

377580

16



COMO DIVISIONAL DE LA PATENTE DE INVENCION No. 359.544

377580

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I.P.C.
CL. 607 A61
SUB. f k

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

Solicitante: MERCK & CO., INC.

Domicilio: 126 East Lincoln Avenue, RAHWAY, New Jersey,
Estados Unidos

Enunciado: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE DERI-
VADOS DE ACIDO (CIS-1,2-EPOXIPROPIL)FOSFONICO"

Prioridad: De las solicitudes de patentes estadounidenses
No. 758.149 del 6 de Septiembre de 1968; y
No. 760.684 del 18 de Septiembre de 1968

- 1 -

RK.

377580



16 MAR 1970

1

RESUMEN DE LA MEMORIA

5

Las amidas de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico se preparan convirtiendo el ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico o una sal del mismo en un haluro de ácido y haciendo reaccionar este último con una amina. Las nuevas amidas de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico son agentes antibacterianos activos.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

10

15

20

Aunque son conocidos 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 a un antibiótico particular, éste resulta inactivo contra tales variedades resistentes. Debido a este desarrollo de resistencia contra los antibióticos conocidos, prosiguen las investigaciones en un esfuerzo para descubrir nuevos agentes antibacterianos que sean activos contra una amplia variedad de agentes patógenos y en particular contra las variedades de agentes patógenos que son resistentes a los antibióticos conocidos.

DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

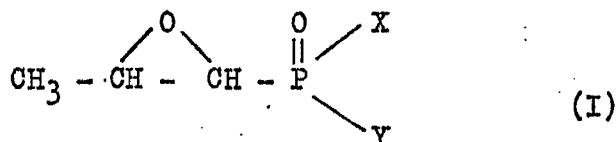
25

Este invento se refiere a compuestos que poseen una notable actividad antibacteriana y a los procedimientos para su preparación. Los compuestos que constituyen el

377580



1 objeto de este invento son nuevas amidas de ácido (-)
 (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico. Estos nuevos derivados
 pueden ser representados por la siguiente fórmula:



10 donde X es -OH, -NR₁R₂ o halógeno e Y es -OH, -NR₁R₂ o
 halógeno, en los que R₁ y R₂ son hidrógeno o un radical
 hidrocarbilo, o bien -NR₁R₂ representa el resto de una
 amina cíclica primaria o secundaria, como por ejemplo
 morfolina, piperidina o pirrolidina, así como las dia-
 minas cíclicas vecinales como fenilendiamina y fenilen-
 diaminas sustituidas, con la condición de que por lo me-
 nos uno de los radicales X o Y sea -NR₁R₂.

15 Cuando R₁ y/o R₂ en la Fórmula I representa un ra-
 dical hidrocarbilo, este radical puede ser alifático,
 cicloalifático, arilalifático, aromático o heterocíclico
 que, si se desea, puede estar sustituido. Así, por ejem-
 plo, puede ser alifático, como alquilo, alquenilo, o al-
 quinilo con o sin sustituyentes, de los que son ejemplos
 20 representativos los radicales alquilo como metilo, propi-
 lo, isopropilo, terc-butilo, hexilo, octilo, decilo,
 dodecilo; haloalquilo como cloroetilo, fluorpropilo,
 bromoetilo y dicloroetilo; acilamidoalquilo como acetil-
 aminometilo y benzoilaminometilo; aciloxialquilo como

25



1 acetoximetilo, pivaloximetilo, propionoxietilo y bencil-
oxietilo; hidroxipropilo, piperidinometilo, aminometi-
lo, aminoetilo, alquilaminoalquilo, como dimetilamino-
5 metilo y dietilaminopropilo, carboalcoximetilo, ciano-
etilo, sulfonamidoetilo, ftalimidometilo y metoximetilo;
alquenilo como alilo, metililo, vinilpropenilo, hexeni-
lo, octadienilo; alquinilo como propargilo, etinilo,
o cloroetinilo; cicloalquilo como ciclohexilo, ciclo-
hexenilo o ciclopropilo. Cuando R_1 y/o R_2 son alifáticos,
10 preferiblemente contienen de 1 a 6 átomos de carbono,
es decir, es alquilo o alquenilo inferior con o sin sus-
tituyentes.

Son ejemplos de R_1 y/o R_2 representando un radical
arilalifático aquellos casos en que es aralquilo como
15 bencilo, fenetilo, fenilpropilo, p-halobencilo y o-, m-
o p-alcoxibencilo, nitrobencilo, aminofenetilo, piridil-
etilo, furilmetilo, tienilpropilo y similares.

