

- 3 NOV. 1959

252350



252350

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

PATENTE DE INVENCION

EN

ESPAÑA

por VEINTE años

a nombre de EMI LILLY AND COMPANY, entidad norteamericana establecida en 740 Alabama Street, Indianápolis, Indiana, Estados Unidos de América, por:

"UN METODO DE PRODUCIR TILOSINA O DESMICOSINA"

Este invento se refiere a nuevos compuestos orgánicos. Más en particular, se refiere a nuevos compuestos orgánicos nitrogenados y a procedimientos para su preparación.

El invento proporciona un método de producción de Tilosina o Desmicosina que comprende el cultivo de una cepa de Streptomyces fradiae productora de Tilosina, en un medio de cultivo que contenga fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, en condiciones aerobias sumergidas hasta que se produzca por dicho organismo una cantidad considerable de Tilosina en el citado medio de cultivo y, si se desea, hidrolizando con áci-

5

10



252350

do para formar Desmicosina.

El invento proporciona además un método de producción de Tilosina, que comprende el cultivo de una cepa de Streptomyces fra-
diac productora de Tilosina en un medio de cultivo que contenga
5 fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, en
condiciones aerobias sustridas hasta que se produzca una cantidad
considerable de Tilosina por dicho organismo en el citado medio
de cultivo, y la recuperación de la Tilosina de dicho medio de cul-
tivo.

10 Mediante este invento se consiguen nuevas bases orgánicas
que se han designado arbitrariamente y se citan aquí con el nom-
bre de Tilosina y Desmicosina. Las nuevas bases poseen propieda-
des químicas, farmacológicas y antimicrobianas estrechamente re-
lacionadas. La hidrólisis ácida de la Tilosina da lugar a la for-
15 mación de Desmicosina mediante la eliminación de la molécula de
Tilosina de una unidad de azúcar que es la nicaxosa. Las dos nue-
vas bases forman derivados acilados y sales catiónicas, que se ha-
llan comprendidos en este invento. Las propiedades químicas, fí-
sicas, y otras propiedades de las nuevas bases orgánicas, según
20 se describen aquí en lo que sigue, identifican a los compuestos y
los diferencian de los compuestos anteriormente conocidos o des-
critos.

La Tilosina en forma de base libre tiene las caracterís-
ticas siguientes: Es un sólido blanco. Cristaliza fácilmente en
25 forma de placas pequeñas de una serie de disolventes de cristali-
zación como por ejemplo la acetona acuosa, alcoholes inferiores
acuosos, como por ejemplo el etanol acuosa y agua. La base libre,
que presenta solubilidad inversa, puede cristalizarse de agua di-
solviéndola en agua a una temperatura de unos 2° C y calentando
30 gradualmente la solución a temperatura ambiente o algo superior,

252350



con lo cual, se separa la Tilosina en forma cristalina. Los cristales secos de Tilosina funden a unos 127-132° C.

La base libre de la Tilosina es soluble en soluciones acuosas ligeramente ácidas, por ejemplo, ácido acético acuoso al 5 por 100. Además es soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos polares siendo ejemplos de los mismos las cetonas inferiores como la acetona, metil-etil-cetona y metil-isobutil-cetona, los alcoholes inferiores como el metanol y etanol, los ésteres inferiores como el acetato de etilo y formiato de etilo, los hidrocarburos halogenados como el cloruro de acetileno y cloroformo, éteres como el éter dietílico, disolventes orgánicos que contengan nitrógeno como la diaetil-formamida, piridina y trietilamina y los disolventes orgánicos heterocíclicos como el tetrahidrofurano y tiofeno. Es soluble en benceno mientras que es relativamente insoluble en los disolventes no polares del tipo de los hidrocarburos alifáticos, por ejemplo, hexano y heptano. Es débilmente soluble en agua y en soluciones acuosas débilmente alcalinas.

La base libre de la Tilosina es relativamente estable en solución en una zona de PH entre pH 4 a pH 9, mientras que es inestable en soluciones fuertes ácidas y fuertemente básicas. Cuando la Tilosina se trata con una solución ácida que tenga un pH inferior aproximadamente a 4, tiene lugar rápidamente la degradación de la base libre, produciendo Desmicosina y un fragmento de hidrato de carbono que, según se indicó anteriormente, es micarosa.

Una valoración electrométrica de la Tilosina en solución en diaetilformamida-agua (2:1 partes en volumen) revela la presencia de un grupo valorable de $pK'a = 7,0$.

El peso molecular determinado a partir de los datos de la valoración es, aproximadamente, 931 \pm 30.

Un análisis de la solubilidad de la base cristalina en

252350



agua indicó que la Tilosina era soluble en una extensión de 5,0 mg/ml a 25,0° C.

Una media de diversos análisis elementales de la base cristalina seca en vacío a unos 80° C sobre pentóxido de fósforo dió los siguientes valores:

Carbono	58,58 %
Hidrógeno	8,53 %
Nitrógeno	1,55 %
Oxígeno (por diferencia)	30,24 %

Los datos anteriores indican una fórmula empírica de $C_{46}H_{77}NO_{13}$, pero como se comprenderá, esta fórmula solamente es una aproximación y puede someterse a ligeras revisiones cuando se aclare la estructura molecular completa del compuesto.

