



436176

C07D//A61K

436176

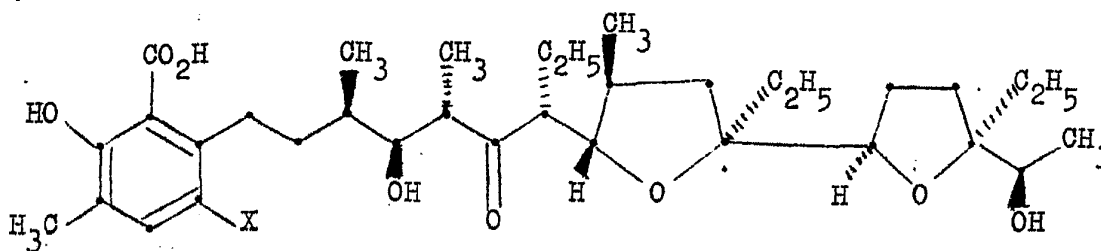
PATENTE
DE
INVENCION

por "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE DERIVADOS HALOGENA-
DOS DEL ANTIBIOTICO ISO-LASALOCIDA A", a favor de la firma
suiza F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE, S.A., residente en BASILEA
(Suiza).

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

El presente invento se refiere a nuevos derivados
halogenados de la fórmula general



(I)

en la que

5. X se elige del grupo constituido por cloro, bromo

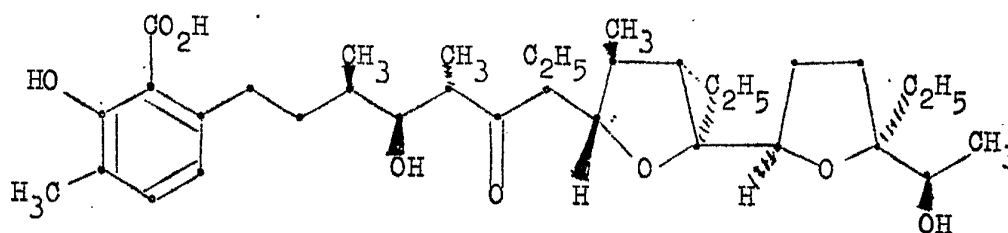


e yodo,

y a sus sales aceptables en farmacia.

5. Se ha descubierto que los nuevos derivados halogenados de la fórmula I y sus sales aceptables en farmacia exhiben actividad bactericida y antiprotozoaria. Así pues, son útiles como agentes bactericidas y antiprotozoarios.

10. Los nuevos derivados halogenados de la fórmula I y sus sales aceptables en farmacia se preparan según el presente invento mediante un procedimiento que comprende someter a halogenación correspondiente una sal de un compuesto de la fórmula



(II)

15. y convertir, si se desea, un compuesto de la fórmula I en una sal respectiva aceptable en farmacia.

20. La halogenación de las sales del compuesto de la fórmula II se lleva a cabo siguiendo técnicas de halogenación convencionales. Así pues, la halogenación puede llevarse a cabo con la ayuda de N-bromo- o N-clorosuccinimida en un disolvente orgánico halogenado tal como cloroformo, tetracloruro de carbono o cloruro de metileno. La temperatura para esta reacción se encuentra, convenientemente, en la gama comprendida entre la temperatura del ambiente y el punto de ebullición de la mezcla reaccional con la variación correspondiente



