



Nº 374.798

374798

REGISTRO TECNICO
CLASIFICACION
CLAS. C-07 A-61
SUBCLAS. E K

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

Solicitante: MERCK & CO. INC.

Residencia: 126 East Lincoln Avenue, RAHWAY, New Jersey, USA

Enunciado: UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE ACIDO (-)(CIS-1,2-EPOXIPROPIL) FOSFONICO

Prioridad: de la solicitud de patente estadounidense Nº 787.580 del 27 de diciembre de 1968

AM



1 Este invento se refiere a un método de separación  
de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico de mezclas  
enantioméricas de derivados de ácido (cis-1,2-epoxipro-  
5 pil) fosfónico. Más especialmente, se refiere a un méto-  
do de hidrolizar estereoselectivamente los ésteres y ami-  
das de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico.

#### Antecedentes de la invención

10 El ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico y sus  
sales son valiosos antibióticos que son eficaces contra  
varios agentes patógenos Gram-positivos y Gram-negativos.  
Aunque estos antibióticos pueden ser producidos por fer-  
mentación de variedades adecuadas de Streptomyces, por  
ejemplo cultivando aerobianente Streptomyces fradiae  
15 NRRL B-3351 en medios de fermentación adecuados, se han  
encontrado otros métodos por los cuales pueden prepararse  
por síntesis el antibiótico y sus sales, ésteres y  
amidas, por ejemplo a partir de ácido cis-propenilfosfó-  
nico y sus derivados. Un inconveniente de estos métodos  
de síntesis es que el producto deseado se obtiene mezcla-  
20 do con su enantiómero, habitualmente en forma de racema-  
to y debe ser separado para obtener el producto en forma  
pura.

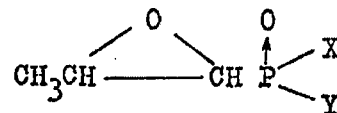
#### Compendio de la invención

25 Un objeto del presente invento es proporcionar  
un método mediante el cual pueda obtenerse el isómero (-)



1 del ácido (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico a partir de las  
 mezclas de ésteres y amidas de ácido (+) y (-) (cis-1,2-  
 epoxipropil)fosfónico. Otro objeto es proporcionar un  
 procedimiento para hidrolizar estereoselectivamente los  
 5 ésteres y amidas de los estereoisómeros de ácido (cis-  
 1,2-epoxipropil)fosfónico para obtener ácido (-) (cis-  
 1,2-epoxipropil)fosfónico y sus sales. Otros objetos se  
 pondrán en evidencia en la descripción detallada de este  
 invento dada a continuación.

10 De acuerdo con el presente invento, se ha encon-  
 trado que los ésteres y amidas antípodos del ácido (cis-  
 1,2-epoxipropil)fosfónico pueden ser hidrolizados selec-  
 tivamente sometiendo estas mezclas a la acción de enzimas  
 de variedades hidrolizantes selectivas de microorganismos  
 15 para producir mezclas que contienen ácido (-) (cis-  
 1,2-epoxipropil)fosfónico o sus sales. En la realización  
 del procedimiento de este invento los ésteres o amidas  
 pueden ser agregados a un medio nutritivo en el que está  
 siendo cultivado el microorganismo o pueden ser puestos  
 20 en íntimo contacto con células del organismo en medios  
 adecuadamente regulados. Por lo tanto, de acuerdo con las  
 realizaciones preferidas de este invento, cuando las mez-  
 clas antípodos de ésteres y amidas de fórmula



25

374798







22

1 butilo, hexilo, octilo, decilo, dodecilo, haloalquilo  
como cloroetilo, fluorpropilo, bromometilo y dicloroeti-  
lo, acilaminoalquilo como acetilaminometilo y benzoilami-  
noetilo, aciloxialquilo como acetoximetilo, propionoxi-  
5 etilo y benzoiloxietilo, otros grupos alquilo sustituí-  
dos como hidroxipropilo, piperidinometilo, aminometilo y  
aminoetilo, alquilaminoalquilo como dimetilaminometilo,  
dietilaminopropilo, carboalcoximetilo, cianoetilo, sul-  
fonamidoetilo, ftalimidometilo y metoximetilo; alquenilo  
10 como alilo, metalilo, vinilpropenilo, hexenilo, octadie-  
nilo; alquinilo como propargilo, etinilo o cloroetinilo;  
cicloalquilo como ciclohexilo, ciclohexenilo, o ciclopro-  
pilo. Cuando  $R_1$  y  $R_2$  son alifáticos, preferiblemente con-  
tienen de 1 a 6 átomos de carbono.

15 Como ejemplos de  $R_1$  y  $R_2$  cuando representan un  
radical aralifático citaremos aquellos casos en los que  
es aralquilo como bencilo, fenetilo, fenilpropilo, p-halo-  
bencilo, o-alcoxibencilo, m-alcoxibencilo, p-alcoxibenci-  
lo, nitrobencilo, aminofenetilo, piridiletilo, furilmeti-  
lo, tienilpropilo y similares.

20  $R_1$  y  $R_2$  también pueden representar un radical  
arilo como fenilo, naftilo o fenilo sustituido, v.g. p-  
clorofenilo, o-nitrofenilo, o,p-dihalofenilo, cianofenilo,  
metoxifenilo, aminofenilo y tolilo y preferiblemente un  
25 resto aromático de un solo núcleo. Cuando  $R_1$  o  $R_2$  es he-



1           terocíclico, puede ser heteroaromático como piridilo,  
furilo, tienilo, tiazolilo o pirazinilo o alternativa-  
mente puede representar un heterocinillo hidrogenado del  
que son ejemplos el tetrahidrofurilo y el piperazinilo.

