



ESPAÑA

19 ES	11 21	NUMERO 480.721	10 A1
	22	FECHA DE PRESENTACION 18 Mayo 1.979	

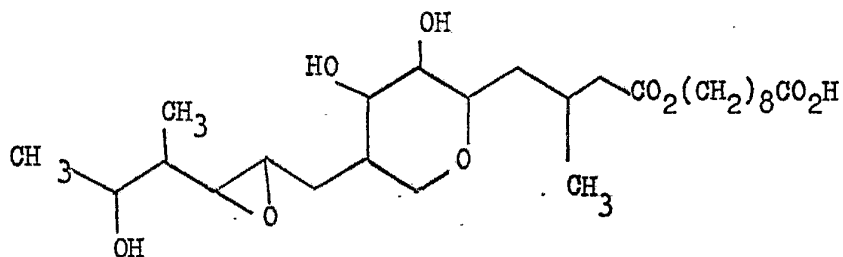
PATENTE DE INVENCION

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

50 PRIORIDADES:		
51 NUMERO	52 FECHA	53 PAIS
20958/78	20 Mayo 1.978	GRAN BRETAÑA
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D 13/02 / A61K31/71	
54 TITULO DE LA INVENCION		
UN PROCEDIMIENTO PARA AISLAR PSEUDOMONATO DE LITIO.		
71 SOLICITANTE (S)		
BEECHAM GROUP LIMITED		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Beecham House, Great West Road, Brentford, Middlesex, GRAN BRETAÑA.		
72 INVENTOR (ES)		
Alan David Curzons, de nacionalidad británica.		
73 TITULAR (ES)		
El mismo solicitante.		
74 REPRESENTANTE		
DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU		

1 Esta invención se refiere a una nueva sal de un compuesto antibacteriano y a un procedimiento para su preparación.

5 El ácido pseudomónico es el compuesto de fórmula (I):



10 Este compuesto está descrito en la patente británica n° 1.395.907 como poseedor de actividad antibacteriana y, por lo tanto, es útil en el tratamiento de las infecciones bacterianas en el hombre y los animales. El método descrito en la patente británica n° 1.395.907 para la preparación del ácido pseudomónico consiste en aislar una mezcla que contiene los componentes ácidos que constituyen el principio activo, de un medio de cultivo o de un medio en el que se ha cultivado Pseudomonas fluorescens en condiciones aerobias y después separar el ácido de la mezcla por cromatografía.

20 Ahora se ha hallado que el ácido pseudomónico puede ser aislado directamente de un extracto del caldo de fermentación, en forma de su sal de litio.

25 La sal de litio del ácido pseudomónico (a la que nos referiremos aquí como pseudomonato de litio) es un compuesto nuevo y constituye un aspecto de esta invención. Aunque la patente británica n° 1.395.907 describe la sal sódica del ácido pseudomónico, no describe ni prevé el uso de la sal de litio. Mientras la sal sódica es un compuesto amorfo e higroscópico, sorprendentemente el pseudomonato de litio es estable, cristalino y no higroscópico. Además, la sal de li-

30

1 tio es mucho menos soluble que la sal sódica. Estas propie-
dades no podían deducirse de la patente británica número
1.395.907 y hacen del pseudomonato de litio un intermediario
útil en el aislamiento o purificación del ácido pseudomónico.

5 Por consiguiente, en un segundo aspecto, esta inven-
ción proporciona un procedimiento de aislamiento del pseudo-
monato de litio de una preparación cruda que contiene ácido
pseudomónico, cuyo procedimiento consiste en extraer la pre-
paración cruda con un disolvente orgánico polar, no miscible
10 con agua, en el que sea soluble el ácido pseudomónico, tra-
tar el extracto con una sal de litio que sea por lo menos li-
geramente soluble en el disolvente no miscible con agua y
separar el pseudomonato de litio resultante.

15 Después el pseudomonato de litio puede convertirse
en el ácido libre, ácido pseudomónico, o en una sal diferen-
te de este último, por técnicas convencionales.

20 El procedimiento de esta invención es especialmente
adecuado para aislar ácido pseudomónico, en forma de su sal
de litio, de medios de cultivo o de medios en los que se han
cultivado cepas de bacterias productoras de ácido pseudomóni-
co. En este caso, la forma más adecuada de llevar a cabo el
procedimiento es la siguiente.

