina RN 1395
K. pneumoniae (10-4)	A15130	125	>125
5 Pr. mirabilis (10-4)	A9900	0,3	0,6
Pr. morganii (10-4)	A15153	125	>125
Ps. aeruginosa (10-4)	A9843A	>125	>125
Ser. marcescens (10-4)	A20019	32	63
Ent. cloacae (10-4)	A9656	>125	>125
10 Ent. cloacae (10-4)	A9657	63	63
Ent. cloacae (10-4)	A9659	63	>125

* 45 % AAB + 5 % suero + 50 % NB

** dilución de un cultivo de caldo de una noche

15

TABLA II

Niveles en sangre en ratas (mcg/ml)

100 mg/kg - vía oral

Compuesto	Sexo	Horas					
		0,5	1	1,5	2	4	6
20 RN 1395	M	15,1	20,2	21,8	18,9	2,8	0,5
	M	22,4	23,0	20,2	18,6	2,9	0,8
	M	14,2	18,9	19,5	12,2	6,1	0,5
	H	12,2	21,8	20,7	17,3	3,6	0,8
	H	18,9	23,0	23,0	18,9	2,9	0,7
	H	14,3	22,4	20,7	18,6	3,5	0,4
25 Promedio		16,18	21,55	20,98	17,41	3,63	0,6
30 BL-P1410	M	16,0	23,0	14,3	12,2	2,9	0,2
	M	17,9	16,9	16,4	13,4	4,1	0,6
	M	18,6	15,5	16,4	11,0	3,3	0,5
	H	16,9	19,8	13,4	11,0	2,6	0,6

TABLA II (continuación)

<u>Compuesto</u>	<u>Sexo</u>	<u>Horas</u>					
		<u>0,5</u>	<u>1</u>	<u>1,5</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>6</u>
BL-P1410	H	17,7	15,6	13,4	15,1	3,4	0,2
	H	16,8	22,4	12,5	12,5	2,6	0,5
Promedio		17,31	18,86	14,40	12,50	3,15	0,43