5           Cuando  $R_1$  y/o  $R_2$  son acilo, preferiblemente re-  
presentan alcanilo inferior o aroilo como acetilo, pro-  
pionilo, butirilo, hexanoilo, benzoilo, halobenzoilo,  
nitrobenzoilo y similares.

10           De acuerdo con el presente invento, se ha encon-  
trado que existen varios microorganismos productores de  
enzimas capaces de hidrolizar selectivamente los ésteres  
y amidas de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico.  
Así, las bacterias del orden de Actinomycetes, por ejem-  
plo Nocardia corallina; los hongos como las variedades  
15           adecuadas de Penicillium, por ejemplo Penicillium fre-  
quentans y Penicillium vermiculatum; variedades de  
Aspergillus, por ejemplo Aspergillus niger; Fungi imper-  
fecti, por ejemplo Ashbya gossypii y Helicostylum piri-  
forme, han resultado todos ellos productores de enzimas  
20           capaces de hidrolizar selectivamente los ésteres y ami-  
das de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico.

25           El microorganismo productor de enzimas útiles  
para la realización de los procesos de este invento pue-  
de ser encontrado fácilmente cultivando microorganismos  
conocidos o microorganismos desconocidos obtenidos de



1 fuentes tales como suelos y similares, en presencia de  
un monoéster o amida de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)-  
fosfónico y determinando, después de haber alcanzado un  
5 buen crecimiento del organismo (siendo normalmente sufi-  
cientes para este fin de 2 a 5 días) si el líquido que  
sobrenada presenta o no actividad determinada por el en-  
sayo con Proteus vulgaris. Alternativamente, esta misma  
selección puede ser efectuada utilizando células resi-  
duales que contienen el enzima e incubando estas células  
10 en medios adecuados, por ejemplo regulador 0,05 M Tris  
a pH 8,0 durante 2-4 días y después valorando la porción  
líquida con Proteus vulgaris. En la realización de es-  
tos ensayos es conveniente inocular simultáneamente el  
microorganismo probado en un medio nutritivo adecuado  
15 que no contenga monoéster ni amida con objeto de distin-  
guir los organismos que producen el antibiótico directa-  
mente de los que son capaces de hidrolizar selectivamen-  
te los ésteres o amidas.

20 Los siguientes ejemplos ilustran los métodos de  
realización de este invento.

#### EJEMPLO 1

25 Se ajusta a pH 7,0 un medio conteniendo 0,8 %  
de caldo nutritivo (Difco), 0,2 % de extracto de leva-  
dura, 3 % de cerelesa y 0,3 % de extracto de malta en  
agua destilada. Se introducen 40 ml de este medio en un



1 erlenmeyer de 250 ml que después se introduce en auto-  
clave a 15 psi (1,05 kg/cm<sup>2</sup>) durante 15 minutos. A con-  
tinuación el medio se inocula con 4 ml de inoculum pro-  
cedente de un agar inclinado de Aspergillus niger  
5 NRRL-67 y se incuba en un agitador mecánico que funcio-  
na a 220 rpm, con un recorrido de 2 pulgadas (5 cm) a  
28°C durante 4 días, hasta que se obtiene un buen creci-  
miento del organismo. Se transfieren asépticamente 10 ml  
del caldo de fermentación resultante a un tubo de cen-  
trífuga y las células son granuladas en una centrífuga a  
10 25.000 G. Los fluidos que sobrenadan se desprecian y las  
células granuladas se suspenden de nuevo en 4 ml de solu-  
ción reguladora 0,05 M de (hidroximetil)aminometona (re-  
gulador Tris) ajustada a pH 8,0. Entonces se transfieren  
15 asépticamente 2 ml de la suspensión celular resultante  
a un tubo de ensayo esterilizado de 20 x 200 mm conte-  
niendo 200  $\gamma$  de (cis-1,2-epoxipropil)fosfonato só-  
dico monometílico racémico en 2 ml de solución regulado-  
ra 0,005 M de (hidroximetil)aminometano a pH 8,0. El tu-  
bo es incubado durante 48 horas a 28°C en un sacudidor  
20 mecánico. El caldo incubado resultante es centrifugado  
a 25.000 G y en el fluido que sobrenada se examina la ac-  
tividad biológica por ensayo de disco con Proteus vulgaris  
MB-838 (ATCC 21100 y NRRL B-3361) y se encuentra que tie-  
25 ne una zona de inhibición de 26 mm, indicando la presen-



1           cia de una sal de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fos-  
fónico.

          Unos tubos de control conteniendo (1) 2 ml de  
suspensión celular más 2 ml de solución reguladora  
5           0,05 M de (hidroximetil)aminometano a pH 8,0 y (2) 4 ml  
de la misma solución reguladora conteniendo 200 gammas  
de (cis-1,2-epoxipropil)fosfonato sódico monometílico  
racémico, son incubados de forma similar durante 48 ho-  
ras, a 28°C. El líquido que sobrenada de cada uno de es-  
10          tos tubos de control no presenta zona de inhibición en  
el ensayo con Proteus vulgaris.

          El ensayo utilizando Proteus vulgaris MB-838  
se realiza de la siguiente forma:

          El cultivo sometido a prueba se mantiene como  
15          cultivo inclinado en agar nutritivo (Difco) más 0,2 %  
de extracto de levadura (Difco). Los cultivos inclinados  
inoculados se incuban a 37°C durante 18-24 horas y se  
mantienen a las temperaturas del refrigerador durante  
una semana, preparando cultivos inclinados recientes ca-  
20          da semana.