La curva de absorción en el infrarrojo a la base cristalina libre en cloroformo se representa en la figura I de los dibujos adjuntos. Las bandas que pueden distinguirse en el aspecto infrarrojo en la zona de $2,0 \mu$ a $15,0 \mu$ son las siguientes: 2,85, 3,35, 3,41, (salientes a 3,47, 3,52 y $3,58 \mu$), 3,66, 5,80, 5,84, 5,27, 5,88, 7,09, 7,27, 7,36, 7,31, 7,90, 8,45, 8,52, 8,75, 8,95, 8,28, 9,53, 9,85, 10,04, 10,13, 10,40, 10,30, 11,10, 11,53 y 11,91.

Un espectro de absorción en el ultravioleta de la Tilosina en agua presenta un máximo de absorción intenso aproximadamente a 280 m μ , con una extinción molar de $E_1^{1\%} = 241$.

La rotación óptica específica de una muestra de la base libre cristalizada de la Tilosina desecada a temperatura ambiente en vacío sobre cloruro cálcico anhidro durante unas 15 horas es la siguiente: $[\alpha]_D^{250} = -45,3^{\circ}$; $c = 2\%$ en metanol (peso por volumen).

25 23 50



Un diagrama de difracción con rayos X, en polvo, utilizando como radiación el cobre sin filtro y un valor de longitud de onda de 2,2915 Å para calcular las distancias reticulares dió los siguientes valores:

	<u>" d "</u>	<u>I/I₁</u>
	7.72	0.40
	5.50	1.00
	5.12	0.40
10	5.74	0.40
	5.16	0.40
	4.71	0.03
	4.54	0.15
	4.37	0.60
15	4.23	0.02
	4.12	0.03
	3.84	0.12
	3.68	0.12
	3.63	0.12
20	3.47	0.12
	3.31	0.03
	3.18	0.12
	3.05	0.02
	2.97	0.20
25	2.84	0.02
	2.74	0.04
	2.68	0.04
	2.47	0.02
	2.39	0.04
30	2.33	0.04



2,25	0.04
2.14	0.02
2.032	0.02
1.908	0.02

252350

5 Los ensayos químicos realizados con la base libre cristalina demuestran la presencia de grupos acetoxilo, hidroxilo, N-metilo y O-metilo. La base libre de ensayos positivos de Molisch y de antrona da la presencia de hidratos de carbono. Decolora la solución de permanganato. La base cristalina da resultados negativos en los ensayos de ninhidrina, biuret y de proteína de Sakaguchi, da ensayo negativo con cloruro férrico de grupos fenólicos y da ensayo del maltol.

15 La cromatografía de la base de Tilosina cristalizada sobre papel Whatman no. 1 produce los siguientes valores del R_f : $R_f = 0,35$ en un disolvente formado por agua que contenía 7 por 100 de sulfato magnésico (peso-volumen) y 2,5 por 100 de metil-etil-cetona (volumen-volumen); $R_f = 0,06$ en un disolvente formado por n-butanol saturado de agua; $R_f = 0,09$ en un disolvente formado por metil-isobutil-cetona saturada con agua y que contenía 2
20 por 100 de ácido p-toluenosulfónico monohidratado (peso-volumen); y $R_f = 0,03$ en un disolvente formado por metil-etil-cetona saturada con agua. Para determinar los valores anteriores, la base de la Tilosina se aplicó al papel en forma de solución en acetona.

25 La base libre de la tilosina tiene una acción inhibitoria del desarrollo de los organismos microbianos incluyendo bacterias gram-positivas y gram-negativas, algunas de las cuales son patógenas en las plantas. Sin embargo, la mayoría de los organismos frente a los cuales tiene acción inhibitoria son gram-positivos. Las concentraciones a las cuales la Tilosina presenta inhibición
30 del desarrollo de los organismos ilustrativos se indican numéri-

252350



amente en la tabla I. Las concentraciones de inhibición se deter-
minaron mediante el ensayo de dilución en agar o mediante el en-
sayo de dilución del caldo (indicado en la tabla con las letras
"ad" y "bd", respectivamente. En el ensayo de dilución de agar,
el organismo de ensayo se introdujo o plantó en una serie de pla-
cas de agar que contenían diferentes concentraciones de Tilosina
para determinar la concentración mínima de Tilosina base en mcg/
ml (microgramos por mililitros) en un sustrato de agar que inhi-
be el desarrollo del organismo durante un período de 48 horas (o
72 horas en el caso de organismos patógenos para las plantas.

En el ensayo de dilución del caldo, una serie de tubos
que contenían caldo nutritivo con diferentes concentraciones de
Tilosina se inocularon con el organismo de ensayo para determi-
nar la concentración mínima de Tilosina base en mcg/ml en el cal-
do sustrato que inhibe el desarrollo del organismo durante un
período de unas 20 horas.