R_1 y/o R_2 también pueden representar un radical ari-
lo como fenilo, naftilo, o fenilo sustituido, por ejem-
20 plo p-clorofenilo, o-nitrofenilo, o,p-dihalofenilo, cian-
nofenilo, metoxifenilo, aminofenilo y tolilo y preferi-
blemente un resto aromático de un solo núcleo como piri-
dilo, furilo, tienilo, tiazolilo o pirazinilo o alter-
nativamente puede representar un heteroanillo hidrogenado
25 de los que son ejemplos el tetrahidrofurilo y el piper-

377580



1 zinilo.

5 Los compuestos de Fórmula I que son ácidos, es decir, los ácidos libres, pueden formar sales y estas sales constituyen un aspecto preferido del invento porque son más estables que el ácido libre. Como observarán los expertos en la técnica, los compuestos de Fórmula I en los que por lo menos uno de los radicales X o Y es -OH, formarán sales orgánicas e inorgánicas y ambas están consideradas en este invento. Son ejemplos de tales sales las sales metálicas inorgánicas como las de sodio, aluminio, potasio, amonio, calcio, magnesio, plata y hierro. Las sales orgánicas que pueden mencionarse como representativas son las sales con aminas primarias, secundarias o terciarias, como monoalquilaminas, dialquilaminas, trialquilaminas y aminas heterocíclicas nitrogenadas. Son ejemplos representativos las sales con aminas como α -fenetilamina, dietilamina, quinina, brucina, lisina, protamina, arginina, procaína, etanolamina, morfina, bencilamina, etilendiamina, N,N'-dibenciletilendiamina, dietanolamina, piperazina, dimetilaminoetanol, 2-amino-2-metil-1-propanol, teofilina, ésteres de aminoácidos y N-metilglucamina. Si se desea, la porción básica de la sal puede ser una amina biológicamente activa como eritromicina, oleandomicina o novobiocina.

15
20
25 Algunos ejemplos representativos de los compuestos

377580



1970

1

de Fórmula I y de sus sales que pueden ser preparados por los procedimientos aquí descritos son los siguientes:

5

(1) Diamidas fosfónicas, amidas y sales amónicas

ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)dimorfolinofosfinoso,

ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)dipirrolidinofosfinoso,

sal de morfolina de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)-
morfolinofosfínico;

10

sal de pirrolidina de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)-
pirrolidinofosfínico;

(2) Haluros fosfonoamídicos

cloruro N,N-dimetil-(-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfono-
amídico,

15

cloruro N,N-dietil-(-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfono-
amídico.

20

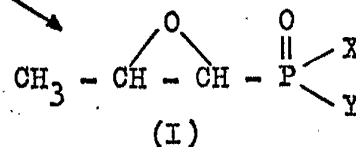
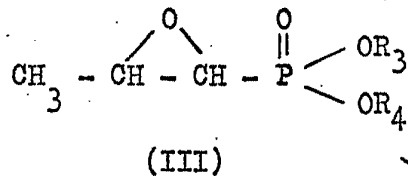
Los fosfonoamidatos es decir, aquellos compuestos en los que uno de los radicales X o Y es $-NR_1R_2$, pueden ser preparados a partir de ácido (-)(cis-1,2-epoxipropil)-fosfónico y de sus sales mediante una serie de reacciones que se discuten más adelante con más detalle. La reacción global puede ser descrita esquemáticamente como sigue:

25

377580



16



10

donde X e Y son los definidos anteriormente; R₃ y R₄ son hidrógeno, un metal como sodio, potasio, calcio, magnesio, aluminio, plata, cobalto y hierro; un ión amonio o un ión amonio sustituido como fenetilamonio, bencilamonio, tetraamonio y dietilamonio.

15

Los fosfonoamidatos pueden ser preparados convirtiendo un compuesto de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)-fosfónico en su haluro de ácido y después haciendo reaccionar este último con una amina primaria o secundaria. Como ejemplo de tales aminas citaremos las siguientes: dimetilamina, morfolina, dimetiletildiamina, ciclohexilamina, dimetilpropilendiamina, bencilamina, hexametildiamina, difenilamina, fenilamina y similares. También se consideran las aminas sustituidas como clorofenilamina, aminoetilbenceno, β-etoxietilmorfolina, dietoxietilamina, p-metoxibencilamina, p-nitrodifenilamina, fenetilamina y similares.

