

377581



CO7 F 7/44 (07 D 105/02 A 61 K 27/00 CO7 F 9/38

| |
|------------------------|
| SECCION PATENTARIA |
| CLASIFICACION C. I. C. |
| CLASE: C 07 A 61 |
| SUBCLASE: F H |

No. 377.581

COMO DIVISIONAL DE LA PATENTE DE INVENCION No. 359.544

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
AGENTES ANTIBACTERIANOS, PARTICULARMENTE
NUEVAS AMIDAS DE ACIDO (-) (CIS-1,2-EPOXI-
PROPILO)FOSFONICO".

Prioridad: de la solicitud de patente estadounidense
Parcial : No. 758.149 del 6 de Septiembre de 1968.

377581

31 OCT



1
RESUMEN DE LA MEMORIA

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
5 ácido y haciendo reaccionar este último con una amina.
Las nuevas amidas de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fos-
fónico son agentes antibacterianos activos.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

10 Aunque son conocidos muchos antibióticos valio-
sos 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 desarro-
llan resistencia a un antibiótico particular, éste resul-
15 ta 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
20 y en particular contra las variedades de agentes patóge-
nos que son resistentes a los antibióticos conocidos.

DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

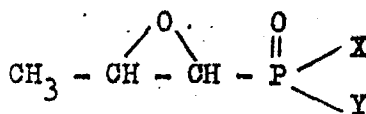
25 Este invento se refiere a compuestos que poseen
una notable actividad antibacteriana y a los procedimien-
tos para su preparación. Los compuestos que constituyen el

377581

31 OCT



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:



(I)

10 donde X es -OR, e Y es -NR₁R₂, en los que R es un radical alquilo y R₁ y R₂ son hidrógeno o un radical hidrocárbilo, o bien -NR₁R₂ representa el resto de una amina cíclica primaria o secundaria, como por ejemplo morfolina, piperidina o pirrolidina.

15 Cuando R en la Fórmula I representa un radical alquilo puede ser metilo, propilo, isopropilo, terc-butilo, hexilo, octilo, decilo, dodecilo. Preferiblemente R contiene de 1 a 6 átomos de carbono, es decir, es alquilo inferior.

20 Cuando R₁ y/o R₂ en la Fórmula I representan un radical hidrocárbilo, este radical puede ser alifático, cicloalifático, arilalifático, aromático o heterocíclico que, si se desea, puede estar sustituido. Así, por ejemplo, puede ser alifático, como alquilo, alqueno o alquino con o sin sustituyentes, de los que son ejemplos representativos los radicales alquilo como metilo, propilo, isopropilo, terc-butilo, hexilo, octilo, decilo,
25 dodecilo; halcalquilo como cloroetilo, fluorpropilo,

377581



1 bromoetilo y dicloroetilo; acilamidoalquilo como acetyl-
aminometilo y benzoilaminometilo; aciloxialquilo como
acetoximetilo, pivaloximetilo, propionoxietilo y ben-
ciloxi-
5 etilo; hidroxipropilo, piperidinometilo, aminome-
tilo, aminoetilo, alquilaminoalquilo como dimetilamino-
metilo y dietilaminopropilo, carboalcoximetilo, ciano-
etilo, sulfonamidoetilo, ftalimidometilo y metoximetilo;
alquenilo como alilo, metalilo, vinilpropenilo, hexeni-
10 lo, octadienilo; alquinilo como propargilo, etinilo o
cloroetinilo; cicloalquilo como ciclohexilo, ciclohexe-
nilo o ciclopropilo. Cuando R_1 y/o R_2 es alifático, pre-
feriblemente contiene de 1 a 6 átomos de carbono, es
decir, es alquilo o alquenilo inferior con o sin susti-
tuyentes.

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

R_1 y/o R_2 también pueden representar un radical
arilo como fenilo, naftilo, o fenilo sustituido, por
ejemplo, p-clorofenilo, o-nitrofenilo, o,p-dinalofenilo,
cianofenilo, metoxifenilo, aminofenilo y tolilo y prefe-
25 riblemente un resto aromático de un solo núcleo como

377581



1 piridilo, furilo, tienilo, tiazolilo, o pirazinilo o al-
ternativamente puede representar un heteroanillo hidroge-
nado de los que son ejemplos el tetrahidrofurilo y el
piperazinilo.

5 Un ejemplo representativo de los compuestos
de Fórmula I que pueden ser preparados por el procedi-
miento del invento es
P-(-)(cis-1,2-epoxipropil)-N,N-difenilfosfonoamidato de
etilo.