10

15

20

25

30

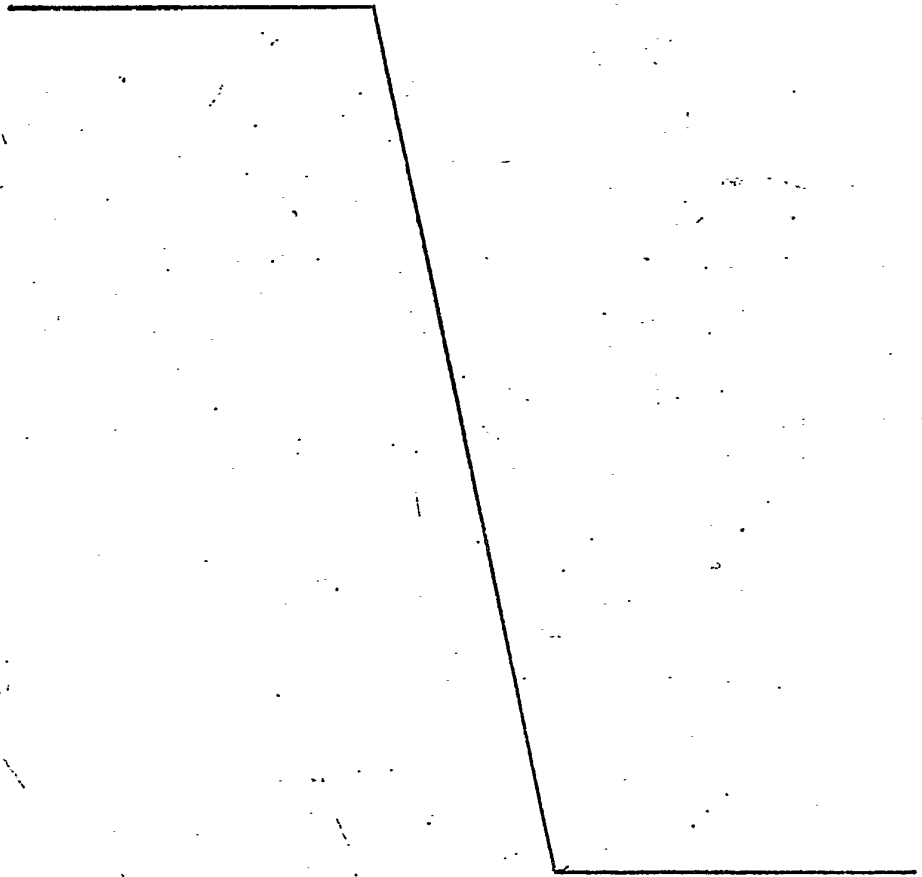


TABLA III

	RN 1395 DQ IV 148 ratas, vía oral 100 mg/kg	BL-P1410 PR 4 ratas, vía oral, 100 mg/kg	Ensayo t esta- distico
1	0 horas	-	n.s. *
5	0,5 horas	16,18	17,31 p > 0,05
	1 hora	21,55	18,86 p > 0,01
	1,5 horas	20,98	14,40 p > 0,01
	2 horas	17,41	12,50
10	4 horas	3,63	3,15 n.s.
	6 horas	0,61	0,43 n.s.
	Máximo de la curva concentración media en suero-tiempo (mcg/ml)	21,55	18,86 p > 0,05
	Promedio de la concentración máxima individual en suero (mcg/ml)	21,91	19,90 p > 0,05
15	Tiempo del máximo de la curva de concentración media en suero-tiempo (horas)	1,0	1,0 n.s.
	Promedio de los tiempos máximos individuales (horas)	0,75	1,16 -
	Promedio de las áreas bajo la curva de concentración individual en suero-tiempo mcg/ml x horas	58,99	47,68 p < 0,001
20	Eliminación urinaria (mg) 0-3 horas al cabo de	5,06	4,53
	3-6 horas	1,11	0,90
	0-6 horas	6,17	5,43
25	Eliminación urinaria en porcentaje de la dosis absorbida	43,7	39,9 p > 0,05

* n.s. = no significativo.

TABLA III

	<u>RN 1395 DQ IV 148</u> <u>ratas, vía oral</u> <u>100 mg/kg</u>	<u>BL-P1410 PR 4</u> <u>ratas, vía oral,</u> <u>100 mg/kg</u>	<u>Ensayo t esta-</u> <u>dístico</u>
horas	-	-	n.s.*
,5 horas	16,18	17,31	p > 0,05
hora	21,55	18,86	p > 0,01
,5 horas	20,98	14,40	p > 0,01
horas	17,41	12,50	
horas	3,63	3,15	n.s.
horas	0,61	0,43	n.s.
tración media en suero-tiempo (mcg/ml)	21,55	18,86	p > 0,05
ión máxima individual en suero(mcg/ml)	21,91	19,90	p > 0,05
urva de concentración media en suero-	1,0	1,0	n.s.
áximos individuales (horas)	0,75	1,16	-
o la curva de concentración indi- mcg/ml x horas			
0-6 horas	58,99	47,68	p < 0,001
0-3 horas	5,06	4,53	
3-6 horas	1,11	0,90	
0-6 horas	6,17	5,43	
0-6 horas	43,7	39,9	p > 0,05

o.

1 Además de lo anterior, los compuestos de la invención
también son útiles como intermediarios para la preparación de
los correspondientes compuestos p-hidroxi que se sabe que son
potentes agentes antibacterianos, útiles en el tratamiento de
5 las enfermedades infecciosas en el ganado aviar y en los ani-
males, incluido el hombre, producidas por muchas bacterias
Gram-positivas y Gram-negativas.

 Hemos encontrado que el ácido 6-D--)- α -amino- α -(p-ace-
10 toxifenilacetamido)penicilánico, aunque estable en una solu-
ción salina normal, es hidrolizado enzimáticamente al conoci-
do y potente ácido 6-D--)- α -amino- α -(p-hidroxifenilacetami-
do)penicilánico.