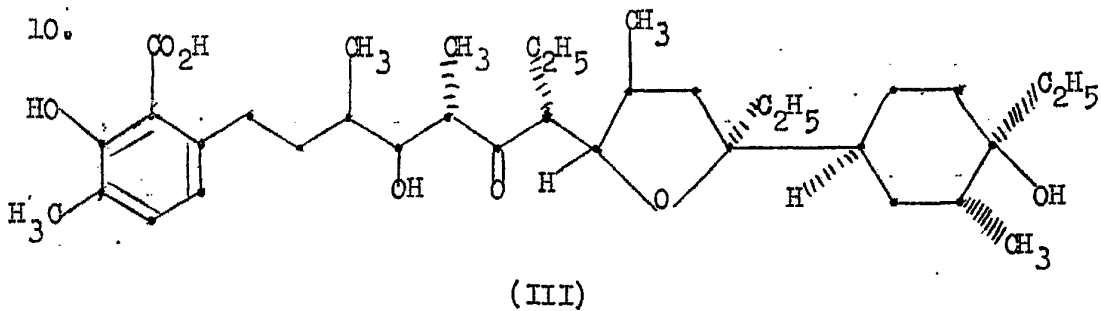
- del tiempo de la reacción, por ejemplo alrededor de 12 horas cuando se elabora a la temperatura del ambiente y alrededor de 10 minutos a alrededor de 2 horas cuando se elabora a la temperatura de reflujo. La halogenación puede llevarse a cabo también con la ayuda de bromo, por ejemplo en uno de los disolventes halogenados antes indicados o en disulfuro de carbono o bien con la ayuda de cloro, por ejemplo en tetracloruro de carbono. La temperatura está comprendida, convenientemente, entre alrededor de -10°C y $+10^{\circ}\text{C}$ y el tiempo de la reacción entre alrededor de 1 y 6 horas. La yodación puede realizarse con monocloruro de yodo, por ejemplo en ácido acético glacial a alrededor de la temperatura del ambiente durante un tiempo comprendido entre unos 15 minutos y unas 2 horas o mediante yodo en una base orgánica tal como, por ejemplo, morfolina a una temperatura alrededor de la ambiente durante unos 5 a 7 días.
- 5.
- 10.
- 15.

- Los compuestos de partida útiles en el procedimiento según el invento, o sea las sales del compuesto de la fórmula II, pueden prepararse por fermentación para producir el compuesto de la fórmula II y subsiguiente conversión de éste en una sal. El microorganismo que produce dicho compuesto de la fórmula II es un organismo streptomyces aislado de una muestra de terreno recogido en Hyde Park, Massachusetts. En el departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Agricultural Research Service, Northern Utilization Research and Development División, Peoria, Illinois se depositaron tubos liofilizados del cultivo con la designación de laboratorio X-357. El cultivo, identificado con el número NRRL 3382 por el Agricultural Research Service, se ha
- 20.
- 25.

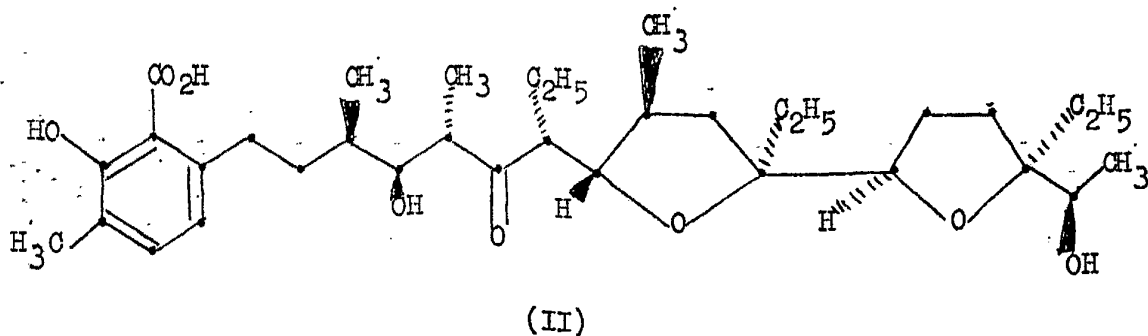


ofrecido al público como NRRL.

La fermentación utilizando dicho microorganismo da un material antibiótico, identificado hasta ahora como antibiótico X-537A (Lasalocida A), que con el análisis de laboratorio ha resultado ser el ácido 6-7(R)-[5(S)-etil-5-(5(R)-etiltetrahydro-5-hidroxi-6(S)-metil-2H-piran-2(R)-il)-tetrahydro-3(S)-metil-2(S)-fural]-4(S)-hidroxi-3(R),5(S)-dimetil-6-oxo-nonil -2,3-crosótico, o sea, un compuesto de la fórmula



junto con un isómero de Lasalocida A antibiótica, o sea el compuesto de la fórmula II que tiene la fórmula



y se denomina

25. Ácido 6-7(R)-[5(S)-etil-5-(5(S)-etiltetrahydro-



-5-(1(R)-hidroxietil)-furan-2(R)-il)-tetrahidro-3(S)-
-metil-2(S)-furil]-4(S)-hidroxi-3(R),5(S)-dimetil-6-
-oxononil } -2,3-cresótico. Este último compuesto se identi-
fica también como iso-lasalocida A.

