

377587

16



377587

SECCION TECNICA	
CLASIFICACION I.P.C.	
CLASE	609 AG
SUBCLASE	f R

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

Solicitante: MERCK & CO., INC.

Domicilio: 126 East Lincoln Av. RAHWAY, New Jersey,  
USA.

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

Prioridad: de la solicitud de patente estadounidense  
nº 759.246 del 11 de setiembre 1.968.

Como divisional de la solicitud de patente  
nº 359.540.

MGS.-

377587



16

1

RESUMEN DE LA MEMORIA

5

Se preparan anhídridos de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico, tratando un compuesto de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico con ácido ortofosfórico. Los anhídridos de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico son agentes antibacterianos activos.

10

ANTECEDENTES DEL INVENTO.

15

Aunque se conocen 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 contra un antibiótico particular; el antibiótico resulta inactivo contra estas variedades resistentes. Debido a este desarrollo de resistencia frente a los antibióticos conocidos, prosiguen las investigaciones en un esfuerzo por descubrir nuevos agentes antibacterianos que sean activos contra una amplia gama de agentes patógenos y en especial contra aquellas variedades de agentes patógenos que son resistentes a los antibióticos conocidos.

20

DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

25

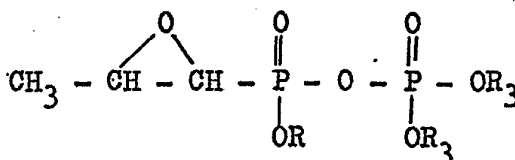
El presente invento se refiere a compuestos que tienen notable actividad antibacteriana y a procedimientos para su preparación. Los compuestos que son objeto de este invento son los anhídridos de ácido (-) (cis-

377587



16

1 1,2-epoxipropil)fosfónico. Los nuevos anhídridos compren-  
didos dentro del invento pueden ser representados de la  
forma siguiente:



(III)

10 donde R<sub>3</sub> es hidrógeno, alquilo inferior como metilo, etilo,  
propilo, y butilo, bencilo o un catión metálico como  
amonio, sodio, potasio, calcio, magnesio, aluminio, hie-  
rro o plata; y R es hidrógeno o un radical hidrocarbilo  
con o sin sustituyentes, en el que el radical hidrocar-  
bilo es alquilo inferior, como metilo, propilo, terc-  
butilo, cloroetilo, bromoetilo, dicloroetilo; alquenilo  
15 inferior como alilo, metalilo, hexenilo; alquinilo infe-  
rior como propargilo, etinilo o cloroetinilo; cicloalqui-  
lo como ciclohexilo, ciclohexenilo o ciclopropilo; arilo,  
aralquilo o heteroarilo. Cuando R es alifático, preferible-  
mente contiene de 1 a 6 átomos de carbono.

20 Cuando R es un radical arilalifático, puede ser  
aralquilo como bencilo, fenetilo, p-halobencilo, nitro-  
bencilo y similares.

25 Cuando R es un radical arilo, puede ser un radi-  
cal como fenilo, fenilo sustituido, por ejemplo p-cloro-  
fenilo, o-nitrofenilo o naftilo. Cuando R es heterocíclico



1 co, puede ser heteroaromático, como piridilo, tienilo,  
tiazolilo o puede representar un heterocanillo saturado  
como piperazina.

5 También están comprendidas en este invento las  
sales de los compuestos III en el que R es hidrógeno.  
Las sales constituyen un aspecto preferido del invento  
porque generalmente son más estables que el ácido libre  
correspondiente. Dentro de las sales consideradas se en-  
cuentran las sales inorgánicas como las de sodio, alumi-  
10 nio, potasio, amonio, calcio, magnesio, hierro y plata,  
así como las sales amínicas orgánicas como las de aminas  
primarias, secundarias y terciarias, por ejemplo mono- y di-  
alquilaminas, trialquilaminas y aminas heterocíclicas ni-  
trogenadas. Son ejemplos de estas sales amínicas las de  
15 aminas como  $\alpha$ -fenetilamina, dietilamina, quinina, brucina,  
lisina, etanolamina, morfina, bencilamina, piperazina y  
similares. Cuando se desea, la sal puede ser la de una  
amina biológicamente activa, tal como eritromicina, olea-  
nomicina o novobiocina.

