

368557



19 J

368557

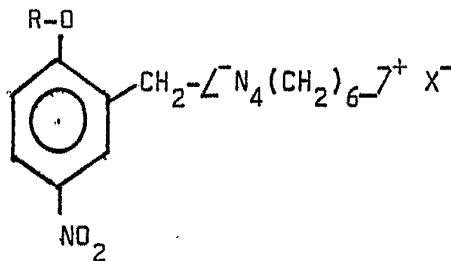
SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE <u>C 07 / A 61</u>
SUBCLASE <u>L / K</u>

MEMORIA DESCRIPTIVA
 de una Patente de Invención a nombre de:
 SCHWEIZ. SERUM- UND IMPFINSTITUT UND
 INSTITUT ZUR ERFORSCHUNG DER INFJEKTIONS-
 KRANKHEITEN, Rehhagstrasse 79, BERN (Sui-
 za); por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARA-
 CION DE NUEVOS COMPUESTOS DE AMONIO"

.....oooo000oooo.....

El presente invento concierne al procedimiento para
 la preparación de los nuevos compuestos de 2-hidroxi- y de
 2-alcoxi-5-nitro-bencil-hexametileno-tetraamonio con acción
 antimicrobiana, de la fórmula general

5



I,

10

en que R significa hidrógeno o un grupo alcoholo inferior,
 preferiblemente el grupo metilo, y X⁻ significa un ión ha-
 lógeno, preferiblemente el ión cloro o bromo o un ión sul-
 fato o sulfonato.

POOR QUALITY



Se ha encontrado que estos compuestos son apropiados como sustancias activas para el tratamiento de infecciones de los intestinos y de las vías urinarias a causa de bacterias patógenas.

5 Hasta ahora, para el tratamiento de enfermedades infecciosas de los intestinos se utilizaron con preferencia hidroxiquinoleínas halogenadas, especialmente la 7-yodo-5-cloro-8-hidroxi-quinoleína conocida desde 1899, o la sulfaguanidina. El compuesto primeramente citado puede producir alergias en el caso de pacientes sensibles al yodo. La sulfaguanidina tiene una actividad frecuentemente insuficiente.

10

 Como antisépticos para las vías urinarias se utilizaron hexametilenotetramina y sales de ácido mandélico o, en los últimos tiempos, incluso combinaciones de estas dos sustancias activas. La actividad es insuficiente en muchos casos.

15

 Por lo tanto, desde hace muchos años se está buscando un agente químico-terapéutico que actúe específicamente sobre bacterias patógenas para los intestinos y/o las vías urinarias. Sería muy especialmente deseable poseer una sustancia activa, con la cual también se pudieran tratar terapéuticamente enfermedades tan temibles como el cólera y el tifus abdominal. Una terapia química apropiada para estas enfermedades extendidas mundialmente significaría un gran progreso, ya que hasta ahora no existe en el comercio ningún preparado que pueda ser utilizado con suficiente éxito para el cólera y para el tifus abdominal.

20

25

Los nuevos compuestos de 2-hidroxi- y 2-alcoxi-5-nitro-



bencil-hexametilenotetraamónio de la fórmula general I muestran una pronunciada actividad bacteriostática sobre los vibriones del cólera, sobre *Salmonella typhi*, y además también contra los Shigelos, que son agentes patógenos frecuentes de la disentería. Además, las sustancias muestran una buena actividad sobre otro número de bacterias patógenas de los intestinos. Por ejemplo, si un medio para alimentación apropiado contiene solamente 25 mg/% de estas sustancias, ya se reduce o reprime el crecimiento de las siguientes cepas de bacterias: *V. cholerae* 34580, *Shigella* N^o 108, *Staphylococcus wood* n^o 46, y se inhibe ya muy intensamente el crecimiento de *Salmonella typhi* Ty 2.728. Con concentraciones de 50 y 100 mg/%, se reprimen totalmente el crecimiento y el desarrollo de todos estos agentes patógenos. Estos datos se refieren a un tiempo de incubación de solamente 2 horas. Con un tiempo de incubación de 6 horas, se obtienen resultados todavía mejores.

En la siguiente tabla I están indicados los datos averiguados sobre la actividad bacteriostática de dos compuestos (A y B) obtenidos según el invento y de dos compuestos (C y D) antes conocidos utilizados análogamente. Todos los datos indicados fueron determinados simultáneamente y bajo condiciones idénticas.

