



19 ES	11 NUMERO	10 A1
	21	
22	FECHA DE PRESENTACION	
	9 enero 1976	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07D/A61K	436.766 sol. 18.4.1975

64 TITULO DE LA INVENCION

UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE ACIDO CLAVULANICO.

71 SOLICITANTE (S)

BEECHAM GROUP LIMITED.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

Beecham House, Great West Road, BRENTFORD, Middlesex, Inglaterra.

72 INVENTOR (ES)

Martin Cole; Thomas Trevor Howarth; Christopher Reading, todos de nacionalidad británica.

73 TITULAR (ES)

El mismo solicitante.

74 REPRESENTANTE

DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU.

1 tas cepas de estos organismos a algunas penicilinas y ce-
falosporinas. La importancia de la producción de β -lacta-
masa puede ser comprendida cuando se observa que una gran
proporción de organismos clínicamente aislados producen
5 β -lactamasas [véase, por ejemplo, M. Wilson e I.A. Freeman,
Bacteriological Proceedings, 80 (1969) donde, en un artí-
culo titulado "Penicillin Inactivation by Gram-negative
Bacilli" demuestran que el 84 % de los organismos Gram-
negativos aislados en un hospital americano producían β -
10 lactamasas]. En muchos casos, algunas penicilinas o cefa-
losporinas son ineficaces en el tratamiento de enfermeda-
des atribuidas a organismos no productores de β -lactamasa
debido a la aparición común de una co-infección por un
producto de β -lactamasa [véase, por ejemplo, R. May y cola-
15 boradores; Brit. J. Dis. Chest., 66, 185 (1972)]. Cabe espe-
rar que la combinación de una sustancia inhibidora de la
 β -lactamasa con una penicilina o cefalosporina proteja
estas últimas de la degradación de la β -lactamasa bacteria-
na y con ello aumente su actividad antibacteriana contra
20 muchos organismos infecciosos. Este proceso de potenciación
de la actividad antibacteriana es denominado sinergismo
cuando la actividad antibacteriana de la combinación es muy
superior a la simple adición de las actividades de las dos
sustancias separadas. El componente inhibidor de la β -lacta-
25 masa de la mezcla se denomina sinergista y estas sustancias

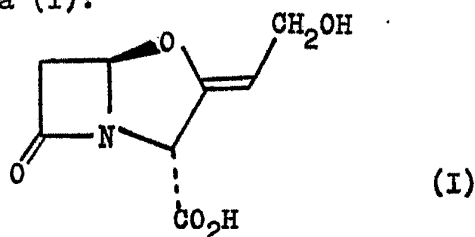
1 son valiosas para aumentar la actividad antibacteriana de
las penicilinas y de las cefalosporinas contra los organis-
mos resistentes. Uno de los objetos de esta invención es
proporcionar estos sinergistas.

5 Ya se han descrito en la bibliografía ejemplos
del uso de ciertas penicilinas y cefalosporinas semi-sinté-
ticas resistentes a la β -lactamasa como inhibidores de la
 β -lactamasa y sinergistas para penicilinas y cefalospo-
rinas; véase, por ejemplo Sutherland y colaboradores, Nature,
10 201, 868 (1964); Sabath y colaboradores, Nature, 204, 1066
(1964); O'Callaghan y colaboradores, Antimicrob. Agents
and Chemotherapy, 1968, 67 (1969). Sin embargo, ninguno
de estos agentes conocidos ejerce un efecto espectacular
sobre el espectro del otro antibiótico presente en la mezcla.

15 Algunos cultivos de actinomicetes han sido descri-
tos como productores de sustancias inhibitoras de la β -lac-
tamasa que actúan sinérgicamente con las penicilinas o ce-
falosporinas, por ejemplo los cultivos descritos en la pa-
tente británica nº 1.363.075 y los descritos por Hata y
20 colaboradores, J. Antibiotics, 25, 473 (1972) y Umezawa y
colaboradores, J. Antibiotics, 26, 51 (1973). Ninguno de
estos inhibidores de β -lactamasa de origen actinomicetal
han encontrado todavía utilización clínica. Algunas carac-
terísticas especialmente notables que distinguen al ácido
25 clavulánico y a otros inhibidores de β -lactamasa de origen

1 actinomicetal son su posibilidad de extracción en disolven-
tes orgánicos a partir del filtrado del cultivo a pH 2,
su gran estabilidad en la sangre humana y su amplio espec-
tro de actividad antibacteriana e inhibidora de la β -lacta-
5 masa, su bajo peso molecular y sus altos valores R_f en cro-
matografía de papel utilizando diversos sistemas disolven-
tes.

