



ESPAÑA

(10) ES	(11) NUMERO	(12) AT
(21)	452885	
(22)	FECHA DE PRESENTACION	
	29 octubre 1976	

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES:		
(31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	CO7D; AG1K	
(54) TITULO DE LA INVENCION		
"PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE NUEVAS SALES DE LA 2,4-DIAMINO-5-(3,4,5-TRIMETOXIBENCIL)-PIRIMIDINA INSOLUBLES EN MEDIO ACUOSO".		
(71) SOLICITANTE (ES)		
LABORATORIO MARTÍN CUATRECASAS, S. A.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Barcelona, calle Vizcaya, 417		
(72) INVENTOR (ES)		
Don Pedro PUIGDELLIVOL LLOBET		
(73) TITULAR (ES)		
(74) REPRESENTANTE		
Don Ignacio PONTI GRAU		

La presente patente de invención trata de la preparación de nuevas sales de la 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxibencil)-pirimidina, que presentan una interesante actividad antibacteriana y un efecto "retard" como consecuencia
5 de la insolubilidad en agua de dichas sales.

Se ha demostrado que la 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxibencil)-pirimidina, conocida también con el nombre de trimetoprim, es un potente inhibidor del enzima ácido dihi-
drofólico-reductasa, que cataliza la reacción de reducción
10 del ácido dihidrofólico a tetrahidrofólico, el cual es un coenzima muy activo que interviene en la biosíntesis del ácido inosínico.

En efecto, el ácido tetrahidrofólico mediante la reacción con formiato y el concurso del ATP, se convierte
15 en N-10-formil-tetrahidrofolato, que interviene en la etapa de formilación del 5-amino-imidazol-4-carboxamida ribonucleó-
tido, cuya molécula al ciclarse con pérdida de agua, se transforma en el ribonucleótido purínico, ácido inosínico, que es un precursor directo del RNA.

20 Por lo tanto, la presencia del trimetoprim, cuya estructura química tiene cierta analogía con la del ácido dihidrofólico, produce la inhibición competitiva del enzima que cataliza la reducción a tetrahidrofólico, impidiendo por
tanto la formación de éste, y, de esta manera, es bloqueada
25 la etapa que implica la formilación del 5-amino-imidazol-4-carboxamida ribonucleótido, inhibiéndose de esta forma el crecimiento de un gran número de bacterias.

El tetrahidrofolato participa en reacciones bio-

sintéticas que son vitales para el crecimiento celular y para su supervivencia. En el microorganismo, el dihidrofolato se sintetiza a partir de ácido p-aminobenzoico. En animales superiores, el ácido fólico se asimila con la dieta. En todas las especies el tetrahydrofolato se oxida a dihydrofolato en la síntesis del timidilato, y el enzima dihydrofolato-reductasa es esencial para el mantenimiento de los niveles de tetrahydrofolato. El (TMP) trimetoprim inhibe selectivamente las reductasas microbianas y su selectividad se basa en la capacidad de distinguir las diferentes estructuras de las reductasas aisladas de varios organismos. Su efectividad se ve sorprendentemente aumentada cuando se bloquea simultáneamente la síntesis del dihydrofolato por las sulfonamidas, tales como el sulfametoxazol (SMX).

Debido a que las sulfonamidas inhiben la biosíntesis de folatos y debido a que el TMP reduce el número de reacciones en el ciclo del ácido fólico, inhibiendo la reducción del dihydrofolato, los componentes TMP-SMX pueden presentar cierta actividad cuando actúan conjuntamente.

La combinación SMX-TMP (co-trimoxazol) tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana, actúa rápidamente y es menos susceptible al desarrollo de resistencias que cada uno de los componentes por separado.