Significan:

A: Cloruro de 2-metoxi-5-nitro-bencil-hexametileno-tetraamónio

B: Cloruro de 2-hidroxi-5-nitro-bencil-hexametileno-tetraamónio

C: 7-yodo-5-cloro-8-hidroxi-quinoleína

D: Sulfaguanidina



5:--

10

15

Metodología: Las actividades bacteriostáticas se llevaron a cabo en cultivos en agar. Las placas de agar sobreinoculadas fueron cubiertas con plaquitas de papel de filtro tratadas en autoclave de 9 mm de diámetro y fueron incubadas después de aplicar 0,025 ml de sustancia disuelta o suspendida (lo que corresponde a 2,5 mg de sustancia/plaquita) a +37°C. Los diámetros indicados de los halos o aureolas de inhibición corresponden al diámetro total. Un diámetro total de 9 mm ha de ser equiparado prácticamente a la expresión "ninguna inhibición".

Resultados: Estos están reunidos en la Tabla I. Un gran halo o aureola de inhibición corresponde a una alta actividad bacteriostática. Un diámetro de 9 mm corresponde a una actividad nula.



T A B L A I

	Bacterias patógenas	Diámetro total de los halos o aureolas de inhibición en mm con:			
		A	B	C	D
5	Escherichia Coli	12	9	14	11
	Klebsiella	28	22	9	11
	Pseudomonas aeruginosa	13	16	9	11
	Proteus mirabilis	25	22	9	10
	Proteus vulgaris	22	11	9	11
10	Salmonella typhi Ty 2	23	22	9	9
	Salm. paratyphi A	21	13	9	12
	B	17	24	9	9
	C	25	24	9	9
	Salmonella typhi murium	21	14	9	9
15	Shigella Nr 108	30	25	15	11
	Shigella shigae Nr 401	34	33	15	10
	Vibrio cholerae El Tor Nr 1418	30	28	18	11
	Vibrio cholerae 569 B	40	35	17	14
	Staphylococcus aureus 31	26	16	15	10
	Staphylococcus wood 46	24	22	12	9

20 En la Tabla II están indicadas las actividades bacterios-
táticas de los compuestos A y B obtenidos según el invento, en com-
paración con la actividad de la hexametenotetraamina (sustancia
E) antes conocida. La determinación se realizó sobre placas de san-
gre en substratos o medios de cultivo sólidos en concentraciones
25 de 25, 50 y 100 mg por 100 ml para una serie de bacterias patógenas.

19 JUN



TABLA II

5.	Bacterias patógenas	actividades bacteriostáticas de las sustancias							
		B			A			E	Testigos
		Concentración en mg/100 ml:							
	25	50	100	25	50	100	100		
	Escherichia coli	±	(±)	-	(±)	(±)	-	+	+
	Klebsiella	±	-	-	(±)	-	-	-	+
	Pseud. aeruginosa	(±)	-	-	(±)	-	-	+	+
	Salm. typhi Ty 2/728	(±)	-	-	-	-	-	-	+
	S. paratyphi A 105	-	-	-	-	-	-	(±)	+
10.	S. paratyphi B 223	-	-	-	-	-	-	-	+
	S. paratyphi C 502	-	-	-	-	-	-	-	+
	S. typhi murium	(±)	-	-	±	-	-	±	+
	Salm. enteritidis	±	-	-	±	-	-	±	+
	Shigella No 108	-	-	-	-	-	-	-	+
	Sh. shigae No 401	-	-	-	-	-	-	-	+
	Sh. shigae No 406	-	-	-	-	-	-	-	+
15.	Sh. flexneri 102 Typ IB	-	-	-	-	-	-	(±)	+
	Staphylococ. aureus	±	-	-	±	-	-	±	+
	Staphylococ. wood 46	-	-	-	(±)	-	-	-	+
	Vibrio cholera 1418	-	-	-	-	-	-	-	+
	Vibrio cholera 38383	-	-	-	-	-	-	-	+
	Vibrio cholera 34580	-	-	-	-	-	-	-	+
20.	(Neiss. gonorrhoe)	(±)	-	-	-	-	-	(±)	+

Valoración:

- : Ningún crecimiento de la flora bacteriana

(±) : Crecimiento muy débil

± : Crecimiento débil

25. + : Crecimiento bueno normal

A partir de las Tablas I y II se desprende lo siguiente:

Los compuestos A y B del presente invento muestran comparativamente actividades bacteriostáticas muchísimo más intensas frente



19 JUN

a un número muchísimo mayor de bacterias patógenas que los compuestos C, D y E antes conocidos. Por el contrario, la flora de coli bacilos natural y normal en los intestinos es afectada solamente poco por las sustancias A y B.

