

Nº 359.540



MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

Solicitante: MERCK & CO., INC.

Domicilio: 126 East Lincoln Av. RAHWAY, New Jersey,
EE.UU.

Enunciado: "PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR ANHIDRIDOS"

Prioridad= de la solicitud de patente estadounidense
nº 759.246 del 11 setiembre 1.968.

MGS.-



16

1
RESUMEN DE LA MEMORIA

5
Se preparan anhídridos de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico tratando un compuesto de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico con un anhídrido de alquilo. Los anhídridos de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico son agentes antibacterianos activos.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

10
Aunque se conocen muchos antibióticos valiosos para el tratamiento de diversas enfermedades, muchos de los antibióticos conocidos son, en general, activos contra un número limitado de agentes patógenos. Cuando ciertas variedades de estos agentes patógenos desarrollan resistencia contra un antibiótico particular, el antibiótico resulta inactivo contra estas variedades resistentes. Debido a este desarrollo de resistencia frente a los antibióticos conocidos, prosiguen las investigaciones en un esfuerzo por descubrir nuevos agentes antibacterianos que sean activos contra una amplia gama de agentes patógenos y en especial contra aquellas variedades de agentes patógenos que son resistentes a los antibióticos conocidos.

15
20
DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

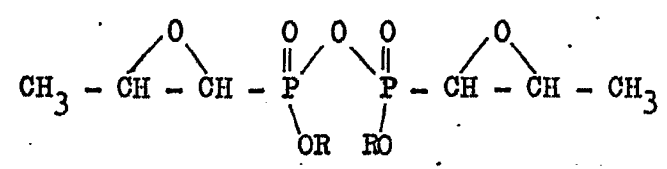
25
El presente invento se refiere a compuestos que tienen notable actividad antibacteriana y a procedimientos para su preparación. Los compuestos que son objeto



1

de este invento son los anhídridos de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico. Los nuevos anhídridos comprendidos dentro del invento pueden ser representados de la forma siguiente:

5



(I)

10

donde R es hidrógeno o un radical hidrocarbilo con o sin sustituyentes, en el que el radical hidrocarbilo es alquilo inferior, como metilo, propilo, terc-butilo, cloroetilo, bromoetilo, dicloroetilo; alqueno inferior como alilo, metalilo, hexenilo; alquino inferior como propargilo, etinilo o cloroetinilo; cicloalquilo como ciclohexilo, ciclohexenilo o ciclopropilo; arilo, aralquilo o heteroarilo. Cuando R es alifático, preferiblemente contiene de 1 a 6 átomos de carbono.

15

Cuando R es un radical arilalifático, puede ser aralquilo como bencilo, fenetilo, p-halobencilo, nitro-bencilo y similares.

20

Cuando R es un radical arilo, puede ser un radical como fenilo, fenilo sustituido, por ejemplo p-clorofenilo, o-nitrofenilo o naftilo. Cuando R es heterocíclico, puede ser heteroaromático, como piridilo, tienilo, tiazolilo o puede representar un heteroanillo saturado como

25

16 MAR 1954



1 piperazina.

5 También están comprendidas en este invento las sales de los compuestos I en los que R es hidrógeno, las sales constituyen un aspecto preferido del invento porque generalmente son más estables que el ácido libre correspondiente. Dentro de las sales consideradas se encuentran las sales inorgánicas como las de sodio, aluminio, potasio, amonio, calcio, magnesio, hierro y plata, así como las sales amínicas orgánicas como las de aminas primarias, secundarias y terciarias, por ejemplo monoalquilaminas, dialquilaminas, trialquilaminas y aminas heterocíclicas nitrogenadas. Son ejemplos de estas sales amínicas las de aminas como α -fenetilamina, dietilamina, quinina, brucina, lisina, etanolamina, morfina, bencilamina, 10 piperazina y similares. Cuando se desea, la sal puede ser la de una amina biológicamente activa, tal como eritromicina, oleandomicina o novobiocina.