Los espectros de actividad del trimetoprim y de las sulfonamidas generalmente coinciden y las bacterias más importantes las podemos dividir en dos grupos: un primer grupo de cocos piogénicos, estreptococos hemolíticos, pneumococos y estafilococos. Las infecciones causadas por estos

microorganismos son generalmente tratadas con efectividad por antibióticos, en particular con penicilinas, por lo que en estos casos es poco usada la combinación de trimetoprim con sulfonamidas. En el otro gran grupo de bacterias podemos

5 citar las enterobacterias que son habitantes saprófitos intestinales, *Escherichia coli*, especies de *Proteus*, *Klebsiella*, y los patógenos del género *Salmonella* y *Shigella*. Entre todos los organismos denominados comúnmente coliformes, sólo la *Pseudomonas aeruginosa* es resistente al trimetoprim.

10 Tal como hemos señalado anteriormente este tipo de sales presentan un efecto "retard" y un mejoramiento de las propiedades organolépticas debido a su insolubilidad en medio acuoso.

Se ha comprobado que las suspensiones de trimetoprim tienen un sabor muy amargo, por cuyo motivo se presentan algunos problemas al administrar tales suspensiones en general y, en particular, a los niños. Esta desventaja organoléptica, ha sido corregida al enmascarar totalmente el sabor amargo del trimetoprim, por formación de sales insolubles, tales como pamoato, palmitato, estearato, etc. de trimetoprim.

15

20

La medicación "retard" por vía oral, muy usada actualmente, permite, además de disminuir el número de dosis diarias, asegurar durante un determinado periodo de tiempo unos niveles terapéuticos regulares en sangre, y por consiguiente, conduce a una mejor tolerancia de la medicación al evitarse concentraciones de choque.

25

Para lograr sustancias con efecto "retard" exis-

ten en general varias posibilidades:

a) Modificar químicamente la estructura de la molécula, frenando de esta manera la eliminación de estos compuestos. Este es el caso de las sulfamidas "retard".

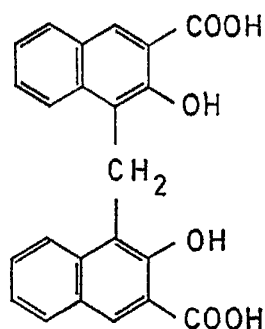
5 b) Por procedimientos galénicos con los cuales se consigue frenar y regular la absorción, utilizándose varios métodos; uno en el que la dosis total es fraccionada en pequeñas dosis, liberadas progresivamente a intervalos regulares, y otro en el que el principio activo es retenido en el
10 seno del excipiente, el cual frena su difusión.

Por otra parte existen métodos químicos que permiten, mediante la formación de sales o esterificaciones apropiadas, obtener compuestos muy poco hidrosolubles. Uno, de estos últimos procedimientos es el descrito en esta patente
15 el cual es exclusivo para sustancias básicas, y consiste en la formación de sales del compuesto alcalino con el ácido pamoico, palmítico, etc. Estas sales así obtenidas son muy insolubles en agua, de cuyo medio la parte activa es liberada progresivamente, lográndose mantener buenos niveles tera
20 péuticos en sangre, tal como especificamos más adelante a modo de ejemplo, permitiendo además enmascarar, debido a la poca hidrosolubilidad de las susodichas sales, el desagradable gusto propio de la 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxiben-
cil)-pirimidina.

25 Estos compuestos se obtienen generalmente formando la sal en un disolvente común a la base y al ácido, y posterior evaporación de éste; o por doble descomposición entre las sales sódicas, potásicas, etc., de los ácidos pa-

moicos palmítico, etc., y una sal de la base estudiada.

El ácido pamoico, también denominado ácido embóni-co, es el ácido 4,4'-metilen-bis-3-hidroxi-2-naftoico, de peso molecular 388,36 y que tiene por fórmula:



5 se obtiene por reacción del ácido 3-hidroxi-2-naftoico con formaldehído. El ácido pamoico se presenta como un polvo cristalino de color amarillo que se descompone a 280°; es poco soluble en agua y soluble en soluciones alcalinas. Forma con bases numerosas sales insolubles en agua,
10 generalmente insípidas.

