



DIVISIONAL I

11	12	13	14	15
16	17	18	19	20
21	22	23	24	25
26	27	28	29	30
31	32	33	34	35
36	37	38	39	40
41	42	43	44	45
46	47	48	49	50
51	52	53	54	55
56	57	58	59	60
61	62	63	64	65
66	67	68	69	70
71	72	73	74	75
76	77	78	79	80
81	82	83	84	85
86	87	88	89	90
91	92	93	94	95
96	97	98	99	100

NUMERO 480146  
FECHA DE PRESENTACION 2 mayo 1.979

PATENTE DE INVENCIÓN

Concedido al Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

40	41	42	43	44
45	46	47	48	49
50	51	52	53	54
55	56	57	58	59
60	61	62	63	64
65	66	67	68	69
70	71	72	73	74
75	76	77	78	79
80	81	82	83	84
85	86	87	88	89
90	91	92	93	94
95	96	97	98	99
100	101	102	103	104
105	106	107	108	109
110	111	112	113	114
115	116	117	118	119
120	121	122	123	124
125	126	127	128	129
130	131	132	133	134
135	136	137	138	139
140	141	142	143	144
145	146	147	148	149
150	151	152	153	154
155	156	157	158	159
160	161	162	163	164
165	166	167	168	169
170	171	172	173	174
175	176	177	178	179
180	181	182	183	184
185	186	187	188	189
190	191	192	193	194
195	196	197	198	199
200	201	202	203	204
205	206	207	208	209
210	211	212	213	214
215	216	217	218	219
220	221	222	223	224
225	226	227	228	229
230	231	232	233	234
235	236	237	238	239
240	241	242	243	244
245	246	247	248	249
250	251	252	253	254
255	256	257	258	259
260	261	262	263	264
265	266	267	268	269
270	271	272	273	274
275	276	277	278	279
280	281	282	283	284
285	286	287	288	289
290	291	292	293	294
295	296	297	298	299
300	301	302	303	304
305	306	307	308	309
310	311	312	313	314
315	316	317	318	319
320	321	322	323	324
325	326	327	328	329
330	331	332	333	334
335	336	337	338	339
340	341	342	343	344
345	346	347	348	349
350	351	352	353	354
355	356	357	358	359
360	361	362	363	364
365	366	367	368	369
370	371	372	373	374
375	376	377	378	379
380	381	382	383	384
385	386	387	388	389
390	391	392	393	394
395	396	397	398	399
400	401	402	403	404
405	406	407	408	409
410	411	412	413	414
415	416	417	418	419
420	421	422	423	424
425	426	427	428	429
430	431	432	433	434
435	436	437	438	439
440	441	442	443	444
445	446	447	448	449
450	451	452	453	454
455	456	457	458	459
460	461	462	463	464
465	466	467	468	469
470	471	472	473	474
475	476	477	478	479
480	481	482	483	484
485	486	487	488	489
490	491	492	493	494
495	496	497	498	499
500	501	502	503	504
505	506	507	508	509
510	511	512	513	514
515	516	517	518	519
520	521	522	523	524
525	526	527	528	529
530	531	532	533	534
535	536	537	538	539
540	541	542	543	544
545	546	547	548	549
550	551	552	553	554
555	556	557	558	559
560	561	562	563	564
565	566	567	568	569
570	571	572	573	574
575	576	577	578	579
580	581	582	583	584
585	586	587	588	589
590	591	592	593	594
595	596	597	598	599
600	601	602	603	604
605	606	607	608	609
610	611	612	613	614
615	616	617	618	619
620	621	622	623	624
625	626	627	628	629
630	631	632	633	634
635	636	637	638	639
640	641	642	643	644
645	646	647	648	649
650	651	652	653	654
655	656	657	658	659
660	661	662	663	664
665	666	667	668	669
670	671	672	673	674
675	676	677	678	679
680	681	682	683	684
685	686	687	688	689
690	691	692	693	694
695	696	697	698	699
700	701	702	703	704
705	706	707	708	709
710	711	712	713	714
715	716	717	718	719
720	721	722	723	724
725	726	727	728	729
730	731	732	733	734
735	736	737	738	739
740	741	742	743	744
745	746	747	748	749
750	751	752	753	754
755	756	757	758	759
760	761	762	763	764
765	766	767	768	769
770	771	772	773	774
775	776	777	778	779
780	781	782	783	784
785	786	787	788	789
790	791	792	793	794
795	796	797	798	799
800	801	802	803	804
805	806	807	808	809
810	811	812	813	814
815	816	817	818	819
820	821	822	823	824
825	826	827	828	829
830	831	832	833	834
835	836	837	838	839
840	841	842	843	844
845	846	847	848	849
850	851	852	853	854
855	856	857	858	859
860	861	862	863	864
865	866	867	868	869
870	871	872	873	874
875	876	877	878	879
880	881	882	883	884
885	886	887	888	889
890	891	892	893	894
895	896	897	898	899
900	901	902	903	904
905	906	907	908	909
910	911	912	913	914
915	916	917	918	919
920	921	922	923	924
925	926	927	928	929
930	931	932	933	934
935	936	937	938	939
940	941	942	943	944
945	946	947	948	949
950	951	952	953	954
955	956	957	958	959
960	961	962	963	964
965	966	967	968	969
970	971	972	973	974
975	976	977	978	979
980	981	982	983	984
985	986	987	988	989
990	991	992	993	994
995	996	997	998	999
1000	1001	1002	1003	1004
1005	1006	1007	1008	1009
1010	1011	1012	1013	1014
1015	1016	1017	1018	1019
1020	1021	1022	1023	1024
1025	1026	1027	1028	1029
1030	1031	1032	1033	1034
1035	1036	1037	1038	1039
1040	1041	1042	1043	1044
1045	1046	1047	1048	1049
1050	1051	1052	1053	1054
1055	1056	1057	1058	1059
1060	1061	1062	1063	1064
1065	1066	1067	1068	1069
1070	1071	1072	1073	1074
1075	1076	1077	1078	1079
1080	1081	1082	1083	1084
1085	1086	1087	1088	1089
1090	1091	1092	1093	1094
1095	1096	1097	1098	1099
1100	1101	1102	1103	1104
1105	1106	1107	1108	1109
1110	1111	1112	1113	1114
1115	1116	1117	1118	1119
1120	1121	1122	1123	1124
1125	1126	1127	1128	1129
1130	1131	1132	1133	1134
1135	1136	1137	1138	1139
1140	1141	1142	1143	1144
1145	1146	1147	1148	1149
1150	1151	1152	1153	1154
1155	1156	1157	1158	1159
1160	1161	1162	1163	1164
1165	1166	1167	1168	1169
1170	1171	1172	1173	1174
1175	1176	1177	1178	1179
1180	1181	1182	1183	1184
1185	1186	1187	1188	1189
1190	1191	1192	1193	1194
1195	1196	1197	1198	1199
1200	1201	1202	1203	1204
1205	1206	1207	1208	1209
1210	1211	1212	1213	1214
1215	1216	1217	1218	1219
1220	1221	1222	1223	1224
1225	1226	1227	1228	1229
1230	1231	1232	1233	1234
1235	1236	1237	1238	1239
1240	1241	1242	1243	1244
1245	1246	1247	1248	1249
1250	1251	1252	1253	1254
1255	1256	1257	1258	1259
1260	1261	1262	1263	1264
1265	1266	1267	1268	1269
1270	1271	1272	1273	1274
1275	1276	1277	1278	1279
1280	1281	1282	1283	1284
1285	1286	1287	1288	1289
1290	1291	1292	1293	1294
1295	1296	1297	1298	1299
1300	1301			

1

COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS

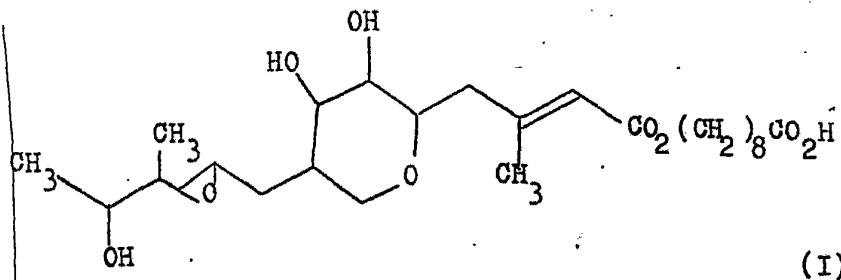
5

Esta invención se refiere a compuestos antibacterianos y, en particular, a un nuevo compuesto antibacteriano producido por la bacteria Pseudomonas fluorescens, y a las sales y esteres del compuesto.