25

Los compuestos de Fórmula I en los que X es -OH

377580



1 se preparan haciendo reaccionar un éster de fosfonoami-
dato con un equivalente aproximadamente de álcali, como
hidróxido sódico. La sal sódica así formada puede ser
5 convertida después en el ácido libre por técnicas cono-
cidas. El éster ha sido preparado previamente haciendo
reaccionar primero el compuesto de ácido fosfónico con
una sal de un metal pesado como nitrato de plata o ni-
trato de oro. A continuación se hace reaccionar la disal
10 metálica con un haluro de alquilo como yoduro de metilo
o de etilo, para formar un diéster. El diéster se hidro-
liza parcialmente tratándolo con álcali, como hidróxido
sódico, para formar un semiéster semisal, como por ejem-
plo la sal sódica de (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonato
de metilo y el semiéster semisal se convierte en el mono-
15 éster de haluro de ácido por reacción con cloruro de
tionilo, por ejemplo. A continuación el monoéster de
haluro de ácido se hace reaccionar con una amina como
dimetilamina, para formar los compuestos en los que X
en la Fórmula I es -OR, donde R es un radical hidrocar-
20 buro e Y es $-NR_1R_2$.

Cuando X en la Fórmula I es halógeno, pueden pre-
pararse los haluros fosfonoamídicos convirtiendo la sal
de fosfonoamidato, donde X es -OH, en su haluro de áci-
do por reacción con un agente halogenante como, por
25 ejemplo, cloruro de tionilo.

377580



1 El ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico y
sus sales que son los materiales de partida en la pre-
paración de los nuevos fosfonoamidatos puede obtenerse
por fermentación aerobia de medios nutritivos acuosos
5 adecuados, en condiciones controladas, por ciertas
variedades del género Streptomyces como Streptomyces
fradiae (MA-2915, NRRL-3417), Streptomyces viridochro-
mogenes (MA-2903, NRRL-3413) y Streptomyces wedmorensis
(MA-3269, ATCC-21239). La fermentación se lleva a cabo
10 a temperaturas comprendidas entre 25° y 38°C aproxima-
damente. El pH de los medios nutritivos adecuados para
cultivar el Streptomyces y producir el compuesto de
ácido fosfónico puede variar entre 5,5 y 7,5 aproxima-
damente. El ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico
15 puede ser aislado a continuación del caldo de fermenta-
ción por adsorción en alúmina lavada con base o con
ácido. El material adsorbido puede ser eluido de la
alúmina con solución acuosa o hidroalcohólica de hidró-
xido amónico a un pH de 11,2 aproximadamente, recogiendo
20 el eluato fraccionadamente. De esta forma se obtiene
la sal amónica. Otras sales pueden obtenerse pasando
una solución de la sal amónica por una resina cambiada-
ra de catión apropiada o mediante otras técnicas cono-
cidas.

25 Las (-) (cis-1,2-epoxipropil)amidas son eficaces

377580



16

MAR

1971

1 en la inhibición del crecimiento de varios microorga-
nismos. En especial los fosfonoamidatos inhiben el cre-
cimiento de microorganismos tales como Proteus vulgaris
5 y Salmonella schottmuelleri. Los antibióticos pueden
ser utilizados como desinfectantes en el lavado de hue-
vos y de las zonas sometidas a la infección por Salmo-
nella. Los amidatos y sus sales son también útiles como
bactericidas en diversas aplicaciones industriales, por
ejemplo en la inhibición del crecimiento indeseable de
10 bacterias en el agua blanca de las fábricas de papel
y en las pinturas como la pintura de látex de acetato
de polivinilo.

Las (-) (cis-1,2-epoxipropil)amidas son también
útiles en el tratamiento de las enfermedades causadas
15 por las infecciones bacterianas en los animales.

Los nuevos derivados de ácido (-) (cis-1,2-epoxi-
propil)fosfónico pueden ser administrados solos o en
combinación con otros ingredientes biológicamente acti-
vos, especialmente con otros agentes antibacterianos
20 como penicilina, estreptomycinina y novobiocina.