15 Son ejemplos representativos de los nuevos anhídridos de fórmula I los siguientes:

20 bis-(-) (cis-1,2-epoxipropil)pirofosfonato disódico,
bis-(-) (cis-1,2-epoxipropil)pirofosfonato de dimetilo,
bis-(-) (cis-1,2-epoxipropil)pirofosfonato de dibutilo,
bis-(-) (cis-1,2-epoxipropil)pirofosfonato de difenilo,
bis-(-) (cis-1,2-epoxipropil)pirofosfonato de dibencilo,
25 bis-(-) (cis-1,2-epoxipropil)pirofosfonato dicálcico, y
bis-(-) (cis-1,2-epoxipropil)pirofosfonato de dibencilamonio



1 Los compuestos de fórmula I, denominados en adelan
te pirofosfonatos, pueden ser preparados por reacción de
un compuesto de ácido fosfónico, por ejemplo ácido (-)-
5 (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico o una sal metálica de di-
cho ácido, por ejemplo las sales de sodio, potasio, cal-
cicio, magnesio, aluminio, cobalto o hierro o un monoéster
del ácido fosfónico, como los ésteres hidrocarbílicos en
los que el radical hidrocarbilo es el definido anterior-
mente, con un anhídrido de alquilo inferior como anhídri-
10 do acético, propiónico o butanoico. Aunque la reacción
puede llevarse a cabo sobre el ácido libre, una monosal
o un monoéster del ácido, para realizar la reacción se
prefiere una sal del ácido puesto que se obtienen mejo-
res rendimientos de pirofosfonato cuando se emplea dicha
15 sal como material de partida. Generalmente la reacción
transcurre a temperaturas comprendidas entre 25° y 100°C,
pero se prefiere llevarla a cabo a una temperatura com-
prendida entre unos 50° y 75°C.

20 Para la reacción puede emplearse cualquier disol-
vente anhidro inerte como éter, tetrahidrofurano, bence-
no, tolueno y similares. Generalmente la mezcla de reac-
ción se agita a la temperatura apropiada durante 1 a 5
horas aproximadamente, después de lo cual se enfría la
mezcla y se aísla el anhídrido de la mezcla de reacción
25 por técnicas conocidas.



1 El ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico y sus
sales se preparan por fermentación aerobia de medios nu-
tritivos acuosos adecuados, en condiciones controladas,
por ciertas variedades del género Streptomyces, como
5 Streptomyces fradiae (MA-2915, NRRL-3417), Streptomyces
wedmorensis (MA-3269, ATCC 21239) y Streptomyces virido-
chromogenes (MA-2903, NRRL-3413). La fermentación se rea-
liza a temperaturas que oscilan entre 25° y 38° C aproxi-
madamente. El pH del medio nutritivo adecuado para culti-
10 var el Streptomyces y producir el compuesto de ácido fos-
fónico puede variar entre 5,5 y 7,5 aproximadamente. A
continuación el ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico
puede ser aislado del caldo de fermentación por adsorción
en alúmina lavada con ácido o con base. El material adsor-
15 bido puede ser eluído de la alúmina con una solución acuo-
sa o hidroalcohólica de hidróxido amónico a un pH de 11,2
aproximadamente y el eluato se recoge fraccionadamente.
De esta forma se obtiene la sal amónica. Pueden obtenerse
otras sales pasando una solución de la sal amónica a tra-
20 vés de una resina cambiadora de catión apropiada o median-
te otras técnicas conocidas.

Los monoésteres de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)-
fosfónico pueden ser preparados a partir de los correspon-
dientes diésteres. Los diésteres se obtienen haciendo reac-
25 cionar dicloruro (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico con



1970

1 2 equivalentes en moles de un alcohol. A continuación se
obtiene el monoéster separando uno de los radicales éster del diéster con una base. Entonces puede prepararse una monosal monoéster haciendo reaccionar el monoéster
5 con 1 equivalente de base.

Los dihaluros fosfónicos pueden ser preparados haciendo reaccionar ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico con un agente halogenante como cloruro de tionilo o bromuro de tionilo.

10 Los anhídridos de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico son eficaces en la inhibición del crecimiento de diversos microorganismos. En general, se ha demostrado que inhiben el crecimiento del Staphylococci y Salmonella. Son ilustrativos de estos agentes patógenos el Salmonella schottmuelleri, Salmonella gallinarum y Staphylococcus aureus y Staphylococcus pyogenes.
15

Los anhídridos pueden ser empleados como agentes antisépticos para eliminar los organismos susceptibles del equipo farmacéutico dental y médico y de otras zonas sometidas a infección por tales organismos.
20

Como el antibiótico y sus sales son muy activos en la inhibición del crecimiento de varias especies de Salmonella, pueden ser utilizados como desinfectantes en el lavado de huevos y de zonas sometidas a la infección por Salmonella. Las sales de anhídridos de ácido (-) (cis-
25



MAR 1970

1 1,2-epoxipropil)fosfónico y los ésteres hidrocarbólicos
y sales del mismo son también útiles como bactericidas
en diversas aplicaciones industriales, por ejemplo en la
inhibición del crecimiento de bacterias indeseables en el
5 agua blanca de las fábricas de papel y en las pinturas
como la pintura de látex de acetato de polivinilo.

