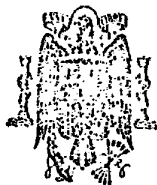


MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

19	ES	21	NUMERO	10	A1
			445395		
		22	FECHA DE PATENTEACION		
			20-2-1.976		

PATENTE DE INVENCION

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
31	NUMERO				
	75/17 140		2-6-1.975		Francia

43	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			C07D//A61M		

54	TITULO DE LA INVENCION
	UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE 1-O-ACETOXIBENZOIL-4-HIDROXI-L-PROLINA Y 1-O-ACETOXIBENZOIL-L-PROLINA.

71	SOLICITANTE (S)
	MERREL TORAUDE

	DOMICILIO DEL SOLICITANTE
	2place de la Sorbonne, 75005 PARIS (France)

73	INVENTOR (ES)

73	TITULAR (ES)
	El mismo solicitante

74	REPRESENTANTE
	DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1 Esta invención se refiere a un procedimiento de preparación de 1-O-acetilbenzoil-4-hidroxi-L-prolina y 1-O-acetoxibenzoil-L-prolina.

5 Esta invención se refiere a un procedimiento utilizable para efectuar la reacción del ácido acetilsalicílico con L-prolina o 4-hidroxi-L-prolina, caracterizado por hacer reaccionar cantidades convenientes de L-prolina o de 4-hidroxi-L-prolina y ácido acetilsalicílico o uno de sus halógenuros, en solución en un medio orgánico acuoso neutro o ligeramente básico, precipitar el producto deseado volviendo ácido el pH de dicho medio y separar dicho precipitado del medio de reacción. Este precipitado puede ser separado del medio de reacción mediante una extracción con un disolvente como acetato de etilo o dicloroetano.

10 Dicha reacción puede ser efectuada en un primer tiempo a baja temperatura, alrededor de -2°C y en un segundo tiempo a la temperatura ambiente.

15 Dicho medio orgánico acuoso puede ser una mezcla de agua, trietilamina y éter.

20 El producto de la invención puede ser utilizado como medicamento y presenta principalmente propiedades analgésicas anti-inflamatorias y antitérmicas. Puede administrarse por vía oral o intraperitoneal a la dosis unitaria de alrededor de 100 mg a 1 g de principio activo, acondicionado por ejemplo en una ampolla inyectable, en una píldora o comprimido o un supositorio.

25 Por ejemplo, se puede utilizar en el hombre de una a cinco de dichas dosis unitarias por día para tratar principalmente las neuralgias de origen reumático u otro.

30 Los ejemplos no limitativos siguientes ilustran la

1 invención.

EJEMPLO 1

Preparación de 1-O-acetoxibenzoil-4-hidroxi-L-prolina

5 A lo largo de 30 minutos se agregan simultáneamente, con agitación emulsionante, a $-2 \pm 1^\circ\text{C}$, 24,05 g (0,121 moles) de cloruro de O-acetoxibenzoílo en 50 ml de éter anhidro y 17 ml (0,121 moles) de trietilamina pura en 18 ml de agua de hielo a una solución de 15,9 g (0,121 moles) de 4-hidroxi-L-prolina en 42 ml de agua y 17 ml (0,121 moles) de trietilamina pura. Se mantiene la agitación durante 45 minutos a la misma temperatura y después durante 25 minutos a la temperatura ambiente. Se lleva el pH de 7 a 3 por adición de 9,8 ml de HCl 12,35N (0,121 moles), se extrae la suspensión lechosa con 15 900 ml de acetato de etilo puro en total, se seca sobre sulfato sódico anhidro y después se concentran a vacío los extractos orgánicos reunidos para obtener en dos o tres fases sucesivas 23 g del producto buscado (rendimiento; 65 %).

Análisis cuantitativo para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_6 = 293,27$:

Calculado : C, 57,33; H, 5,16; N, 4,78; O, 32,72

Encontrado: C, 56,92; H, 5,06; N, 4,89; O, 33,45.

Punto de fusión: 175°C

Solubilidad en agua: alrededor del 5 % en peso (pH = 3).

Poder rotatorio específico en agua: $\alpha_D = -114^\circ$

EJEMPLO 2

Preparación de 1-O-acetoxibenzoil-L-prolina

30 A lo largo de 30 minutos se añaden simultáneamente, con agitación emulsionante, a $-2 \pm 1^\circ\text{C}$, 53,7 g (0,27 moles) de cloruro de O-acetoxibenzoílo en 100 ml de éter etílico anhidro y 37,8 ml (0,27 moles) de trietilamina pura en 250 ml

1 de agua de hielo a una solución de 31,2 g (0,27 moles) de L-prolina en 90 ml de agua y 37,8 ml (0,27 moles) de trietilamina pura.