20 Los compuestos de fórmula III pueden ser ilustra-  
dos por los siguientes:

ácido P-(-) (cis-1,2-epoxipropil)isohipofosfórico,  
sal disódica de ácido sodio-P-(-)(cis-1,2-epoxipropil)-  
isohipofosfórico,

25





1 propilo y butilo o un catión metálico como sodio, amonio, potasio, calcio, magnesio, aluminio y similares. Además, el compuesto de partida (IV) puede ser una sal de amina tal como una sal de morfolinio, fenetilamonio  
5 o trietilamonio. Como base orgánica puede emplearse cualquier amina terciaria, por ejemplo terc-butilamina, terc-etilamina o terc-metilamina. Se prefiere emplear para esta reacción un disolvente orgánico seco, por ejemplo benceno o tolueno; también se puede emplear un disolvente básico como la piridina. Cuando el compuesto de  
10 ácido fosfónico de partida es una sal o el ácido libre, es conveniente emplear una amina como disolvente. En este último caso, se obtiene el anhídrido en forma de la sal de amina en los casos en que R en la fórmula IV sea hidrógeno. También están incluidos los compuestos en los  
15 que  $-NR_1R_2$  representa el resto de una amina cíclica, por ejemplo morfolina, piperidina o pirrolidina. Cuando R,  $R_1$  y  $R_2$  representan un radical hidrocarbilo, éste es el definido anteriormente. Es fundamental que las sustancias reaccionantes y el equipo estén secos para obtener los  
20 compuestos de fórmula III con buen rendimiento. Por esta razón, las sustancias reaccionantes se secan en general inmediatamente antes de llevar a cabo la reacción. Generalmente la reacción transcurre a la temperatura ambiente y la mezcla se agita durante 5 a 50 horas para  
25



16

1       asegurar una reacción completa. La reacción puede lle-  
varse a cabo a temperaturas más altas pero generalmente  
se obtiene un rendimiento más bajo del anhídrido a estas  
altas temperaturas.

5               El material de partida para la reacción con áci-  
do ortofosfórico puede prepararse haciendo reaccionar un  
compuesto de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico,  
por ejemplo la sal de morfolina del ácido (-) (cis-1,2-  
epoxipropil)fosfónico, con una carbo-di-imida, por ejem-  
plo dicitclohexilcarbo-di-imida, en presencia de una amina  
10       primaria o secundaria, como dimetilamina o morfolina.

15               El ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico y sus  
sales se preparan por fermentación aerobia de medios nu-  
tritivos acuosos adecuados, en condiciones controladas,  
por ciertas variedades del género Streptomyces, como  
Streptomyces fradiae (MA-2915, NRRL-3417), Streptomyces  
wedmorensis (MA-3269, ATCC 21239) y Streptomyces virido-  
chromogenes (MA-2903, NRRL-3413). La fermentación se rea-  
liza a temperaturas que oscilan entre 25° y 38° C aproxi-  
madamente. El pH del medio nutritivo adecuado para culti-  
var el Streptomyces y producir el compuesto de ácido fos-  
fónico puede variar entre 5,5 y 7,5 aproximadamente. A  
20       continuación el ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico  
puede ser aislado del caldo de fermentación por adsorción  
25       en alúmina lavada con ácido o con base. El material adsor-



1 bido puede ser eluido de la alúmina con una solución  
acuosa o hidroalcohólica de hidróxido amónico a un pH  
de 11,2 aproximadamente y el eluato se recoge fracciona-  
5 damente. De esta forma se obtiene la sal amónica. Pueden  
obtenerse otras sales pasando una solución de la sal  
amónica a través de una resina cambiadora de catión apro-  
piada o mediante otras técnicas conocidas.

Los monoésteres de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)-  
fosfónico pueden ser preparados a partir de los corres-  
10 pondientes diésteres. Los diésteres se obtienen haciendo  
reaccionar dicloruro (-) (cis-1,2-epoxipropil)-fosfónico  
con 2 equivalentes en moles de un alcohol. A continuación  
se obtiene el monoéster separando uno de los radicales  
éster del diéster con una base. Entonces puede prepararse  
15 una monosal monoéster haciendo reaccionar el monoéster  
con 1 equivalente de base.

Los dihaluros fosfónicos pueden ser preparados  
haciendo reaccionar ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fos-  
fónico con un agente halogenante como cloruro de tionilo  
o bromuro de tionilo.  
20

Los anhídridos de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)-  
fosfónico son eficaces en la inhibición del crecimiento  
de diversos microorganismos. En general, se ha demostra-  
do que inhiben el crecimiento del Staphylococci y Salmo-  
nella. Son ilustrativos de estos agentes patógenos el  
25



16

1        Salmonella schottmuelleri, Salmonella gallinarum y  
      Staphylococcus aureus y Staphylococcus pyogenes.

5        Los anhídridos pueden ser empleados como agentes  
      antisépticos para eliminar los organismos susceptibles  
      del equipo farmacéutico, dental y médico y de otras zo-  
      nas sometidas a infección por tales organismos.

