

377582



14 S

SECCION	
CLASIFICACION	
CLASE	07 061
SUBCLASE	E K

No 377.582

Como divisional de la solicitud de pa-
tente n^o. 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 NUEVO PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE
AGENTES ANTIBACTERIANOS, PARTICULARMENTE NUE-
VOS TIOATOS DE ACIDO (-) (CIS-1,2-EPOXIPRO-
PIL) FOSFONICO.

Prioridad: De las solicitudes de patentes estadouniden-
ses:
N^o 758.149 del 6 de Septiembre de 1.968; y
N^o 760.684 del 18 de Septiembre de 1.968.

MP.

377582



RESUMEN DE LA MEMORIA

1
5
Los tioatos de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico se preparan por reacción de un haluro de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico con un mercaptano. Los nuevos tioatos 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.

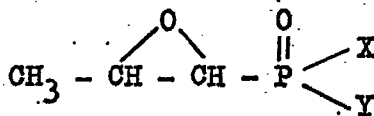
DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

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

377582



1 ser representados por la siguiente fórmula:

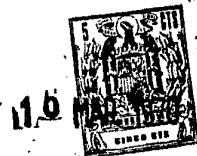


(I)

5 donde X es -OR o -SR, e Y es -SR o -NR₁R₂, en los que R es hidrógeno o un radical hidrocarbilo y 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.

10 Cuando R en la Fórmula I representa un radical hidrocarbilo, 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, alquenilo o alquinilo con o sin sustituyentes, de los que son ejemplos representativos los radicales alquilo como metilo, propilo, isopropilo, terc-butilo, hexilo, octilo, decilo, dodecilo; haloalquilo como cloroetilo, fluorpropilo, bromoetilo y dicloroetilo; acilamidoalquilo como acetilaminometilo y benzoilaminometilo; aciloxialquilo como acetoximetilo, pivaloximetilo, propionoxietilo y benciloxietilo; hidroxipropilo, piperidinometilo, aminometilo, aminoetilo, alquilaminoalquilo como dimetilaminometilo y dietilamino-

377582



1 propilo, carboalcoximetilo, cianoetilo, sulfonamidoeti-
lo, ftalimidometilo y metoximetilo; alquenilo como alilo,
metalilo, vinilpropenilo, hexenilo, octadienilo; alqui-
5 nilo como propargilo, etinilo o cloroetinilo; cicloalqui-
lo como ciclohexilo, ciclohexenilo o ciclopropilo. Cuando
R es alifático, preferiblemente contiene de 1 a 6 átomos
de carbono, es decir, es alquilo o alquenilo inferior con
o sin sustituyentes.

10 Son ejemplos de R representando un radical aril-
alifático aquellos casos en que es aralquilo como bencilo,
fenetilo, fenilpropilo, p-halobencilo y o-, m- o p-alcoxi-
bencilo, nitrobencilo, aminofenetilo, piridiletilo, furil-
metilo, tienilpropilo y similares.

15 R también puede representar un radical arilo como
fenilo, naftilo o fenilo sustituido, por ejemplo p-cloro-
fenilo, o-nitrofenilo, o,p-dihalofenilo, cianofenilo, meto-
xifenilo, aminofenilo, y tolilo y preferiblemente un resto
aromático de un solo núcleo como piridilo, furilo, tieni-
lo, tiazolilo o pirazinilo o alternativamente puede repre-
20 sentar un heterocanillo hidrogenado de los que son ejem-
plos el tetrahidrofurilo y el piperazinilo.

Cuando R_1 y/o R_2 representan un radical hidrocar-
bilo, son iguales a los descritos anteriormente para el
sustituyente R.

25 Algunos ejemplos representativos de los compues-



1 tos de Fórmula I y de sus sales que pueden ser prepara-
dos por los procedimientos aquí descritos son los si-
guientes:

(1) Fosfonoamidotioatos

5 N,N-dimetil-(-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonoamidotioato
de S-bencilo,

N,N-difenil-(-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonoamidotioato
de S-metilo,

10

(-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonoamidotioato de S-isopro-
pilo;

(2) Fosfonoditioatos

(-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonoditioato de dibencilo,

(-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonoditioato de dimetilo,

(-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonoditioato de dietilo,

15

(-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonoditioato de difenilo,

(-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonoditioato de dinitrofenilo,

(-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonoditioato de dicitclohexilo,

(-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonoditioato de di-terc-
butilo,

20

(-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonoditioato de di-p-metoxi-
fenilo.