10 Los compuestos de Fórmula I se preparan hacien-
do reaccionar primero el compuesto de ácido fosfónico
con una sal de un metal pesado como nitrato de plata o
nitrato de oro. A continuación se hace reaccionar la
disal metálica con un haluro de alquilo como yoduro de
15 metilo o de etilo, para formar un diéster. El diéster
se hidroliza parcialmente tratándolo con álcali, como
hidróxido sódico, para formar un semiéster semisal, como
por ejemplo la sal sódica de (-) (cis-1,2-epoxipropil)-
fosfonato de metilo y el semiéster semisal se convierte
20 en el monoéster de haluro de ácido por reacción con clo-
ruro de tionilo, por ejemplo. A continuación el mono-
éster de haluro de ácido se hace reaccionar con una amina
como dimetilamina, para formar los compuestos en los
25 que X en la Fórmula I es -OR, donde R es un radical

377581



31

1
5
10
15
20
25

hidrocarburo e Y es $-NR_1R_2$.

El ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico y sus sales que son los materiales de partida en la preparación de los nuevos fosfonoamidatos puede obtenerse por fermentación aerobia de medios nutritivos acuosos adecuados, en condiciones controladas, por ciertas variedades del género Streptomyces como Streptomyces fradiae (MA-2915, NRRL-3417), Streptomyces viridochromogenes (MA-2903, NRRL-3413) y Streptomyces wedmorensis (MA-3269, ATCC-21239). La fermentación se lleva a cabo a temperaturas comprendidas entre 25° y 38° C aproximadamente. 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 aproximadamente. El ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico puede ser aislado a continuación del caldo de fermentación 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 hidróxido amónico a un pH de 11,2 aproximadamente, recogiendo 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 cambiadora de catión apropiada o mediante otras técnicas conocidas.

Las (-) (cis-1,2-epoxipropil)amidas son efica-

377581



1 ces en la inhibición del crecimiento de varios micro-
organismos. En especial los fosfonoamidatos inhiben el
crecimiento de microorganismos tales como Proteus vul-
5 garis y Salmonella schottmuelleri. Los antibióticos
pueden ser utilizados como desinfectantes en el lavado
de huevos y de las zonas sometidas a la infección por
Salmonella. Los amidatos son también útiles como bacte-
ricidas en diversas aplicaciones industriales, por ejem-
plo en la inhibición del crecimiento indeseable de bac-
10 terias en el agua blanca de las fábricas de papel y en
las pinturas como la pintura de látex de acetato de poli-
vinilo.

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-epo-
xipropil)fosfónico pueden ser administrados solos o en
combinación con otros ingredientes biológicamente acti-
vos, especialmente con otros agentes antibacterianos co-
mo penicilina, estreptomycinina y novobiocina.
20

Los siguientes ejemplos se dan con fines ilus-
trativos pero no limitativos:

EJEMPLO 1

25 P-(-) (Cis-1,2-epoxipropil)-N,N-dimetilfosfonoamidato
de metilo

377581



1

pensión 1 equivalente de cloruro de tionilo más un 10 % de exceso y la mezcla se continúa agitando a la temperatura ambiente durante 1 hora después de completada la adición. A continuación la mezcla se enfría en un baño de hielo y se burbujea a través de la misma un gran exceso de dimetilamina. Se prosiguen la agitación y el enfriamiento durante media hora después de completada la adición y durante otra 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 evaporación del filtrado se cromatografía sobre 360 g de gel de sílice en cloroformo. Se combinan las fracciones 7 a 14 (2,2 g) y, por destilación en tubo, se obtiene P-(-) (cis-1,2-epoxipropil)-N,N-dimetilfosfonamidato de metilo en forma de aceite amarillo claro que se caracteriza por RMN.

5

10

15

A continuación ilustramos un método de preparación de los compuestos de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico de partida.

20

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

25

Harina de avena molida

Gramos/litro

10

377581



| | | |
|---|--------------------------------------|----------|
| 1 | Hidrolizado de levadura | 10 |
| | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,05 |
| | Tampón de fosfato* | 2 ml |
| | Agua c.s. | el resto |

5 * 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 esterilización.