Los derivados acilados de la Tilosina y las sales por
adicción de ácidos de la base libre y de los derivados acilados
poseen actividades aproximadamente del mismo valor que se indica
en la Tabla I, teniendo en cuenta los pesos moleculares aumenta-
dos de los derivados acilados y sales.

TABLA I

Organismo de ensayo	Concentración de inhi- bición (mcg/ml)	
<u>BACTERIA</u>		
<u>Staphilococcus aureus</u>	1.56	ad
<u>Staphilococcus albus</u>	3.13	ad
<u>Bacillus subtilis</u>	1.56	ad



	<u>Mycobacterium phlei</u>	.78	ad
	<u>Mycobacterium tuberculosis</u> (507)	.78	ad
	<u>Mycobacterium avium</u>	.78	ad
	<u>Escherichia coli</u>	> 100.	ad
5	<u>Proteus vulgaris</u>	50.	ad
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	> 100.	ad
	<u>Aerobacter aerogenes</u>	> 100.	ad
	<u>Klebsiella pneumoniae</u>	12.5	ad
	<u>Salmonella enteritidis</u>	> 100.	ad
10	<u>Shigella paradyserteriae</u>	100.	ad
	<u>Brucella bronchiseptica</u>	25.	ad
	<u>Vibrio metschnikovii</u>	50.	ad
	<u>Streptococcus pyogenes</u>	0.195	bd
	<u>Corynebacterium diphtheriae</u>	0.0975	bd
15	<u>Diplococcus pneumoniae</u>	0.195	bd
	<u>BACTERIAS PATOGENAS PARA LAS PLANTAS</u>		
	<u>Erwinia amylovora</u>	100.	ad
	<u>Agrobacterium tumefaciens</u>	> 100.	ad
	<u>Xanthomonas campestris</u>	25.	ad
20	<u>Xanthomonas malvacearum</u>	12.5	ad
	<u>Xanthomonas phaseoli</u>	6.25	ad
	<u>Pseudomonas syringae</u>	25.	ad
	<u>Corynebacterium insidiosum</u>	100.	ad
	<u>Corynebacterium sepedonicum</u>	---	

25

En la tabla anterior se observará que la Tilosina tiene una actividad antimicrobiana relativamente amplia. Esta actividad puede demostrarse no sólo in vitro, sino también in vivo.

Así, la administración de Tilosina a ratones infectados con diferentes organismos patógenos produce la rápida eliminación de la

30

25 23 50



infección, independientemente de que la droga se administre en forma subcutánea, intraperitoneal u oral. La DE₅₀ de la Tilosina (dosis eficaz para proteger el 50 por 100 de los ratones utilizados como animales de ensayo) en infecciones realizadas como ejemplo se indica a continuación en la tabla II

TABLA II

Organismo infectante	Vía de administración de Tilosina	DE ₅₀ mg de Tilosina/kg de peso de cuerpo
10 <u>Staphylococcus aureus</u>	Subcutanea	3.8 (x 2)
<u>Staphylococcus aureus</u>	Oral	42. (x 2)
<u>Diplococcus pneumoniae</u>	Subcutanea	4.8 (x 2)
<u>Meningopneumonitis virus</u>	Intraperitoneal	41.5 (x 5)
<u>Streptococcus Pyogenes 0203</u>	Subcutanea	2.6 (x 2)
15 <u>Streptococcus haemolyticus</u>	Oral	65. (x 2)

En los ratones, la administración de Tilosina es efectivo para vencer las infecciones de Spirochaeta novyi, siendo la dosis oral eficaz de unos 31 mg/kg de peso de cuerpo y la dosis intraperitoneal eficaz de unos 2 mg/kg de peso de cuerpo.

La Desmicosina, sus derivados acilados y sus sales catiónicas, que se describirán en lo que sigue, poseen actividades antimicrobianas prácticamente iguales a las indicadas anteriormente para la Tilosina.

La Tilosina puede producirse cultivando cepas de organismos encontrados recientemente y no descritas hasta la fecha en las muestras de suelos obtenidos en Hongkhai, Tailandia. Los organismos se desarrollaron utilizando la fermentación en cultivo sumergido en condiciones aerobias en un medio de cultivo que contenía fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgáni-

252350



5
10
15
20
25
30

das. Los organismos se aislaron de las muestras de suelo anteriores poniendo en suspensión porciones de las muestras en agua destilada estéril e introduciendo las suspensiones en un agar nutritivo. Las placas de agar nutritivo sembradas se incubaron a unos 25-30° C durante varios días. Al cabo del tiempo de incubación, se transfirieron colonias de los organismos productores de Tilosina, mediante un lazo de platino estéril para inocular muestras de agar. Las muestras de agar inoculadas se incubaron produciendo cantidades mayores de inóculo para la producción de Tilosina.