Los anhídridos también son útiles en el tratamien-
to de las enfermedades causadas por infecciones bacteria-
nas en los animales.

10 Los siguientes ejemplos se dan con fines ilustra-
tivos y no limitativos:

EJEMPLO 1

Bis-(-) (cis-1,2-epoxipropil)pirofosfonato disódico

15 Se suspenden 9,2 g de (-) (cis-1,2-epoxipropil)-
fosfonato disódico en 75 ml de anhídrido acético. La sus-
pensión se agita a 75°C durante 2½ horas, se enfría a 25°C,
se agita con 500 ml de éter y se filtra. La torta del fil-
tro se tritura con 500 ml de éter y el sólido se separa
por filtración y se lava con éter. Después de secar el
20 residuo a 40°C en vacío, se obtiene la sal disódica de
ácido bis-(-) (cis-1,2-epoxipropil)pirofosfónico que se
caracteriza por sus espectros infrarrojos y RMN.

25 Los materiales de partida empleados en la prepa-
ración de los compuestos de este invento pueden obtenerse
de la forma siguiente:



1 A. Dicloruro (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico

Se colocan en 20 ml de benceno, 1,38 g (0,01 moles) de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico y 1,6 ml de piridina y a la mezcla resultante se añaden con
5 agitación 2,4 g (0,020 moles) de cloruro de tionilo. La mezcla de reacción se agita a la temperatura ambiente durante 3 horas, después de lo cual se decanta la solución del precipitado gomoso y se concentra a vacío a la temperatura ambiente. Por destilación instantánea del residuo a 0,5 mm, se obtiene dicloruro (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico, p.e. 32-33°C, en forma de líquido incoloro y transparente.
10

B. Monoéster de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico

Se enfría a 5°C una mezcla agitada de 0,1 moles de (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonato.dicloruro (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico y 0,2 moles de trietilamina en
15 100 ml de benceno. Se añaden a la mezcla 0,2 moles de alcohol metílico a una velocidad suficiente para mantener la temperatura a 5-10°C. Una vez completada la adición, la mezcla se agita a la temperatura ambiente durante 1 hora. La sal hidrocioruro de trietilamina precipitada se
20 separa por filtración y el disolvente se elimina a vacío dejando como residuo (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonato de dimetilo. El éster dimetílico se disuelve en 75 ml de
25 agua y a la solución resultante se añade gota a gota, con



1 agitación, 0,1 moles de hidróxido sódico a lo largo de
5 horas, mientras se mantiene el pH entre 8,5 y 11,0.
La solución se mantiene a la temperatura ambiente durante
18 horas, después de lo cual se separa el disolvente a
5 vacío. El residuo se disuelve en metanol y se precipita
el (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonato de sodio y metilo
mediante la adición de éter, recuperándose por filtración.

C. Acido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico

10 Se emplea un cultivo liofilizado de Streptomyces
fradise MA-2913 (ATCC 21099) para inocular 50 ml de me-
dio estéril de la siguiente composición, contenido en un
matraz Erlenmeyer de 250 ml provisto de tabique:

	<u>gramos/litro</u>
Harina de avena molida	10
15 Hidrolizado de levadura	10
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05
Tampón de fosfato*	2 ml
Agua c.s.	el resto

20 * 91 g de KH₂PO₄ y 95 g de Na₂HPO₄ llevados a 1 litro con
agua destilada.

El medio se ajusta a pH 6,5 antes de la esterili-
zación.