10        Como el antibiótico y sus sales son muy activos  
      en la inhibición del crecimiento de varias especies de  
      Salmonella, pueden ser utilizados como desinfectantes  
      en el lavado de huevos y de zonas sometidas a la infec-  
      ción por Salmonella. Las sales de anhídridos de ácido (-)-  
      (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico y los ésteres hidrocarbú-  
      licos y sales del mismo son también útiles como bacteri-  
15        cidas en diversas aplicaciones industriales, por ejem-  
      plo en la inhibición del crecimiento de bacterias inde-  
      seables en el agua blanca de las fábricas de papel y en  
      las pinturas como la pintura de látex de acetato de po-  
      livinilo.

20        Los anhídridos también son útiles en el tratamien-  
      to de las enfermedades causadas por infecciones bacteria-  
      nas en los animales.

      Los siguientes ejemplos se dan con fines ilustra-  
      tivos y no limitativos:

25

377587



16

EJEMPLO 1

Acido P-(-)(cis-1,2-epoxipropil)isohipofosfórico

Se concentra a sequedad en vacío 1,55 g de (-)-  
(cis-1,2-epoxipropil)morfolinofosfinato de morfolinio  
en 36 ml de piridina y se añaden 36 ml más de piridina  
al residuo. Este proceso se repite tres veces para ase-  
gurar una sequedad completa. A la solución seca resultan-  
te de la sal de ácido morfolinofosfónico se agregan 1,45  
ml de solución al 85 % de ácido orto-fosfórico, 1,43 ml  
de butilamina terciaria y 72 ml de piridina seca. La so-  
lución resultante se agita durante 50 horas, después de  
lo cual se separa a vacío el disolvente y el residuo se  
lava tres veces con 20 ml de agua. Después de separar el  
agua y secar el residuo, se obtiene ácido P-(-)(cis-1,2-  
epoxipropil)isohipofosfórico en forma de sal de piridi-  
na.

Cuando en el procedimiento anterior se emplea  
(-)(cis-1,2-epoxipropil)morfolinofosfinato de metilo en  
lugar de (-)(cis-1,2-epoxipropil)morfolinofosfinato de  
morfilonio, se obtiene ácido metil-P-(-)(cis-1,2-epoxi-  
propil)isohipofosfórico que se caracteriza por RMN.

Los materiales de partida empleados en la prepa-  
ración de los compuestos de este invento pueden obtener-  
se de la forma siguiente:

377587



1     A. Dicloruro (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico

Se colocan 20 ml de benceno, 1,38 g (0,01 moles) de ácido (-)(cis-1,2-epoxipropil)fosfónico y 1,6 ml de piridina y a la mezcla resultante se añaden con agitación 2,4 g (0,020 moles) de cloruro de tionilo. La mezcla de reacción se agita a la temperatura ambiente durante 3 horas, después de lo cual se decanta la solución del precipitado gomoso y se concentra a vacío a la temperatura ambiente. Por destilación instantánea del residuo a 0,5 mm, se obtiene dicloruro (-)(cis-1,2-epoxipropil)fosfónico, p.e. 32-33°C, en forma de líquido incoloro y transparente.

10     B. Monoéster de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico

Se enfría a 5°C una mezcla agitada de 0,1 moles de (-)(cis-1,2-epoxipropil)fosfonato dicloruro (-)(cis-1,2-epoxipropil)fosfónico y 0,2 moles de trietilamina en 100 ml de benceno. Se añaden a la mezcla 0,2 moles de alcohol metílico 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. La sal hidroccloruro de trietilamina precipitada se separa por filtración y el disolvente se elimina a vacío dejando como residuo (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfonato de dimetilo. El éster dimetílico se disuelve en 75 ml de agua y a la solución resultante se añade gota a

377587



1           gota, con agitación, 0,1 moles de hidróxido sódico a  
lo largo de 5 horas, mientras se mantiene el pH entre  
8,5 y 11,0. La solución se mantiene a la temperatura  
5           ambiente durante 18 horas, después de lo cual se separa  
el disolvente a vacío. El residuo se disuelve en metanol  
y se precipita el (-)(cis-1,2-epoxipropil)fosfonato de  
sodio y metilo mediante la adición de éter, recuperándose  
se por filtración.

10           C. Sal de morfolina de ácido (-)(cis-1,2-epoxipropil)-  
morfolinofosfínico

Se pasan 2,59 g de (-)(cis-1,2-epoxipropil)fosfo-  
nato de fenetilamonio a través de una columna de 40 g  
de resina Dowex 50 (H<sup>+</sup>) provista de una doble pared por  
la que circula agua de hielo y se eluye con agua de hie-  
15           lo. Inmediatamente se neutraliza el efluente (450 ml)  
con 860 mg de morfolina recién tratada y la solución  
acuosa se liofiliza.