          El inoculum para las placas de ensayo se pre-  
para cada día inoculando un erlenmeyer de 250 ml conte-  
niendo 50 ml de caldo nutritivo (Difco) más 0,2 % de ex-  
tracto de levadura (Difco) con una rascadura procedente  
25          del tubo inclinado. El matraz se incuba a 37°C en una



1 máquina sacudidora durante 18-24 horas. El caldo de cul-  
tivo es ajustado entonces a una transmitancia del 40 %  
a una longitud de onda de 660 mμ, utilizando un aparato  
Bausch & Lomb Spectronic 20 mediante la adición de solu-  
5 ción de extracto de levadura al 2% al cultivo. El caldo  
no inoculado se utiliza como patrón para esta determi-  
nación. Se emplean 30 ml del caldo ajustado para inocu-  
lar 1 litro de medio.

10 Como medio de ensayo se utiliza agar nutritivo  
(Difco) más 0,2 % de extracto de levadura (Difco). Se  
prepara este medio, se esteriliza en autoclave y se de-  
ja enfriar a 50°C. Una vez inoculado el medio, se agre-  
gan 10 ml a unos discos Petri estériles y el medio se  
deja solidificar.

15 Unas muestras del líquido que sobrenada que han  
de ser probadas se diluyen en solución reguladora 0,05 M  
de Tris a pH 8,0 hasta una concentración apropiada. Se  
sumergen unos discos en la solución de ensayo y se colo-  
can sobre la superficie de la placa de ensayo; normalmen-  
20 te se colocan dos discos por cada muestra sobre una pla-  
ca, uno frente a otro. Sobre la placa se colocan dos dis-  
cos sumergidos en una solución de ácido (-) (cis-1,2-  
epoxipropil)fosfónico, conteniendo 0,4 unidades por mili-  
litro, sobre la placa en posición alternativa con la mues-  
25 tra. Las placas se incuban a 37°C durante 18 horas y se

374798



1 determinan los diámetros de las zonas en milímetros. La  
potencia de la muestra se determina mediante un nomogra-  
ma o a partir de la curva de calibrado. Un mg de ácido  
5 (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico contiene 357 unidades,  
siendo una unidad la concentración del producto que pro-  
duce una zona de 28 mm de diámetro.

#### EJEMPLO 2

10 Cuando se repite el procedimiento del Ejemplo 1  
utilizando Ashbya gossypii NRRL Y 1056 en lugar de  
Aspergillus niger, se encuentra que el líquido que sobre-  
nada tiene una zona de inhibición de 18 mm en el ensayo  
con Proteus vulgaris.

#### EJEMPLO 3

15 Cuando se repite el procedimiento del Ejemplo 1  
utilizando 200 gammas de (cis-1,2-epoxipropil)fosfonato  
sódico monoetilico racémico, el líquido que sobrenada re-  
sultante da una zona de inhibición de 30 mm por ensayo  
con Proteus vulgaris.

#### EJEMPLO 4

20 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1 em-  
pleando la misma cantidad de sal sódica del éster mono-  
propílico racémico en lugar del éster monometílico, el  
líquido resultante que sobrenada da una zona de inhibi-  
ción de 20 mm en el ensayo con Proteus vulgaris.

25



1

EJEMPLO 5

5

Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, pero empleando la misma cantidad de sal sódica de éster monoalílico racémico en lugar del éster monoetilico se encuentra que el líquido resultante que sobrenada da una zona de inhibición de 30 mm por ensayo con Proteus vulgaris.

10

EJEMPLO 6

15

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, se obtienen células en reposo de Ashbya gossypii NRRL Y 1056 en forma de gránulos. Cuando estas células se incuban en solución reguladora Tris a pH 8 con 2 ml de una solución de (cis-1,2-epoxipropil)fosfonato sódico monoetilico racémico, conteniendo 200 gammas por ml, utilizando los procedimientos descritos en el Ejemplo 1, el líquido que sobrenada obtenido después de incubar durante 48 horas da una zona de inhibición de 17 mm en el ensayo con Proteus vulgaris.

20

EJEMPLO 7

25

Siguiendo los procedimientos descritos en el Ejemplo 6, pero empleando la sal sódica del éster monoalílico racémico en lugar del éster monoetilico, se encuentra que el caldo incubado resultante tiene una zona de inhibición de 24 mm determinada por el ensayo con Proteus vulgaris.

374798



22

1

EJEMPLO 8

5

10

Siguiendo los procedimientos descritos en el Ejemplo 1, se obtienen células en reposo de Nocardia corallina ATCC 4273 en forma de gránulos. Cuando estas células en reposo se incuban con la sal sódica del éster monometílico del ácido (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico racémico, siguiendo los procedimientos descritos en el Ejemplo 1, el caldo incubado resultante tiene una zona de inhibición de 12 mm determinada por el ensayo con Proteus vulgaris.

EJEMPLO 9

15

Cuando se repite el procedimiento del Ejemplo 8 empleando la misma cantidad de sal sódica de éster monoetilico en lugar de sal de éster monometílico, se encuentra que el caldo incubado resultante tiene una zona de inhibición de 13 mm determinada por el ensayo con Proteus vulgaris.

EJEMPLO 10

20

25

Cuando se repiten los procedimientos del Ejemplo 8 empleando la misma cantidad de sal sódica de éster monopropílico racémico en lugar de sal de éster monometílico racémico, se encuentra que el caldo incubado resultante tiene una zona de inhibición de 11 mm determinada por el ensayo con Proteus vulgaris.

374798



1

EJEMPLO 11

5

Quando se repiten los procedimientos del Ejemplo 8 empleando la misma cantidad de sal sódica de éster monoalílico racémico en lugar de sal de éster monometílico racémico, se encuentra que el caldo incubado resultante tiene una zona de inhibición de 19 mm determinada por el ensayo con Proteus vulgaris.

EJEMPLO 12

10

15

Siguiendo los procedimientos descritos en el Ejemplo 1, se cultiva Penicillium frequentans NRRL 1915 y las células resultantes se aíslan en forma de gránulos. Las células en reposo se incuban después con la sal sódica del éster monometílico de ácido (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico racémico y la solución líquida resultante se somete a ensayo mediante el procedimiento con Proteus vulgaris. El ensayo indica que el producto tiene una zona de inhibición de 21 mm.