Los nuevos organismos capaces de producir Tilosina se han depositado de modo permanente en "The Culture Collection of the Northern Utilization Research and Development Branch" del Departamento de Agricultura de los EE.UU., Peoria, Illinois, habiéndoseles asignado los números de cultivo NREL 2702 y NREL 2703.

Los nuevos organismos descubiertos son en muchos aspectos totalmente análogos a las especies Streptomyces fradiae, pertenecientes al orden de los Actinomycetales, según se define en el "Manual of Determinative Bacteriology" de Bergey, séptima edición pág. 799. Los nuevos organismos NREL 2702 y NREL 2703 se han clasificado como nuevas cepas de la especie S. fradiae, organismo identificado primeramente por Waksman y que puede obtenerse ahora de la "American Type Culture Collection" como ATCC 10745 (Waksman 3535). Una diferencia notable entre nuestras nuevas cepas y la cepa de Waksman de S. fradiae radica en el hecho de que la cepa de Waksman no da lugar a la producción de Tilosina ni Desnicosina. La cepa de Waksman se ha cultivado en los medios preferidos descritos aquí, pero nunca se han observado cantidades detectables de Tilosina o Desnicosina.

Este invento se describirá con detalle refiriéndose en particular al organismo encontrado recientemente, NREL 2702. Sin

25 23 50



5 embargo, debe entenderse que la producción del antibiótico median-
te el desarrollo de otros organismos como, por ejemplo, otras ce-
pas productoras de tilosina, incluyendo la NRRL 2703 o mutantes
de NRRL 2702 y NRRL 2703 se halla dentro de los límites de este
invento. Estos otros organismos, cepas o mutantes pueden producir-
se mediante procedimientos conocidos, por ejemplo, sometiendo un
organismo productor de tilosina a la irradiación con rayos X o
ultravioleta o a los agentes químicos, por ejemplo, mostazas ni-
trogenadas.

10 En los párrafos siguientes se indican los resultados de
un estudio taxonómico detallado de la cepa de S. fradiaz produc-
tora de tilosina, NRRL 2702. Los colores utilizados en la des-
cripción están de acuerdo con las definiciones utilizadas en Ridg-
way: Culture Standards and Nomenclature (1912).

15 Morfología microscópica

Agar, pasta de tomate-harina de avena (14 días a 30° C).

20 Las cadenas de esporas forman ganchos, lazos y hélices irregula-
res. Se encuentran raramente espirales típicas. Las esporas
son de forma sub-globosa y oscilan entre 0,8 μ a 1,5 μ , aproxi-
madamente.

Agar, sales inorgánicas-fécula (14 días a 30° C).

25 morfología microscópica como la observada en agar, pasta de tomate-ha-
rina de avena.

Agar, sales inorgánicas-ribosa (14 días a 30° C).

morfología microscópica como la observada en agar, pasta de tomate-ha-
rina de avena.

30

252350



Características de cultivo

5 Agar de Czapek (14 días a 30° C). Desarrollo mediano. No hay micelio aéreo. El reverso aproximadamente de color crema (Cream Color).

Agar, lactato de calcio (14 días a 30° C). Desarrollo moderado. En zonas de color ante crema (Cream Buff). El reverso amarillo Nápoles (Naples Yellow).

10 Agar glucosa-asparaguina (14 días a 30° C). Desarrollo muy escaso.

15 Agar sales inorgánicas- fécula (14 días a 30° C). Desarrollo abundante. Micelio aéreo moderado, color blanco a salmón-ocre pálido (Pale Ochraceous Salmon). El reverso aproximadamente de color ante crema (Cream Buff).

Agar pasta de tomate-harina de avena (14 días a 30° C). Desarrollo abundante. Micelio aéreo moderado, color blanco a ante vinoso (Vinaceous Buff).

20 Agar de Emerson (14 días a 30° C). Desarrollo moderado. Micelio aéreo mediano, blanco. El reverso de color ante-ocre (Ochraceous Buff).

25 Agar extracto de lavadura (14 días a 30° C). Desarrollo moderado. Micelio aéreo mediano, blanco. Reverso amarillo anti-monio (Antimony Yellow).

Agar de patata (14 días a 30° C). No hay desarrollo visible.

30



252350

Fisiología

- Licuefacción de gelatina - lenta
- Reducción de nitrato - reduce los nitratos
- Producción de H₂S - ninguna
- Hidrólisis de almidón - buena
- Temperatura - 25° C - 30° C desarrollo óptimo
- Temperatura - 32° C - 37° C esporulación óptima
- No se produce micelio aéreo a los 25° C.

En la tabla III se indican los resultados de los ensayos de utilización de carbono realizados sobre el organismo NRR 2702. En la tabla se emplean los símbolos siguientes:

- + = desarrollo y utilización
- = no hay desarrollo ni utilización
- ‡ = desarrollo limitado, probablemente utilización escasa.