- 5. La iso-lasalocida A se prepara con la fermentación de un medio apropiado con *Streptomyces* X-537 bajo condiciones sumergidas aeróbicas, con el pH del caldo de fermentación ajustado entorno del neutro, o sea, alrededor de 6,5 a 7,5. El medio utilizado contiene una fuente de nitrógeno, tal como levadura, un producto derivado de levadura, maíz, soja y similares, siendo el más preferido la glicina; sales como el fosfato potásico, el carbonato cálcico, y elementos vestigiales; una fuente de carbohidrato, como el azúcar, melaza y similares, prefiriéndose el almidón; y una grasa o aceite vegetal o animal tal como el aceite de soja o el aceite de manteca de cerdo para proporcionar una fuente de carbono y control de espuma. La fermentación se lleva a cabo a temperaturas ligeramente elevadas, por ejemplo entre alrededor de 25° y 35°C, siendo la temperatura de incubación preferida de unos 31°C. Después de una incubación alrededor de 4 a 9 días, el caldo de fermentación se filtra y se recupera el antibiótico mediante extracción.
- 10.
- 15.
- 20.

25. Después de completada la fermentación pueden utilizarse una serie de procedimientos para aislar y purificar la iso-lasalocida A. Los procedimientos apropiados de aislamiento y purificación incluyen técnicas de extracción de disolvente, tales como columnas de extracción por partidas o de extracción de líquido-líquido de flujo continuo a contracorriente y cromatografía de permeabilidad de gel en un



sistema no acuoso.

- Las sales de iso-lasalocida A pueden prepararse siguiendo métodos convencionales. Estas sales se preparan a partir de la forma de ácido libre del antibiótico siguiendo métodos bien conocidos en el arte, por ejemplo, mediante lavado del ácido libre en solución con una base o sal apropiada. Ejemplos de estas sustancias básicas aptas para formar sales para los fines del presente invento incluyen bases alcalinometálicas tales como hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido lítico y similares; bases metálicas alcalinotérreas tales como hidróxido calcico, hidróxido de bario y similares; e hidróxido amónico. Las sales alcalinometálicas o las sales metálicas alcalinotérreas apropiadas para formar sales aceptables en farmacia pueden incluir aniones tales como carbonatos, bicarbonatos y sulfatos.

- La actividad útil de los compuestos de la fórmula I y sus sales aceptables en farmacia se ilustra por el hecho de que el compuesto de bromo, o sea, en donde X representa en la fórmula I bromo, ha mostrado actividad contra una serie de bacterias grampositivas, o sea:

- Bacillus sp. E (ATCC N° 27 859)
- Bacillus sp. TA (ATCC N° 27 860)
- Bacillus megaterium (ATCC N° 8011)
- Bacillus subtilis (NRRL N° 558)
- Staphylococcus aureus (ATCC N° 6538p)
- Sarcina lutea (ATCC N° 9341)
- Actinomyces cellulosa (ATCC N° 3313).

La actividad antibiótica relativa del derivado de bromo en una prueba *in vitro* contra Bacillus sp. TA se



calculó comparando una Lasalocida A antibiótica pura y el derivado de bromo de iso-lasalocida A utilizando las técnicas de difusión de copa-placa de agar, El derivado de bromo tiene una actividad relativa porcentual in vitro de 75. Por otra

5. parte, el derivado de bromo de iso-lasalocida A es considerablemente menos tóxico ya que la DL_{50} es de 2000 mg/kg p.o. en los ratones en comparación con 150 mg/kg p.o., aproximadamente, para la lasalocida A.

EJEMPLO 1.

10. Preparación del derivado de bromo de iso-lasalocida A

Se adicionaron lentamente, durante un período de una hora y a $3^{\circ}C$, 0,323 cc de bromo en 50 cc de cloruro de metileno a una solución de 3,672 g de la sal sódica de iso-lasalocida A en 500 cc de cloruro de metileno. Al cabo de una

15. hora se dejó calentar lentamente la solución hasta $15^{\circ}C$ y se adicionó 1 litro de agua. Se separó la fase disolvente, se lavó a su vez con bisulfito sódico acuoso, carbonato sódico acuoso y agua. Se secó la solución sobre Na_2SO_4 y se concentró hasta formar un aceite del que se recuperaron, después
20. de la adición de acetona/hexano, 2,1 g de cristales. Se disolvió el material cristalino en cloruro de metileno y se lavó con HCl 1N. Se concentró la fase disolvente hasta volumen reducido y después de la adición de acetona/hexano se recrystalizó la iso-lasalocida A bromada en metanol acuoso. La
25. iso-lasalocida A bromada ofreció un punto de fusión de 185-186 $^{\circ}C$.