EJEMPLO 13

20

25

A 40 ml de un medio estéril constituido por 0,8 % de caldo nutritivo, 0,2 % de extracto de levadura, 3 % de cerelesa y 0,3 % de extracto de malta en agua destilada, ajustado a pH 7,0 en un erlenmeyer de 250 ml, se agrega un inoculum de Aspergillus niger NRRL 67 procedente de un agar inclinado. El matraz inoculado se incuba

22 DIC.



1 en un sacudidor mecánico que funciona a 220 rpm con un  
recorrido de 2" (5 cm) a 28°C, durante 4 días. Después  
se transfieren asépticamente a una centrífuga 10 ml del  
caldo de fermentación resultante y las células se gra-  
5 nulan a 25.000 G. El líquido que sobrenada se desprecia  
y las células granuladas se suspenden de nuevo en 4 ml  
de solución reguladora 0,05 Tris a pH 8,0. A continua-  
ción se transfieren asépticamente 2 ml de la suspensión  
celular resultante a un tubo de ensayo esterilizado de  
10 20 x 200 mm conteniendo 200 gammas de N,N'-tetraetil-  
(cis-1,2-epoxipropil)fosfonamida racémica en 2 ml de so-  
lución reguladora 0,05 M de Tris a pH 8,0. Después el  
tubo se incuba durante 48 horas a 28°C en un sacudidor  
mecánico que funciona a 220 rpm con un recorrido de  
15 2" (5 cm). Después de la incubación, las células se se-  
paran por centrifugación y en el líquido que sobrenada  
se determina la actividad biológica con Proteus vulga-  
ris MB-838. El ensayo indica que la solución tiene una  
zona de inhibición de 38 mm.

20

#### EJEMPLO 14

25

Siguiendo los procedimientos descritos en el  
Ejemplo 13, se cultiva Helicostylum piriforme ATCC 8992  
y las células resultantes se incuban con N,N'-tetrame-  
til-(cis-1,2-epoxipropil)fosfonamida racémica durante  
2 días a 28°C. El líquido que sobrenada en el caldo in-



1 cubado resultante da una zona de inhibición de 35 mm.  
cuando se determina con Proteus vulgaris MB-838.

EJEMPLO 15

5 Siguiendo los procedimientos descritos en el  
Ejemplo 13, se incuban unas células de Penicillium  
frequentans NRRL 1915 con N,N'-tetrametil-(cis-1,2-  
epoxipropil)fosfonamida racémica y se encuentra que la  
porción fluída incubada resultante tiene una zona de  
inhibición de 39 mm cuando se determina con Proteus  
10 vulgaris.

EJEMPLO 16

Cuando se utilizan células en reposo de Asper-  
gillus fumigatus NRRL 165 en lugar del Aspergillus  
niger en el Ejemplo 13, se encuentra que el fluído que  
sobrenada da una zona de inhibición de 44 mm cuando se  
15 ensaya con Proteus vulgaris MB 838.

EJEMPLO 17

Utilizando los procedimientos descritos en el  
Ejemplo 13, se incuban unas células en reposo de Peni-  
cillium vermiculatum, cultivo 54 B en la colección  
20 Quatermaster en Natick Conn., con N,N'-tetrametil-(cis-  
1,2-epoxipropil)fosfonamida racémica durante 48 horas  
y se encuentra que el líquido que sobrenada resultante  
tiene una zona de inhibición de 32 mm determinada con  
25 Proteus vulgaris MB 838.

EJEMPLO 18

1 Una solución de 1,2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  
0,4 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,002 g de  $\text{SnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,004 g de  
5  $\text{FeSO}_4$ , 2 g de  $\text{CaCO}_3$  y 2 g de lactato de etilo en 400 ml  
de agua corriente en un erlenmeyer de 4 litros se ajusta  
a pH 7,0 y el matraz se esteriliza calentando en au-  
toclave a  $121^\circ\text{C}$  y 15 psi ( $1,05 \text{ kg/cm}^2$ ) durante 15 minu-  
tos. Al medio estéril resultante se agrega un cultivo  
vegetativo de Aspergillus niger NRRL 67 y el matraz ino-  
10 culado resultante se incuba durante 4 días en una má-  
quina sacudidora rotatoria que opera a 220 rpm con un  
recorrido de 2" (5 cm), a  $28^\circ\text{C}$ . A este medio de fermenta-  
ción se agregan después 40 ml de una solución acuosa que  
15 contiene 20 g de (cis-1,2-epoxipropil)fosfonato sódico  
monoetilico racémico, neutralizada previamente a pH 7  
y esterilizada por filtración. Entonces se prosigue la  
incubación durante otras 24 horas.

El medio de fermentación resultante es filtrado  
después y el filtrado es evaporado repetidas veces con  
20 metanol, a vacío, hasta que se obtiene una solución cong-  
tituida por 90 % de metanol. A continuación se filtra  
esta solución metanólica para separar las sales inorgá-  
nicas precipitadas y el residuo se lava con metanol que  
se agrega al filtrado. La solución metanólica resultan-  
25 te se cromatografía en una columna que contiene 2000 g

374798



1 de alúmina; la solución concentrada se agrega a la  
alúmina previamente lavada con metanol. Entonces se  
desarrolla la columna con metanol y se recogen frac-  
ciones de eluato de 200 ml. Las fracciones se someten  
5 a ensayo mediante el procedimiento con Proteus vulga-  
ris y las fracciones que contienen actividad antibió-  
tica se combinan, separando el metanol por evaporación  
a presión reducida. El residuo que contiene la sesqui-  
sal sódica de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico  
10 se recristaliza en metanol acuoso para obtener la ses-  
quisal sódica en forma cristalina pura. Una solución  
al 2 % de este producto en agua tiene un pH de 6,8 y  
un  $[\alpha]_{405}^{28^{\circ}\text{C}}$  de 14,9°.