 Por consiguiente, esta invención también proporciona
un nuevo procedimiento para la preparación de ácido 6-D--)-
15 α -amino- α -(p-hidroxifenilacetamido)penicilánico, un hidrato
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, cuyo proce-
dimiento consiste en tratar una solución acuosa del ácido
6-D--)- α -amino- α -(p-acetoxifenilacetamido)penicilánico con
20 una esterasa, a un pH comprendido aproximadamente entre 5,0
y 7,5; aislar el producto por métodos conocidos y, si se de-
sea, convertir por métodos conocidos el producto en forma de
ácido libre o hidrato en la correspondiente sal farmacéutica-
mente aceptable del mismo.

 Una realización preferida es la preparación del ácido
25 6-D--)- α -amino- α -(p-hidroxifenilacetamido)penicilánico, su
hidrato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, cu-
yo procedimiento consiste en tratar en solución acuosa el
ácido 6-D--)- α -amino- α -(p-acetoxifenilacetamido)peniciláni-
co con una esterasa seleccionada entre suero humano, suero
30 animal, esterasa cítrica, salvado de trigo, germen de trigo

1 y *Bacillus subtilis*, a un pH comprendido aproximadamente entre 5,0 y 7,5 y a una concentración de alrededor de 5 a 10 mg/ml de esterasa por volumen total de la solución acuosa; aislar el producto por métodos conocidos y, si se desea, convertir el producto en forma de ácido libre o hidrato en la correspondiente sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 Una realización comercialmente preferida de esta invención es la preparación de ácido 6-D(-)- α -amino- α -(p-hidroxifenilacetamido)penicilánico, hidratos o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, que consiste en:

10 tratar en solución acuosa el ácido 6-D(-)- α -amino- α -(p-acetoxifenilacetamido)penicilánico con una esterasa seleccionada entre esterasa cítrica, salvado de trigo y germen de trigo, a un pH comprendido aproximadamente entre 5,0 y 7,5 y a una concentración de unos 5 a 10 mg/ml de esterasa por volumen total de la solución acuosa; y

15 aislar el producto por métodos conocidos y, si se desea, convertir el producto en forma de ácido libre o de hidrato en la correspondiente sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 De especial interés comercial es el procedimiento para la preparación de ácido 6-D(-)- α -amino- α -(p-hidroxifenilacetamido)penicilánico, un hidrato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que consiste en:

25 tratar en una solución acuosa el ácido 6-D(-)- α -amino- α -(p-acetoxifenilacetamido)penicilánico con la esterasa comercial, salvado de trigo grosero, a un pH comprendido entre 5,5 y 6,0 u opcionalmente en presencia de un regulador a un pH de 7,0, a una concentración de unos 10 mg/ml de esterasa por volumen total de solución y

30

1 aislar el producto por métodos conocidos y, si se desea, convertir el producto en forma de ácido libre o hidrato en su correspondiente sal farmacéuticamente aceptable.

5 El ácido 6-D-(-)- α -amino- α -(p-hidroxifenilacetamido)-penicilánico (amoxicilina), preparado mediante esta invención, es conocido como potente agente antibacteriano, útil en el tratamiento de las enfermedades infecciosas en el ganado aviar y en los animales, incluido el hombre, producidas por muchas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

10 Los siguientes ejemplos ilustran la preparación de amoxicilina de acuerdo con la invención.

EJEMPLO A

15 Se preparan soluciones de 0,5 mg/ml de ácido 6-D-(-)- α -amino- α -(p-acetoxifenilacetamido)penicilánico (p-acetoxiampicilina) en solución salina normal y en suero humano. También se preparan soluciones patrón de 0,5 mg/ml de ácido 6-D-(-)- α -amino- α -(p-hidroxifenilacetamido)penicilánico (p-hidroxiampicilina) en solución salina normal y en suero humano.