5. Junto con la buena y muchísimo superior actividad frente a bacterias patógenas del tifus y frente a Shigelos, que son agentes patógenos frecuentes de la disentería, tiene especial importancia la actividad comparativamente especialmente intensa - sobre los vibriones del cólera -véase por ejemplo actividad de la sustancia A sobre Vibrio Cholerae 569 B-.

10. Un cólera vencido o soportado e incluso la vacunación protectora del cólera producen solamente una inmunización transitoria. En India y en los países limítrofes, por lo tanto, más de una millarda (mil millones) de hombres están sometidos continuamente a un peligro potencial del cólera. Un agente terapéutico químico del cólera activa es una exigencia para estos países, por no indicar la importancia de un antiséptico activo para los intestinos para el tratamiento y para la profilaxia del tifus y de la disentería, que en estos países son acompañantes continuos de los hombres y representan un peligro para su salud.

15. Tolerancias:

20. Los compuestos del presente invento, no obstante, no solamente son muchísimo más activos que los compuestos antes conocidos comparables, sino que también se caracterizan, de modo sorprendente, por su tolerancia desusadamente buena y comparativamente mayor.

25. En ensayo con animales, las sustancias A y B se han -

368557



mostrado prácticamente como atóxicas. Así, la dosis letal media (DL₅₀) para el ratón pudo ser determinada con valores menores de 8000 mg por Kg. de peso corporal en el caso de administración peroral. Dosis más altas no pudieron ser administradas por razones técnicas. Tampoco en el caso de la aplicación de altas dosis mostraron los animales ningún fenómeno secundario llamativo. En el ensayo de toxicidad subcrónica, en el cuál el preparado había sido administrado diariamente como alimento con la sonda de garganta a 10 ratas durante 30 días, en la dosis diaria de 100 mg/kg, no se pudo observar ningún fenómeno secundario llamativo en estos animales. Como testigo, se emplearon 10 ratas adicionales, a las cuales se administró solamente agua en cantidades adecuadas. Todos los animales recibieron cantidades normales de alimentación y de agua potable "ad libitum". Tanto los controles de peso regulares como las determinaciones del espectro o cuadro clínico sanguíneo realizadas tres veces, no presentaron ninguna desviación con relación a la norma ni en los animales de ensayo ni en los animales testigo. Después de terminar el ensayo, todos los animales fueron muertos y se investigaron histológicamente todos sus órganos más importantes, tales como hígado, pulmón, bazo, timo, riñón, ovarios, testículos, vasos sanguíneos, etc. En los órganos de ratas no se pudo determinar ningún resultado patológico. Los preparados A y B fueron bien tolerados por lo tanto en cualquier respecto.

25. En comparación con ésto, la dosis letal (DL₅₀) para la 7-yodo-5-cloro-8-hidroxi-quinoleína (sustancia C) es de 7200 mg/kg de ratón.

Pacientes, que padecían de enteritis o de enterocoli-

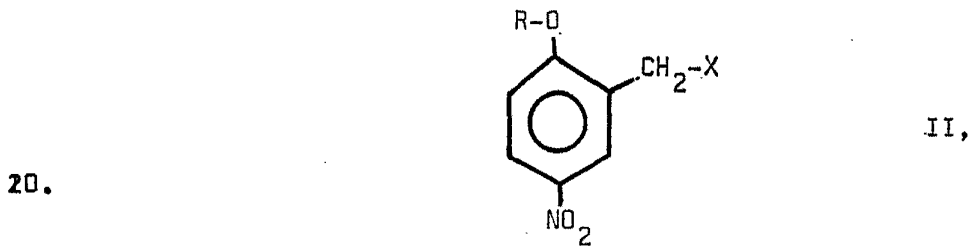
368557



5. tis, recibieron la sustancia A en forma de grageas en dosis de 250 mg. Toleraron este nuevo medicamento sin ningún tipo de fenómeno secundario. La actividad también era buena; la mayoría de los pacientes mostró una rápida mejoría de sus dolencias. La dosis era en general de 3 a 4 veces dos grageas, es decir 1,5 g por día.