15 Los ésteres y amidas enantioméricos de ácido  
(cis-1,2-epoxipropil)fosfónico utilizados en el proce-  
dimiento de este invento se obtienen por epoxidación  
de los derivados correspondientes de ácido cis-propen-  
nilfosfónico.

20 Así, los monoésteres se preparan por epoxida-  
ción de los monoésteres correspondientes de ácido cis-  
monopropenilfosfónico o, alternativamente, por hidró-  
lisis ácida del diéster de ácido (cis-1,2-epoxipropil)-  
fosfónico. Por ejemplo, los monoésteres pueden ser pre-  
parados partiendo de fosforoclorurito de di-terc-butilo,  
25

22 DIC.



1 de la siguiente forma:

5 En un matraz de tres bocas y 2 litros de capacidad, provisto de agitador mecánico, termómetro, embudo de decantación y tubo desecador, se introducen 68,7 g (0,5 moles) de tricloruro de fósforo y 750 ml de benceno anhidro. La solución se enfría a 5°C y se agregan 50,6 g (0,5 moles) de trietilamina a 5-10°C durante 20 minutos. Después la solución bencénica se agita durante 20 minutos. Se añade una solución de 50,6 g (0,5 moles) de trietilamina y 37,06 g (0,5 moles) de terc-butanol, a lo largo de 20 minutos con agitación a 5-10°C y la mezcla se agita durante 20 minutos. Entonces se agrega una segunda porción de 37,06 g (0,5 moles) de terc-butanol a lo largo de un periodo de 20 minutos, a 5-10°C y la mezcla de reacción que contiene fosforoclorurito de di-terc-butilo se agita durante 90 minutos a 5-10°C.

15 Se disuelven 50,6 g (0,5 moles) de trietilamina y 28,03 g (0,5 moles) de alcohol propargílico en 40 ml de benceno anhidro y la solución se agrega a la mezcla de reacción que contiene fosforoclorurito de di-terc-butilo a lo largo de 25 minutos, con agitación, manteniendo la temperatura de reacción entre 5° y 10°C mediante refrigeración externa. La mezcla resultante que contiene 2-propinilfosfito de di-terc-butilo se agita a 25 5-10°C durante 1 hora.

374798



1                    Después se calienta a reflujo la mezcla de  
reacción que contiene 2-propinilfosfito de di-terc-  
butilo y el reflujo se prosigue durante 1 hora. A con-  
tinuación se enfría la solución a la temperatura ambien-  
5                    te con un baño de agua y se agregan en porciones 185 ml  
de agua. El hidrocioruro de trietilamina se disuelve en  
la capa acuosa y la capa orgánica se separa de aquella.  
La solución bencénica se calienta a la presión atmosfé-  
rica y el agua se separa por destilación azeotrópica.  
10                    La solución bencénica residual contiene propadienilfos-  
fonato de di-terc-butilo.

                    Cuando se desee, puede obtenerse el éster pu-  
ro separando el disolvente y destilando el éster a al-  
to vacío; el éster puro se caracteriza por sus espectros  
15                    infrarrojo y de resonancia magnética nuclear.

                    La solución bencénica seca de propadienilfos-  
fonato de di-terc-butilo se hidrogena a 20-25°C con 5,0 g  
de catalizador de paladio al 5 % en carbón hasta que ce-  
sa la absorción de hidrógeno. El catalizador se separa  
20                    por filtración y se lava con dos porciones de 50 ml de  
benceno. Por separación del disolvente a vacío se obtie-  
ne cis-propenilfosfonato de di-terc-butilo que se carac-  
teriza por sus espectros infrarrojo y de resonancia mag-  
nética nuclear. El éster crudo puede ser purificado por  
25                    destilación en alto vacío.

374798



1                   Se disuelven 1,0 moles de cis-propenilfosfo-  
nato de di-terc-butilo y 0,005 moles de ácido para-  
toluensulfónico en 235 ml de benceno y la solución se  
calienta a reflujo hasta que se ha formado la cantidad  
5                   calculada de isobutenó. Para detectar el isobuteno se  
emplea un dispositivo de medida de gases. Después la  
mezcla de reacción se enfría a la temperatura ambiente,  
se separa el disolvente a vacío y se obtiene como resi-  
duo ácido cis-propenilfosfónico.

10                   Los diésteres de ácido cis-propenilfosfónico  
se obtienen convirtiendo primero el ácido libre en di-  
cloruro cis-propenilfosfónico y después haciendo reaccio-  
nar este dicloruro con 2 equivalentes en moles de un  
alcohol representado por la fórmula R-OH, donde R re-  
15                   presenta el resto alcohólico del éster resultante. Los  
monoésteres se preparan a partir de los diésteres por  
eliminación de uno de los radicales éster con una base.  
Entonces puede prepararse una monosal del monoéster ha-  
ciendo reaccionar este último con un equivalente de ba-  
20                   se. Aquí damos ejemplos representativos de las reaccio-  
nes anteriores y debe entenderse que los demás ésteres  
y sales se obtienen de la misma forma a partir de los  
productos de partida apropiados.