10

La patente británica nº 1.395.907 describe y reivindica un procedimiento para el aislamiento de compuestos antibacterianos de la bacteria Pseudomonas fluorescens, siendo uno de dichos compuestos el llamado ácido pseudomónico, de fórmula (I)

15



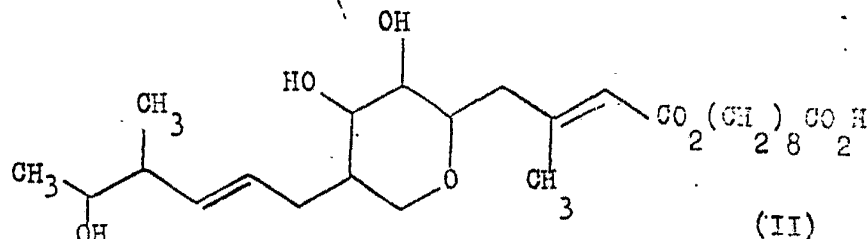
al que nos referiremos aquí como "ácido pseudomónico A".

20

Se ha encontrado ahora que otro compuesto antibacteriano puede aislarse de Pseudomonas fluorescens y este compuesto puede prepararse también de ácido pseudomónico A.

Por lo tanto, la presente invención describe un compuesto de fórmula (II) o una sal o éster correspondientes farmacéuticamente aceptables:

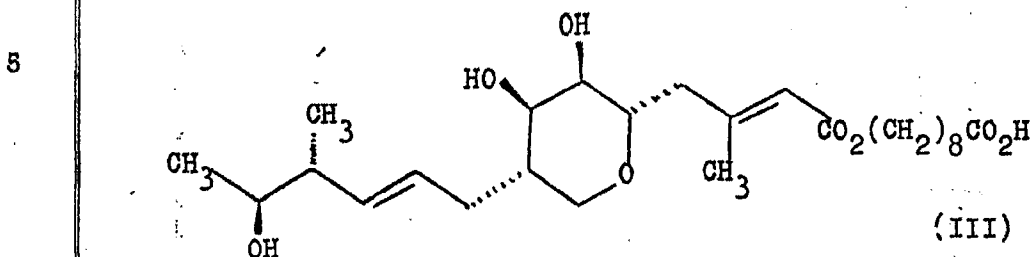
25



30

El compuesto (II) se nombrará aquí como "ácido pseudomónico

1 G". Se cree que el compuesto tiene la esteoquímica absoluta que indica la fórmula (III)



los dos dobles enlaces tienen una configuración trans- o E.

10 Sales no tóxicas aceptables del ácido pseudomónico C son: sales metálicas, por ejemplo, de aluminio, sales de metales alcalinos, tales como sodio y potasio, sales de metales alcalino terrosos, tales como de calcio o magnesio y sales amónicas o amónicas sustituidas, por ejemplo, aque-

15 llas de alquilamino inferior, tales como trietilamina, hidroxialquilamino inferior, tales como 2-hidroxi-etilamina, bis-(2-hidroxi-etil)-amina o tri-(2-hidroxi-etil)-amina, cicloalquilaminas, tales como biciclohexilamina, o de procaina, dibenzilamina, N,N-dibenziletlen-diamina, l-efenamina, N-etilpiperidina, N-benzil-β-fenetil-amina, dihidroabietilamina, N,N'-bis-des

20 tipo piridina, tales como piridina, colidina o quinoleína.

Las sales preferidas son las de metales alcalinos.

Los ésteres adecuados incluyen:

25 (a) de alquilo C<sub>1-20</sub>, alquenilo C<sub>2-8</sub> o alquinilo C<sub>2-8</sub>, cada uno de los cuales puede estar, opcionalmente, sustituido por un cicloalquilo C<sub>3-7</sub>; halógeno, carboxi, alcóxicarbonilo C<sub>1-6</sub>, carbamoilo, arilo, heterocíclico, hidroxilo, alcancilo-

(b) de cicloalquilo C<sub>3-7</sub> sustituido, opcionalmente, con alquilo C<sub>1-6</sub>.

30

1 (c) arilo

(d) heterociclilo.

El término "arilo" incluye grupos fenilo y naftilo  
opcionalmente sustituido con hasta cinco halógenos, alquilo  
5 C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub>, haloalquilo C<sub>1-6</sub>, hidroxí, amino, carbo-  
xi, alcóxicarbonilo C<sub>1-6</sub>, o alcoxi(C<sub>1-6</sub>) carbonilalquilo  
(C<sub>1-6</sub>).

El término "heterociclilo" incluye anillos sencil-  
llos o fundidos, comprendiendo hasta cuatro heteroátomos  
en el anillo, seleccionados entre oxígeno, nitrógeno, azu-  
10 fre y, opcionalmente, sustituidos con hasta tres grupos ha-  
lógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub>, haloalquilo C<sub>1-6</sub>, hidro-  
xi, amino, carboxi, alcóxicarbonilo C<sub>1-6</sub>, alcoxi (C<sub>1-6</sub>) car-  
bonilalquilo(C<sub>1-6</sub>), arilo u oxo.

Un tipo de grupos esterés el formado por grupos  
15 alquilo, arilo y aralquilo, cualquiera de los cuales puede  
estar sustituido por un grupo hidroxí, amino o halógeno.  
Por ejemplo, el grupo ester puede ser un grupo alquilo C<sub>1-6</sub>,  
en particular, metilo, etilo, n o iso-propilo, n, sec-,  
iso o terc-butilo; un grupo haloalquilo C<sub>1-6</sub>, tal como  
trifluorometilo, 2,2,2-tricloroetilo; un grupo aminoalqui-  
20 lo, tal como aminometilo, 2-aminoetilo; hidroximetilo, hidro-  
xi etilo; fenilo; fenilo sustituido o un grupo bencilo.

Los esterés preferidos son esterés alquilo C<sub>1-6</sub>.

El ácido pseudomónico C, sus sales y sus esterés,  
25 tienen actividad antibacteriana. Tienen, particularmente,  
alta actividad contra Haemphilus influenzae, Neisseria gono-  
rrhoeae y Mycoplasma sp, y, por ello, son válidos en el tra-  
tamiento de enfermedades respiratorias y venereas, de huma-  
nos y enfermedades veterinarias, inducidas por micoplasmas.  
Además, los compuestos de esta invención tienen la ventaja  
sobre el ácido pseudomónico A de ser estables en condiciones  
30 ácidas y mas estables en condiciones alcalinas.

1 En humanos, las infecciones contra las que son  
particularmente útiles el ácido pseudomónico C y sus sales  
y esterres incluyen las enfermedades venereas. Debido a que  
no es un antibiótico  $\beta$ -lactámico, es efectivo contra cepas  
5 de N. gonorrhoeae productoras de  $\beta$ -lactamasa, contra las que  
los tratamientos normales, tales como los antibióticos  
de penicilina y cefalosporina no pueden ser utilizados.

El ácido pseudomónico C puede ser también efecti-  
vo en el tratamiento de infecciones respiratorias, como,  
bronquitis crónica y meningitis bacteriana, uretritis no es-  
10 pecífica y neumonía. En animales se emplea, generalmente, co-  
mo un promotor de crecimiento, o para el tratamiento de mas-  
titis en ganado o para el tratamiento de infecciones de mi-  
coplasma en animales, como pavos, pollos y cerdos.

Esta invención proporciona, también, una composi-  
15 ción farmacéutica o veterinaria, que comprende ácido pseudó-  
mónico C, o una sal o ester correspondientes, junto con una  
sustancia transportadora o excipiente, farmacéutica o vete-  
rianariamente aceptables.

Las composiciones pueden formularse para adminis-  
tración por cualquier vía, dependiendo de la enfermedad tra-  
20 tada. Las composiciones pueden presentarse en forma de table-  
tas, cápsulas, polvos, gránulos, pastillas o preparaciones  
líquidas, como disoluciones o suspensiones orales o paren-  
terales estériles.

Las tabletas y cápsulas para administración oral  
pueden presentarse en forma de dosis unidad, y pueden conte-  
25 ner excipientes convencionales como agentes aglutinantes,  
por ejemplo, sirope, acacia, gelatina, sorbitol, tragacan-  
to, o polivinil pirrolidona; de relleno, por ejemplo, lacto-  
sa, azúcar, almidón de maíz, fosfato cálcico, sorbitol o  
glicina; lubricantes de tabletas, por ejemplo, estearato  
30 magnésico, talco, polietilen glicol o sílice; desintegran-

1 tes, por ejemplo, almidón de patata, o agentes humectantes  
aceptables, como sulfato de sodio y laurilo. Las tabletas  
pueden revestirse de acuerdo con los métodos bien conocidos  
5 en la práctica farmacéutica normal. Las preparaciones ora-  
les líquidas pueden ser en forma de, por ejemplo, suspensio-  
nes acuosas u oleosas, disoluciones, emulsiones, jarabes o  
elixires, o pueden presentarse como un producto seco para  
su reconstitución con agua, u otro vehículo adecuado, antes  
de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener adi-  
10 tivos convencionales, como agentes formadores de suspensio-  
nes, por ejemplo, sorbitol, sirope, metilcelulosa, jarabe  
de glucosa, grasas comestibles de gelatina hidrogenada, agen-  
tes emulsionantes, por ejemplo, lecitina, monooleato de sor-  
bitan o acacia; vehículos no acuosos (que pueden incluir  
aceites comestibles), por ejemplo, aceite de almendra, acei-  
15 te de coco fraccionado, esterres grasos como glicerina, pro-  
pilen glicol o alcohol etílico; conservantes, por ejemplo,  
p-hidroxibenzoato de metilo o propilo; o ácido sórbico, y  
si se desea, agentes saborantes y colorantes convencionales.