La sal sódica de iso-lasalocida A, que se utilizó anteriormente como material de partida, puede prepararse como sigue:



Preparación de iso-lasalocida A

- El organismo estreptomicoes se desarrolló en cultivo sumergido y aireado en matraces sacudidos. El pH del caldo se ajustó a 6,5-7,5 mediante la adición de solución de KOH y luego se esterilizó el caldo. Se empleó un tanque de fermentación y en el tanque se utilizó un inóculo al 5-10% constituido por un cultivo sumergido de 3 días procedente de botellas aireadas. El medio estuvo constituido por guisantes amarillos abiertos al 2%, almidón de maíz 1%, K_2HPO_4 al 0,1% y aceite de manteca de cerdo al 2%. La fermentación se llevó a cabo a 28°C bajo presión de aire positiva, con flujos de 5-10 pies cúbicos de aire por minuto y por 40-80 galones de carga de líquido. El caldo se cosecho después de 6 días de fermentación, se filtró y se recuperó el antibiótico por extracción. La extracción se llevó a cabo como sigue:

- Se filtraron 204 litros del caldo y se suspendió la torta de filtración en 100 litros de acetato de etilo y se agitó la mezcla durante una noche a la temperatura del ambiente. Luego se filtró la mezcla y se separó la fase acuosa y se desechó. La solución de acetato de etilo, ensayando 30 millones de unidades de Bacillus E, se concentró en vacío hasta 3 litros, se lavó con solución de carbonato sódico al 10% y se secó con sulfato sódico anhidro.

- Con ulterior concentración hasta 300 cc y dilución con 350 cc de éter de petróleo (punto de ebullición 50-60°C), se separaron 41 g de material sólido, ensayando 25 millones de unidades de Bacillus E. Luego se extrajo este material sólido en un aparato Soxhlet con 4 litros de éter de petró-



Leo (punto de ebullición 50-60°C) durante 40 horas. Se reco-
gió el extracto hasta sequedad en vacío. Se suspendió el re-
síduo cristalino en éter de petróleo y se filtró. En el fil-
trado se encuentra isolasalocida A.

5. Aislamiento de iso-lasalocida A

Se cromatografió una porción del filtrado concen-
trado procedente de la preparación a gran escala del ejemplo
1 en un aparato de distribución a contracorriente de 200 tu-
bos (cada uno de 80 cc de capacidad). Se disolvió la muestra
10. en 160 cc de fases mixtas (heptano-acetato de etilo-metanol-
agua, 27:18:18:2) y se introdujo la solución en los dos pri-
meros tubos. Después de 380 transferencias se evaporó el con-
tenido de los tubos siguientes y los sólidos recuperados des-
pués de la evaporación contenían:

15. A. Mezcla de homólogos de lasalocida B, C, D y E. Estos ho-
mólogos tienen una estructura que difiere de la lasalo-
cida A y de la iso-lasalocida A.

B. Lasalocida A

C. Iso-lasalocida A bruta.

20. La fracción C, que se halló en forma bruta y con-
tenía sodio y potasio en forma de sales, se disolvió en clo-
ruro de metileno y se lavó con HCl 0,1N para convertirla en
el ácido libre de iso-lasalocida A purificado.

25. La iso-lasalocida A que se aisló ofreció un punto
de fusión de 183-185°C.

Preparación de la sal sódica de iso-lasalocida A

Aproximadamente 100 mg de iso-lasalocida A se di-
solvieron en cloruro de metileno y se trataron con una solu-
ción saturada de carbonato sódico. Se concentró la fase di-



solvente con hexano, lo que dió 104 mg de la sal sódica de iso-lasalocida cristalina (punto de fusión 183-183,5°C).