10. Los nuevos compuestos de la fórmula general I deben ser utilizados, de acuerdo con su sorprendente idoneidad como medicamentos, especialmente como agentes químico-terapéuticos para el tratamiento de infecciones de los intestinos y de las vías urinarias.

15. El procedimiento para la preparación de los presentes nuevos compuestos de 2-hidroxi- y 2-alcoxi-5-nitro-bencil-hexametileno-tetraamonio de la fórmula I, está caracterizado porque se hace reaccionar un éster de 2-hidroxi- o 2-alcoxi-5-nitro-bencilo reactivo de la fórmula general



25. en que R significa hidrógeno o un grupo alcohol inferior, preferiblemente el grupo metilo, y X significa un radical halógeno, preferiblemente el radical cloro o bromo, o un radical sulfato o sulfonato, con hexametileno-tetraamina.

La forma de realización preferida del procedimiento consiste en hacer reaccionar con hexametileno-tetraamina un halo

368557

19 JUN 19



genuro de 2-hidroxi- o 2-metoxi-5-nitrobencilo.

La preparaci3n se realiza de la manera m1s conveniente haciendo reaccionar cantidades equimolares de los dos educ--tos en un disolvente inerte en lo que se refiere a la reacci3n, preferiblemente en cloroformo.

5,

La reacci3n se realiza convenientemente dentro de un margen de temperaturas que oscila entre aproximadamente 0° C y 100° C, preferiblemente en un intervalo de temperaturas que s3lo supera moderadamente la temperatura ambiente, de aproximadamente 20 a 50° C.

10.

EJEMPLOS DE REALIZACION:

1) Cloruro de 2-metoxi-5-nitro-bencil-hexametileno-tetraamonio

15.

70 g (0,348 moles) de cloruro de 2-metoxi-5-nitro-bencilo purisimo son disueltos en 400 ml de cloroformo, y son mezclados bajo agitaci3n, en porciones, con 48,7 g (0,348 moles) - de hexametilenotetraamina pura. Tiene lugar gradualmente una di- soluci3n casi total de la hexametilenotetraamina a1adida.

20.

Despu3s de aproximadamente 2 horas comienza a separar se el producto. Se agita durante 3 d1as a la temperatura ambien- te. A continuaci3n, el producto separado es filtrado con suc- - ci3n y secado en vac1o.

Cantidad: 102,7 g, es decir 86,3% de la teor1a

Punto de fusi3n: 184° C (con descomposici3n)

Micro-an1lisis: Calculado para C₁₄H₂₀C1N₅O₃

25.

C: calc.: 49,19%; enc.: 49,10%

N: calc.: 20,49%; enc.: 20,23%

Cl: calc.: 10,37%; enc.: 10,24%

368557

19



Peso equivalente (determinado con HClO_4 en
AcOH en presencia de acetato de Hg):

Calc: 341,80; enc: 339,8

El cloruro de 2-metoxi-5-nitro-bencil-hexametileno-
5 tetraamonio es muy fácilmente soluble en agua y metanol, bien
soluble en ácido acético glacial, algo soluble en etanol, y
poco soluble en la mayor parte de los restantes disolventes
orgánicos usuales.

2) Cloruro de 2-hidroxi-5-nitro-bencil-hexametileno-tetraamonio

10 9,38 g (0,05 moles) de cloruro de 2-hidroxi-5-nitro-
bencilo purísimo son disueltos en 250 ml de cloroformo. La
solución obtenida es introducida bajo agitación en una solu-
ción de 7,01 g de (0,05 moles) de hexametenotetraamina
pura en 120 ml de cloroformo.

15 Bajo ligero calentamiento se inicia la reacción
e inmediatamente comienza a separarse en forma de precipita-
do amarillo el compuesto formado de hexametenotetraamonio.

20 Se sigue agitando durante 18 horas a la tempera-
tura ambiente, y después de esto se filtra con succión el
producto separado, y se seca en vacío a la temperatura am-
biente.

Cantidad: 16,4 g, es decir 100% de la teoría.