Los supositorios contendrán bases de supositorio  
convencionales, por ejemplo, mantequilla de coco u otro gli-  
20 cérido.

Para administración parenteral, las formas fluidas  
de dosis unidad se preparan utilizando el compuesto y un  
vehículo estéril, preferiblemente agua. El compuesto, depen-  
diendo del vehículo y la concentración usada, puede ser sus-  
pendido o disuelto en el vehículo. En la preparación de di-  
25 soluciones, el compuesto puede disolverse en agua para in-  
yección y filtrado esterilizado antes de introducirlo en un  
vial o ampolla adecuado y cerrarlo. Otros aditivos, como  
anestésicos locales, agentes conservantes y tamponantes se  
pueden disolver, ventajosamente, en el vehículo. Para mejo-  
30 rar la estabilidad, la composición puede congelarse después

1 de introducirla en el vial y eliminar el agua a vacío. En-  
tonces se cierra herméticamente el vial con el polvo liofi-  
lizado seco en su interior. Las suspensiones parenterales  
se preparan, sustancialmente, de la misma manera, excepto  
5 que el compuesto se suspende en el vehículo en vez de disol-  
verse y la esterilización no puede completarse por filtra-  
ción. El compuesto puede esterilizarse mediante exposición  
a óxido de etileno antes de suspenderlo en el vehículo es-  
téril. En la composición, puede incluirse ventajosamente, un  
agente surfactante o humectante, para facilitar la distri-  
10 bución uniforme del compuesto.

Las composiciones pueden contener de 0,1% a 99%,  
en peso, preferiblemente, de 10-60%, en peso, del material  
activo, dependiendo del método de administración. Cuando  
las composiciones comprenden dosis unidad, cada unidad con-  
15 tendrá, preferiblemente, de 50-500 mg. del ingrediente ac-  
tivo. La dosis empleada para el tratamiento de un humano  
adulto será, preferiblemente, del orden de 100 mg. a 3 g.  
por día, por ejemplo, 250mg-2g., por día, dependiendo de la  
via y frecuencia de la administración.

20 El ácido pseudomónico C o una sal o ester pueden  
administrarse, alternativamente, como parte de una dieta  
total. En este caso, la cantidad de compuesto empleada debe  
ser menos del 1%, en peso, de la dieta y, preferiblemente,  
no más del 0,5%, en peso. La dieta para animales puede con-  
sistir en un pienso normal, al que puede añadirse el com-  
puesto, o este ya puede haber sido añadido a una premezcla.

25 La presente invención proporciona, también, un  
procedimiento para la preparación del ácido pseudomónico C  
o una sal o un ester correspondientes, cuyo procedimiento  
comprende la reacción del ácido pseudomónico A o una sal  
o ester correspondientes, con un reactivo que convierte un  
30 epóxido a una olefina; y, opcionalmente, la realización de

1 una de las siguientes etapas:

- (i) formación de una sal del ácido pseudomónico C producido
- 5 (ii) esterificación del ácido pseudomónico C o una sal correspondiente para producir un ester del ácido pseudomónico C; o
- (iii) hidrolisis de un ester del ácido pseudomónico C.

La conversión de un epóxido a una olefina puede realizarse mediante varios reactivos descritos en la bibliografía, y el reactivo particular a elegir para el procedimiento de la presente invención se decide mediante un procedimiento de prueba y error. Algunos de tales reactivos son mas adecuados que otros para este propósito. Algunos métodos, generalmente adecuados, son los siguientes

- (a) Selenocianato potásico en metanol/agua;  
(vease JCS Chem.Comm., 1975, 1216; JCS 1949, 278)
- 15 (b) Haluros de wolframio de baja valencia; por ejemplo  $WCl_6$ /butil litio (vease J.Amer.Chem.Soc. 1972, 94, 6538)
- (c)  $Ph_3P = Se$ /ácido trifluoroacético;  
(vease JCS Chem.Comm. 1973, 253)
- (d) Ioduro de trifluoroacetilo/iouduro sódico;  
20 (vease J.Org.Chem., 1978, 43, 1841).

En las siguientes referencias se describen otros métodos:

J.Amer.Chem.Soc., 1973, 95, 2697.

Tet.Letts (17) 1976, 1395.

Ber. 1955, 88, 1654.

J. Org.Chem., 1958, 22, 1118.

25 Se ha encontrado que un método conveniente consiste en el uso de selenocianato potásico.

Disolventes adecuados para usar con selenocianato potásico incluyen mezclas de agua con alcoholes, en particular los alcoholes  $C_1-C_{20}$ . Se ha encontrado que los mas altos rendimientos del compuesto de fórmula (II) se obtienen si se

30

1 emplea un alcohol con un grupo alquilo de gran tamaño, en  
particular ramificado o cíclico. Alcoholes específicos son,  
por ejemplo, alcohol iso-hexílico, alcohol terc-amílico y  
alcohol ciclohexílico. La reacción se lleva a cabo, general-  
5 mente, a elevadas temperaturas, preferiblemente, alrededor  
del punto de ebullición del disolvente empleado. El tiempo  
para que la reacción se realice, depende de la temperatura  
de la reacción y, por tanto, del disolvente. Generalmente,  
es adecuado un tiempo de 2 a 9 días.

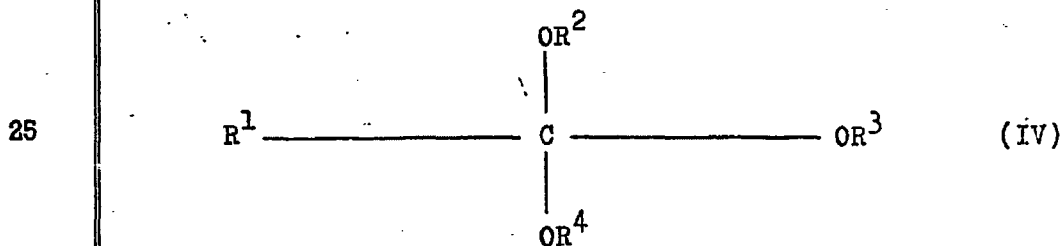
10 Otro método adecuado para convertir el epóxido del  
ácido pseudomónico A, o una sal o ester correspondientes  
en una olefina, comprende el tratamiento con ioduro de tri-  
fluoroacetilo e ioduro sódico. El ioduro de trifluoroacetilo  
puede prepararse in situ a partir de anhídrido trifluoroacé-  
tico. La reacción se lleva a cabo adecuadamente a tempera-  
15 tura ambiente durante 10-36 horas, aproximadamente, prefe-  
riblemente 24 horas, aproximadamente.

20 Cuando el producto deseado es el ácido pseudomóni-  
co C libre, o la sal, puede ser conveniente emplear un ester  
de ácido pseudomónico A para el procedimiento antes citado.  
Este ester es un grupo protector del carboxilo. Los grupos  
protectores de carboxilo adecuados dependen de las condi-  
ciones de reacción empleadas para la apertura del epóxido  
y son, por ejemplo, grupos ester 2,2,2-tricloro-etílico,  
(que pueden eliminarse con zinc en un alcohol inferior, espe-  
cialmente metanol), fenilo, pentacloro fenilo, bencilo y t-  
butilo. Otros protectores de carboxilo adecuados son los  
25 grupos sililo. En este caso, el ácido carboxílico reacciona  
con un agente sililante, como un halosilano o un silazano.  
Un agente sililante preferido es N,O-bis(trimetilsilil)ace-  
tamida, que produce el derivado trimetil-sililado del ácido.