25                   a) En un matraz de fondo redondo, de tres bocas  
y 250 ml de capacidad, se introducen 6,1 g de ácido cis-



1 propenilfosfónico, 60 ml de benceno seco y 9,0 ml de  
piridina. La mezcla se calienta a 50°C, se retira el  
calor y se agregan gota a gota 13,2 g de cloruro de  
5 tionilo, a una velocidad tal que la mezcla de reacción  
se mantiene a 50°C. Después se enfría la mezcla a la  
temperatura ambiente y se agita durante 2 horas a di-  
cha temperatura. Se filtra la mezcla y el filtrado se  
concentra a vacío a 35°C dando 4,5 g de un aceite tur-  
bio. Se destila dando dicloruro cis-propenilfosfónico  
10 p.e. 67-69°C/9-10 mm;  $n_D^{20} = 1,4885$ .

b) Una mezcla agitada de 0,1 moles de diclo-  
ruro cis-propenilfosfónico y 0,2 moles de trietilamina  
en 100 ml de benceno se enfría a 5°C. A la mezcla se  
añaden 0,2 moles de alcohol metílico, a una velocidad  
15 suficiente para mantener la temperatura entre 5° y 10°C.  
Cuando la adición es completa, la mezcla se agita a la  
temperatura ambiente durante 1 hora. La sal hidroclo-  
ruro de trietilamina precipitada se separa después por  
filtración y el disolvente se elimina a presión reduci-  
da dejando cis-propenilfosfonato de dimetilo. Otros  
20 diésteres de ácido cis-propenilfosfónico, como los és-  
teres alquílicos, alquenílicos, alquinílicos y alquíli-  
cos, alquenílicos o alquinílicos sustituidos, se prepa-  
ran de la misma forma empleando 0,2 moles del alcohol  
25 apropiado.



1 El cis-propenilfosfonato de dimetilo se con-  
vierte después en la sal sódica del cis-p-propenilfos-  
fonato de monometilo calentando el diéster en solución  
acuosa de hidróxido sódico durante un tiempo suficien-  
5 te para convertir el diéster en monoéster. Análogamen-  
te se convierten otros ésteres dialquílicos, dialquení-  
licos o dialquinílicos en la sal del monoéster.

10 c) En un matraz de fondo redondo y tres bocas,  
de 50 ml de capacidad, provisto de agitador, termóme-  
tro y embudo de adición, se introducen 1,5 g (0,01 mo-  
les) de cis-propenilfosfonato sódico monometílico en  
30 ml de metanol. El pH se ajusta a 4,5 con hidróxido  
sódico 2,5 N. Se añaden 0,06 g de dihidrato de wolfra-  
mato sódico y la mezcla se calienta a 55°C. Se añaden  
15 gota a gota 3 ml de peróxido de hidrógeno al 30 % a lo  
largo de 15 minutos, a 55-60°C. La mezcla se envejece  
durante 1 hora a 55-60°C. Se añade peróxido de hidróge-  
no a medida que es necesario para mantener un ensayo  
positivo con yoduro de almidón. La mezcla se apaga agre-  
gando solución saturada de sulfito sódico hasta ensayo  
20 negativo con yoduro de almidón. Los sólidos inorgánicos  
se separan por filtración, la solución se evapora has-  
ta la mitad de su volumen y se enfría. El (+) (cis-1,2-  
epoxipropil)fosfonato sódico metílico sólido así obte-  
nido se separa por filtración, se lava con etanol y se  
25



1           seca. Se obtiene el mismo resultado con vanadato de  
cinc o con selenomolibdowolframato sódico utilizados  
como catalizador en lugar de wolframato sódico.

5           Cuando se epoxida en la forma antes descri-  
ta una cantidad equimolecular de cis-propenilfosfona-  
to sódico n-butílico, cis-propenilfosfonato sódico  
etílico, cis-propenilfosfonato sódico monovinílico,  
cis-propenilfosfonato potásico monoalílico o cis-pro-  
penilfosfonato potásico propargílico, se obtiene la  
10          sal sódica del éster n-butílico, etílico, vinílico,  
alílico y propargílico del ácido (cis-1,2-epoxipropil)-  
fosfónico racémico.

15          Las fosfonoamidas y diamidas empleadas como  
productos de partida se obtienen por reacción del di-  
cloruro cis-propenilfosfónico con una amina primaria o  
secundaria. Cuando se emplea 1 mol de amina, uno de  
los cloruros es desplazado para dar el cloruro de cis-  
propenilfosfonamida.

20          Las diamidas se obtienen a partir de diclo-  
ruro cis-propenilfosfónico por los procedimientos an-  
teriores empleando 2 moles de amina primaria o secunda-  
ria. Las monoamidas o diamidas de ácido cis-propenil-  
fosfónico así obtenidas pueden reaccionar después con  
peróxido de hidrógeno para producir las correspondien-  
tes amidas de ácido (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico. Por  
25



1        ejemplo, la N,N'-dibenzoil-(cis-1,2-epoxipropil)fosfo-  
nodiamida racémica se prepara de la siguiente forma:

5                    A una mezcla de 3,25 g de N,N'-dibenzoil-  
cis-propenilfosfonodiamida en 15 ml de metanol se añaden  
0,06 g de dihidrato de wolframato sódico y la mezcla se  
calienta a 55°C. Después se añaden lentamente, a lo lar-  
go de 15 minutos, 3 ml de peróxido de hidrógeno al 30 %  
y la mezcla resultante se agita durante 1 hora a 55°C.  
El peróxido de hidrógeno se agrega durante este tiempo  
10        en la medida necesaria para mantener un ensayo positivo  
con yoduro de almidón. Transcurrida 1 hora, se agrega  
solución acuosa saturada de sulfito sódico para descom-  
poner el peróxido residual, se filtra la mezcla y se  
evapora a sequedad a presión reducida para dar N,N'-di-  
benzoil-(+)(cis-1,2-epoxipropil)fosfonodiamida. Las sa-  
15        les inorgánicas se separan por extracción de la fosfono-  
diamida con metanol. Cuando se epoxidan la N,N-dietil-  
cis-propenilfosfonoamida y la N,N'-tetrametil-cis-prope-  
nilfosfonodiamida utilizando los mismos procedimientos,  
se obtienen respectivamente la N,N-dimetil-(cis-1,2-epo-  
20        xipropil)fosfonoamida racémica y la N,N,N',N'-tetrame-  
til-(cis-1,2-epoxipropil)fosfonodiamida racémica.