5 Se mantiene la agitación durante una hora a la misma temperatura; se deja alcanzar la temperatura ambiente en una hora y la mezcla de reacción se mantiene a dicha temperatura ambiente durante 30 minutos.

10 Se lleva el pH de 6 a 2 por adición de 23,7 ml de ácido clorhídrico 11,6N, se extrae la solución turbia lechosa sucesivamente con 125 ml, dos veces 65 ml y después 35 ml de diclorometano puro, se seca sobre sulfato sódico anhidro y se evapora a vacío, en condiciones anhidras, gradualmente hasta una temperatura del baño de 120°C con el fin de expulsar el disolvente y el agua de fijación. La laca residual (65,7 g)
15 se disuelve en 50 ml de diclorometano anhidro, se agregan 50 ml de éter y después 50 ml de hexano anhidro, se siembra y se deja cristalizar.

20 Se decantan las aguas madres y los cristales se lavan varias veces con éter anhidro. Se recrystaliza por disolución en 80 ml de diclorometano y después adición de otro tanto de hexano, ambos disolventes anhidros.

Rendimiento: 30-34 g (40-45 % del rendimiento teórico).

Punto de fusión: 136°C (producto higroscópico).

25 Solubilidad en agua: 5 %.

Análisis elemental:

Calculado : C, 60,64; H, 5,45; N, 5,05; O, 28,85

Encontrado: C, 60,30; H, 5,53; N, 5,30; O, 29,36.

Análisis cuantitativo para $C_{14}H_{15}NO_6 = 293,27$:

Calculado : C, 57,33; H, 5,16; N, 4,78; O, 32,72

30 Encontrado: C, 56,92; H, 5,06; N, 4,89; O, 33,45.

1

Punto de fusión: 175°C.

Solubilidad en agua: alrededor del 5% en peso (pH = 3).

Poder rotatorio específico en agua: $\alpha_D^{20} = -114^\circ$

EJEMPLO 2

5

Toxicidad aguda en el ratón por vía venosa

La determinación de la toxicidad aguda se realiza por comparación con una aspirina inyectable, el acetilsalicilato de lisina. El contenido en ácido acetilsalicílico puede ser considerado comparable para los dos productos (alrededor del 50 %).

10

Los resultados de los dos ensayos se encuentran en la siguiente Tabla I:

TABLA I

(Vía intravenosa en el ratón)

15

Dosis (0,5 ml/ 20 g)	1-0-acetoxibenzoil- 4-hidroxi-L-prolina	Aspirina inyec- table
700 mg/kg	0/5*	
1500 mg/kg	0/5	0/5
2000 mg/kg		5/5
3000 mg/kg	0/5	3/5
3500 mg/kg	0/5	5/5
4000 mg/kg	0/5	

20

* x/5: número de muertes sobre 5 animales ensayados.

25

Los síntomas inmediatos son pronunciados para la aspirina inyectable con abatimiento, ataxia y crisis convulsivas. La muerte aparece entre 30 minutos y 2 horas después de la administración.

30

Por el contrario, los síntomas son prácticamente inexistentes para el producto de la invención. La DL_{50} es alrededor de 10 g/kg para el producto de la invención administrado por vía intraperitoneal mientras que es alrededor de 3 g/kg para la

1 forma soluble del ácido acetilsalicílico. Por vía oral, el
producto de la invención ha sido administrado a razón de 10 g/
kg sin que haya aparecido ningún fenómeno de toxicidad. El pro
ducto comparativo presenta una DL₅₀, por esta vía, de 3g/kg.

5 Además, como demuestra la Tabla I anterior, el producto
de la invención es prácticamente atóxico por vía venosa mien-
tras que el acetilsalicilato de lisina presenta una DL₅₀ de
2 g/kg aproximadamente.

10 EJEMPLO 3

Actividad analgésica

15 La actividad analgésica se ha estudiado mediante el en-
sayo de producción de convulsiones con fenilbenzoquinona, en
comparación con la misma aspirina inyectable utilizada en el
Ejemplo 2 anterior, siendo administrados los dos productos
por vía oral dos horas antes del ensayo sobre grupos de 10 ani-
males.

Los resultados globales se encuentran en la siguiente
Tabla II:

20 TABLA II

	Número de convulsiones	Porcentaje de inhibición con respecto a los testigos
Testigo	449	
Aspirina inyectable, 50 mg/kg de ácido acetilsalicílico	386	-14 %
25 Aspirina inyectable, 100 mg/kg de ácido acetilsalicílico	196	-56 %
Producto de la invención, 50 mg/kg (en peso de producto)	396	-12 %
Producto de la invención, 100 mg/kg (en peso de producto)	194	-57 %.