30 Antes de realizar el procedimiento anterior, ca-  
racterístico de esta invención, puede ser deseable proteger

1 los grupos hidroxilo en el ácido pseudomónico A o su sal o  
2 ester. Aunque la reacción puede realizarse sin protección  
3 del hidroxilo, en algunos casos se darían rendimientos mas  
4 altos del derivado del ácido pseudomónico C si los grupos  
5 hidroxilo estuvieran protegidos. Tales grupos protectores  
6 deben ser eliminables bajo condiciones suficientemente sua-  
7 ves. Grupos adecuados son, por ejemplo, los grupos sililo  
8 producidos a partir de un agente sililante como ya se ha dis-  
9 cutido anteriormente. Grupos protectores de hidroxilo parti-  
10 cularmente adecuados son, por ejemplo, trimetilsililo, t-  
11 butildimetilsililo, metiltiométilo. Un grupo protector de  
12 hidroxilo preferido es trimetilsililo, que se elimina facil-  
13 mente al completar la reacción. Alternativamente, para algu-  
14 nas reacciones de apertura del epóxido es posible proteger  
15 los grupos hidroxilo con otros radicales ester, que pueden  
16 eliminarse por medios químicos o enzimáticos. Por ejemplo,  
17 p-nitrobenzoato, metoxiacetato, fenoxiacetato, trifluoroa-  
18 cetato, cada uno de los cuales puede eliminarse bajo condi-  
19 ciones básicas suaves, como amoniaco acuoso, o carbonato  
20 potásico en metanol acuoso.

Tambien es posible proteger el resto glicol del  
21 ácido pseudomónico A. Reactivos adecuados para formar tales  
22 grupos protectores de hidroxilo son, por ejemplo, los com-  
23 puestos de fórmula (IV)



30 donde  $\text{R}^1$  representa hidrógeno o un grupo alquilo  $\text{C}_{1-6}$  y  $\text{R}^2$ ,  
 $\text{R}^3$  y  $\text{R}^4$ , independientemente, representan un grupo alquilo

1

$C_{1-6}$ .

El grupo  $R^1$  puede representar, por ejemplo, hidrógeno, metilo, etilo, n- o iso-propilo. Preferiblemente,  $R^1$  representa hidrógeno, de tal manera que el compuesto de fórmula (IV) sea un ortoformiato de trialquilo.

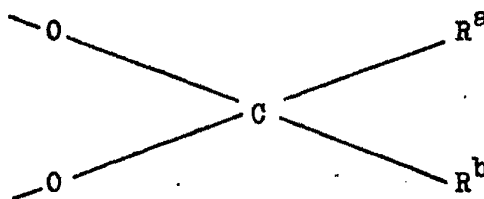
5

Los grupos  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  puede ser, por ejemplo, metilo, etilo, n- o iso-propilo, n-, iso-, sec- o terc-butilo. Preferiblemente,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos iguales y cada uno representa un grupo metilo.

10

Otros grupos protectores del glicol incluyen aquellos en los que el resto glicol se convierte en la estructura:

15



donde  $R^a$  y  $R^b$  representan hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$  o fenilo. Preferiblemente,  $R^a$  y  $R^b$  son ambos metilo, es decir, el grupo es el grupo isopropilideno. Este grupo puede introducirse en el ácido pseudomónico A o en su sal o ester, por reacción con 2,2-dimetoxipropano y se elimina con ácido acético.

20

El grupo protector de hidroxilo puede eliminarse por un método convencional para cada grupo protector de hidroxilo particular.

25

Puede suceder que se elimine directa o alternativamente, puede convertirse en un grupo protector diferente que entonces es eliminable bajo diferentes condiciones. Esta última vía puede emplearse cuando se usa un grupo protector de glicol derivado de un compuesto (IV); este se convierte, por ácido, en el grupo  $-OCOR^1$ , que entonces se elimina.

30

1 Cuando se requiere un ester del ácido pseudomónico C, el paso de esterificación, paso (ii) anterior, puede realizarse por cualquier método convencional, por ejemplo, por reacción del ácido o una sal correspondiente:

- 5 (a) con el haluro apropiado, sulfato o alcanosulfonato del alcohol en presencia de un disolvente como acetona, dimetilsulfuro o dimetilsulfóxido y calcio, o carbonato potásico o con un haluro en presencia de hexametil fosforamida; o
- 10 (b) por métodos catalíticos de transferencia de fase con el haluro y/o sulfato del alcohol en disolución acuosa y/o orgánica en presencia de una sal de amonio cuaternario, tal como bisulfato o haluro de tetrabutil amonio, o haluro de benciltrimetil amonio ; o
- (c) con un diazoalcano.

15 La hidrólisis de un ester de ácido pseudomónico C (paso (iii) anterior) puede ser hidrólisis química, por ejemplo, por hidrólisis selectiva alcalina; o hidrólisis enzimática, por ejemplo, por el uso de Levadura de Panadero.

20 Tambien se incluye dentro del alcance de la presente invención un procedimiento para la preparación del ácido pseudomónico C o una sal o ester correspondientes, que comprende el crecimiento de Pseudomonas fluorescens bajo condiciones aeróbicas o en un medio de cultivo que contiene sales inorgánicas y fuentes de carbono y nitrógeno asimilables, hasta que el medio de cultivo muestra, al menos, una actividad antibacteriana detectable, acidificación del medio de cultivo; extracción, con un disolvente orgánico,

25 de los materiales activos disueltos en el medio de cultivo, y mas tarde, bien:

- 30 (a) separación del ácido pseudomónico C o una sal correspondiente a partir de cualquier otro material activo y, opcionalmente, posterior esterificación del ácido separado, o
- (b) esterificación de los materiales activos, separación de

1 un ester del ácido pseudomónico C a partir de esteres de otros materiales activos y, opcionalmente, posterior hidrólisis del ester separado para formar el ácido pseudomónico C o una sal correspondiente.

5 En el procedimiento anterior, la etapa de cultivo, donde Pseudomonas fluorescens crece, se realiza de forma convencional. Según nuestros conocimientos, puede emplearse cualquier cepa de este organismo; una cepa pública aceptable será Pseudomonas fluorescens NCIB 10586 (NCIB = Colección Nacional de Bacterias Industriales).

10 Después que se completa la fermentación, los materiales activos, incluyendo el ácido pseudomónico C, se extraen del medio de cultivo acidificado acuoso con un disolvente adecuado.

15 El procedimiento de extracción comprende, preferiblemente, la extracción del medio de cultivo, con un disolvente orgánico, después de acidificación; reextracción del extracto orgánico con una disolución alcalina acuosa tamponada; y, finalmente, reextracción de esta última, con un disolvente orgánico, después de acidificación. Disolventes adecuados se pueden determinar mediante un procedimiento de prueba y error, como ejemplos pueden mencionarse iso-butilmetil cetona (IBMC), cloroformo y, preferiblemente, acetato de etilo.

20 El ácido pseudomónico C puede, entonces, separarse a partir de otros materiales activos producidos en la fermentación, bien directamente (etapa (a) anterior) o por esterificación de la mezcla y separación del ester de ácido pseudomónico C (etapa (b) anterior). Cuando la bacteria empleada es Pseudomonas fluorescens NCIB 10586, el material mayoritario que se produce, además del ácido pseudomónico C, es el ácido pseudomónico A. Si el último material se encuentra en cantidades sustanciales es preferible eliminar

25

30

1 la mayoría del ácido pseudomónico A por cristalización, op-  
cionalmente por inoculación, a partir de un disolvente adecua-  
do, por ejemplo, dietil eter.

5 Si se realiza la alternativa (a), el ácido pseudó-  
monico C puede separarse directamente por cromatografía de  
la mezcla restante, bien como el mismo ácido libre, o como  
una sal correspondiente. Por cromatografía sobre gel de sí-  
lice, el ácido pseudomónico C corre ligeramente por delante  
del ácido pseudomónico A, por lo que las fracciones pueden  
identificarse de esta manera.

10 El ácido pseudomónico C o una sal correspondiente  
pueden esterificarse por cualquiera de los métodos descri-  
tos antes en esta memoria descriptiva.

15 Si se realiza la alternativa (b) anterior, la mez-  
cla de los materiales activos se esterifica primero, prefe-  
riblemente después de eliminar la mayoría del ácido pseudo-  
mónico A por cristalización. Otra vez, pueden emplearse  
cualquiera de los métodos de esterificación descritos. Lo  
mas conveniente es formar esteres de alquilo C<sub>1-6</sub> de los  
componentes de la mezcla, preferiblemente esteres metili-  
cos.

20 La mezcla resultante de esteres puede, entonces,  
cromatografiarse y separar el ester deseado del ácido pseu-  
domónico C. Si lo que se desea es el ácido libre o la sal  
puede producirse mediante hidrólisis química o enzimática  
del ester separado.