En nuestra solicitud de patente española copendien-
te nº 436.766, se describe el ácido clavulánico, que es el
10 compuesto de fórmula (I):

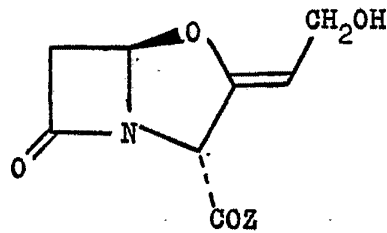


15 y sus sales y su preparación por cultivo aerobio de
Streptomyces clavuligerus.

La gran utilidad de los ésteres de ácido clavulá-
nico puede ser fácilmente apreciada cuando se observa que
ciertas cepas de Klebsiella aerogenes A, cuyo crecimiento
20 no es inhibido por 125 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina o por 10 $\mu\text{g/ml}$
de éster metílico de ácido clavulánico, son inhibidas por
menos de 12,5 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina en presencia de 5 $\mu\text{g/ml}$
del éster metílico del ácido clavulánico.

25 Esta invención proporciona un procedimiento para
la preparación de un compuesto de fórmula (II):

1

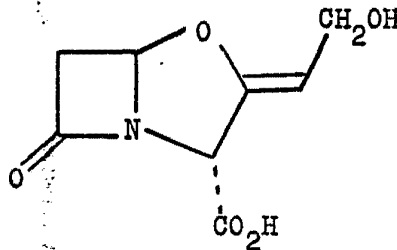


(II)

5

donde Z es un grupo OR o SR y donde R es un grupo alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, o arilalquilo, opcionalmente sustituido, de hasta 16 átomos de carbono, cuyo procedimiento consiste en hacer reaccionar un compuesto de fórmula (I):

10



(I)

15

con un diazoalcano e con un alcohol ROH o tiol RSH, en presencia de un agente promotor de la condensación.

La reacción normalmente tendrá lugar en un disolvente orgánico inerte de constante dieléctrica relativamente alta, tal como acetonitrilo.

20

Esta reacción se lleva a cabo normalmente a la temperatura ambiente o más baja, por ejemplo entre -10°C y $+22^{\circ}\text{C}$, más habitualmente entre -5°C y $+18^{\circ}\text{C}$, por ejemplo inicialmente a 0°C y después calentando gradualmente hasta unos 15°C . El agente promotor de la condensación

25

1 utilizado es normalmente un agente que separa agua de la
mezcla de reacción. Los agentes adecuados son las carbodi-
imidias, carbodiimidazoles o reactivos equivalentes. La
díciclohexilcarbodiimida ha resultado ser un agente promo-
5 tor de la condensación especialmente adecuado para uso en
este procedimiento. Con objeto de reducir al mínimo la
auto-condensación del ácido clavulánico, esta reacción
habitualmente se lleva a cabo en presencia de un exceso
considerable del alcohol.

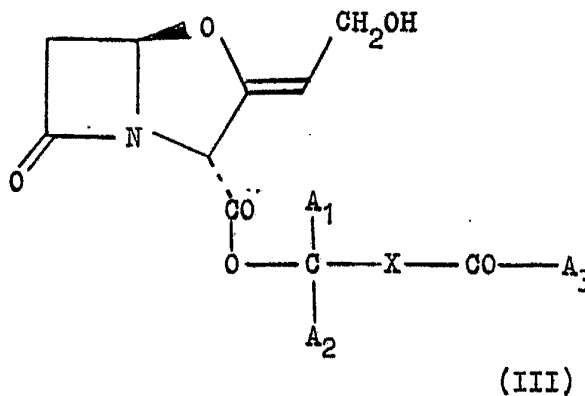
10 Adecuadamente el grupo R en la fórmula (II) con-
tiene no más de 12 átomos de carbono y todavía mejor no
más de 8 átomos de carbono.

15 Preferiblemente, el grupo R deriva nocionalmente
de un alcohol ROH o (menos favorablemente) de un tiol
RSH que sea farmacéuticamente aceptable.