Estudio farmacocinético

Se ha llevado a cabo un estudio farmacocinético comparativo del trimetoprim y de sus pamoatos (proporción 1:1 y 1:2, pamoico-trimetoprim, respectivamente), en dos es-
15 pecies animales: rata y conejo.

Características de los animales de experimentación: ratas Wistar, hembras de peso aproximado 200 g y conejos albinos, machos de peso comprendido entre 1,8 y 2,3 Kg. Alimento estándar y agua "ad libitum" hasta el momento del
20 ensayo.

Administración

a) En rata:

Se han preparado suspensiones de los tres productos en carboximetilcelulosa, a una concentración del 1% (p/v) en TMP, de forma que se administró 0,5 ml por 100 g de peso/animal, lo que corresponde a una dosis de 50 mg/kg peso.

b) En conejo:

Análogamente, tres suspensiones al 2% (p/v) en TMP, de las que se administraron 2,5 ml por kg de peso del animal, lo que corresponde a una dosis de 50 mg/kg peso.

La extracción de muestras de sangre, a diversos tiempos tras la administración, se llevó a cabo por punción en los capilares próximos al ojo de la rata y por corte en la oreja del conejo. Las muestras se centrifugaron inmediatamente y se separó el plasma, en el cual se efectuó la determinación. El volumen de plasma necesario para cada ensayo fué de 0,2 ml en las muestras de rata y de 1,0 ml en las de conejo.

La determinación siguió la técnica fluorimétrica que a continuación se detalla.

Reactivos.

- solución de carbonato sódico, 0,1 N: 14,3 g de $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ disueltos en 500 ml de H_2O destilada.
- cloroformo
- H_2SO_4 0,01N
- permanganato potásico 0,1N en NaOH 0,1N; 1,58 g de KMnO_4 disueltos en 100 ml con NaOH 0,1N.

- solución de formaldehído 35%.

- H_2SO_4 1N.

Técnica.

5 1. Primera extracción : en un tubo provisto de tapón de rosca tomar: 8 ml Na_2CO_3 0,1N , la muestra de plasma y 10 ml de cloroformo. Tapar y agitar durante 4 minutos; seguidamente centrifugar por espacio de 10 minutos a 3000 r.p.m. Desechar la fase acuosa.

10 2. Segunda extracción: en otro tubo análogo al anterior, tomar 7 ml de la anterior fase clorofórmica. Adicionar 4 ml de H_2SO_4 0,01N y agitar durante 10 minutos; seguidamente centrifugar en la misma forma de la primera extracción. Desechar la fase clorofórmica.

15 3. Oxidación: en otro tubo del mismo tipo tomar 3 ml de la anterior fase sulfúrica. Adicionar 2 ml de la solución de $KMnO_4$. Mezclar y dejar por espacio de 20 minutos en un baño de agua a $60^\circ C$. Pasado este tiempo sacar del baño y añadir 0,3 ml de formaldehído y 1 ml de H_2SO_4 2N, homogeneizar y dejar nuevamente en el baño a $60^\circ C$ durante otros 10 minutos; en este tiempo, remover varias veces. Dejar enfriar.

25 4. Tercera extracción: a la mezcla enfriada, adicionar 2 ml de cloroformo. Agitar durante 10 minutos y seguidamente centrifugar en la forma usual. Tomar la fase clorofórmica y destinarla a la medición espectrofotofluorimétrica en cubeta tapada.

exc = 275 nm	em = 350 nm	(teóricas)
exc = 284 nm	em = 356 nm	(halladas)

Resultado

Las concentraciones plasmáticas que seguidamente se exponen han sido halladas por interpolación, en una curva de calibrado previamente elaborada en la que se han re-
 5 presentado pares de valores mcg/ml - unidades de fluorescencia.