25 Los siguientes ejemplos deben considerarse ilus-  
trativos, pero no limitativos de la presente invención:

Ejemplo 1

10,11-Desoxipseudomonato A de metilo (pseudomonato C de metilo)  
a partir de pseudomonato A de metilo

30

1 Una disolución de pseudomonato A de metilo (1,03 g.  
2 mmoles) y selenocianato potásico (0,846 g., 6 mmoles) se  
calentó a reflujo durante 7 días en metanol-agua 9:1 (30 ml.)  
El precipitado negro de selenio se filtró y el filtrado se  
5 evaporó a un aceite. El último se repartió entre acetato  
de etilo y agua y la fase orgánica separada, se lavó con bi-  
carbonato sódico, salmuera, ( $MgSO_4$ ) seco y se evaporó a un  
aceite. Por cromatografía sobre gel de sílice H (tipo 60)  
usando un gradiente de cloroformo a 4% de metanol-cloroformo  
se obtuvo metil 10,11-desoxipseudomonato de metilo como un  
10 aceite (0,129 g.), la cromatografía en capa fina con cloro-  
formo-metanol 9:1 demostró un componente de  $R_f = 0,46$  y la  
cromatografía de líquidos de alta presión dió un único pico,  
 $\nu_{max}$  ( $CHCl_3$ ) 3400, 2900, 2850, 1720, 1710, 1650, 1150 y 980  
 $cm^{-1}$ ,  $\lambda_{max}$  (EtOH) 221 nm ( $\epsilon$  11500),  $\delta_H$  ( $CDCl_3$ ) 5,75 (1H, m,  
15 C2-H), 5,40 (2H, m, C10-H y C11-H), 4,05 (2H, t, C9'- $CH_2$ )  
3,65 (3H, s,  $CH_3$ ), 2,21 (3H, s ancho, C15- $CH_3$ ), 1,21 (3H,  
d, C17- $CH_3$ ) y 1,00 (3H, d, C14- $CH_3$ ),  $\delta_C$  ( $CDCl_3$ ) 174,3 (C1'),  
166,8 (C1), 156,8 (C3), 134,5 y 129,4 (C10 y 11), 117,6  
(C2), 74,8 (C5), 71,2 (C13), 70,4 (C7), 68,9 (C6), 64,8  
(C16), 63,8 (C9'), 51,4 ( $CH_3O$ ), 44,7 y 43,1 (C4 y 12), 42,0  
20 (C8), 34,1 (C2'), 32,4 (C9), 29,1 (C4', 5' y 6'), 28,7 (C8'),  
26,0 (C7'), 24,9 (C3'), 20,4 (C14), 19,1 (C15) y 16,6 (C17),  
m/e (intensidad relativa) 499 (100%,  $M^+$  + 1 por C.I.)

Ejemplo 2

25

Acido pseudomónico C por fermentación

(a) fermentación

30

Pseudomonas fluorescens, cepa NCIB 10586 se cultivó en  
una pendiente de agar y se lavó con agua estéril. Se añadió

1 una muestra al siguiente medio de cultivo:

Extracto de levadura oxide	2%(w/v)
Glucosa	0,11
Ortofosfato disodio hidrógeno	0,26
Ortofosfato de potasio y dihidrogeno	0,24.

5

Esto se cultivó a 28° durante la noche y entonces se utilizó para inocular el medio de producción siguiente:

Licor de maiz macerado	0,3% (w/v)
Glucosa	2,0
Glicerina	0,5
10 Sulfato amónico	0,2
Carbonato cálcico	0,4
Ortofosfato de potasio y dihidrógeno	0,04
Ortofosfato de disodio e hidrógeno	0,065
Cloruro de manganeso R H <sub>2</sub> O	0,0003
Cloruro potásico	0,05
15 Sulfato magnésico 7 H <sub>2</sub> O	0,0375

P2000 para minimizar la formación de espumas

La fermentación se realizó a 25°C durante 48 horas, entonces la producción estuvo esencialmente completa.

20

Después de eliminar las células por centrifugación, el sobrenadante se repartió en acetato de etilo a pH3. La disolución de acetato de etilo se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporó a un volumen reducido, se añadió eter y se dejó que el ácido pseudomónico A cristalizase.

(b) Aislamiento del ácido pseudomónico C

25

Las aguas madre de la anterior cristalización se evaporaron hasta dejar un aceite que se cromatografió sobre placas de gel de sílice, 20 x 20 cm., de cromatografía de capa fina preparativa, que se desarrollaron con cloroformo: isopropanol-ácido acético (80:20:0,5). La banda por encima del ácido pseudomónico A de Rf 0,65 se eliminó y re-cromatografió como antes para dar ácido pseudomónico C. (Calculado

30

1 para  $C_{26}H_{44}O_8$ : C 64,4; H 9,2%. Encontrado: C 64,0; H 9,3%),  
5  $\nu_{max}$  ( $CHCl_3$ ) 3430 (ancho), 1710, 1650, 1220 (ancho), 1153,  
1110, 1050, y 977  $cm^{-1}$ ,  $\lambda_{max}$  (EtOH) 222 nm ( $\epsilon$  14100),  $\delta_H$   
( $CDCl_3$ ) 5,69 (1H, m, C2-H), 5,4 (2H, m, C10-H), 4,65 (4H,  
ancho), 4,01, (2H, t, C9'- $CH_2$ ) 2,15 (3H, s, C15- $CH_3$ ), 1,12  
(3H, d, C17- $CH_3$ ; J=6Hz), 0,96 (3H, d, C14- $CH_3$ ; J=8Hz),  $\delta_C$   
( $CDCl_3$ ) 178,1 (C1'), 166,9 (C1), 156,9 (C3), 134,5 y 129,5  
(C10 y C11), 117,6 (C2), 74,9 (C5), 71,4 (C13), 70,4 (C7),  
69,0 (C6), 64,9 (C16), 63,9 (C9'), 44,7 (C12), 43,0 (C4),  
41,9 (C8), 34,0 (C2'), 32,4 (C9), 28,9 (C4', 5' y 6'), 28,6  
10 (C8'), 25,9 (C7'), 24,7 (C3'), 20,4 (C14), 19,2 (C15), 16,7  
(C17).

Ejemplo 3

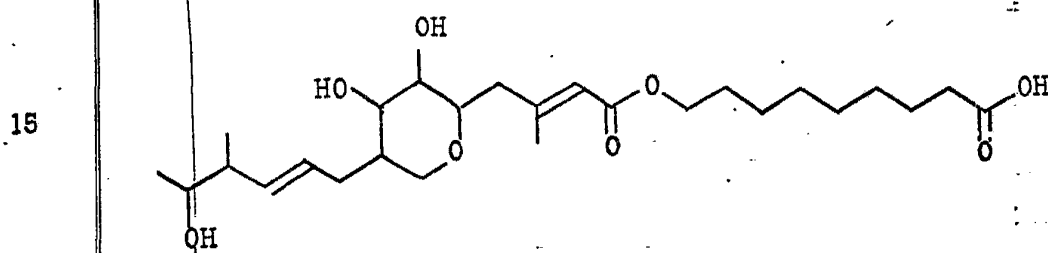
Aislamiento de pseudomonato C de metilo

15 El aceite residual obtenido de las aguas madres del  
Ejemplo 2(a) (aproximadamente 5 g.) se disolvió en metanol  
(50 ml.), se diluyó con agua (50 ml.) y el pH se ajustó a 7  
con hidróxido sódico acuoso. Después de evaporar hasta se-  
20 quedad una disolución del residuo en dimetilformamida  
(50 ml.), hexametilfosforamida (5 gotas) e ioduro de metilo  
(5 ml.) se agitó durante la noche a temperatura ambiente.  
La disolución se evaporó a sequedad y el residuo se repar-  
tió entre acetato de etilo (50 ml.) y agua (20 ml.), La  
capa orgánica se lavó con salmuera saturada, bicarbonato  
25 sódico acuoso, salmuera, se secó con ( $MgSO_4$ ) y se evaporó  
hasta dejar un aceite a partir del cual cristalizó algo  
de pseudomonato A de metilo. El aceite residual se cro-  
matografió 2 veces sobre gel de sílice (20 g., luego 15 g.,  
tipo 60), eluyendo con un gradiente de 0-4% de metanol-clo-  
roformo. Las fracciones que contenían pseudomonato C de  
30 metilo, sustancialmente puro, (Rf 0,46, en cromatografía de

1 capa fina sobre sílice, cloroformo/metanol 9:1, metilpseudomonato A, Rf 0,42) se combinaron y cromatografiaron sobre sílice (4 g., tipo 60) usando un gradiente de 0-3% de metanol-cloroformo (destilado sobre pentóxido de fósforo). Las fracciones que contenían pseudomonato C de metilo puro (por  
5 cromatografía de capa fina) se combinaron y evaporaron para dar un aceite (50 mg.) que demostró ser espectroscópica y cromatográficamente idéntico al 10,11-desoxipseudomonato A de metilo, obtenido en el Ejemplo 1.