TABLA III

UTILIZACIÓN DE CARBONO POR LA NRR 2702

	<u>Compuesto</u>	<u>Desarrollo</u>
	L (+) Arabinosa	+
	L (+) Ralanosa	‡
	D (+) Ribosa	-
	D (+) Xilosa	+
25	D (-) Fructuosa	+
	D (+) Glucosa	+
	D (+) Melibiosa	-
	Sacarosa	+
	D (+) Trehalosa	+
30	D (+) Melicitosa	-

252350



	D (+) Dextrinosa	-
	Celulosa	-
	Inulina	-
	Adonita	-
5	D-inosita	-
	Manita	±
	Acetato sódico	+
	Salicina	-

10 Según se indicó, la Tilosina puede producirse mediante el cultivo de NRE 2702. El medio de cultivo puede ser uno cualquiera de una serie de medios puesto que, según se deduce de los ensayos de utilización anteriormente descritos, el organismo es capaz de utilizar muchas fuentes de energía. Sin embargo, para una mayor economía de la producción, rendimientos máximos de antibiótico y facilidad del aislamiento del antibiótico, son preferibles determinados medios de cultivo. Los medios que son de utilidad para la producción de Tilosina comprenden una fuente de carbono asimilable como la glucosa, sacarosa, fructosa, almidón, glicina, melazas, dextrina, azúcar moreno, sólidos de maceración de maíz y similares. Las fuentes de carbono preferidas son glucosa y almidón. Además, los medios que pueden emplearse comprenden una fuente asimilable de nitrógeno como harina de linaza extracto de residuos animales, harina de pescado, harina de semilla de algodón, harina de avena, trigo molido, harina de soja, extracto de carne, peptonas (carne o soja), caseína, mezclas de aminoácidos y similares. Las fuentes de nitrógeno preferidas son la harina de soja, caseína y sólidos de maceración de maíz.

25 Pueden incorporarse a los medios con resultados beneficiosos sales minerales, por ejemplo, las que proporcionen iones

30

25 23 50



roflo, potasio, amonio, calcio, magnesio, cobalto, sulfato, cloruro, fosfato, carbonato, acetato y nitrato, y una fuente de factor de crecimiento como productos solubles de destileria y extracto de levadura.

5 Igual que es necesario para el crecimiento y desarrollo de otros microorganismos, deben incluirse asimismo elementos traza esenciales en el medio de cultivo para el desarrollo del actinomiceto empleado en este invento. Dichos elementos traza se introducen ordinariamente como impurezas inherentes a la adición de los
10 otros constituyentes del medio.

El pH inicial del medio de cultivo puede variarse ampliamente. Sin embargo, se ha encontrado conveniente que el pH inicial del medio se encuentre aproximadamente entre el pH 5,5 y pH 8,0, y, de preferencia, entre pH 6,5 y aproximadamente pH 7,0. Según se ha observado con otros actinomicetos, el pH del medio aumenta gradualmente durante todo el período del desarrollo del organismo durante cuyo tiempo se produce la Tilosina y puede alcanzar un pH desde, aproximadamente, pH 7,2 a pH 8,0 ó superior, dependiendo el pH final por lo menos en parte del pH inicial del
15 medio, de los amortiguadores presentes en el mismo y del período de tiempo durante el que se deja que se desarrolle el organismo.

Las condiciones de elección para la producción de grandes cantidades de Tilosina son las condiciones aerobias de cultivo sumergido. Para la preparación de cantidades relativamente pequeñas, pueden emplearse cultivos agitados y cultivo superficial
25 en frascos, pero para la preparación de grandes cantidades se prefiere el cultivo aerobio sumergido en tanques estériles. El medio en el tanque estéril puede inocularse con una suspensión esporulada, pero debido al desarrollo retardado que se observa cuando una suspensión esporulada se utiliza como inóculo se pre-
30

252350



fiere la forma vegetativa del cultivo. Con ello se evita el creci-
miento retardado consiguiéndose un empleo más eficaz de la instala-
ción de fermentación. Según esto, es conveniente primeramente,
5 producir un inóculo vegetativo de los organismos inoculando una
cantidad relativamente pequeña de medio de cultivo con el organis-
mo en forma de esporas y cuando se ha obtenido un inóculo vegeta-
tivo, joven, activo, traspasar el inóculo vegetativo asépticamen-
te al tanque grande. El medio en el que se produce el inóculo
vegetativo puede ser el mismo medio o diferente al utilizado para
10 la producción en gran escala de Tilosina.

Los organismos se desarrollan mejor a temperaturas en el
intervalo de unos 25° a unos 32° C. La producción óptima de
tilosina parece que tiene lugar a una temperatura a unos 25 a
30° C.

15 Como es usual en los procesos de cultivo susorgido, se
inyecta aire estéril a través del medio de cultivo. Para el de-
sarrollo eficaz del organismo y la producción de Tilosina, el vo-
lumen de aire empleado en la producción de Tilosina en tanque es
preferentemente de 0,1 volúmenes de aire por minuto por volumen
20 de medio de cultivo o más. Se obtienen desarrollos eficaces y
rendimientos óptimos de Tilosina cuando el volumen de aire uti-
lizado es, por lo menos, un volumen de aire por minuto por volu-
men de medio de cultivo.