Se añade gota a gota una solución de 8,24 g de  
díciclohexilcarbo-di-imida en 150 ml de terc-butanol a  
20           una solución calentada a reflujo del material liofiliz-  
ado, 100 ml de terc-butanol, 100 ml de agua y 2,61 ml  
de morfolina, durante 3 horas. Una vez completada la  
adición, se prosigue el reflujo durante 1 hora más. Des-  
pués se enfría la mezcla de reacción a la temperatura  
25           ambiente y se filtra para separar la díciclohexilurea.

377587



R. 1970

1 La torta del filtro se lava con terc-butanol y el filtra  
do se evapora a vacío hasta que se ha separado todo el  
terc-butanol. La solución acuosa se extrae tres veces  
5 con éter y por liofilización de la solución acuosa se  
obtiene la sal de morfolina de ácido (-) (cis-1,2-epoxi-  
propil)morfolinofosfónico.

D. Acido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico

Se emplea un cultivo liofilizado de Streptomyces  
fradiae MA-2913 (ATCC 21099) para inocular 50 ml de medio  
10 estéril de la siguiente composición, contenido en un ma-  
traz Erlenmeyer de 250 ml provisto de tabique:

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

\* 91 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 95 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> llevados a 1 litro  
20 con agua destilada.

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

El matraz inoculado se incuba a 28°C durante 24  
horas en un sacudidor rotatorio. Se emplean 10 ml del  
25 caldo resultante para inocular un segundo matraz Erlen-



1 meyer de 250 ml conteniendo 50 ml del mismo medio este-  
 ril. Después de incubación a 28°C durante 24 horas en  
 un sacudidor rotatorio, el caldo de fermentación resul-  
 tante se emplea para inocular un fermentador de 5 litros  
 5 que contiene 3 litros de caldo nutritivo estéril de la  
 siguiente composición:

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

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

El medio inoculado se incuba después a 28°C du-  
 rante 4 días mientras se agita y se airea el caldo de  
 fermentación con 3 litros de aire por minuto. Para evi-  
 tar la excesiva formación de espuma se añaden 3 ml de  
 20 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 mediante un ensayo normalizado  
 25 empleando Proteus vulgaris.



1970

1                   Una segunda fermentación empleando este mismo  
procedimiento da un caldo con una actividad de 6,75 uni-  
dades/ml.

5                   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 en-  
saya contra el Proteus vulgaris empleando el procedimien-  
to de ensayo modificado.

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

20                   A 10 ml de una solución acuosa de la sal amónica  
de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico conteniendo  
200 mg de sólidos y con una actividad total de 54.000  
unidades, se añaden 100 mg de hidróxido sódico y la so-  
lución resultante se diluye hasta 20 ml con agua y se  
filtra. El filtrado se concentra hasta unos 8,5 ml en  
25                   vacío, con calefacción. El concentrado resultante se de-



MAR. 1970

1  
5  
10  
15  
20  
25

ja en reposo hasta que comienza a cristalizar de la solución la sal sódica de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)-fosfónico y se deja que la cristalización prosiga, con agitación, durante toda la noche (17 horas). El producto cristalino se separa por filtración y se lava con una pequeña cantidad de metanol acuoso al 50 % seguido de una pequeña cantidad de metanol. Después de secar el residuo cristalino a vacío a la temperatura ambiente, se obtiene la sal sódica de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico.

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

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

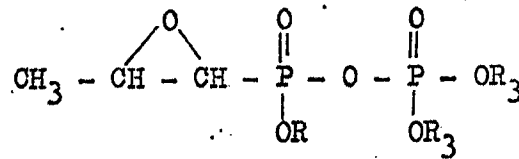
377587



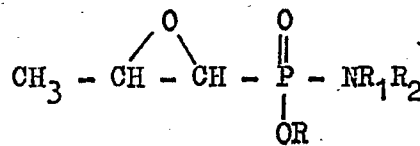
MAR 1970

REIVINDICACIONES

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



donde R es hidrógeno, un radical hidrocarbilo o un catión metálico y las sales de amina del mismo cuando R es hidrógeno y R<sub>3</sub> es hidrógeno, alquilo inferior, aralquilo o un catión metálico, cuyo procedimiento consiste en hacer reaccionar un compuesto de fórmula:



con ácido orto-fosfórico en presencia de una base orgánica, donde R es el definido anteriormente y R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son hidrógeno o un radical hidrocarbilo.

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que el compuesto obtenido es ácido P(-)(cis-1,2-epoxipropil)isohipofosfórico.

3. 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 UN ANHIDRIDO DE ACIDO (-) (CIS-1,2-EPOXIPROPIL)FOSFONICO".

377587



6 MAR. 1970

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

Madrid, 16 marzo 1.970

BERNARDO UNGRIA

P.P.

5.

377587