30 En conclusión, el producto de la invención, conteniendo

1 a peso igual un tenor de ácido acetilsalicílico igual a la
 mitad del de la aspirina inyectable, presenta una actividad
 prácticamente duplicada en comparación con dicha aspirina
 inyectable.

5

EJEMPLO 4

Actividad anti-inflamatoria

Se utiliza como ensayo el edema plantar con carragenina
 en la rata.

10

En el tiempo H_0 , se efectúa una inyección de carrageni-
 na en tres grupos de 8 a 9 ratas y después se mide el volumen
 de la pata, se administran los productos a ensayar por vía
 intraperitoneal y se efectúa una nueva medida del volumen 3
 horas después.

15

A título comparativo, se ensayó igualmente la aspirina
 inyectable utilizada en los Ejemplos 2 y 3 anteriores.

Los resultados, expresados como porcentaje de aumento
 del volumen $(DV)/V$, se encuentran en la siguiente Tabla III.

TABLA III

	Testigos	Aspirina inyectable, 200 mg/kg (en peso de producto)	Producto según la inven- ción, 200 mg/kg (en pe- so de producto)
20	105 %	87,5 %	63,5 %
	89,2 %	74,4 %	61,6 %
	100 %	61 %	67,4 %
	74,4 %	85 %	53,7 %
25	85,4 %	64 %	60,9 %
	76 %	74,4 %	63,6 %
	89,8 %	83,3 %	64 %
	86 %	70,7 %	82,5 %
		68,3 %	82,3 %
30	\bar{X} 88,22 % \pm 10,5	74,29 % \pm 9,36	66,61 % \pm 9,7
	Porcentaje de va- riación -	-16 %	-24 %
	P:	>0,02	>0,001

1 Según la Tabla III anterior, se observa que el producto de la invención presenta una actividad anti-inflamatoria muy buena, netamente superior a la de la aspirina inyectable.

5 EJEMPLO 5

Actividad antitérmica

10 La actividad antitérmica es apreciada por la hipertermia provocada por la levadura de cerveza, siendo inyectada la levadura 17 horas antes de iniciarse la experiencia (grupos de 8 ratas + 1 grupo testigo sin levadura). La primera lectura térmica se efectúa en el tiempo Ho y los productos a ensayar se administran por vía intraperitoneal. La temperatura central se controla al cabo de una hora y media, 3 horas y 4 horas y media después de Ho.

15 Los resultados globales se encuentran en la siguiente Tabla IV:

TABLA IV

	<u>Ho</u> <u>°C</u>	<u>1 h 30</u> <u>°C</u>	<u>3 h</u> <u>°C</u>	<u>4 h 30</u> <u>°C</u>
40 animales + levadura a Ho	37,28 ± 0,052			
Aspirina inyectable, 200 mg a 400 mg/kg		36,64 ± 0,19	36,92 ± 0,09	36,90 ± 0,12
Producto de la invención, 200 a 400 mg/kg		36,12 ± 0,25	36,40 ± 0,14	36,82 ± 0,11

25 Se observa que la actividad antitérmica del producto de la invención es muy netamente superior a la de la aspirina inyectable.

EJEMPLO 6

Preparación de 1-0-acetoxibenzoil-L-prolina

30 A lo largo de media hora, con agitación emulsionante, se añaden simultáneamente, a $-2 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 53,7 g (0,27 moles) de

1 cloruro de O-acetoxibenzoílo en 100 ml de éter etílico anhi-
dro y 37,8 ml (0,27 moles) de trietilamina pura en 250 ml de
5 agua de hielo a una solución de 31,2 g (0,27 moles) de L-pro-
lina en 90 ml de agua y 37,8 ml (0,27 moles) de trietilamina
pura.

Se mantiene la agitación durante una hora a la misma
temperatura; se deja alcanzar la temperatura ambiente en una
hora y se mantiene la mezcla de reacción a dicha temperatura
ambiente durante media hora.

10 Se lleva el pH de 6 a 2 por adición de 23,7 ml de ácido
clorhídrico 11,6N, se extrae la solución turbia lechosa suce-
sivamente con 125 ml, dos veces 65 ml y después 35 ml de di-
clorometano puro, se seca sobre sulfato sódico anhidro y se
15 evapora a vacío, en condiciones anhidras, gradualmente has-
ta una temperatura del baño de 120°C con el fin de expulsar
el disolvente y el agua de fijación. Se disuelve la laca re-
sidual (65,7 g) en 50 ml de diclorometano anhidro, se añaden
50 ml de éter y después 50 ml de hexano anhidro, se siembra
y se deja cristalizar.

20 Se decantan las aguas madres y se lavan los cristales
varias veces con éter anhidro. Se recristaliza por disolu-
ción en 80 ml de diclorometano y después adición de otro tan-
to de hexano, ambos disolventes anhidros.