20 Los sustituyentes adecuados que pueden incluirse
en el grupo R son átomos de halógeno y grupos alcoxilo infe-
rior, hidroxilo, aciloxi inferior, alquil(inferior)amino,
dialquil(inferior)amino y similares. El término "inferior"
25 significa que el grupo contiene hasta 6 átomos de carbono
y preferiblemente hasta 4 átomos de carbono. Así, por ejem-
plo, R puede ser un grupo metilo, etilo, n-propilo, isopro-
pilo, butilo lineal o ramificado, pentilo, heptilo, octilo,
nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, vinilo, alilo, buteni-
lo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo,

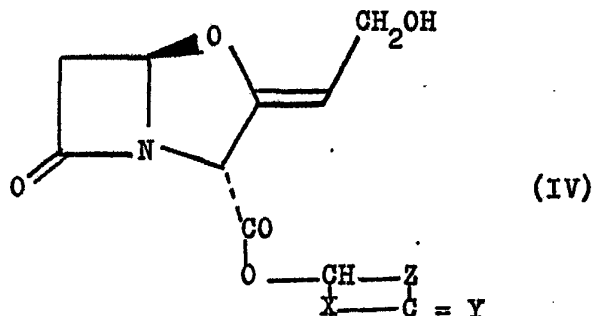
1 cicloheptilo, ciclohexenilo, ciclohexadienilo, metilciclo-
 pentilo, metilciclohexilo, bencilo, benzohidrilo, fenileti-
 lo, naftilmetilo, fenilo, naftilo, propinilo, tolilo, 2-
 cloroetilo, 2,2,2-tricloroetilo, 2,2,2-trifluoroetilo, ace-
 5 tilmetilo, benzoilmetilo, 2-metoxietilo, 2-dimetilamino-
 etilo, 2-dietilaminoetilo, 2-piperidinoetilo, 2-morfolino-
 etilo, 3-dimetilaminopropilo, p-clorobencilo, p-metoxiben-
 cilo, p-nitrobencilo, p-bromobencilo, m-clorobencilo, 6-me-
 toxinaftil-2-metilo, p-clorofenilo, p-metoxifenilo o cual-
 10 quier grupo similar, así como los grupos que en el campo
 de las penicilinas o cefalosporinas son conocidos por pro-
 ducir ésteres que se sabe que son fácilmente hidrolizados
in vivo para formar el antibiótico de origen.

15 Los ésteres fácilmente hidrolizables comprenden,
 aunque sin limitarse solamente a ellos, los de fórmulas
 (III) y (IV):



25

1



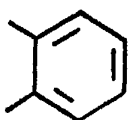
5

10

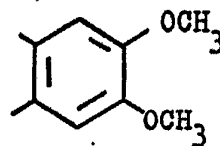
15

donde A_1 es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, arilo o aralquilo; A_2 es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo; A_3 es un grupo alquilo, arilo o aralquilo; X es oxígeno o azufre; Y es oxígeno o azufre y Z es un grupo orgánico divalente. Los ésteres de fórmulas (III) y (IV) que liberan con bastante facilidad el ácido clavulánico a la corriente sanguínea después de la administración son aquéllos donde A_1 es un átomo de hidrógeno, A_2 es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo y A_3 es un grupo metilo, etilo, propilo, butilo, bencilo o fenilo y aquéllos donde X es oxígeno, Y es oxígeno y Z es $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$,

20



o

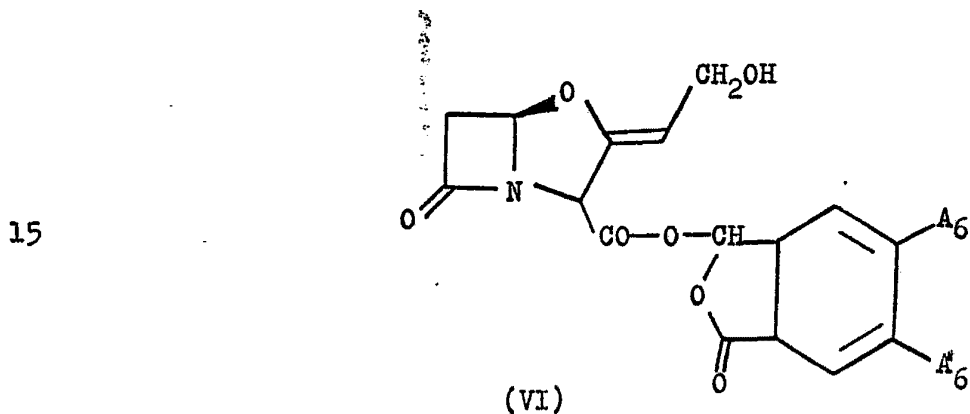
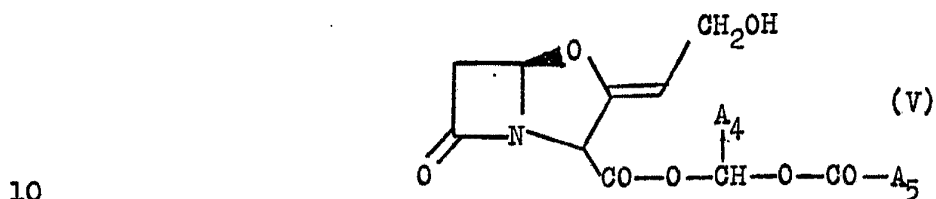