10 Ejemplo 4

Acido pseudomónico C a partir de pseudomonato C de metilo



20 Pseudomonato C de metilo (230 mg.) del Ejemplo 3 se disolvió en DMF (25 ml.) y se diluyó con un tampón de fosfato 0,05 M (120 ml.) y entonces se agitó con levadura de panadero (6 g.) durante la noche. La mezcla se filtró, se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en acetato de etilo (50 ml.) y agua (50 ml.). La capa orgánica se lavó con agua y con las capas acuosas combinadas, se ajustaron a pH 3 (HCl 5M) y se extrajeron varias veces con acetato de etilo. Después de secar, los extractos combinados se evaporaron para dar un aceite. Por cromatografía sobre gel de sílice H (tipo 60, 8 g.) y elución con gradiente 0 a 6% de metanol-cloroformo se obtuvo el ácido pseudomónico C  
25 (150 mg., 67%) que fué cromatográfica y espectroscópicamen-  
30

1 te, idéntico al material obtenido en el Ejemplo 2.

Ejemplo 5

5 Pseudomonato C de metilo

(Procedimiento alternativo al del Ejemplo 3)

10 Las aguas madres (15 g.) del Ejemplo 2 (a) se disolvieron en acetona (150 ml.), y se agitaron durante la noche con carbonato potásico (42 g.) e ioduro de metilo (21 ml.) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se evaporó a sequedad, entonces se tomó el acetato de etilo/agua y se procesó como en el Ejemplo 3 para dar pseudomonato C de metilo.

El ester de metilo puede hidrolizarse como en el Ejemplo 4.

15

Ejemplo 6

Pseudomonato C sódico

(10,11-Desoxipseudomonato A sódico)

20

Una disolución de pseudomonato C de metilo (0,330 g.) en tetra-hidrofurano destilado (20 ml.) y una disolución de hidróxido sódico N/10 (20 ml.) se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El tetrahidrofurano se eliminó a vacío para dar una disolución acuosa turbia, que se lavó con eter-acetato de etilo para eliminar el ester que no había reaccionado. La capa acuosa se saturó con cloruro sódico, se añadió acetato de etilo y se acidificó con ácido clorhídrico diluido a pH 1,5. La capa de acetato de etilo se separó, se lavó con salmuera, se secó con (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporó a sequedad. El ácido pseudomónico C obtenido se suspendió en agua-tetrahidrofurano y se añadió una disolución

25

30

1 de hidróxido sódico N/10 a pH 7,5. La disolución acuosa re-  
sultante se evaporó a sequedad a vacío. El residuo se disol-  
vió en metanol seco (5 ml.), se filtró y el exceso de eter  
5 seco se añadió al filtrado con agitación. El precipitado  
blanco resultante de pseudomonato C sódico se recogió y  
secó a vacío (0,153 g.). El compuesto demostró ser homoge-  
neo por cromatografía de capa fina y por cromatografía de  
líquidos de alta presión,  $[\alpha]_{D}^{20}$  - 0,94 ( $c$  1,0, MeOH),  $\nu_{\max}$   
(KBr) 3400, 2800, 1700, 1640, 1560, 1230, 1150, 975  $\text{cm}^{-1}$ ,  
10  $\lambda_{\max}$  (EtOH) 221 nm ( $\epsilon$  13300),  $\delta_{\text{H}}$  (( $\text{CD}_3$ )<sub>2</sub>SO) 5,7 (1H, m,  
H vinílico), 5,3 (2H, m, -CH=CH-), 3,95 (2H, s,  $\text{CH}_2$ -9'),  
2,08 (3H, s, -CH<sub>3</sub> vinílico), 0,95 (3H, d, -CH<sub>3</sub> secundario)  
y 0,88 (3H, d, -CH<sub>3</sub> secundario).

Ejemplo 7

15 Pseudomonato C sódico

Pseudomonato C de metilo (1 g.) se disolvió en THF  
(50 ml.)/agua (50 ml.) y el pH se ajustó a 12 y se mantuvo  
durante 2<sup>1/2</sup> horas. La disolución se ajustó a pH 7 y se  
evaporó a sequedad, entonces se redisolvió en agua (30 ml.)  
20 y se lavó con acetato de etilo. La fracción acuosa entonces  
se acidificó a pH 2 y se extrajo con acetato de etilo. Des-  
pués se secó con ( $\text{MgSO}_4$ ) y los extractos combinados se eva-  
poraron a vacío. El aceite resultante (0,55 g.) se trató con  
bicarbonato sódico (95 mg., 1 eq.) en agua (20 ml.)/meta-  
nol (20 ml.) y se evaporó a sequedad. La sal sódica se di-  
25 solvió en etanol (mínimo) y se añadió, gota a gota, a eter  
(300 ml.) y el precipitado se filtró (0,58 g., 57%),  $\nu_{\max}$   
(KBr) 3380 (ancho), 1700, 1642, 1560, 1225, 1150 y 973  
 $\text{cm}^{-1}$ ,  $\lambda_{\max}$  (EtOH) 222 nm ( $\epsilon$  13700),  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CH}_3\text{OD}$ ) 1,07 (3H, d,  
 $J$  7 Hz, C17- $\text{CH}_3$ ), 1,18 (3H, d,  $J$  7 Hz, C14- $\text{CH}_3$ ), 1,44 (12H,  
30 m, -( $\text{CH}_2$ )<sub>6</sub>), 2,25 (3H, s, C15- $\text{CH}_3$ ), 4,11 (2H, s, C9- $\text{CH}_2$ ),

1 5,5 (2H n, H-10, H-11), 5,79 (1H, s, H-2),  $\delta_C$ (CD<sub>3</sub>OD) 183,0  
(C1'), 168,4 (C1), 158,9 (C3), 135,7, 129,6 (C10, C11),  
118,2 (C2), 76,2 (C5), 72,0 (C7), 71,5 (C13), 69,8 (C6),  
65,6 (C16), 64,8 (C9'), 45,2 (C12), 44,0, 43,6 (C4, C8),  
5 39,3 (C2'), 33,6 (C9), 30,7, 30,4, 30,3, 29,8, 27,7, 27,1  
(C3'-C8'), 20,3 (C14), 19,4 (C15), 16,6 (C17). (Calculado  
para C<sub>26</sub>H<sub>43</sub>O<sub>8</sub>Na.H<sub>2</sub>O: C 59,5; H 8,6; Na 4,4%. Encontrado:  
C 59,4; H 8,4; Na 4,9%).

Ejemplo 8

10

Acido pseudomónico C

15

20

25

30

Acido pseudomónico A (500 mg.) se disolvió en 2,2-dimetoxipronano (20 ml.) y acetato de etilo (20 ml.), entonces se añadió ácido p-toluensulfónico (unos pocos cristales). La disolución se agitó durante 1 hora y entonces se lavó con salmuera y se secó con (MgSO<sub>4</sub>). Después de evaporar el disolvente a vacío, el residuo se disolvió en agua-metanol (1:1, 20 ml.) y se añadió bicarbonato potásico (100 mg., 1 eq.). Los disolventes se eliminaron a vacío, se añadió selenocianato potásico (432 mg., 3 eq.), alcohol terc-amílico-agua (9:1, 15 ml.) y la reacción se calentó a reflujo durante 4 días. Después de filtrar, la disolución se evaporó a sequedad, se añadió agua (20 ml.) y la disolución se ajustó a pH 2 (HCl-5M) bajo una capa de acetato de etilo (20 ml.). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo, otra vez, con acetato de etilo (3 x 20 ml.). Los extractos combinados se secaron con (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporaron para dar un aceite que se redisolvió en 80% de ácido acético (10 ml.) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La disolución se evaporó a sequedad y el aceite residual se cromatografió sobre sílice (10 g.), eluyendo con 0 a 6% de metanol-cloroformo. Las fracciones que contenían

1 producto puro (por cromatografía de capa fina) se combina-  
ron y evaporaron para dar ácido pseudomónico C (280 mg.,  
58%)

5 Ejemplo 9

Acido pseudomónico C

10 Acido pseudomónico A (500 mg.) se disolvió en 2,2-  
dimetoxiprocano (50 ml.) y se trató con ácido p-toluensulfó-  
nico (unos pocos cristales). Después de 1 hora, la disolu-  
ción se diluyó con acetato de etilo, se lavó con salmuera  
y se secó con (MgSO<sub>4</sub>). La disolución se evaporó a vacío y  
el residuo se redisolvió en agua-metanol (1:1, 20 ml.) y  
se añadió bicarbonato potásico (100 mg., 1 eq.). Los disolven-  
tes se eliminaron a vacío, se añadió selenocianato potásico  
15 (432 mg., 3 eq.) y se añadió alcohol iso-hexílico-agua  
(9:1, 15 ml.) y la reacción se calentó a reflujo durante 4  
días. Después de filtrar, la mezcla de reacción se diluyó  
con acetato de etilo (20 ml.) y se extrajo con bicarbonato  
sódico acuoso (3 x 20 ml.). Los extractos acuosos se combi-  
naron y acidificaron con ácido acético bajo una capa de  
20 acetato de etilo (20 ml.). Después de agitar durante 1 ho-  
ra, aproximadamente, la capa orgánica se separó y la capa  
acuosa se extrajo, otra vez, con acetato de etilo (3 x 20  
ml.). Los extractos combinados se lavaron con salmuera, se  
secaron con (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporaron para dar un aceite. Por  
25 cromatografía del aceite sobre sílice (5 g.) se obtuvo ácido  
pseudomónico C (215 mg. 45%).