La concentración de Tilosina activa en el medio de culti-
25 vo puede regularse con facilidad durante el período de fermenta-
ción mediante el ensayo en muestras del medio de cultivo de su
actividad inhibitoria del desarrollo de un organismo que se sabe
que se inhibe en presencia en presencia de Tilosina. El empleo
del organismo Staphylococcus aureus se ha encontrado muy satisfac-
30 torio con este objeto. El ensayo puede realizarse por los méto-

252350



dos conosidos turbidificados o de plato.

En general, la producción máxima tiene lugar después de la inoculación del medio de cultivo a los dos a cinco días aproximadamente cuando se emplea el cultivo aerobio sumergido o el cultivo en matraces con agitación y a los cinco a diez días aproximadamente cuando se utiliza cultivo superficial.

El micelio y los sólidos sin disolver se separan del caldo de fermentación por los sistemas usuales como filtración o centrifugación. El antibiótico se separa del caldo filtrado o centrifugado empleando técnicas de adsorción o extracción. Es preferible emplear un procedimiento de extracción para recuperar el antibiótico del caldo filtrado ya que dichos procedimientos de extracción son normalmente más rápidos, eficaces y económicos para la recuperación de antibiótico. Para la extracción del antibiótico del caldo filtrado, se prefieren disolventes orgánicos polares, inmiscibles con el agua, incluyéndose entre ellos los ésteres de ácidos grasos, por ejemplo, acetato de etilo y acetato de amilo; hidrocarburos clorados, por ejemplo, cloroformo, dicloruro de etileno y tricloroetileno; alcoholes inmiscibles con el agua, por ejemplo, alcoholes butílico y amílico; acetonas inmiscibles con el agua, por ejemplo, metil-isobutil-cetona y metil-anil-cetona; y ésteres, por ejemplo, éter dietílico y éter metil-propílico. Pueden emplearse asimismo otros disolventes de carácter análogo. Los disolventes de extracción preferidos actualmente son el cloroformo y el acetato de amilo.

Si se utilizan técnicas de adsorción, pueden emplearse diversos adsorbentes y resinas cambiadoras de ión, por ejemplo, carbón, gel de sílice, alúmina y resinas cambiadoras de ión de carácter ácido como, por ejemplo, "XE" 64 y "IRC" 50 (resinas débilmente ácidas cambiadoras de cation que vende la Rohm and

252350



Haas Company), resina de carboximetil-celulosa y "Dowex" 50 (una resina fuertemente ácida cambiadora de cation que vende la Dow Cheminal Company). La Tilosina puede adsorberse sobre uno de los adsorbentes antes indicados a partir de su solución en cloroformo, acetona o benceno. La Tilosina adsorbida puede eluirse a continuación del adsorbente lavando el adsorbente sobre el que está adsorbida la Tilosina con un alcohol inferior como el metanol o etanol o con un alcohol inferior que contenga hasta un 50 por loo de una cetona inferior como la acetona.

10 Los extractos en disolvente orgánico obtenidos por el método de extracción preferido pueden evaporarse directamente a sequedad dando lugar a preparaciones de Tilosina bruta. Sin embargo, los extractos de disolvente orgánico se utilizan de preferencia para obtener preparaciones purificadas de Tilosina. Por ejemplo, la Tilosina purificada puede obtenerse mediante concentración a vacío de un extracto en un disolvente orgánico de la Tilosina hasta pequeño volumen decoloración del concentrado de Tilosina con carbón y precipitación de la Tilosina mediante adición de un disolvente no polar como, por ejemplo, un exceso de 2 a 10 veces de eter de petróleo. El precipitado así obtenido es una Tilosina sólida, purificada que es normalmente amorfa. El precipitado amorfo puede cristalizarse empleado uno de los disolventes de cristalización anteriormente indicados. Por otra parte, la Tilosina puede recuperarse a partir de un extracto orgánico que contenga Tilosina mediante la cromatografía de adsorción, recuperando la Tilosina adsorbida del adsorbente por elución.

30 Según se indicó anteriormente, la Tilosina se convierte en Desmicosina hidrolizando la Tilosina con ácido diluido aproximadamente a temperatura ambiente o superior. Debe evitarse condiciones enérgicas de hidrólisis para impedir la destrucción de la

252350



Desmicosina. La Desmicosina puede obtenerse muy fácilmente de-
jando estar una solución acuosa, ácida de Filosina a temperatura
ambiente durante un periodo de tiempo suficiente para conseguir
cantidades considerables de Desmicosina como producto de hidró-
5 lisis. Se ha encontrado que se obtiene un rendimiento excelente
de desmicosina disolviendo la Filosina hasta una concentración del
4 por 100 en una solución acuosa, ácida, por ejemplo, en ácido
clorhídrico acuoso diluido, dejando estar la mezcla a temperatu-
ra ambiente durante unos 3 días y recuperando después la Desmico-
10 sina de la mezcla de hidrólisis neutralizando la mezcla y extra-
yendo la Desmicosina con un disolvente inmisible con agua.