20 Todas las soluciones anteriores se incuban a 37°C, sacudiendo y se muestrean para cromatografía a intervalos de tiempo de 0, 2, 4, 8 y 24 horas. Las soluciones, aproximadamente 5 microlitros por raya, se depositan sobre tiras de media pulgada (12,7 mm) de papel Whatman nº 1, que se secan y desarrollan en un sistema disolvente que contiene 80 partes de acetato de butilo, 15 partes de n-butanol, 40 partes de ácido acético y 24 partes de agua. Después las tiras son bioautografiadas sobre placas sembradas con bacillus subtilis, a un pH de 6,0.

25 Los biocromatogramas indican que la p-acetoxiampicilina es rápidamente hidrolizada a la forma p-hidroxi en el suero

30

1 humano pero parece estable en solución salina normal.

EJEMPLO B

Se preparan las siguientes soluciones:

5 0,5 mg/ml de ácido 6-D-(-)- α -amino- α -(p-acetoxifenil-acetamido)penicilánico (p-acetoxiampicilina) en solución salina;

0,5 mg/ml de p-acetoxiampicilina en una solución de esterasa cítrica diluida diez veces con solución reguladora de fosfato potásico 0,1M para mantener el pH a 7,0 y

10 0,5 mg/ml de p-acetoxiampicilina en una solución de 10 mg/ml de salvado de trigo grueso (Shiloh) conteniendo 0,1 M. de solución reguladora de fosfato potásico.

15 Todas las soluciones anteriores se incuban a 37°C con sacudidas y se muestrean para cromatografía como se ha descrito en el Ejemplo A.

Estos biocromatogramas indican que la p-acetoxiampicilina es estable en solución salina pero que se hidroliza rápidamente a la forma p-hidroxi con la esterasa cítrica y con la esterasa de salvado.

20

EJEMPLO C

Se preparan las siguientes mezclas de reacción, sacudidas a 28°C y muestreadas a intervalos de 0, 0,5, 1, 2, 3, 4 y 6 horas, como se describe en el Ejemplo A.

25 1. 25 g de salvado desengrasado (salvado de trigo obtenido de Shiloh, tratado con acetona y secado), 4,5 ml de solución reguladora de fosfato potásico 0,1M, pH 6,0 y 0,5 ml de ácido 6-D-(-)- α -amino- α -(p-acetoxifenilamido)penicilánico (p-acetoxiampicilina) a una concentración de 5 mg/ml en la misma solución reguladora.

30

2. 25 mg de salvado desengrasado, 4,5 ml de solución

1 reguladora de fosfato potásico 0,1M, pH 7,0 y 0,5 ml de p-ace-
toxiampicilina a razón de 5 mg/ml en la misma solución regu-
ladora.

5 3. 25 mg de salvado desengrasado, 4,5 ml de solución
reguladora de fosfato potásico 0,1M, pH 7,5 y 0,5 ml de p-ace-
toxiampicilina a una concentración de 5 mg/ml en la misma so-
lución reguladora.

10 4. 50 mg de salvado desengrasado, 4,5 ml de solución
reguladora de fosfato potásico 0,1M a pH 6,0 y 0,5 ml de p-
acetoxiampicilina a una concentración de 5 mg/ml en la misma
solución reguladora.

15 5. 50 mg de salvado desengrasado, 4,5 ml de solución
reguladora de fosfato potásico 0,1M a pH 7,0 y 0,5 ml de
p-acetoxiampicilina a una concentración de 5 mg/ml en la mis-
ma solución reguladora.

20 6. 50 mg de salvado desengrasado, 4,5 ml de solución
reguladora de fosfato potásico 0,1M a pH 7,5 y 0,5 ml de p-
acetoxiampicilina a una concentración de 5 mg/ml en la misma
solución reguladora.

Los resultados de los biocromatogramas se encuentran
en la Tabla IV.

TABLA IV

% de conversión en p-hidroxiampicilina

25

Reacción nº	Tiempo de reacción (horas)						
	0	0,5	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 %

30

1 Por lo tanto, se obtienen resultados óptimos utilizando la mezcla de reacción nº 5; la conversión total en p-hidroxiampicilina es completa en 2 horas a una concentración de enzima de 10 mg/ml y a un pH de 7,0.