Ejemplo 10

Pseudomonato C de metilo

30 Pseudomonato A de metilo (5,14 g.), selenocianato

1 potásico (4,32 g.) en alcohol iso-hexílico-agua (9:1, 150  
ml.) se calentaron a reflujo durante 3 días. La mezcla de  
reacción se filtró, se evaporó a sequedad y se disolvió en  
5 acetato de etilo (50 ml.)-salmuera (50 ml.). La capa orgá-  
nica se separó, se lavó con salmuera (50 ml.) y se secó con  
(MgSO<sub>4</sub>). Después de la evaporación de los disolventes a va-  
cio, el residuo se cromatografió sobre sílice (80 g.) elu-  
yendo con 0-4% de metanol-cloroformo. Las fracciones puras  
se combinaron y evaporaron para dar un aceite que, dejándolo  
10 estar, dió un pseudomonato C de metilo cristalino, p.f.  
47-9°C (2,57 g., 52%). (Calculado para C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>8</sub>: C 65,0;  
H 9,3%. Encontrado: C 65,0; H 9,5%.)

Ejemplo 11

Pseudomonato C de metilo y ácido pseudomónico C

15 Pseudomonato A de metilo (514 mg.) se disolvió en  
2,2-dimetoxipropano (20 ml.) y se añadieron unos pocos cris-  
tales de ácido p-toluensulfónico. La disolución se agitó  
durante 1/2 hora y entonces se añadió acetato de etilo (20  
ml.) y la disolución se lavó con salmuera y se secó con  
20 (MgSO<sub>4</sub>). Después de evaporar los disolventes, el acetónido  
se disolvió en alcohol terc-amílico-agua (9:1, 15 ml.), se  
añadió selenocianato potásico (432 mg.) y la reacción se ca-  
lentó a reflujo durante 5 días. La disolución se filtró, se  
evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en acetato de  
etilo (20 ml.)-salmuera (20 ml.). La capa orgánica se sepa-  
25 ró y la capa acuosa se extrajo, otra vez, con acetato de eti-  
lo (3 x 20 ml.). Los extractos combinados se secaron con  
(MgSO<sub>4</sub>) y se evaporaron a sequedad. El producto bruto conte-  
nia dos compuestos mayoritarios (sobre cromatografía de capa  
fina), que se separaron por cromatografía de columna sobre  
30 sílice (10 g.), eluyendo con 0-8% de metanol-cloroformo. La

1 primera fracción se identificó como 6,7-0-isopropiliden  
pseudomonato C de metilo (206 mg., 38%),  $\nu_{\max}(\text{CHCl}_3)$  3450,  
1722, 1643 y 1220  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\delta_{\text{H}}(\text{CDCl}_3)$  0,98 (3H, d,  $\underline{J}$  7 Hz,  
5 C17- $\underline{\text{CH}}_3$ ), 1,13 (3H, d,  $\underline{J}$  7 Hz, C14- $\underline{\text{CH}}_3$ ), 1,33 (15H, m,  
(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>, acetónido  $\underline{\text{CH}}_3$ ), 1,48 (3H, s, acetónido  $\underline{\text{CH}}_3$ ), 2,18  
(3H, s, C15- $\underline{\text{CH}}_3$ ), 3,63 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4,05 (2H, t, C9'- $\underline{\text{CH}}_2$ ),  
5,45 (2H, m, H-10, H-11), 5,73 (1H, s, H-2),  $\delta_{\text{C}}(\text{CDCl}_3)$   
174,0 (C1'), 166,6 (C1), 156,2 (C3), 135,0, 128,9 (C10, C11),  
117,8 (C2), 108,7 ( $\text{>C<}$ ), 76,5 (C5), 76,7 (C7), 74,3  
10 (C6), 71,0 (C13), 66,5 (C16), 63,7 (C9'), 51,3 (OCH<sub>3</sub>), 44,6  
(C12), 44,1 (C4), 37,9 (C8), 34,2 (C2'), 34,1 (C9), 29,1  
(C4', 5', 6'), 28,8 (C8'), 28,3, 26,3 ( $\text{>C<}$   $\begin{matrix} \text{Me} \\ | \\ \text{C} \\ | \\ \text{Me} \end{matrix}$ ), 26,0  
15 (C7'), 24,9 (C3'), 20,3 (C14), 19,1 (C15), 16,4 (C17), m/e  
(intensidad relativa) 523 (6%), 494 (19), 436 (22), 369 (30)  
306 (22), 299 (20). (Calculado para  $\text{H}^+-\text{CH}_3$ : 523,3257. Encon-  
trado: 523,3263). La segunda fracción se identificó como  
ácido 6,7-0-isopropiliden pseudomónico C (130 mg., 25%).  
20  $\nu_{\max}(\text{CHCl}_3)$  2300-3600 (ancho), 1702, 1642, 1220, 1152 y  
1052  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\delta_{\text{H}}(\text{CDCl}_3)$  0,98 (3H, d,  $\underline{J}$  7 Hz, C17- $\underline{\text{CH}}_3$ ), 1,14  
(3H, d,  $\underline{J}$  7 Hz, C14- $\underline{\text{CH}}_3$ ), 1,33 (15H, m, (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>, acetónido  
 $\underline{\text{CH}}_3$ ), 1,49 (3H, s, acetónido  $\underline{\text{CH}}_3$ ), 2,18 (3H, s, C15- $\underline{\text{CH}}_3$ ),  
4,06 (2H, t, C9'- $\underline{\text{CH}}_2$ ), 5,45 (2H, m, H-10, H-11), 5,73 (1H,  
s, H-2),  $\delta_{\text{C}}(\text{CDCl}_3)$  178,1 (C1'), 166,7 (C1), 156,1 (C3),  
134,9, 129,0, (C10, C11), 117,8 (C2), 108,7 ( C ), 76,4  
25 (C5), 75,6 (C7), 74,2 (C6), 71,2 (C13), 66,4 (C16), 63,8  
(C9'), 44,4 (C12), 44,0 (C4), 36,8 (C8), 34,0 (C2'), 33,7  
(C9), 29,0 (C4', 5', 6'), 28,7 (C8'), 28,3, 26,2  
30 ( $\text{>C<}$   $\begin{matrix} \text{Me} \\ | \\ \text{C} \\ | \\ \text{Me} \end{matrix}$ ), 25,9 (C7'), 24,7 (C3'), 20,1 (C14), 19,0 (C15),  
16,4 (C17), m/e (intensidad relativa) 509 (7%), 480 (10),

1 422 (10), 404 (8), 394 (10), 387 (7), 383 (8). (Calculado  
para  $M^+-CH_3$  509,3108. Encontrado 509,3110). Los acetónidos  
se convirtieron, cuantitativamente, en pseudomonato C de  
5 metilo y ácido pseudomónico C, respectivamente, con 80% de  
ácido acético, durante la noche.