El siguiente ejemplo se da con fines ilustrativos
pero no limitativos:

25

377580



EJEMPLO 1

P-(-) (cis-1,2-epoxipropil)-N,N-dimetilfosfonoamidato
sódico

Se colocan 62 g de (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfo-
nato de fenetilamonio en 390 ml de agua conteniendo
18,8 g (1 equivalente) de bicarbonato sódico. A la so-
lución resultante se añade gota a gota, con agitación,
una solución acuosa de 76,16 g (2 equivalentes) de ni-
trato de plata; una vez completada la adición, la mez-
cla resultante se continúa agitando durante 30 minutos
a la temperatura ambiente. Después se filtra la mezcla
y se lava bien con agua, acetona y éter. La disal de
plata que se obtiene (74 g) se suspende después en 500 ml
de dimetoxietano y se añaden a la suspensión 64 g (2 equi-
valentes) de yoduro de metilo. La mezcla se continúa agi-
tando durante la noche a 50-60°C, después de lo cual
se filtra y el filtrado se evapora a sequedad. El resi-
duo que contiene el éster dimetílico (32 g) se cromato-
grafía después sobre 90 g de gel de sílice en cloro-
formo. El éster dimetílico obtenido del cromatograma (18 g)
se disuelve en 50 ml de agua y se añaden lentamente a
esta solución, con agitación, 0,9 equivalentes de hi-
dróxido sódico 2,6 N. Se agita la mezcla de reacción
durante la noche y después se evapora a sequedad. El

377580

840972



16

1 residuo contiene 15,7 g de semiéster semisal y 1,3 g de
diéster. El semiéster semisal (3 g) se suspende en
100 ml de benceno con agitación y la suspensión se en-
fría en un baño de hielo. Se añade el equivalente de
5 cloruro de tionilo más un exceso del 10 % a la suspen-
sión y la mezcla se agita a la temperatura ambiente du-
rante 1 hora después de completada la adición. A conti-
nuación la mezcla se enfría en un baño de hielo y se ha-
ce burbujear a través de la misma un gran exceso de di-
10 metilamina. Se prosiguen la agitación y el enfriamiento
durante media hora después de completada la adición y
durante media hora a la temperatura ambiente. Después se
filtra la mezcla y el filtrado se evapora a sequedad. El
aceite de color amarillo claro (12 g) que se obtiene por
15 evaporación del filtrado se cromatografía sobre 360 g
de gel de sílice en cloroformo. Se combinan las fraccio-
nes 7 a 14 (2,2 g) y, por destilación en tubo, se obtie-
nen 2 g de un aceite amarillo claro que contiene la semi-
amida semiéster. A continuación se disuelve 1 g de la
20 semiamida semiéster en 25 ml de agua y se añaden 0,95
equivalentes de hidróxido sódico 2,6 N. Después la so-
lución se agita durante toda la noche a la temperatura
ambiente. Por liofilización de la solución, se obtienen
600 mg de P-(-)(cis-1,2-epoxipropil)-N,N-dimetilfosfono-
25 amidato y se caracteriza por RMN.

377580



1 Cuando en el procedimiento anterior se emplean
 dietilamina, dibutilamina, y difenilamina en lugar de
 dimetilamina, se obtienen respectivamente P-(-)(cis-
 1,2-epoxipropil)-N,N-dietilfosfonoamidato sódico,
 5 P-(-)(cis-1,2-epoxipropil)-N,N-dibutilfosfonoamidato
 sódico y P-(-)(cis-1,2-epoxipropil)-N,N-difenilfosfono-
 amidato sódico.

10 A continuación ilustramos un método de prepara-
 ción de los compuestos de ácido (-) (cis-1,2-epoxipro-
 pil)fosfónico de partida.

A. Se emplea un cultivo liofilizado de Streptomy-
ces fradiae MA-2913 (ATCC 21099) para inocular 50 ml
 de medio estéril de la siguiente composición en un ma-
 traz Erlenmeyer de 250 ml provisto de tabiques:

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

* 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 esteri-
 lización.

25 El matraz inoculado se incuba a 28°C durante 24



1 horas en un sacudidor rotatorio. Se emplean 10 ml del
 caldo resultante para inocular un segundo matraz Erlen-
 meyer de 250 ml conteniendo 50 ml del mismo medio es-
 5 t ril. Después de una incubación de 24 horas a 28 C en
 un sacudidor rotatorio, el caldo de fermentación resul-
 tante se emplea para inocular un fermentador de 5 li-
 tros que contiene 3 litros de caldo nutritivo estéril
 de la siguiente composición:

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

El medio se ajusta a pH 6,5 antes de la esteri-
 lización.