5 EJEMPLO D

Se prepara la siguiente mezcla de reacción conteniendo 50 mg de salvado desengrasado (Shiloh), 2,5 mg de ácido 6-D-(-)- α -amino- α -(p-acetoxifenilacetamido)penicilánico (p-acetoxiampicilina) y 5,0 ml de agua. La mezcla se sacude a unos 10 28°C y se evalúa por cromatografía al cabo de 1, 2 y 3 horas como se ha descrito en el Ejemplo 2.

Los resultados de los biocromatogramas indican una 15 conversión del 100 % de p-acetoxiampicilina en p-hidroxiampicilina en 3 horas. El pH de la mezcla de reacción permanece constante a 5,7 aproximadamente, a pesar de la ausencia de solución reguladora.

EJEMPLO E

Se combinan los siguientes materiales: 20 g de salvado desengrasado (Shiloh), 1,0 g de ácido 6-D-(-)- α -amino- α - 20 (p-acetoxifenilacetamido)penicilánico (p-acetoxiampicilina) y 2 l de una solución acuosa 0,01M de regulador de fosfato potásico a pH 7,0. La mezcla resultante se agita a unos 28°C y se muestrea cada hora como se ha descrito en el Ejemplo A.

Los biocromatogramas indican una conversión del 100 % 25 en 3 horas. Después se centrifuga la mezcla. El líquido que sobrenada se recoge, se ajusta a pH 4,0 con ácido clorhídrico y se liofiliza. El liofilizado se vuelve a analizar como se ha descrito antes y se encuentra que contiene aproximadamente 900 mg de p-hidroxiampicilina.

30 Se suspenden 6,0 g del liofilizado en 20 ml de agua.

1 A la mezcla resultante se añade ácido clorhídrico 6N para
reducir gradualmente el pH hasta 2,0. Se continúa agitando
durante otros 15 minutos y después se filtra el sólido. El
5 filtrado se trata con 1,0 g de carbón decolorante, se filtra
y el filtrado transparente se ajusta a un pH de 4,5. Tiene
lugar la cristalización al rascar las paredes de la solución
y se deja que continúe durante una hora. Los cristales se re-
cogen en un filtro, se lavan con agua y acetona y después se
10 secan para dar 180 mg de trihidrato de ácido 6-D-(-)- α -ami-
no- α -(p-hidroxifenilacetamido)penicilánico, punto de descompo-
sición 201°C.

	<u>% teórico</u>	<u>% encontrado</u>
Análisis para C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S: C	45,82	45,87
H	6,01	5,71
15 N	10,02	10,48
H ₂ O K.F.	12,89	13,68

DATOS BIOLÓGICOS

Datos sobre la actividad in vivo

20 Las dosis curativas medias (DC₅₀) en ratones contra
un ataque letal en exceso de varios organismos patógenos fue-
ron determinadas para el ácido 6-[D-(-)- α -amino- α -(4-hidroxif-
enil)acetamido]penicilánico. Los datos DC₅₀ obtenidos se en-
cuentran a continuación en mg/kg.

<u>Organismo</u>	<u>Vía de administración</u>	<u>DC₅₀ (mg/kg)</u>
25 S. aureus Smith	intramuscular	0,2
	oral	0,9
Sal. enteritidis	intramuscular	5,4
	oral	4,0
K. pneumoniae	intramuscular	7
	oral	7
30 S. enteritidis	oral	3,5

Datos de la absorción oral

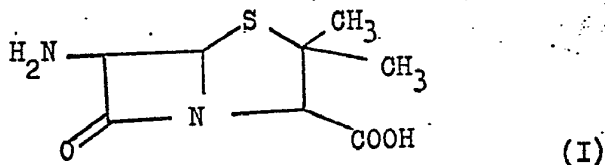
Se realizaron medidas de los niveles en sangre obtenidos en ratones por administración oral de ácido 6-[D-(-)-α-amino-α-(4-hidroxifenil)acetamido]penicilánico. En el ensayo, cuatro ratones fueron medicados oralmente con 30 mg/kg del compuesto. A continuación damos los niveles medios en sangre obtenidos:

<u>Tiempo, (horas)</u>	<u>Niveles en sangre (mcg/ml)</u>
0,5	8,1
1,0	4,0
2,0	1,40
3,5	1,1

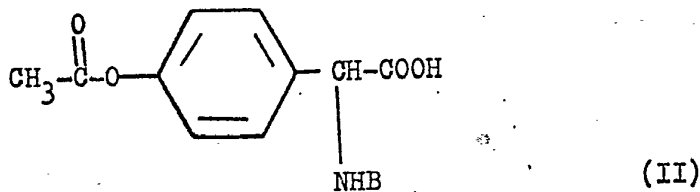
En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de ácidos acetamido penicilánicos que consiste en a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula:



o un éster silílico o una sal del mismo, con un agente acilante de un ácido de fórmula:



donde B es un grupo protector del amino y separar el grupo protector del amino para producir el compuesto citado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y, si se desea,

1

antes o después de separar B, convertir por métodos conocidos el producto en forma de ácido libre, de éster silílico o de sal, en el correspondiente ácido libre o en una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; estando dicho compuesto de fórmula (II) en la forma D-(-) esencialmente exenta del isomero L-(+); y opcionalmente b) tratar en una solución acuosa el ácido 6-D-(-)- α -amino- α -(p-acetoxifenilacetamido) penicilánico obtenido en la etapa anterior con una esterasa, a un pH comprendido aproximadamente entre 5,0

5

y 7,5; aislar el producto y, si se desea, convertir el producto en forma de ácido 6-D-(-)- α -amino- α -(p-hidroxifenilacetamido)penicilánico libre o hidrato en su correspondiente sal farmacéuticamente aceptable.

10

15

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde el agente acilante es hidrocloruro de cloruro de D-(-)- α -amino- α -(p-acetoxifenil) acetilo.

20

3. Un procedimiento según la reivindicación 1, que consiste en tratar en solución acuosa el ácido 6-D-(-)- α -amino- α -(p-acetoxifenilacetamido)penicilánico con una esterasa seleccionada entre el grupo formado por suero humano, suero animal, esterasa cítrica, salvado de trigo, germen de trigo, y bacillus subtilis, a un pH comprendido aproximadamente entre 5,0 y 7,5 y a una concentración de unos 5 a 10 mg/ml de esterasa por volumen total de la solución acuosa; aislar el producto por métodos conocidos y, si se desea, convertir el producto en forma de ácido libre o hidrato en la correspondiente sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25

30

4. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 y 3, que consiste en tratar en una solución acuosa el ácido 6-D-(-)- α -amino- α -(p-acetoxifenilacetamido)penicilánico con una esterasa seleccionada entre el grupo formado por esterasa cítrica, salvado de trigo y germen de trigo, a un pH comprendido apro-

1 ximadamente entre 5,0 y 7,5 y a una concentración de unos 5
a 10 mg/ml de esterasa por volumen total de la solución acuosa
aislar el producto por métodos conocidos y, si se desea, con-
vertir el producto en forma de ácido libre o hidrato en la
5 correspondiente sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Un procedimiento según cualquiera de las reivin-
dicaciones 1,3 y 4, que consiste en tratar en una solución a-
cuosa el ácido 6-D(-)- α -amino- α -(p-acetoxifenilacetamido) pe-
nicilánico con la esterasa comercial, salvado de trigo grose-
10 ro, a un pH comprendido entre 5,5 y 6,0 u opcionalmente en pre-
sencia de un regulador a un pH de 7,0 a una concentración de
unos 10mg/ml de esterasa por volumen total de solución; ais-
lar el producto por métodos conocidos y, si se desea, conver-
tir el producto en forma de ácido libre o hidrato en la co-
15 rrespondiente sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: UN
PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE ACIDOS ACETAMIDOPENICIL-
LANICOS.

20 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva que consta de veinticinco pági-
nas mecanografiadas.

Madrid, 12 abril 1.975
BERNARDO UNGRIA
P.P.

25

30