25

Cuando se utiliza en combinación con las fórmulas anteriores, el término "alquilo" incluye los grupos alquilo de hasta 6 átomos de carbono; el término "arilo" incluye los grupos fenilo, naftilo o fenilo sustituido

1 con un sustituyente inerte tal como un átomo de flúor o
cloro o un grupo metilo o metoxi o similares; cuando se
utiliza aquí, el término "aralquilo" significa un grupo
alquilo sustituido con un grupo arilo.

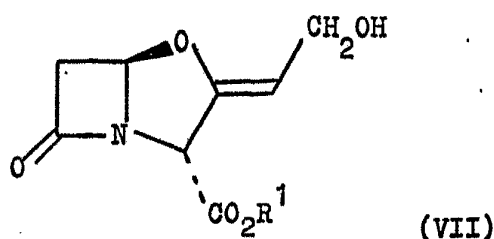
5 Son ésteres especialmente adecuados de fórmulas
(III) y (IV) los de fórmulas (V) y (VI):



20 donde A₄ es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo, A₅
es un grupo metilo, terc-butilo o fenilo y A₆ es un átomo
de hidrógeno o un grupo metoxi.

25 Muchos ésteres del ácido clavulánico difieren
de los ésteres análogos de las penicilinas o cefalosporinas
en que presentan una mayor tendencia a hidrolizarse a áci-

1 do clavulánico bajo condiciones suaves. Así, por ejem-
plo, los ésteres alquílicos simples como el éster metíli-
co se hidrolizan lentamente a ácido clavulánico en agua
regulada a pH 7. Los ésteres que experimentan cierta hi-
5 drólisis bajo condiciones suaves están incluidos dentro
de la fórmula (VII):



15 donde R^1 es un grupo hidrocarbonado de 1 a 9 átomos de car-
bono opcionalmente sustituido por halógeno, alcoxi infe-
rior, hidroxilo o grupos básicos opcionalmente salificados
de fórmula NR^2R^3 , donde R^2 es un átomo de hidrógeno o un
grupo alquilo inferior, R^3 es un átomo de hidrógeno o un
grupo alquilo inferior o está unido a R^2 de manera que
 NR^2R^3 es un anillo de 5 o 6 miembros.

20 Cuando se utiliza con referencia a la fórmula
(VII), el término "inferior" significa que el grupo con-
tiene 1-4 átomos de carbono.

25 Adecuadamente, los grupos R^1 incluyen grupos
alquilo y aralquilo opcionalmente sustituidos con halóge-
no, metoxi, hidroxilo o grupos NR^2R^3 salificados, donde
 R^2 es un grupo metilo o etilo y R^3 es un grupo metilo o

1 etilo o está unido a R^2 de manera que NR^2R^3 es un grupo
pirrolidino, piperidino o morfolino.

Más adecuadamente, los grupos alquilo R^1 son
grupos de cadena lineal de hasta 6 átomos de carbono, opcio-
5 nalmente sustituidos con un grupo metoxilo, hidroxilo o
 NR^2R^3 salificado o un átomo de cloro, bromo o yodo o con
un grupo CCl_3 o CF_3 .

Los ésteres del ácido clavulánico de especial
utilidad como sinergistas son los que se hidrolizan en los
10 tejidos de los mamíferos, especialmente en la sangre huma-
na, para dar ácido clavulánico o una sal del mismo, porque
se cree que el ácido clavulánico y sus sales suelen ser
agentes sinérgicos algo más útiles que los ésteres. Mu-
chos de los ésteres de fórmulas (III)-(VII) son útiles pa-
15 ra este fin.