El medio inoculado se incuba a continuación a
 28 C durante 4 días mientras se agita y airea el caldo
 20 de fermentación con 3 litros de aire por minuto, a a-
 di ndose para impedir la excesiva formación de espuma
 3 ml de un polímero de propilenglicol con un peso mole-
 cular de 2000 aproximadamente (vendido con el nombre co-
 mercial de Polyglycol P-2000 por la Dow Chemical Com-
 25 pany). El caldo de fermentación resultante tiene una



1 actividad de 5,9 unidades/ml determinada por el ensayo
normalizado empleando Proteus vulgaris.

5 Una segunda fermentación empleando este mismo
procedimiento da un caldo con una actividad de 6,7 uni-
dades/ml.

10 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
ensaya frente al Proteus vulgaris empleando el procedi-
miento de ensayo modificado.

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

20 B. Se diluyen con agua hasta 50 ml, 10 ml de la
solución acuosa de la sal amónica de ácido (-)(cis-1,2-
epoxipropil)fosfónico conteniendo 200 mg de sólidos y la
solución resultante se pasa a través de una columna de
25 200 ml (volumen sedimentado) de resina cambiadora de

377580



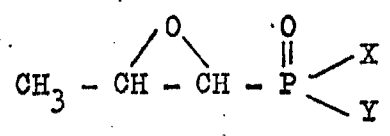
1 cación (Dowex 50) en el ciclo de (+) α -fenetilamonio.
Después de recoger el eluato inicial, la columna se en-
juaga con 200 ml de agua y el eluato total recogido se
evapora a vacío hasta un volumen de 100 ml. El pH del
5 concentrado se ajusta a 5,0 mediante la cuidadosa adic-
ción de pequeñas porciones de resina Dowex 50 en el ci-
clo ácido y la solución ácida se filtra y se evapora a
sequedad en vacío a la temperatura ambiente. El residuo
se recoge en 100 ml de metanol y la solución metanólica
10 se filtra para separar las sales inorgánicas. Se concen-
tra el precipitado hasta volumen reducido, se añaden
100 ml de isopropanol y se repite la evaporación hasta
que se forman cristales. La suspensión cristalina se re-
frigera durante unas 16 horas y el producto cristalino,
15 sal de mono-(+) α -fenetilamonio de ácido (-)(cis-1,2-
epoxipropil)fosfónico, se recoge por filtración.

Debe entenderse que aunque este invento ha sido
descrito haciendo referencia a las realizaciones parti-
culares del mismo, pueden introducirse cambios y modi-
20 ficaciones que se encuentran dentro de su alcance y so-
lo estará limitado por las reivindicaciones del apéndice.



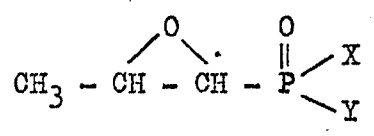
REIVINDICACIONES

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



donde X es -OH, -NR₁R₂ o halógeno; e Y es -OH, -NR₁R₂ o halógeno donde

R₁ y R₂ son hidrógeno o un radical hidrocarbilo o bien -NR₁R₂ es un resto de una amina cíclica primaria o secundaria y las sales del mismo cuando uno de los radicales X e Y es -OH, con la condición de que por lo menos uno de los radicales X o Y sea -NR₁R₂, cuyo procedimiento consiste en hacer reaccionar con una amina primaria o secundaria un compuesto de fórmula

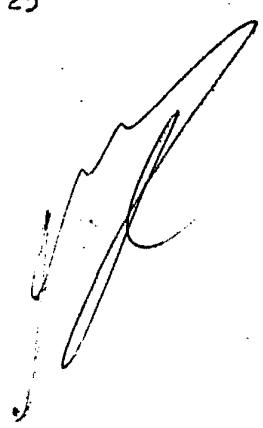


donde X e Y son halógeno u -OH, con la condición de que por lo menos uno de los radicales X o Y sea halógeno.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto obtenido es una sal cuando X es -OH y el catión es un metal alcalino.

3. Un procedimiento según la reivindicación 1,

377580



SECRET

21



NUMERO 377.580

1

en el que el compuesto obtenido es una sal amínica cuando X es -OH.

5

4. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que X es -OH e Y es $-NR_1R_2$.

10

5. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto obtenido es P-(-)(cis-1,2-epoxipropil)-N,N-dimetilfosfonamidato sódico.

15

6. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto obtenido es una sal morfolina del ácido (-)(cis-1,2-epoxipropil)morfolinofosfónico.

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

20

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria descriptiva, que consta de dieciocho páginas mecanografiadas.

Madrid, 16 de marzo de 1970.

BERNARDO UNGRIA

P. B.

377580

25