25 El matraz inoculado se incuba a 28°C durante 24
horas en un sacudidor rotatorio. Se emplean 10 ml del cal-
do resultante para inocular un segundo matraz Erlenmeyer



1 de 250 ml, conteniendo 50 ml del mismo medio estéril. Des-
pués de incubación a 28°C durante 24 horas en un sacudidor
rotatorio, el caldo de fermentación resultante se emplea
para inocular un fermentador de 5 litros que contiene
5 3 litros de caldo nutritivo estéril de la siguiente com-
posición:

	<u>gramos/litro</u>
Harina de avena molida	30
Solubles de destilería	10
10 Harina de soja	25
Citrato sódico	4
Ascorbato sódico	0,5
Agua c.s.	el resto

15 El medio se ajusta a pH 6,5 antes de la esterili-
zación.

20 El medio inoculado se incuba después a 28°C duran-
te 4 días mientras se agita y se airea el caldo de fermen-
tación con 3 litros de aire por minuto. Para evitar la ex-
cesiva formación de espuma se añaden 3 ml de un polímero
de propilenglicol con un peso molecular de 2000 aproxima-
damente (vendido con el nombre comercial de Polyglycol
P-2000 por la Dow Chemical Company). El caldo de fermenta-
ción resultante tiene una actividad de 5,9 unidades/ml
determinada mediante un ensayo normalizado empleando
25 Proteus vulgaris.



AR. 1978

1 Una segunda fermentación empleando este mismo
procedimiento da un caldo con una actividad de 6,75 uni
dades/ml.

5 Los caldos procedentes de las dos fermentaciones
se combinan y se filtran. El caldo filtrado resultante
contiene 20 mg de sólidos por mililitro y a una dilución
de 1:32 da una zona de inhibición de 25 mm cuando se en-
saya contra el Proteus vulgaris empleando el procedimien-
to de ensayo modificado.

10 Se agitan 96,5 ml del caldo durante 40 minutos con
2,5 g de alúmina lavada al ácido. Después se filtra la
mezcla y se encuentra que el filtrado contiene 20 % de la
actividad. El adsorbato en alúmina filtrado se lava y se
eluye con amoniaco acuoso a un pH de 11,2. Se evapora el
15 eluato para separar el amoniaco y se halla que da una zo-
na de inhibición de 25 mm a una dilución de 0,125 mg/ml
por el procedimiento de ensayo modificado.

20 A 10 ml de una solución acuosa de la sal amónica
de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico conteniendo
200 mg de sólidos y con una actividad total de 54.000 uni
dades, se añaden 100 mg de hidróxido sódico y la solución
resultante se diluye hasta 20 ml con agua y se filtra. El
filtrado se concentra hasta unos 8,5 ml en vacío, con ca-
lefacción. El concentrado resultante se deja en reposo
25 hasta que comienza a cristalizar de la solución la sal



1970

1 sódica de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico y se
deja que la cristalización prosiga, con agitación, duran-
te toda la noche (17 horas). El producto cristalino se
5 separa por filtración y se lava con una pequeña cantidad
de metanol acuoso al 50 % seguido de una pequeña canti-
dad de metanol. Después de secar el residuo cristalino
a vacío a la temperatura ambiente, se obtiene la sal sódi-
ca de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico.

10 Debe entenderse que aunque este invento ha sido
descrito haciendo referencia a realizaciones particulares
del mismo, pueden introducirse cambios y modificaciones
que se encuentren dentro de sus límites y solo estará li-
mitado por las reivindicaciones del siguiente apéndice.

15

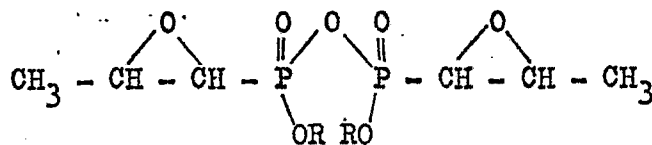
20

25

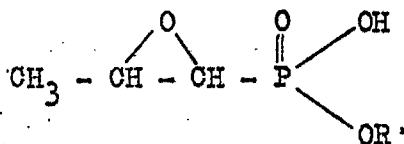


REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de un anhídrido de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico, de fórmula:



y ésteres hidrocarbúlicos y sales del mismo, que consiste en hacer reaccionar un compuesto de fórmula:



con un anhídrido de alquilo inferior, donde R es hidrógeno, un radical hidrocarbilo o un catión metálico.

2. El procedimiento de la Reivindicación 1, en el que el anhídrido es anhídrido acético.

3. El procedimiento de la Reivindicación 1, en el que R es sodio.

4. Un procedimiento según la Reivindicación 3, en el que el compuesto obtenido es bis(-) (cis-1,2-epoxipropil)pirofosfonato disódico.

5. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la patente de invención que se solicita: "PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR ANHIDRIDOS".



1970

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de quince páginas mecanografiadas.

Madrid, 25 octubre 1.968

BERNARDO UNGRIA

p.p.

5