Otro grupo de ésteres especialmente adecuados de
esta invención son los intermediarios útiles que se con-
vierten fácilmente en ácido clavulánico o en una de sus sa-
les por técnicas químicas o bioquímicas que son conoci-
20 das en el campo de las penicilinas o cefalosporinas por
ser suficientemente suaves para no degradar a los anillos
de β -lactama reactivos y lábiles frente a los ácidos.

El éster más adecuado es el que puede separarse
por hidrogenólisis. Los ésteres convencionales para estos
25 procesos son los ésteres bencílico, bencílico sustituido,

1 benzohidrílico, benzohidrílico sustituido, tritílico y si-
milares. El éster bencílico ha resultado especialmente útil
para este fin.

5 Con mucho, la naturaleza de cualquier sustituyen-
te del radical éster carece de importancia siempre que no
interfiera con la reacción de hidrogenolisis.

10 Como ya se ha dicho anteriormente, el ácido clavu-
lánico y sus sales y ésteres poseen valiosas propiedades
terapéuticas. La administración de un éster de ácido clavu-
lánico se realiza en forma de composición farmacéutica que
comprende el éster de ácido clavulánico junto con un vehí-
culo farmacéuticamente aceptable.

15 Estas composiciones incluyen las que se encuentran
en forma adaptada para uso oral, tópico o parenteral y pue-
den ser utilizadas para el tratamiento de las infecciones
en los mamíferos, incluido el hombre.

20 Las formas adecuadas de estas composiciones son
tabletas, cápsulas, cremas, jarabes, suspensiones, solu-
ciones, polvos reconstituibles y formas estériles adecuadas
para inyección o infusión. Estas composiciones pueden con-
tener materiales convencionales farmacéuticamente acepta-
bles como diluyentes, ligantes, colorantes, aromatizan-
tes, preservativos, desintegrantes y similares, de acuerdo
25 con la práctica farmacéutica convencional, en la forma co-
nocida por los expertos en la técnica de formulación de

1 antibióticos.

Las composiciones en forma de dosis unitarias que comprenden un éster de ácido clavulánico adaptadas a una forma de administración oral constituyen un aspecto
5 de composición preferido en esta invención.

Bajo ciertas condiciones, la eficacia de las composiciones orales de los ésteres de ácido clavulánico puede ser aumentada si estas composiciones contienen un agente regulador del pH o un agente de revestimiento entérico
10 de tal forma que los compuestos de la invención no estén en contacto prolongado con los jugos gástricos de gran acidez. Estas composiciones reguladas o entéricamente revestidas pueden ser preparadas por métodos farmacéuticos convencionales.

15 El éster del ácido clavulánico puede estar presente en la composición como agente terapéutico único o puede estar presente junto con los otros agentes terapéuticos tales como un antibiótico β -lactámico. Los antibióticos β -lactámicos adecuados para inclusión en estas composiciones sinérgicas comprenden no solo los conocidos por ser
20 altamente susceptibles a las β -lactamasas sino también los que presentan un buen grado de resistencia intrínseca a las β -lactamasas. Así, los antibióticos β -lactámicos adecuados para ser incluidos en las composiciones de esta invención son la bencilpenicilina, fenoximetilpenicilina,
25

1 carbencilina, meticilina, propicilina, ampicilina, amoxicilina, epicilina, ticarcilina, ciclacilina, ácido 6-aminopenicilánico, ácido 7-aminocefalosporánico, ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico, cefaloridina, cefalotina, cefazolina, cefalexina, cefoxitina, cefacetriilo, cefamandol, cefapirina, 5 cefradina, cefaloglicina y otras penicilinas y cefalosporinas conocidas o pro-drogas, como hetacilina, metampicilina, los ésteres acetoximetílico, pivaloximetílico, o ftalidílico de bencilpenicilina, ampicilina, amoxicilina o cefaloglicina o 10 los α -ésteres fenílico, tolfílico o indanílico de carbencilina o ticarcilina o similares.