25

Los fosfonotioatos y ditioatos, es decir, aque-
llos compuestos en los que uno de los radicales X e Y
o los dos son -SR, pueden ser preparados convirtiendo
un compuesto de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico

377582



1 en su haluro de ácido y después haciendo reaccionar el haluro de ácido con un mercaptano.

5 Cuando X e Y son ambos -SR, el compuesto de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico se convierte primero en el haluro de ácido por reacción con un agente halogenante. Como agente halogenante pueden emplearse reactivos tales como tricloruro de fósforo, pentacloruro de fósforo, cloruro de tionilo, fluoruro de tionilo o bromuro de tionilo. No obstante, se prefiere emplear reactivos como el cloruro de tionilo y el bromuro de tionilo para preparar los haluros de ácido ya que estos reactivos suelen dar mejores rendimientos del haluro de ácido.

10 El compuesto de ácido fosfónico puede emplearse en forma de ácido libre, pero se prefiere realizar la reacción con una sal del compuesto de ácido fosfónico tal como una sal amínica o metálica. Los disolventes adecuados para la reacción son los hidrocarburos como cloroformo, benceno y tolueno. La reacción puede llevarse a cabo convenientemente en disolventes amínicos como piridina,

15 trietilamina, tri-n-propilamina y similares. Cuando se emplea una amina como disolvente, sirve como disolvente del compuesto de ácido fosfónico y de la reacción de haluro de ácido así como de neutralizador para el hidrohhaluro formado. El producto de la reacción de halogenación es el dihaluro de ácido y después este último se ha-

20

25



1 ce reaccionar con un mercaptano, por ejemplo etilmercap-
tano, metilmercaptano o tiofenol, generalmente a las tem-
peraturas del baño de hielo, para formar un fosfonoditioa-
to. A continuación el fosfonoditioato se aisla por técni-
cas conocidas.

5 Cuando X en la Fórmula I es -OR e Y es -SR, el
fosfonotioato se prepara haciendo reaccionar primero el
compuesto de ácido fosfónico con una sal de un metal pe-
sado como nitrato de plata o nitrato de oro. La disal metá-
lica se hace reaccionar después con un haluro de alquilo,
10 como yoduro de metilo o de etilo, para formar un diéster.
El diéster es parcialmente hidrolizado tratándolo con un
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
15 se convierte en el monoéster de haluro de ácido por reac-
ción con cloruro de tionilo, por ejemplo. El monoéster
de haluro de ácido se hace reaccionar después con un mer-
captano, por ejemplo etilmercaptano, para formar los com-
puestos en los que X en la Fórmula I es -OR, donde R es
20 un radical hidrocarbilo.

25 El ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico y
sus sales que son los materiales de partida en la prepara-
ción de los nuevos tioatos puede obtenerse por fermenta-
ción aerobia de medios nutritivos acuosos adecuados, en

377582



16

1 condiciones controladas, por ciertas variedades del gé-
nero Streptomyces como Streptomyces fradiae (MA-2915,
NRRL-3417), Streptomyces viridochromogenes (MA-2903,
NRRL-3413) y Streptomyces wedmorensis (MA-3269, ATCC-
5 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 Strep-
tomyces y producir el compuesto de ácido fosfónico pue-
de variar entre 5,5 y 7,5 aproximadamente. El ácido (-)
10 (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico puede ser aislado a con-
tinuación del caldo de fermentación por adsorción en alú-
mina 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
15 aproximadamente, recogiendo el eluato fraccionadamente.
De esta forma se obtiene la sal amónica. Otras sales pue-
den obtenerse pasando una solución de la sal amónica por
una resina cambiadora de catión apropiada o mediante
otras técnicas conocidas.

20 Los tioatos son eficaces en la inhibición del
crecimiento de varios microorganismos.

Los tioatos son también útiles en el tratamien-
to de las enfermedades causadas por las infecciones bacte-
rianas en los animales.

25 Los nuevos derivados de ácido (-) (cis-1,2-epoxi-



1 propil)fosfónico pueden ser administrados solos o en combinación con otros ingredientes biológicamente activos, especialmente con otros agentes antibacterianos como penicilina, estreptomycinina y novobiocina.

5 Los siguientes ejemplos se dan con fines ilustrativos pero no limitativos:

EJEMPLO 1

N,N-dimetil-(-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonoamidotiato
de S-bencilo

10 Se disuelven 0,1 moles de cloruro N,N-dimetil-(cis-1,2-epoxipropil)-fosfonoamídico en 100 ml de benceno junto con 0,1 moles de trietilamina. La mezcla resultante se enfría a 5°C y se añaden 0,1 moles de bencilmercaptano a una velocidad suficiente para mantener la temperatura a 5-10°C. Una vez completada la adición, la mezcla se agita a la temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se separa por filtración el hidrocloreto de trietilamina precipitado y después de eliminar el disolvente se obtiene N,N-dimetil-(-) (cis-1,2-epoxipropil)-fosfonoamidotiato de S-bencilo.