Se ha utilizado un espectrofotofluorímetro Aminco-Bowman, equipado con lámpara de Xenon.

a) rata.

tiempo desde la administración (min)	mcg TMP/ml plasma		
	TMP	PTMP (1:1)	P2TMP (1:2)
15	21,2	5,2	10,0
30	44,8	12,1	14,5
45	65,5	13,5	23,1
60	57,2	19,8	29,5
90	40,1	22,0	33,5
120	36,8	25,2	33,2
150	27,2	25,3	35,1
180	21,5	19,8	31,7
210	20,3	17,4	27,2
240	14,2	15,1	22,5

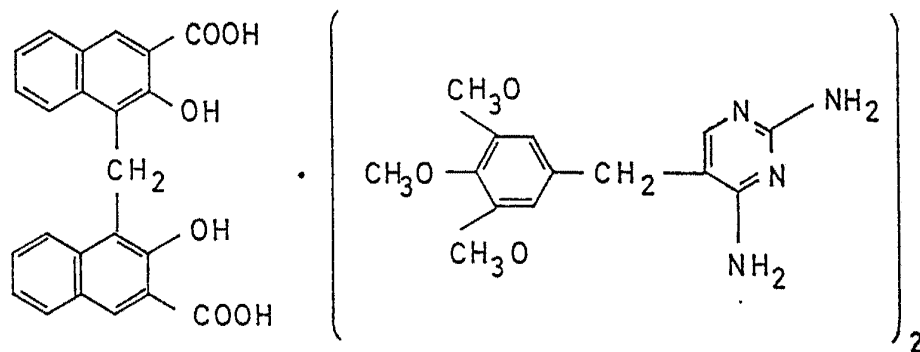
b) conejo.

mcg TMP/ml plasma

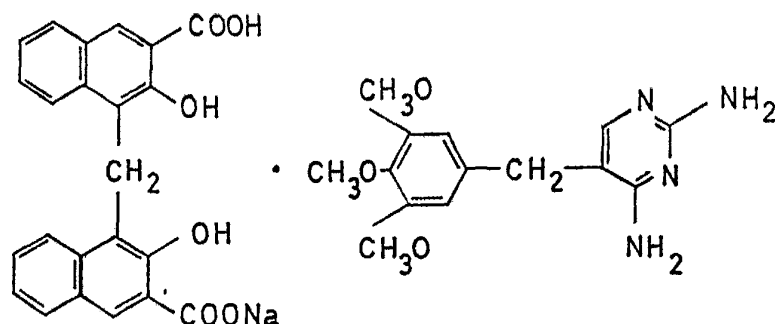
Tiempo desde la
administración

(min)	TMP	PTMP (1:1)	P2TMP (1:2)
15	23,6	6,3	7,2
30	35,2	9,5	10,8
45	43,2	14,8	14,8
60	40,2	17,5	18,9
90	36,4	18,8	24,5
120	27,5	20,5	26,0
150	20,0	18,0	28,2
180	15,8	15,6	25,0
210	11,2	12,6	19,2
240	6,8	7,8	14,3

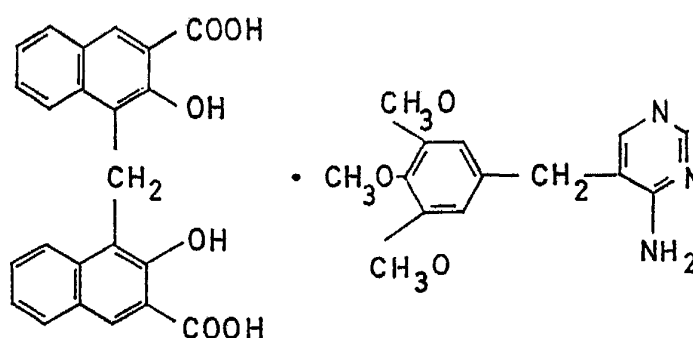
Las sales de la 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxiben-
cil) pirimidina descritos en esta patente de invención co-
rresponden a las siguientes estructuras químicas:



Pamoato de ditrimetoprim



Pamoato monosódico de trimetoprim



Pamoato de trimetoprim

EJEMPLO I

A 400 ml de H₂O se añaden gradualmente 2,9 g (0,01 moles) de trimetoprim, formándose una suspensión. A esta suspensión, en constante agitación, se añaden 10 ml HCL 1N
5 (0,01 moles) hasta disolución total.