Naturalmente, si la penicilina o cefalosporina presente en la composición no es adecuada para administración oral, entonces la composición será adaptada a la administración parenteral. 15

Cuando está presente en una composición farmacéutica junto con un antibiótico de β -lactama, la relación del éster de ácido clavulánico presente a antibiótico de β -lactama presente puede estar comprendida, por ejemplo, entre 10:1 y 1:10 20 y ventajosamente puede ser de 3:1 a 1:3.

La cantidad total de agentes antibacterianos presentes en cualquier dosis unitaria estará comprendida normalmente entre 50 y 1500 mg y habitualmente será de 100 a 1000 mg.

Las composiciones de ésteres de ácido clavulánico 25 pueden ser utilizadas para el tratamiento de infecciones, entre

1 otras, del tracto respiratorio, del tracto urinario y de los tejidos blandos de los seres humanos.

5 Las composiciones de ésteres de ácido clavulánico también pueden ser utilizadas para tratar las infecciones de los animales domésticos tales como mastitis en el ganado vacuno.

10 Normalmente se administran entre 50 y 6000 mg de las composiciones de ésteres de ácido clavulánico cada día de tratamiento pero más habitualmente se administran entre 500 y 300 mg de la composición al día. Sin embargo, para el tratamiento de infecciones sistémicas graves o de infecciones de organismos especialmente intransigentes, pueden emplearse dosis más altas de acuerdo con la práctica clínica.

EJEMPLO 1

15 Preparación de clavulanato de metilo

20 Se tratan 130 mg de ácido clavulánico en 10 ml de etanol con un exceso de diazometano en éter. Al cabo de 2 minutos a la temperatura ambiente, se demuestra por cromatografía en capa fina que la reacción es completa. La solución se evapora a vacío y el residuo se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo. Se combinan las fracciones que contienen el clavulanato de metilo y se evaporan para dar 104 mg de un aceite transparente.

25

1

EJEMPLO 2

Preparación de clavulanato de metilo

Se enfrían y agitan a 0° 200 mg de ácido clavulánico en 5 ml de acetonitrilo. Se añaden 0,5 ml de metanol y después 206 mg de dicitclohexildicarbodiimida y la mezcla de reacción se agita a la temperatura ambiente durante la noche. Se filtra la suspensión y el filtrado se evapora a vacío para dar el clavulanato de metilo crudo. El producto crudo se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo para dar 140 mg de un aceite transparente.

5

10

EJEMPLO 3

Preparación de clavulanato de fenilo

Se enfrían y agitan a 0° 100 mg de ácido clavulánico en 5 ml de acetonitrilo. A la solución se añaden 0,94 g de fenol y 100 mg de dicitclohexildicarbodiimida y la mezcla de reacción se agita a la temperatura ambiente durante la noche. Se filtra la suspensión y se evapora el filtrado. El residuo se fracciona sobre gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo/hexano (1:1) para dar 70 mg de clavulanato de fenilo.

15

20

IR (película): 1800, 1770, 1690 cm^{-1} .

RMN (CDCl_3) 2,18 (s ancho, 1), 3,06 (dd, 1, $J = 17$ Hz, $J_2 = 0,9$ Hz), 3,54 (dd, 1, $J_1 = 17$ Hz, $J_2 = 2,6$ Hz), 4,29 (d, 2, $J = 7,5$ Hz), 5,1 (dt, 1, $J_1 = 7,5$ Hz, $J_2 = 1,5$

25

1 Hz), 5,29 (d, 1, $J = 1,5$ Hz), 5,76 (dd, 1, $J_1 = 2,6$ Hz, $J_2 = 0,9$ Hz), 7,35 δ (m, 5).

Peso molecular (espectrometría de masas): 275,0777
que corresponde a $C_{14}H_{13}NO_5$ (calculado: 275,0794).

5

EJEMPLO 4

Los siguientes compuestos se preparan por un método análogo al descrito en el Ejemplo 2.

Clavulanato de bencilo: IR (película): 1800, 1745, 1695 cm^{-1} ; RMN ($CDCl_3$): 2,25 (s, 1, intercambiable con D_2O), 3,05 (d, 1, $J = 17$ Hz), 3,51 (dd, 1, $J = 17$ Hz, $J_2 = 2,5$ Hz), 4,24 (d, 2, $J = 7,5$ Hz), 4,92 (dt, 1, $J = 7,5$ Hz, $J_2 = 1,5$ Hz), 5,15 (d, 1, $J = 1,5$ Hz), 5,24 (s, 2), 5,71 (d, 1, $J = 2,5$ Hz), 7,45 δ (s, 5).