La Desmicosina tiene prácticamente las mismas propiedades
de solubilidad y de inhibición microbiológica que la Filosina. La
Desmicosina se caracteriza por las siguientes propiedades quími-
15 cas y físicas específicas: es un sólido blanco, que es estable en
solución en el intervalo aproximado de pH 1 a pH 9. Puede obte-
nerse en forma cristalina por cristalización desde disolventes
como el cloroformo y acetonitrilo. Cuando se cristaliza de clo-
roformo, los cristales de Desmicosina tienen forma de hojas y es-
20 tán solvatados por una cantidad aproximadamente equimolar de clo-
roformo. Los cristales solvatados con cloroformo de la base li-
bre de la Desmicosina, después de secarlos al aire a temperatura
ambiente funden a unos 95-115° C. La Desmicosina cristalizada, s
sin solvatar, puede obtenerse calentando los cristales solvatados
25 en vacío a 75° C durante algunas horas.

Una valoración electrométrica de Desmicosina en solución
en dietilformamida-agua (2:1 partes en volumen) indica la presen-
cia de un grupo valorable de $pK^a = 8,0$.

El peso molecular determinado mediante los datos de la va-
30 loración es, aproximadamente, 736 ± 25 .

252350



Una media de varios análisis elementales de la base cris-
talizada seca en vacío a 80° C sobre pentóxido de fósforo dió los
valores siguientes:

5	Carbono	59,73 %
	Hidrógeno	8,34 %
	Nitrógeno	1,70 %
	Oxígeno (por diferencia)	30,23 %

Los datos anteriores indican como fórmula empírica para la
10 Desmicosina aproximadamente $C_{38}H_{57}NO_{14}$, fórmula que igual que la
indicada para la Tilosina es objeto de posible modificación.

La curva de absorción en el infrarrojo de la base libre
cristalizada en solución en cloroformo se representa en la fig.
II de los dibujos adjuntos. Las bandas que pueden distinguirse
15 en el espectro infrarrojo en la zona de 2,0 a 15,0 son las
siguientes: 2,76, 2,86, 3,38, 3,43, 3,48, 3,54, 3,69, 5,80 5,95 5,14
6,25, 6,87, 7,11, 7,16, 7,25, 7,37, 7,50, 7,92, 8,48, 8,59, 8,77
8,91, 9,26, 9,45, 9,92, 10,13, 10,40, 10,75, 11,11, 11,51 y 11,95.

Un espectro de absorción en el ultravioleta de la Desmico-
20 sina en agua presenta un máximo de absorción intenso a 288 μ ,
que tiene una extinción molar de $E_1^{1\%} = 275$.

La rotación óptima específica de la base libre cristaliza-
da de la Desmicosina, que se secó a temperatura ambiente en vacío
sobre cloruro cálcico anhidro durante unas 15 horas, es la si-
25 guiente: $[\alpha]_D^{250} = -15,75\%$; $c = 2$ por 100 en metanol (peso por vo-
lumen).

Un diagrama de difracción con rayos X, en polvo, utili-
zando radiación de cromo sin filtrar y un valor de la longitud
de onda de 2,2895 Å para calcular las distancias reticulares dió
30 los valores siguientes:

252350



- 3 N. 16

	"a"	I/I ₁
	13.1	0.20
	11.6	0.20
	10.1	0.20
5	6.88	0.20
	5.16	0.50
	5.62	0.33
	5.27	1.00
	5.03	0.13
10	4.76	0.13
	4.39	0.33
	4.17	0.13
	4.01	0.20
	3.77	0.20
15	3.64	0.13
	3.51	0.13
	3.35	0.27
	3.09	0.13
	2.91	0.13
20	2.75	0.13
	2.61	0.13
	2.37	0.13
	2.25	0.03

Los ensayos químicos realizados con la base libre cristali-
 25 lizada indican la presencia de grupos metoxilo, hidroxilo, N-metil-
 lo y O-metilo. La base libre decolora la solución de permanganato y da ensayo de Molisch positivo de la presencia de hidratos de
 carbono. La base cristalizada da resultado negativo en los ensa-
 30 yos de ninhidrina, biuret y Sakaguchi de proteína, da ensayo nega-
 tivo de grupos fenólicos con cloruro férrico y produce un ensayo



252350

negativo del maltol.

La cromatografía de la Desmicosina sobre papel Whatman n° 1 da los siguientes valores de R_f : $R_f = 0,65$ en un disolvente formado por agua que contiene 7 por 100 de sulfato magnésico (en peso) y 2,5 por 100 de metil-etil-cetona (en volumen); $R_f = 0,62$ en un disolvente formado de n-butanol saturado con agua; y $R_f = 0,64$ en un disolvente formado por metil-etil-cetona saturada con agua. Para determinar los valores anteriores, la Desmicosina se aplicó al papel en forma de solución en acetona.