Otras sales de iso-lasalocida A, igualmente útiles para la preparación de los derivados halogenados de la fórmula I pueden prepararse como sigue:

5.

Preparación de la sal potásica de iso-lasalocida A

Se disolvieron unos 387 mg de iso-lasalocida A en 200 cc de acetato de etilo y se trataron con KOH 0,2 N. Se secó la fase de disolvente sobre K₂CO₃ y se concentró bajo vacío para formar una espuma incolora de un peso aproximado de 360 mg.

10.

Preparación de la sal de bario de iso-lasalocida A

Se disolvieron unos 0,77 g de iso-lasalocida A en cloruro de metileno y se trató con una solución saturada de Ba(OH)₂. Se separó la fase disolvente y se concentró bajo vacío para formar una espuma con un peso aproximado de 0,62 g.

15.

= . =

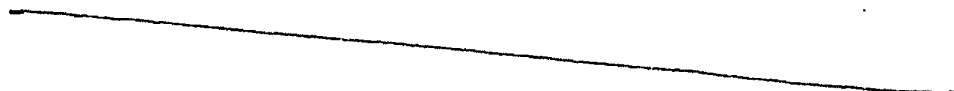
REIVINDICACIONES

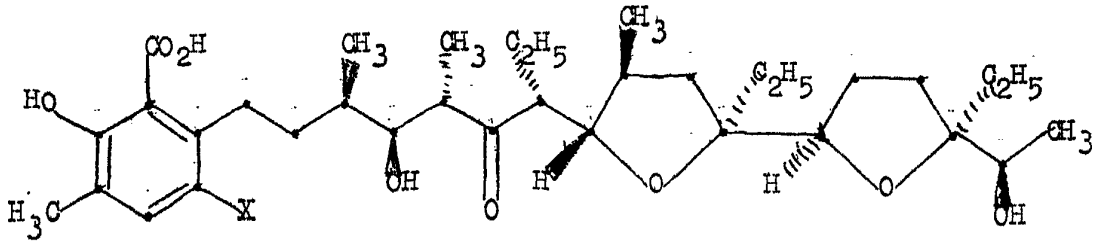
20.

Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la solicitud de patente U.S.A. nº 457.298 del 2 de Abril de 1974.

25.

1.- Procedimiento para la preparación de derivados halogenados del antibiótico iso-lasalocida A, de la fórmula general





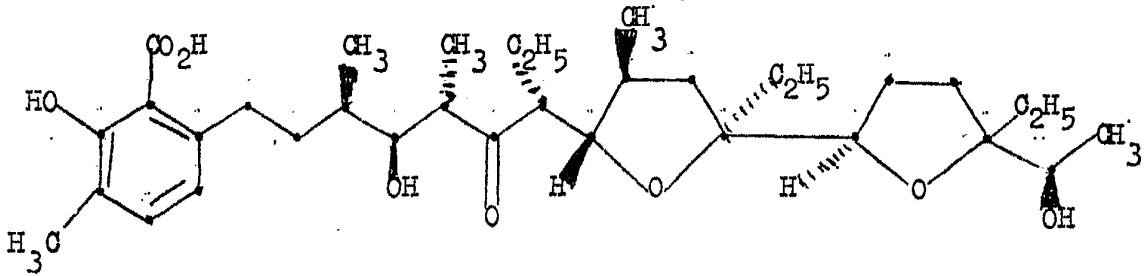
(I)

5. en la que

X se elige del grupo constituido por cloro, bromo e yodo,

y sus sales aceptables en farmacia, caracterizado porque, comprende someter a halogenación correspondiente una sal

10. de un compuesto de la fórmula



(II)

20. y convertir, si se desea, un compuesto de la fórmula I en una sal respectiva aceptable en farmacia,

2.- Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la halogenación se

lleva a cabo mediante tratamiento con N-bromo- o N-cloro-

25. suocinimida o con bromo, cloro, yodo o monocloruro de yodo en un disolvente apropiado.





3.- Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque en una forma de realización preferente se somete a bromación la sal del compuesto de la fórmula II.

5. 4.- Procedimiento para la preparación de derivados halogenados del antibiótico iso-lasalocida A.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 12 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

10.

Madrid, a 1 de Abril de 1975

p.a.

p. p. JAIME ISERN

Firmado: JOSE F. NIETO

mpc.