25                    El ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico  
y sus sales son agentes antimicrobianos útiles, que son  
activos en la inhibición del crecimiento de las bacterias



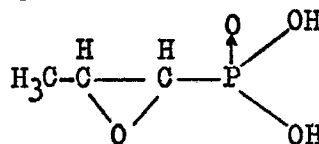
1 patógenas Gram-positivas y Gram-negativas. Este anti-  
biótico, y especialmente sus sales, son activos contra  
2 Bacillus, Escherichia, Staphylococci, Salmonella y  
3 Proteus patógenos y contra las variedades de los mis-  
4 mos resistentes a los antibióticos. Son ilustrativos  
5 de estos agentes patógenos los siguientes: Bacillus sub-  
6 tilis, Escherichia coli, Salmonella schottmuelleri, Sal-  
7 monella gallinarum, Salmonella pullorum, Proteus vul-  
8 garis, Proteus mirabilis, Proteus morgani, Staphylo-  
9 coccus aureus y Staphylococcus pyogenes. Así, el ácido  
10 (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico y sus sales pueden  
11 ser utilizados como agentes antisépticos para eliminar  
12 los organismos susceptibles del equipo farmacéutico,  
13 dental y médico y otras zonas sometidas a la infección  
14 por tales organismos. Análogamente, pueden ser utili-  
15 zados para separar ciertos microorganismos de las mez-  
16 clas de microorganismos. Las sales del ácido (-) (cis-  
17 1,2-epoxipropil)fosfónico son también útiles en el tra-  
18 tamiento de las enfermedades causadas por las infeccio-  
19 nes bacterianas en el hombre y en los animales y son  
20 especialmente valiosas en este aspecto, ya que son ac-  
21 tivas contra las variedades resistentes de agentes pa-  
22 tógenos. Estas sales son especialmente valiosas porque  
23 son eficaces cuando se administran por vía oral, aunque  
24 también pueden ser administradas parenteralmente.  
25



1            Como el antibiótico y sus sales son muy activos en  
 la inhibición del crecimiento de varias especies de Sal-  
monella puede ser utilizado como desinfectante en el lá-  
 vado de huevos y superficies sometidas a la infección  
 5            por Salmonella. Las sales de ácido (-) (cis-1,2-epoxi-  
 propil)fosfónico son también útiles como bactericidas en  
 varias aplicaciones industriales, por ejemplo, en la in-  
 hibición del desarrollo bacteriano indeseable en el agua  
 blanca de las fábricas de papel y en pinturas como pin-  
 10           tura de látex de acetato de polivinilo.

            Cuando el ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico  
 o sus sales se utilizan para combatir las bacterias en  
 el hombre o en los animales inferiores, pueden ser admi-  
 nistrados por vía oral en forma de dosis unidad como cáps-  
 15           ulas o tabletas o en solución o suspensión líquidas. Al-  
 ternativamente, el antibiótico puede ser administrado pa-  
 renteralmente por inyección. Estas formulaciones pueden  
 ser preparadas utilizando diluyentes, extendedores, agen-  
 tes de granulación, preservativos, aglutinantes, agentes  
 20           saborizantes y agentes de revestimiento adecuados, cono-  
 cidos por los expertos en la técnica.

            El ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico puede  
 ser representado por la fórmula:

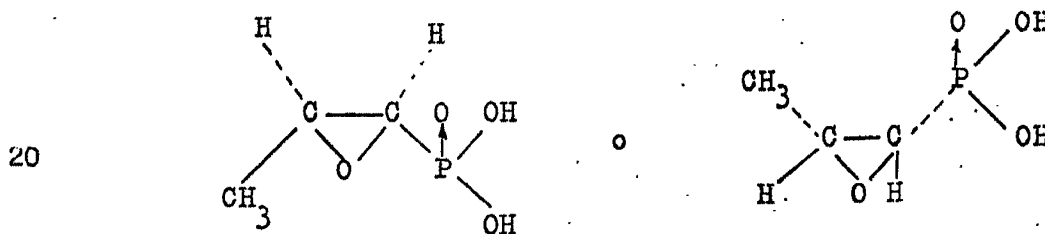


25



1            Esta sustancia es un compuesto ácido que se deno-  
 mina ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico de acuer-  
 do con la práctica actual de nomenclatura química; el  
 símbolo (-) indica que este ácido fosfónico hace girar  
 5            a la luz polarizada en un plano en dirección contraria  
 a la de las agujas del reloj (a la izquierda del observa-  
 dor) cuando se mide la rotación de su sal disódica en  
 agua (concentración, 5 %) a 405 m $\mu$ . La designación cis  
 10           utilizada en la descripción del compuesto de ácido 1,2-  
 epoxipropilfosfónico significa que los átomos de hidró-  
 geno unidos a los átomos de carbono 1 y 2 del ácido pro-  
 pilfosfónico se encuentran en el mismo lado del anillo  
 de óxido.