25 Rendimiento: 30-34 g (40-45 % del rendimiento teórico).

Punto de fusión: 136°C (producto higroscópico).

Solubilidad en agua: 5 %.

Análisis elemental:

Calculado : C, 60,64; H, 5,45; N, 5,05; O, 28,85

Encontrado: C, 60,30; H, 5,53; N, 5,30; O, 29,36

30

EJEMPLO 7

Actividad anti-inflamatoria

La actividad anti-inflamatoria se ha estudiado mediante el ensayo del edema causado por carragenina. En este ensayo, se compararon las actividades anti-inflamatorias del producto de la invención con una aspirina inyectable, el acetilsalicilato de lisina.

Los productos se inyectan por vía intramuscular 30 minutos antes de la carragenina. La intensidad del edema se midió 3 horas después.

Los resultados se encuentran en la Tabla V dada a continuación; según esta tabla, el producto de la invención presenta, a la dosis de 100 mg, una actividad anti-inflamatoria comparable a la del acetilsalicilato de lisina a dosis medias.

TABLA V

	<u>Dosis, mg/kg</u>	<u>Número de ratas</u>	<u>Variación del volumen del edema, %</u>	<u>Inhibición, %</u>
Testigos		26	107,39 + 5,19	
Acetilsalicilato de lisina	50	8	89,41 + 9,39	16,74
	100	8	77,79 + 5,39	27,56
	200	8	62,54 + 6,83	41,76
1-0-acetoxibenzoil-L-prolina	50	10	104,73 + 7,23	2,48
	100	10	81,65 + 5,97	23,97
	200	10	75,71 + 4,8	29,50

EJEMPLO 8

Actividad analgésica

La actividad analgésica es estudiada en la rata mediante el ensayo conocido de Randall-Selitto (Arch. int. Pharmacodyn. 1957, 111, 409, 419).

Los resultados se encuentran en la siguiente Tabla VI; según esta tabla, el producto de la invención presenta a la dosis de 100 mg una actividad analgésica comparable a la del acetilsalicilato de lisina a las dosis medias.

TABLA VI

	Dosis, mg/kg	Número de ratas	Inhibición, %		
			1 hora	2 horas	4 horas
Acetilsalicilato de lisina	50	10	72,98	60,26	65,79
			+ 2,26	+ 8,38	+ 8,82
	100	10	85,14	97,44	73,68
			+14,39	+14,17	+10,71
	200	10	105,40	124,36	111,84
			+19,20	+10,85	+11,51
1-0-acetoxibenzoil-L-prolina	50	10	59,49	67,57	44,00
			+10,02	+11,25	+12,69
	100	10	74,68	89,19	53,33
			+12,34	+14,24	+14,91
	200	10	98,73	130,98	104,01
			+16,45	+16,94	+19,88

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

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de 1-0-acetoxibenzoil-4-hidroxi-L-prolina y 1-0-acetoxibenzoil-L-prolina, caracterizado por hacer reaccionar cantidades convenientes de ácido acetilsalicílico o de uno de sus halogenuros con un producto seleccionado entre L-prolina y 4-hidroxi-L-prolina, teniendo lugar la reacción en solución en un medio

1 orgánico acuoso, neutro o ligeramente básico, precipitar el
producto obtenido por acidulación de dicho medio y separar
dicho precipitado del medio de reacción.

5 2. Un procedimiento según la Reivindicación 1,
caracterizado porque la citada reacción se lleva a cabo en
una primera fase a una temperatura de -2°C aproximadamente y
en una segunda fase a la temperatura ambiente.

10 3. Un procedimiento según las Reivindicacio-
nes 1 y 2, caracterizado porque dicho medio orgánico acuoso
está constituido por una mezcla de agua, trietilamina y éter.

4. Un procedimiento según las Reivindicacio-
nes 1, 2 y 3, caracterizado porque se prepara 1-0-acetoxiben-
zoil-4-hidroxi-L-prolina y el producto final se separa del
medio de reacción por extracción con acetato de etilo.

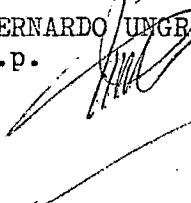
15 5. Un procedimiento según las Reivindicacio-
nes 1, 2 y 3, caracterizado porque se prepara 1-0-acetoxiben-
zoil-L-prolina y el producto final se separa del medio de
reacción por extracción con diclorometano.

20 6. Se reivindica por último como objeto so-
bre el que ha de recaer la patente de invención que se soli-
cita: UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE 1-0-ACETOXIBENZOIL-
-4-HIDROXI-L-PROLINA Y 1-0-ACETOXIBENZOIL-L-PROLINA.

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

Madrid, 20 de Febrero de 1.976

BERNARDO UNGRÍA
P.P.



30