A esta solución de hidrocloreuro de trimetoprim se añade una solución de pamoato sódico, formada por 4,32 g (0,01 moles) de pamoato sódico en 60 ml de H₂O, formándose un precipitado que corresponde a la sal monosódica de tri-
10 metoprim, el cual es filtrado y secado. Punto de fusión 168° 170°C.

EJEMPLO II.

A 400 ml de H₂O se añaden gradualmente 2,9 m (0,01 moles) de trimetoprim, formándose una suspensión; con el fin de formar el hidrocioruro se añaden 10 ml HCl 1N (0,01 moles), y se agita hasta disolución total.

Seguidamente se prepara una disolución con 2,16 g (0,05 moles) de pamoato sódico en 30 ml de H₂O, esta solución es añadida a la anterior formándose un precipitado correspondiente al pamoato de ditrimetoprim.

10 IR característico, punto de fusión 172° - 175°.

EJEMPLO III.

En 150 ml de THF se disuelven 2,9 g (0,01 moles) de trimetoprim y 1,94 g (0,005 moles) de ácido pamoico, calentando ligeramente. Una vez disueltos los dos totalmente, se evapora a sequedad en el rotavapor bajo vacío a una temperatura de 36°, obteniéndose la sal pamoato de ditrimetoprim de punto de fusión 96° - 100°.

EJEMPLO IV.

En 150 ml de THF se disuelven 2,9 g (0,01 moles) de trimetoprim y 3,88 g (0,01 moles) de ácido pamoico. Una vez disueltos el THF es evaporado en el rotavapor bajo vacío a 35°. Obteniéndose la sal pamoato de monotrimetoprim de punto de fusión 119° - 123°.

El invento, dentro de su especialidad, puede ser desarrollado en otras formas de realización que difiera en detalles de las indicadas a título de ejemplo, a las cuales alcanzará igualmente la protección que se recaba. Podrá pues realizarse con los medios y aparatos más adecuados, por todo ello incluido en el espíritu de las reivindicaciones.

R E I V I N D I C A C I O N E S

1. Procedimiento para la obtención de nuevas sa
les de la 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxibencil)-pirimidina
insolubles en medio acuoso, que se caracteriza, esencialmente
te, por el hecho de que estas sales se obtienen por reacción
5 directa entre el ácido y la base correspondientes, utilizando
do un disolvente apropiado para iniciar la reacción.

2. Procedimiento para la obtención de nuevas sa
les de la 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxibencil)-pirimidina
insolubles en medio acuoso, según la reivindicación 1, que
10 se caracteriza, además, porque las citadas sales también se
pueden obtener, por doble descomposición de las sales alcalinas
linas del ácido correspondiente y el halogenuro de la base,
en medio acuoso.

3. Procedimiento para la obtención de nuevas sa
les de la 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxibencil)-pirimidina
15 insolubles en medio acuoso, según la reivindicación 1, que
se caracteriza, porque los compuestos así obtenidos son muy
insolubles en medio acuoso, mejorándose acusadamente las pro
piedades organolépticas de los productos de partida.

20 4. Procedimiento para la obtención de nuevas sa
les de la 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxibencil)-pirimidina
insolubles en medio acuoso.

Todo ello según queda descrito en la presente me-
moria y resumido en las reivindicaciones contenidas al final
de la misma, establecidas de acuerdo con el artículo 100
del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial y que com-

prenden en conjunto catorce hojas foliadas, escritas a máquina por una sola de sus caras.

Barcelona, 29 de octubre de 1976

LABORATORIO MARTÍN CUATRECASAS, SA

P.a.

A large, stylized handwritten signature in black ink is written over the text 'LABORATORIO MARTÍN CUATRECASAS, SA' and 'P.a.'. The signature is highly cursive and loops around the text.