15

Clavulanato de p-nitrobencilo: p.f. 117,5-118°.

Clavulanato de nonilo: IR (película): 1800, 1745, 1690 cm^{-1} . Peso molecular (espectrometría de masas) = 325,1890 que corresponde a $C_{17}H_{27}NO_5$ (calculado: 325,1889).

20

Clavulanato de 2,2,2-tricloroetilo: IR (película): 1800, 1760, 1690 cm^{-1} . RMN ($CDCl_3$): 1,56 (s ancho, 1), 3,07 (dd, 1, $J_1 = 17,5$ Hz, $J_2 = 0,7$ Hz), 3,56 (dd, 1, $J_1 = 17,5$ Hz, $J_2 = 2,5$ Hz), 4,24 (d, 2, $J = 7,5$ Hz), 4,69 (d, 1, $J = 12$ Hz), 4,92 (d, 1, $J = 12$ Hz), 5,02 (dt, 1, $J_1 = 7,5$ Hz, $J_2 = 1,3$ Hz), 5,19 (d, 1, $J = 1,3$ Hz), 5,73 δ (dd, 1, $J_1 = 2,5$ Hz, $J_2 = 0,7$ Hz). Peso molecular (espectrometría de masas) = 328,9621 que corresponde a $C_{10}H_{10}NO_5Cl_3$ (calculado: 328,9625).

25

1

EJEMPLO 5

Ejemplos de actividad del éster metílico del ácido clavulánico

Los ensayos de la actividad antibacteriana en caldo indican que el éster metílico de ácido clavulánico presenta una actividad de amplio espectro pero de un orden inferior a la presentada por el ácido clavulánico. No se sabe con certeza si esta actividad era la actividad del propio compuesto o del ácido clavulánico liberado por la lenta hidrólisis acuosa del éster. El éster metílico del ácido clavulánico presenta un marcado sinergismo antibacteriano en combinación con la ampicilina o la cefaloridina contra las bacterias resistentes a estos antibióticos. Así, la concentración mínima de inhibición (C.M.I.) para la ampicilina contra Staphylococcus aureus (Russell) se redujo de 500 µg/ml a menos de 0,4 en presencia de 1,0 µg/ml de éster metílico de ácido clavulánico. La C.M.I. para la cefaloridina se redujo desde 1,5 µg/ml a menos de 0,03 µg/ml en presencia de 1 µg/ml de éster metílico de ácido clavulánico. La C.M.I. para la ampicilina contra Proteus mirabilis C889 se redujo desde 500 µg/ml hasta 31 µg/ml en presencia de 5 µg/ml de éster metílico de ácido clavulánico.

5

10

15

20

EJEMPLO 6

Espectro antibacteriano de los ésteres del ácido clavulánico

La actividad antibacteriana de dos ésteres de ácido clavulánico contra diversas bacterias fué determinada utili-

1 zando el método del microtítulo. Unas diluciones seriadas de
 2 varios ésteres de ácido clavulánico en caldo Oxoid de ensayo
 3 de la sensibilidad, contenido en una bandeja de plástico
 4 para microtitulaciones, fué inoculado con un cultivo de cal-
 5 do de una noche de cada organismo de forma que la dilución
 6 final del inoculum era de 0,01. Los cultivos fueron incubados
 7 durante la noche y los puntos de crecimiento bacterianos fue-
 8 ron registrados a la mañana siguiente observando la turbidez
 9 del cultivo. Los resultados, expresados como valores CMI apro-
 10 ximados (concentración mínima de inhibición, µg/ml) están
 11 registrados en la Tabla I.

TABLA I

Actividad antibacteriana de los ésteres del ácido clavulánico

<u>Organismo</u>	<u>CMI del ácido clavulánico</u>		
	<u>Ester ben- cílico</u>	<u>Ester noní- lico</u>	<u>Sal sódica</u>
<u>Bacillus subtilis</u> A	250	31	62
<u>Staph. aureus</u> Oxford	62	31	15
<u>Staph. aureus</u> Russell	125	31	15
<u>Escherichia coli</u> 10418	125	250	125

EJEMPLO 7 ..

Sinergismo antibacteriano entre la ampicilina y los ésteres
del ácido clavulánico

25 La actividad antibacteriana de la ampicilina y de
 ampicilina en combinación con los ésteres metílico y bencílico

1 del ácido clavulánico fué determinada por el método del
Ejemplo 6, con una dilución final del inoculum del caldo de
una noche de $0,5 \times 10^{-2}$.