15           La fórmula estructural de esta sustancia antibió-  
 tica se ha presentado en forma plana por comodidad. No  
 obstante, el antibiótico también puede ser descrito es-  
 pacialmente de la siguiente forma:

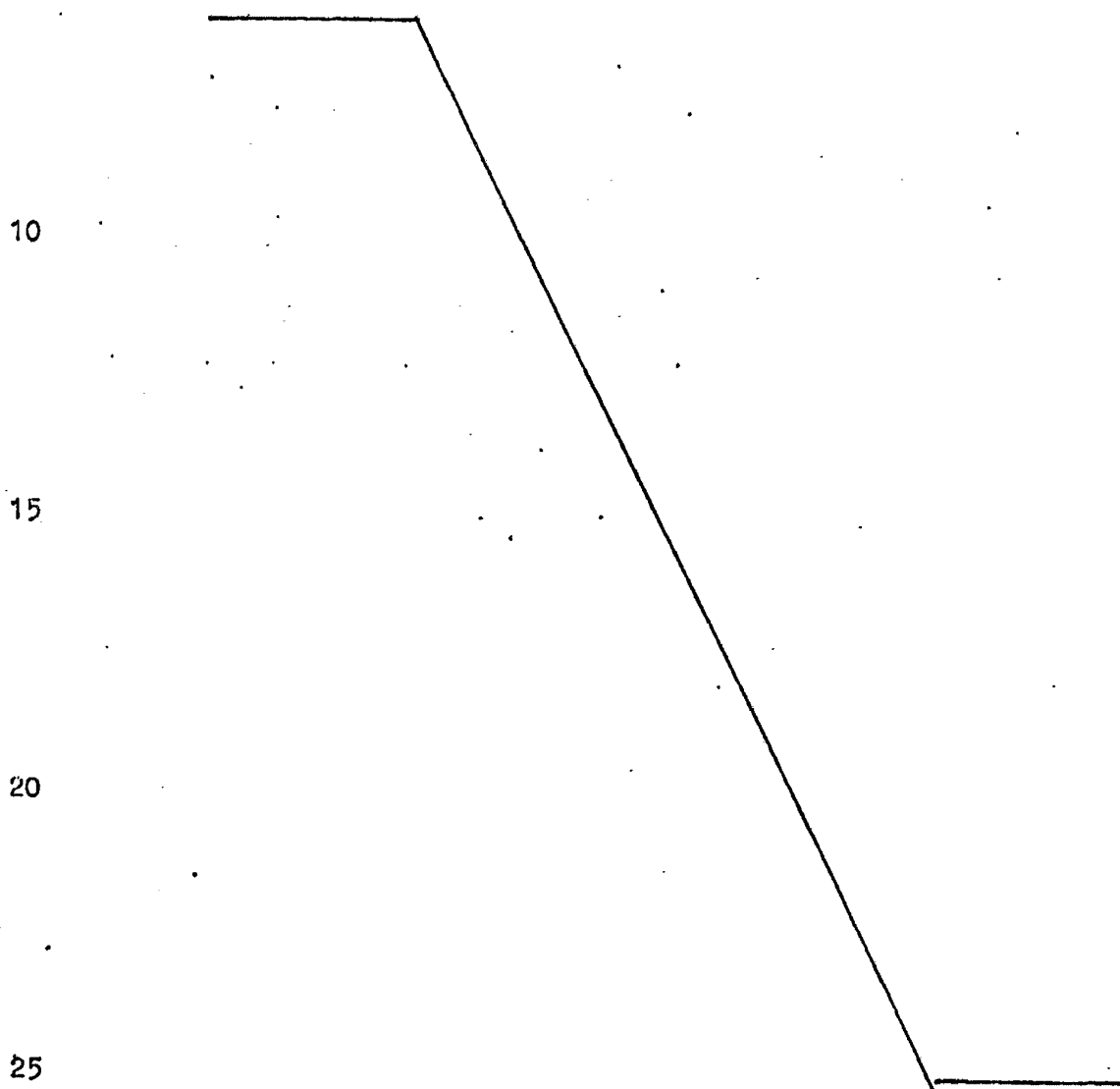


25           El enantiómero dextrógiro del ácido (cis-1,2-epo-  
 xipropil)fosfónico puede ser convertido en el ácido cis-  
 propenilfosfónico calentando con tiocianato potásico en

22 DIC.



1 metanol acuoso. El ácido cis-propenilfosfónico así ob-  
tenido puede ser utilizado como material de partida en  
los procedimientos aquí descritos para producir el enan-  
tíomero levógiro del ácido (cis-1,2-epoxipropil)fosfó-  
5 nico.





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

REIVINDICACIONES

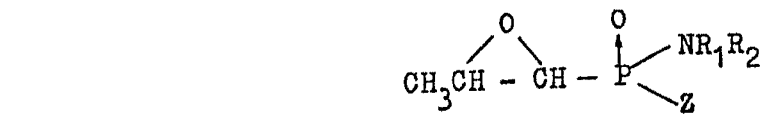
1. Un procedimiento para la preparación de ácido  
5 (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico que consiste en someter  
una mezcla enantiomérica de ésteres o amidas de ácido (cis-  
1,2-epoxipropil) fosfónico a la acción de un enzima produ-  
cido cultivando un microorganismo capaz de hidrolizar se-  
lectivamente un éster o amida del isómero (-) a ácido (-)  
10 (cis-1,2-epoxipropil) fosfónico y separar y recuperar dicho  
ácido en forma de una sal del mismo.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en  
el que el éster es un monoéster de fórmula



o sus sales, donde R es un grupo alquilo inferior de 1 a  
7 átomos de carbono, un grupo alquenilo inferior de 2 a 7  
átomos de carbono o un grupo alquinilo inferior de 2 a 7  
átomos de carbono.

20 3. Un procedimiento según la reivindicación 1, en  
el que la amida responde a la fórmula





donde Z es  $-NR_1R_2$  u OH,  $R_1$  y  $R_2$  representan un grupo hidrocarbilo, un grupo hidrocarbilo sustituido o hidrógeno y pueden ser iguales o diferentes.

5 4. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el microorganismo es un miembro del grupo Fungi imperfecti de microorganismos.

5. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el microorganismo es un Penicillium.

10 6. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el microorganismo es un Aspergillus.

7. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el microorganismo es un Actinomycetes.

15 8. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE ACIDO (-) (CIS-1,2-EPOXIPROPIL) FOSFONICO.

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

20

Madrid 22 de diciembre de 1969

BERNARDO UNGRIA  
P.P.

25

374798