25 Una bacteria productora de ácido pseudomónico, en
general una cepa de bacterias de la familia Pseudomonas, se
cultiva por un método habitual en condiciones aerobias o en
un medio de cultivo adecuado. Estos medios de cultivo son
conocidos en general y contienen sales inorgánicas y fuentes
de nitrógeno y carbono asimilables. En el caso más adecuado,
30 la bacteria utilizada es la Pseudomonas fluorescens. Una cepa
adecuada a disposición del público es la Pseudomonas fluorescens

1 NC1B 10586. Se deja que el microorganismo se desarrolle has-
ta que hay presente en el medio de cultivo una cantidad ade-
cuada de ácido pseudomónico. Después pueden separarse las
partículas sólidas del medio por filtración o centrifugación
5 para producir un líquido transparente. El pH del líquido trans-
parente se ajusta a 3,0-5,0, adecuadamente alrededor de 4,5.

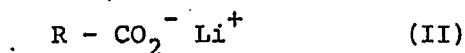
Esta solución acuosa acidulada se extrae después con
un disolvente orgánico polar, no miscible con agua. Se prefie-
ren los disolventes apróticos. El disolvente debe tener una
10 polaridad suficiente para disolver adecuadamente al ácido
pseudomónico. Los disolventes adecuados son acetato de etilo,
butanol, metilisobutilcetona y dicloruro de metileno. Alter-
nativamente, pueden emplearse mezclas disolventes tales como
éster conteniendo alrededor de 5 % de etanol. Un disolvente
15 preferido es la metilisobutilcetona.

El volumen de disolvente utilizado para la extrac-
ción debe ser mínimo, garantizando al mismo tiempo una bue-
na separación física entre las dos fases. Cuando se extrae
un líquido de cultivo, un volumen adecuado es de la mitad
20 a la sexta parte, preferiblemente la cuarta parte, del volu-
men del líquido a extraer.

Frecuentemente es ventajoso lavar el extracto con
salmuera, por ejemplo utilizando un décimo del volumen del
extracto, con objeto de reducir el agua contenida en el ex-
tracto.
25

La siguiente etapa del procedimiento consiste en
tratar el extracto con una sal de litio. La sal de litio
empleada, en el mejor de los casos, debe ser más soluble
en el disolvente que el pseudomonato de litio. Preferible-
mente es la sal de litio de un ácido carboxílico orgánico,
30

1 por ejemplo una sal de un ácido alcanoico de fórmula (II):



donde R es un grupo alquilo, por ejemplo de 1 a 20 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 8 átomos de carbono.

5 Son ejemplos de sales de litio adecuadas el acetato, propionato o hexanoato, siendo una sal preferida el 2-etilhexanoato de litio.

10 La sal de litio puede agregarse al extracto en forma sólida pero es preferible agregarla como solución concentrada en un co-disolvente que disuelve a la sal de litio pero que no solubiliza sustancialmente al pseudomonato de litio. Entre estos co-disolventes se encuentran el etanol y, preferiblemente, el metanol.

15 En general, se prefiere utilizar un exceso de aproximadamente el 10 % de sal de litio y agregar lentamente una solución de la sal al extracto. En la mayoría de los casos, el pseudomonato de litio cristaliza y se separa, proceso que es facilitado enfriando a 0-5°C aproximadamente. El pseudomonato de litio puede ser separado por técnicas convencionales. Después de separar una primera masa de pseudomonato de litio, puede ser conveniente concentrar y separar una segunda masa.

25 Como el pseudomonato de litio no es higroscópico, puede ser secado en una estufa de aire. Esto no es posible con el pseudomonato sódico ni siquiera con el ácido pseudomónico propiamente dicho, que es difícil de secar salvo en una estufa a vacío o muy cuidadosamente a temperatura baja.

30 El pseudomonato de litio puede convertirse en las sales o en el ácido libre por técnicas convencionales, por ejemplo por acidulación y extracción en un disolvente orgá-

1 nico.