5 Los resultados, expresados como valores CMI aproxima-
dos (concentración mínima de inhibición, $\mu\text{g/ml}$) están regis-
trados en la Tabla II.

TABLA II

Sinergismo antibacteriano entre ampicilina y ésteres de áci-
do clavulánico con cepas de Klebsiella aerogenes

10

<u>Cepa</u>	<u>Ampicili- na sola</u>	<u>Ampicilina + 5 $\mu\text{g/ml}$ de és- ter metílico de ácido clavulánico</u>	<u>Ampicilina + 5 $\mu\text{g/ml}$ de éster bencílico de ácido clavulá- nico</u>
A	500	1,9	1,9
E 70	500	3,9	3,9
15 62	500	3,9	3,9

20

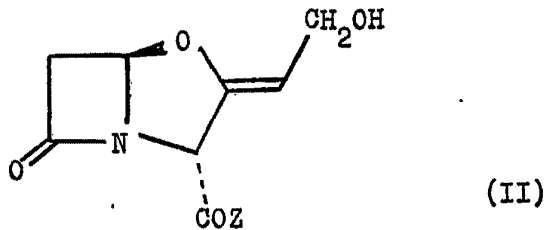
25

1

REIVINDICACIONES

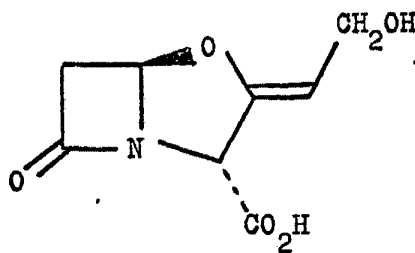
1. Un procedimiento para la preparación de ácido clavulánico de fórmula (II):

5



10 donde Z es un grupo OR o SR y donde R es un grupo alquilo, alquenoilo, alquinilo, arilo o arilalquilo, opcionalmente sustituido, de hasta 16 átomos de carbono, cuyo procedimiento consiste en hacer reaccionar un compuesto de fórmula:

15



con un diazoalcano o con un alcohol ROH o un tiol SRH, en presencia de un agente promotor de la condensación.

20

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde el grupo Z es un grupo OR¹, donde R¹ es un grupo hidrocarbonado de 1 a 9 átomos de carbono opcionalmente sustituido por halógeno, alcoxi C₁₋₄, hidroxilo o grupos básicos salificados de fórmula NR²R³, donde R² es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₄, R³ es un átomo de hidrógeno o un grupo

25

1 alquilo C_{1-4} o está unido a R^2 de manera que NR^2R^3 es un anillo de 5 o 6 miembros.

3. Un procedimiento según la Reivindicación 2, donde el grupo R^1 es un grupo alquilo o aralquilo opcionalmente
5 sustituido con halógeno, metoxi, hidroxilo o grupos NR^2R^3 salificados, donde R^2 es un grupo metilo o etilo y R^3 es un grupo metilo o etilo o está unido a R^2 de forma que NR^2R^3 es un grupo pirrolidino, piperidino o morfolino.

4. Un procedimiento según la Reivindicación 2, donde
10 el grupo R^1 es un grupo alquilo de cadena lineal de hasta 6 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con un grupo metoxi, hidroxilo, NR^2R^3 salificado o un átomo de cloro, bromo o yodo o un grupo CCl_3 o CF_3 .

5. Un procedimiento según la Reivindicación 2, donde
15 R^1 es bencilo, benzohidrilo o tritilo.

6. Un procedimiento según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, donde la reacción se lleva a cabo en acetonitrilo a una temperatura comprendida entre $-10^{\circ}C$ y $+22^{\circ}C$, en presencia de dicitclohexilcarbodiimida como agente promotor
20 de la condensación.

7.- 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 ACIDO CLAVULANICO "

25

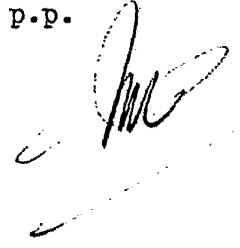
1

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria Descriptiva que consta de veinticuatro páginas mecanografiadas.

Madrid, 9 de Enero de 1976

5

BERNARDO UNGRIA
p.p.



10

15

20

25