20 Cuando en el procedimiento anterior se emplean etilmercaptano, tiofenol y metilmercaptano en lugar de bencilmercaptano, se obtienen respectivamente N,N-dimetil-(-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonoamidotiato de S-etilo, N,N-dimetil-(-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonoamido-

377582

16



1 ticoato de S-fenilo y N,N-dimetil-(cis-1,2-epoxipropil)-
fosfonamidoticoato de S-metilo.

EJEMPLO 2

5 (-)(Cis-1,2-epoxipropil)fosfonoditicoato de S,S'-di-
metilo

10 Se lavan bien con etanol 20 g de resina cambia-
dora de catión Dowex 50 (H⁺). A continuación la resina
se suspende en metanol y la suspensión se enfría a 0°C.
Se disuelven 2 g de sal de fenetilamina de ácido (-)(cis-
1,2-epoxipropil)fosfónico en 15-20 ml de metanol y la so-
lución resultante se enfría a 0°C. Se mezclan la solución
de sal y la suspensión de resina y se agitan fuertemente
durante 60 segundos, filtrando la mezcla sobre 20 ml de
metanol que contiene 2 equivalentes de piridina. Se aña-
15 dá exceso de piridina al filtrado y la solución se evapo-
ra casi hasta sequedad. Se repite la evaporación dos ve-
ces agregando piridina adicional cada vez. La solución
en piridina se enfría entonces a 0°C en un baño de hielo
y sobre esta solución se añaden con agitación 2 equivalen-
20 tes de cloruro de tionilo más un exceso del 10 %. Una vez
completada la adición, se retira el baño de hielo y la
solución se continúa agitando durante 1 hora a la tempe-
ratura ambiente. La solución del dicloruro de ácido se
transfiere después a un embudo de adición y se añade lenta-
25 mente sobre 2 equivalentes de metilmercaptano en 30 ml

377582



1 de benceno a las temperaturas del baño de hielo. Una vez
completada la adición, se retira el baño de hielo y la
mezcla se continúa agitando durante 1 hora a la tempera-
5 tura ambiente. A continuación se filtra la mezcla y el
filtrado se evapora a sequedad. Se añaden partes alícuo-
tas de tolueno y se evapora varias veces para eliminar
las trazas de piridina. El residuo resultante se tritura
con éter y, por evaporación del éter, se obtiene (-) (cis-
1,2-epoxipropil)fosfonoditioato de S,S'-dimetilo.

10 Cuando en el procedimiento anterior se emplean
tiofenol, bencilmercaptano y etilmercaptano en lugar de
metilmercaptano, se obtienen respectivamente (-) (cis-
1,2-epoxipropil)fosfonoditioato de S,S'-difenilo, (-)
15 (cis-1,2-epoxipropil)fosfonoditioato de S,S'-dibencilo
y (-)(cis-1,2-epoxipropil)fosfonoditioato de S,S'-dietilo.

EJEMPLO 3

S-Bencil-(-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonotioato de O-
metilo

20 Se colocan 62 g de (-) (cis-1,2-epoxipropil)fos-
fonato 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 (2 equivalentes) de nitrato
25 de plata. Una vez completada la adición, la mezcla resul-

377582



1 tante se continúa agitando durante 30 minutos a la tem-
peratura ambiente. A continuación se filtra la mezcla
y se lava bien con agua, acetona y éter. La disal de pla-
ta que se obtiene (74 g) se suspende después en 500 ml
5 de dimetoxietano y se añaden a la suspensión 64 g (2 equi-
valentes) de yoduro de metilo. La mezcla se agita duran-
te toda la noche a 50-60°C, después de lo cual se filtra
y el filtrado se evapora a sequedad. El residuo que con-
tiene el éster dimetílico (32 g) se cromatografía des-
10 pués sobre 90 g de gel de sílice en cloroformo. 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 hidróxido sódico 2,6 N.
La mezcla de reacción se agita durante toda la noche y
15 después se evapora a sequedad. El residuo contiene 15,7 g
de semiéster semisal y 1,3 g de diéster. Se suspenden
3 g de semiéster semisal en 100 ml de benceno con agita-
ción y la mezcla se enfría en un baño de hielo. Se añade
a la suspensión un equivalente de cloruro de tionilo más
20 10 % de exceso y la mezcla se agita a la temperatura
ambiente durante 1 hora después de completada la adición.
A continuación se enfría la mezcla en un baño de hielo
y se hace burbujear a través de la misma un gran exceso
de bencilmercaptano. Se prosigue la agitación y la refri-
25 geración durante media hora después de completada la adi-

377582



1 ción y después durante media hora a la temperatura ambiente. Entonces se filtra la mezcla y por evaporación del filtrado a sequedad se obtiene S-bencil(-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonotioato de O-metilo.