### Ejemplo 12

#### Pseudomonato C de metilo

10 Ioduro sódico (600 mg. 4 eq.) (secado a  $110^{\circ}C/4$  ho-  
ras) se agitó en THF seco (1 ml.) y acetonitrilo seco (1 ml.)  
y se añadió anhídrido trifluoroacético (141 l, 1 eq.). Des-  
pués de 5 minutos, la disolución amarilla se enfrió en hie-  
lo y se añadió pseudomonato A de metilo (514 mg.). Después  
de 5 minutos, el baño de hielo se eliminó y la reacción se  
15 agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla  
de reacción se diluyó con bisulfito sódico acuoso y se extra-  
jo con acetato de etilo (4 x 25 ml.). Los extractos combi-  
nados se lavaron con salmuera, se secaron con  $(MgSO_4)$  y se  
evaporaron para dar un aceite que se cromatografió sobre  
sílice (5 g.). Las fracciones puras (cromatografía de capa  
20 fina, y cromatografía de líquidos de alta presión) se com-  
binaron y evaporaron para dar el producto deseado (63 mg.,  
13%)

### Ejemplo 13

#### Pseudomonato C de isohexilo

25 Pseudomonato A de metilo (10 g.) y selenocianato  
potásico (4,32 g., 1,5 eq.) en 2-etil-n-butanol (alcohol  
isohexílico)-agua (9:1, 150 ml.) se calentaron a reflujo du-  
rante 2 días. La disolución se filtró y evaporó y el residuo  
30 se redisolvió en acetato de etilo/agua. La capa orgánica se

1 separó, se lavó con salmuera, entonces se secó con (MgSO<sub>4</sub>)  
y el disolvente se eliminó a vacío. El producto bruto se  
cromatografió sobre sílice (100 g.), eluyendo con 0 a 6%  
de MeOH-CHCl<sub>3</sub>. Las fracciones que contenían pseudomonato C  
5 de metilo, puro, se combinaron y evaporaron para dar un  
aceite que cristalizó dejándolo estar; p.f. 47-9°C (2,2 g.)  
Las fracciones restantes se combinaron y recromatografiaron  
para dar un compuesto puro, identificado después como pseu-  
domonato C de isohexilo (1,0 g.)  $\nu_{\max}$  (CHCl<sub>3</sub>) 3400 (an-  
cho), 1703, 1640, 1427, 1220, 1150, 1020 y 978 cm<sup>-1</sup>,  $\delta_H$   
10 (CDCl<sub>3</sub>) 0,94 (6H, t, (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,97 (3H, d, C17-CH<sub>3</sub>),  
1,14 (3H, d, C14-CH<sub>3</sub>), 1,32 (12H, m, -(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-), 2,19 (3H,  
s, C15-CH<sub>3</sub>), 3,95 (2H, d, OCH<sub>2</sub>CHEt<sub>2</sub>), 4,05 (2H, t, C9'-  
CH<sub>2</sub>), 5,45 (2H, m, H-10, H-11) 5,75 (1H, s, H-2),  $\delta_c$  (CDCl<sub>3</sub>)  
174,0 (C1'), 166,9 (C1), 157,2 (C/), 134,4, 129,0 (C10, C11)  
15 117,8 (C2), 75,0 (C5), 71,2 (C13), 70,4 (C7), 68,8 (C6),  
66,3 (OCH<sub>2</sub>CHEt<sub>2</sub>), 64,9 (C16), 63,8 (C9'), 44,4 (C12), 43,2  
(C4), 42,1 (C8), 40,5 (OCH<sub>2</sub>CHEt<sub>2</sub>), 34,4 (C2'), 32,5 (C9),  
29,1 (C4', C5', C6'), 28,8 (C8'), 26,0 (C7'), 25,0 (C3'),  
23,4 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) 20,3 (C14), 19,2 (C15), 16,4 (C17), 11,0  
20 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

DATOS BIOLÓGICOS

(1) Actividad antibacteriana-organismos humanos

25 La Tabla 1 muestra el espectro antibacteriano del pseu-  
domonato C sódico y el pseudomonato C de metilo en térmi-  
nos de concentración inhibitoria mínima ( $\mu$ g/ml) medida  
por dilución seriada en un nutriente de agar conteniendo  
5% de sangre de caballo chocolateada.

30

TABLA 1

1

5

10

15

20

25

30

ORGANISMO	C.I.M. (μg/ml)	
	pseudomona- to C sódico	pseudomona- to C de metilo
E. coli NCTC 10418	>100	>100
E. coli ESS	1,0	2,5
P. mirabilis 889	>100	>100
K. aerogenes A	>100	>100
Ps aeruginosa NCTC 10701	>100	>100
Pasteurella multocida 1633	1,0	2,5
Haemophilus influenzae Q1	0,1	< 0,2
Haemophilus influenzae Wy 21	0,1	0,5
Neisseria flavescens 6633	0,2	0,5
Bacillus subtilis	0,02	< 0,2
Corynebacterium xerosis 9755	>100	>100
Sarcina lutea	>100	>100
Staph. aureus Oxford	0,1	< 0,2
Staph. aureus Russell	0,2	0,5
Staph. aureus 1517	0,2	0,5
Strep. faecalis I	100	>100
Strep. Pyogenes A 64/848	0,1	1,0
Strep. Pyogenes B 2788	2,5	1,0
Strep. Pyogenes C 2761	0,2	1,0
Strep. pneumoniae GN33	0,1	0,1

(2) Actividad anti-micoplasma

El pseudomonato C de metilo posee buena actividad anti-micoplasma in vitro contra micoplasmas de fuentes humanas

1 y veterinarias, como muestra la Tabla 2.

Método

5 (1) Las concentraciones inhibitorias mínimas (C.I.M.) de  
pseudomonato C de metilo se determinaron en placas Micro-  
titre, por una modificación del test de inhibición metabó-  
lica (Taylor-Robinson, 1967). Los compuestos se diluyeron  
10 seriadamente en agua estéril y desionizada para dar un in-  
tervalo de concentraciones de 250-0,5 g/ml. Se añadió  
el caldo de micoplasma conteniendo 1% (peso/volumen) de glu-  
cosa y 0,005% (peso/volumen) de rojo fenon, para compensar  
la dilución producida por la disolución acuosa de la droga.  
Entonces se añadieron a cada concentración de la droga uni-  
15 dades de micoplasma formadas por colonias de, aproximadamen-  
te,  $10^4$ . En cada placa se incluyeron inóculos infectados  
sin droga, no infectados y de control de pH. Las placas  
se cerraron con cinta de celofán y se incubaron a 37°C du-  
rante 7 días. La C.I.M. fué la concentración mas baja del  
compuesto, que evitó un cambio de color en el cultivo de  
micoplasma, causado por el metabolismo.

20

Referencia

Taylor-Robinson, 1967. Micoplasmas de varios huéspedes y  
sus sensibilidades antibióticas. Post. Grad. Med. J., 43  
25 Suppl. [ March ], 100.

---

---

---

---

25

30

1

TABLA 2

MICOPLASMA	C.I.M. (µg/ml)
M. gallisepticum S.6	62,5
M. synoviae 25204	<0,5
M. pulmonis JB	<0,5
M. suipneumoniae Laber	<0,5
M. pneumoniae 427a	1,0
M. fermentans MW KL4	<0,5

5

10

La Tabla 3 muestra los valores de C.I.M. para el pseudomonato C sódico y el pseudomonato C de metilo contra mas especies de micoplasmas determinadas en caldo de Frii usando el método microtiter.

15

TABLA 3

ORGANISMO	C.I.M. (µg/ml)	
	Pseudomona- to C de me- tilo	Pseudomona- to C sódico
M. suipneumoniae Str. 11	>10	>10
M. suipneumoniae J2206/183b	>10	10
M. dispar H225	10	5,0
M. dispar NCTC 10125	50	2,5
M. pneumoniae 427a	>10	2,5
M. pneumoniae ATCC 15492	10	--
M. fermentans MWKL4	0,039	<0,02
M. pulmonis JB	0,312	0,039

20

25

30

1

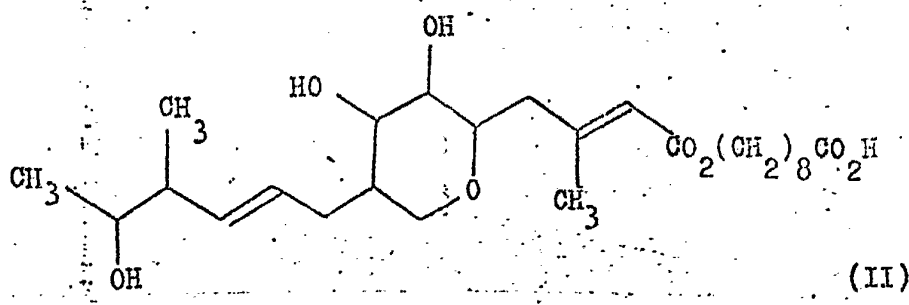
En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

5

1. Un procedimiento para la preparación de derivados del ácido pseudomónico de fórmula (II).

10



15

o una sal o éster del mismo farmacéuticamente aceptable; cuyo procedimiento comprende cultivar Pseudomonas fluorescens bajo condiciones aeróbicas o en un medio de cultivo conteniendo sales inorgánicas y fuertes de carbono y nitrógeno asimilables, hasta que el medio de cultivo presenta, al menos una actividad antibacteriana detectable, acidificación del medio de cultivo, extracción, con un disolvente orgánico de los materiales activos disueltos en el medio de cultivo y, después, separar el ácido pseudomónico C o una sal del mismo de cualesquiera otros materiales activos y, opcionalmente, someter a posterior reacción de esterificación, el ácido separado.

25

2. 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 DEL ACIDO PSEUDOMONICO.

30

1            Todo conforme queda descrito y reivindicado en la  
presente memoria descriptiva que consta de treinta y una  
página mecanografiada.

5            Madrid, 2 Mayo 1.979

BERNARDO HUNGRIA

P. P.



10

15

20

25

30