La invención es ilustrada mediante los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1

5

Aislamiento de pseudomonato de litio

10

Un medio de cultivo que contiene ácido pseudomónico se acidula a pH 4,5 con ácido clorhídrico al 20 % y se extrae con un cuarto de su volumen de metilisobutilcetona. El extracto en metilisobutilcetona se lava con un décimo de su volumen de salmuera saturada. El contenido de ácido pseudomónico en este momento es de 2500 µg/ml y el contenido de agua es del 1,0 %.

15

A 10 litros del extracto en metilisobutilcetona se añade gota a gota una solución de 9,0 g de etilhexanoato de litio en 35 ml de metanol, a lo largo de un periodo de media hora y a la temperatura ambiente y la mezcla se agita durante una hora más a 20°C y después durante una hora a 5°C. El precipitado se aísla por filtración, se lava con metilisobutilcetona y se seca al aire a 50°C para dar pseudomonato de litio, p.f. 169°C, rendimiento: 26,5 g (90 %), pureza: 87 %.

20

EJEMPLO 2

Conversión en ácido pseudomónico

25

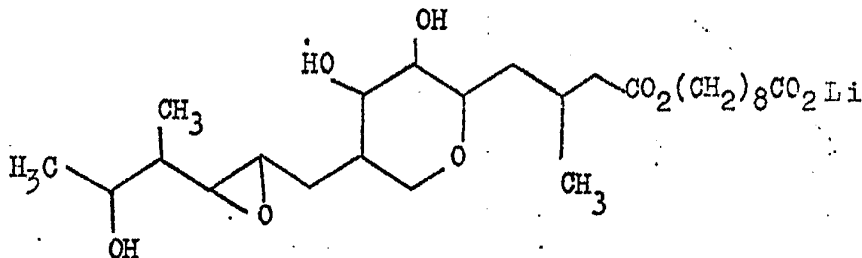
Se disuelven 10 g del pseudomonato de litio del Ejemplo 1 en 200 ml de agua. Se añaden 85 ml de metilisobutilcetona y el pH se ajusta a 4,0 con ácido clorhídrico 4N. Se separa la capa superior de metilisobutilcetona, se seca sobre sulfato sódico anhidro y el ácido libre se precipita por adición de 130 ml de heptano. Después de enfriar a 5°C, el ácido pseudomónico se aísla por filtración, p.f. 77-78°C, rendimiento: 8,0 g (85 %), pureza: 90 %.

30

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

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para aislar pseudomonato de li-
tio de fórmula



de una preparación cruda que contiene ácido pseudomónico,
que comprende:

15 a) extraer la preparación cruda con un disolvente or-
gánico polar, no miscible con agua, en el que es soluble el
ácido pseudomónico;

b) hacer reaccionar el extracto procedente de la eta-
pa anterior con una sal de litio que sea por lo menos ligera-
mente soluble en el disolvente no miscible con agua;

20 c) separar el pseudomonato de litio procedente de
la etapa anterior; y

d) opcionalmente, someter a reacción de hidrólisis
el pseudomonato de litio obtenido para producir ácido pseudo-
mónico.

25 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde
la preparación cruda que contiene ácido pseudomónico es un me-
dio de cultivo o un medio en el que se han cultivado cepas
de bacterias productoras de ácido pseudomónico.

3. Un procedimiento según la reivindicación 2, donde
las bacterias son del género Pseudomas fluorescens.

30 4. Un procedimiento según cualquiera de las reivin-

1

dicaciones 1 a 3, donde la sal de litio con la que se trata el extracto es una sal de un ácido alcanoico de fórmula $R-CO_2^-Li^+$, donde R es un grupo alquilo de 1 a 20 átomos de carbono.

5

5. Un procedimiento según la Reivindicación 4, donde la sal de litio es 2-etilhexanoato de litio.

6. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde se efectúa la etapa d) de hidrólisis para obtener el ácido pseudomónico.

10

7. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita por: UN PROCEDIMIENTO PARA AISLAR PSEUDOMONATO DE LITIO.

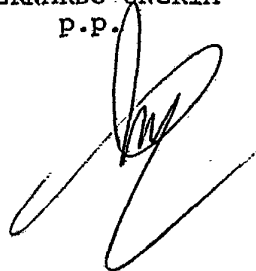
Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de ocho páginas mecanografiadas.

15

Madrid, 18 de Mayo de 1.979

BERNARDO UNGRIA
P.P.

20



25

30