5 Cuando en el procedimiento anterior se emplean tiofenol, etilmercaptano y butilmercaptano en lugar de bencilmercaptano, se obtienen respectivamente S-fenil(-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonotioato de O-metilo, S-etil(-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonotioato de O-metilo y S-butil(-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonotioato de O-metilo.

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

15 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:

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

25

377582



16

1 * 91 g de KH_2PO_4 y 95 g de Na_2HPO_4 llevados a 1 litro con agua destilada.

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

5 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>
15 Harina de avena molida	30
Solubles de destilería	10
Harina de soja	25
Citrato sódico	4
Ascorbato sódico	0,5
20 Agua c.s.	el resto

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

25 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, añadién

17-3075

377582



1

dose 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.

5

10

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

15

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.

20

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 encuentra que da una zona de inhibición de 25 mm a una dilución de 0,125 mg/ml por el procedimiento de ensayo modificado.

25

377582

31 OCT. 1971



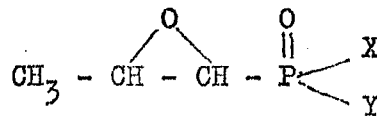
1 B. Se diluyen con agua hasta 50 ml, 10 ml de
la solución acuosa de la sal amónica de ácido (-) (cis-
5 1,2-epoxipropil)fosfónico conteniendo 200 mg de sólidos
y la solución resultante se pasa a través de una columna
de 200 ml (volumen sedimentado) de resina cambiadora de
cación (Dowex 50) en el ciclo de (+)α-fenetilamonio.
Después de recoger el eluato inicial, la columna se 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
10 concentrado se ajusta a 5,0 mediante la cuidadosa adi-
ción de pequeñas porciones de resina Dowex 50 en el ciclo
ácido y la solución ácida se filtra y se evapora a se-
quedad en vacío a la temperatura ambiente. El residuo
se recoge en 100 ml de metanol y la solución metanólica
15 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
refrigera durante unas 16 horas y el producto cristali-
20 no, sal de mono-(+)α-fenetilamonio de ácido (-) (cis-1,2-
epoxipropil)fosfónico, se recoge por filtración.

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



REIVINDICACIONES

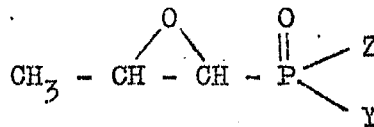
1. Un nuevo procedimiento para la preparación de agentes antibacterianos, particularmente nuevos tioatos de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil) fosfonico, de formula:



donde X es -SR u -OR e Y es -SR o -NR₁R₂, donde

R, R₁ y R₂ son iguales o diferentes y R es un radical hidrocarbilo y R₁ y R₂ representan hidrógeno o un radical hidrocarbilo, o bien -NR₁R₂ es un resto de amina cíclica primaria o secundaria con la condición de que cuando X es -OR, Y es -SR;

cuyo procedimiento consiste en hacer reaccionar un compuesto de fórmula:



con un mercaptano de fórmula



donde Z es halógeno o -NR₁R₂, Y es halógeno, -OR o -NR₁R₂ y R es un radical hidrocarbilo, con la condición de que por lo menos uno de los radicales Y o Z sea halógeno y R₁ y R₂ son los definidos anteriormente.

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde X es -OR y R es terc-butilo o isopropilo, que adicio-

25

377582

3100



1 nalmente comprende la hidrólisis del éster-tioato con un
álcali para formar el ácido libre.

3. Un procedimiento según la reivindicación 1, en
el que X e Y son -SR y R es alquilo inferior.

5 4. Un procedimiento según la reivindicación 1, en
el que X es -SR e Y es -NR₁R₂.

5. Un procedimiento según la reivindicación 1, en
el que X es -OR e Y es -SR.

10 6. Un procedimiento según la reivindicación 1, en
el que el compuesto obtenido es (-)(cis-1,2-epoxipropil)
fosfonoditioato de S,S'-dimetilo.

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

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva, que consta de dieciocho pá-
ginas mecanografiadas.

20

Madrid, 15 de Marzo de 1.970

BERNARDO UNGRIA

P.P.

25