Punto de fusión: 195°C (con descomposición)

Micro-análisis: Calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{ClN}_5\text{O}_3$

25 C: Calc: 47,65%; enc: 47,44%

N: calc: 21,38%; enc: 21,13%

Cl: calc: 10,82%; enc: 10,55%



Peso equivalente (determinado con HClO_4 en AcOH
en presencia de acetato de Hg):

Calc: 327,69; enc: 329,8

5 El cloruro de 2-hidroxi-5-nitro-bencil-hexametileno-
tetraamonio es poco soluble en agua fría y prácticamente inso-
luble en la mayor parte de los disolventes orgánicos usuales.

En el ejemplo número 2 precedente el cloroformo,
utilizado como disolvente, puede ser reemplazado por metanol
o por etanol.

10

3) Bromuro de 2-metoxi-5-nitro-bencil-tetraamonio.

Este se obtiene por reacción de 8,55 g de bromuro
de 2-metoxi-5-nitrobencilo con 4,87 g de hexamilenotetraami-
na en 40 ml de cloroformo.

Punto de fusión: aproximadamente 200°C con descomposición.

15

De manera análoga a como se describe en los ejem-
plos precedentes, por reacción de bromuro de 2-hidroxi-5-nitro-
bencilo con hexamilenotetraamina se obtiene el correspon-
diente bromuro de hexamileno-tetraamonio, y por reacción
de sulfato de 2-hidroxi- o de 2-alcoxi-5-nitro-bencilo o del
correspondiente metanosulfonato de bencilo, se obtienen los
correspondientes sulfatos o sulfonatos de 2-hidroxi- o 2-al-
coxi-5-nitro-bencil-hexametileno-tetraamonio.

20

4) Forma de administración.

25

2,5 kg de cloruro de 2-metoxi-5-nitro-bencil-hexa-
metileno-tetraamonio o de cloruro de 2-hidroxi-5-nitro-bencil-
hexametileno-tetraamonio son granulados con almidón y gelatina
y son moldeados por compresión para formar 10.000 tabletas.



Las tabletas son convertidas en grageas con jarabe de azúcar y son provistas con un revestimiento resistente a los jugos estomacales.

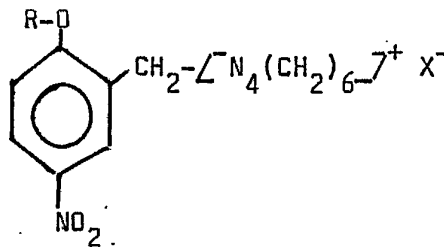
-----N O T A-----

5

Se reivindica como nuevo y de propia invención:

1.- Procedimiento para la preparación de nuevos compuestos de amonio, en especial de 2-hidroxi- y de 2-alcoxi-5-nitro-bencil-hexametileno-tetraamonio de la fórmula general

10

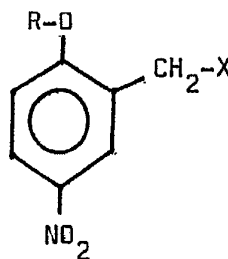


I,

15

en que R significa hidrógeno o un grupo alcoholo inferior, preferiblemente el grupo metilo, y X⁻ significa un ión halógeno, preferiblemente el ión cloro o bromo o un ión sulfato o sulfonato, caracterizado porque se hace reaccionar un éster de 2-hidroxi- o 2-alcoxi-5-nitro-bencilo reactivo de la fórmula general

20



II,



en que R significa hidrógeno o un grupo alcoholo inferior, preferiblemente el grupo metilo, y X significa un radical halógeno, preferiblemente el radical cloro o bromo, o un radical sulfato o sulfonato, con hexametileno-tetraamina.

5 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se hace reaccionar con hexametileno-tetraamina un halogenuro de 2-hidroxi- o de 2-metoxi-5-nitro-bencilo.

10 3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque se hace reaccionar con hexametileno-tetraamina el cloruro de 2-metoxi-5-nitro-bencilo.

4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se hacen reaccionar cantidades equimolares de los dos eductos en un disolvente inerte con relación a la reacción.

15 5.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque se realiza la reacción en cloroformo.

20 6.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque se realiza la reacción en un margen de temperaturas desde aproximadamente 0°C a 100°C, preferiblemente entre 20°C y 50°C.

7.- PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE NUEVOS COMPUESTOS DE AMONIO.

25 Tal como se describe y reivindica en la presente Memoria Descriptiva, que consta de catorce hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 19 JUN. 1969

J. Maury