10 El matraz inoculado se incuba a 28°C durante 24 horas en un sacudidor rotatorio. Se emplean 10 ml del caldo resultante para inocular un segundo matraz Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml del mismo medio estéril. Después de una incubación de 24 horas a 28°C en un sacudidor rotatorio, el caldo de fermentación resultante se emplea para inocular un fermentador de 5 litros que contiene 3 litros de caldo nutritivo estéril de la siguiente composición:

| | <u>Gramos/litro</u> | |
|----|------------------------|----------|
| 20 | Harina de avena molida | 30 |
| | Solubles de destilería | 10 |
| | Harina de soja | 25 |
| | Citrato sódico | 4 |
| | Ascorbato sódico | 0,5 |
| 25 | Agua c.s. | El resto |

377581



1

El medio se ajusta a pH 6,5 antes de la esterilización.

5

10

El medio inoculado se incuba a continuación a 28°C durante 4 días mientras se agita y airea el caldo de fermentación con 3 litros de aire por minuto, añadiéndose para impedir la excesiva formación de espuma 3 ml de un polímero de propilenglicol con un peso molecular de 2000 aproximadamente (vendido con el nombre comercial de Polyglycol P-2000 por la Dow Chemical Company). El caldo de fermentación resultante tiene una actividad de 5,9 unidades/ml determinada por el ensayo normalizado empleando Proteus vulgaris.

15

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

20

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 procedimiento de ensayo modificado.

25

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

377581



1 se lava y se eluye con amoniacaco acuoso a un pH de 11,2.
Se evapora el eluato para eliminar el amoniacaco y se encuentra que da una zona de inhibición de 25 mm a una dilución de 0,125 mg/ml por el procedimiento de ensayo modificado.

5 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
10 200 ml (volumen sedimentado) de resina cambiadora de cación (Dowex 50) en el ciclo de (+) α -fenetilamonio. Después de recoger el eluato inicial, la columna se enjuaga con 200 ml de agua y el eluato total recogido se evapora a vacío hasta un volumen de 100 ml. El pH del concentrado se ajusta a 5,0 mediante la cuidadosa adición de
15 pequeñas porciones de resina Dowex 50 en el ciclo 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 se filtra
20 para separar las sales inorgánicas. Se concentra 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 refrigera durante unas 16 horas y el producto cristalino, sal de
25 mono-(+) α -fenetilamonio de ácido (-) (cis-1,2-epoxipro-

377581



31 00

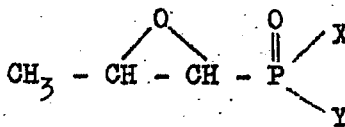
1 pil)fosfónico, se recoge por filtración.

Debe entenderse que aunque este invento ha sido descrito haciendo referencia a las realizaciones particulares del mismo, pueden introducirse cambios y modificaciones que se encuentran dentro de su alcance y solo estará limitado por las reivindicaciones del apéndice.

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

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de agentes antibacterianos, particularmente nuevas amidas de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico de fórmula:



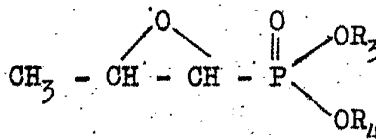
donde Y es $-\text{NR}_1\text{R}_2$ y X es $-\text{OR}$ donde

R es un radical alquilo inferior

R_1 y R_2 son iguales o diferentes y representan hidrógeno o un radical hidrocarbilo o bien $-\text{NR}_1\text{R}_2$

es un resto de una amina cíclica primaria o secundaria,

cuyo procedimiento consiste en hacer reaccionar un compuesto de fórmula



377581



31 OCT 1972

1 con una sal de un metal pesado, tratar la sal dimetálica
ca con un haluro de alquilo, hidrolizar el diéster de
ácido fosfónico formado a una sal de monoéster, hacer
reaccionar la sal de monoéster con un agente halogenante
5 te para formar un haluro de éster y tratar el haluro de
ácido del éster con una amina, donde R_3 y R_4 son hidrógeno,
un catión amonio o un catión metálico.

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1 en el que el agente de halogenación es cloruro
de tionilo y la amina es dimetilamina.
10

3. Un procedimiento según la Reivindicación 1 que adicionalmente comprende la hidrólisis de la
amida de éster para formar el amidato de ácido libre.

4. Un procedimiento según la Reivindicación 3, que adicionalmente comprende la reacción del amidato de ácido libre con un agente de halogenación para
15 formar un haloamidato.

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

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

377581

31 OCT



1

Madrid, 16 marzo 1.970

BERNARDO UNGRIA

P.P.

5

10

15

20

25