10

Tanto la Filosina como la Desmicosina forman con facilidad derivados acilados, o ésteres, por acilación, por ejemplo, con un halogenuro de ácido o el anhídrido de un ácido orgánico como el ácido acético, p-cloro-acético, propiónico, acrílico y similares. Además, puede utilizarse como agente de acilación un ácido orgánico del carácter antes indicado cuando se utiliza asimismo en la mezcla de reacción un reactivo como la N,N'-di-ciclohexilcarbodiimida. Se ha encontrado conveniente emplear agentes acilantes alquilcarbáclicos, siendo los compuestos acilados resultantes derivados de alquilcarbácilo. La separación y purificación de los nuevos derivados acilados se efectúa por cualquiera de las técnicas de cristalización empleadas ordinariamente. Los derivados acilados tienen puntos de fusión diferentes que dependen de la naturaleza y número de sustituyentes acilo y, ordinariamente, tienen valores del pK_a esencialmente inferiores a los valores del pK_a de la Filosina y Desmicosina.

15

20

25

30

Las sales de la Filosina y Desmicosina por adición de ácido pueden formarse empleando un ácido mineral como el sulfúrico, clorhídrico o nítrico o un ácido orgánico como el tartárico, glucónico, oxálico o ácido acético. Las sales por adición de ácido pueden prepararse disolviendo la base libre de la Filosina o Des-

252350



- 3 -

nicosina en un disolvente en el que sea soluble, como la acetona
o el eter, y acidulando la solución aproximadamente con una can-
tidad equimolar del ácido apropiado, con lo cual precipita normal-
mente la sal de la solución. En el caso de que la sal no preci-
pita fácilmente, puede precipitarse evaporando la solución a un
volumen menor o añadiendo un disolvente miscible en el que no sea
soluble la sal. Las sales por adición de ácido de los derivados
acilados de Tilosina y Desmicosina pueden prepararse asimismo los
procedimientos anteriores, utilizando ácidos como los indicados
anteriormente.

Debido a su amplio espectro antibacteriano y a su acción
antimicrobiana muy eficaz, los nuevos compuestos de este invento
son de utilidad en muchos modos como agentes esterilizantes, pa-
ra la esterilización de utensilios de laboratorio y del hogar y
productos alimenticios.

Además, los compuestos son de utilidad en Veterinaria pa-
ra el tratamiento de infecciones como la sinusitis en el pavo. Se
obtiene un control eficaz de la sinusitis mediante la inyección
directa en cada uno de los senos infraorbitales del ave atacada
de una solución que contenga de 5 a 20 mg aproximadamente de Ti-
losina, Desmicosina o un ester o sal catiónica de la misma.

Este invento se aclarará más mediante los siguientes ejem-
plos específicos:

Ejemplo 1

Preparación de Tilosina

Se obtuvo un cultivo esporulado de NRRL 2702 desarrollan-
do el organismo en un agar nutricio inclinado que tenía la compo-
sición siguiente:

252350



	Extracto de levadura	1,0 g
	Extracto de carne	1,0 g
	Caseína hidrolizada ("N-Z-AMINE-Type A" vendido por la Sheffield Chemical Co.)	2,0 g
5	Dextrina	10 g
	Cloruro cobaltoso, heptahidrato	20 mg
	Agar	20 g
	Agua	1 l

10 El pH del medio se ajusta a pH 7,3 mediante la adición de hidróxido sódico.

15 El agar indicado se inocula con esporas de NURL 2702 y se incuba durante cinco días a unos 30° C. El cultivo esporulado desarrollado en el agar inclinado se cubre con agua y el agar se raspa suavemente para separar las esporas obteniendo una suspensión acuosa de esporas.

1 ml de la suspensión de esporas se utiliza para inocular, en condiciones asépticas, una porción de 100 ml de un medio de cultivo vegetativo estéril que tenía la siguiente composición:

20	Glucosa	15 g
	Harina de soja	15 g
	Sólidos de maceración de maíz	15 g
	Cloruro sódico	5 g
	Carbonato cálcico	2 g
25	Se añade agua del grifo hasta completar un volumen total de	1 l.

El medio vegetativo inoculado se incuba a unos 30° C. durante 48 horas, durante cuyo tiempo se agita a 114 ciclos por minuto en un agitador oscilante que tenía una carrera de 5 cm.

30 5 ml del inóculo vegetativo se emplearon para inocular

252350



asépticamente porciones de 100 ml del siguiente medio de producción esterilizado, contenido en matraces Erlenmeyer de 500 ml.:

	Harina de soja	15 g
5	Caseína	1 g
	Jarabe de glucosa bruto	20 ml
	Carbonato cálcico	2,5 g
	Nitrato sódico	3 g
	Añade agua para completar un volumen total de	1 l.

10

El cultivo inoculado se incuba durante 100 horas a unos 26-28° C. Durante el período de incubación, el producto incubado se agita a 114 revoluciones por minuto en un agitador oscilante que tenía una carrera de 5 cm. El pH del medio de partida es aproximadamente de 6,5. Al final del período de incubación, el pH del medio aumenta hasta pH 7,5. El caldo de cultivo obtenido se filtra para eliminar el micelio y otros sólidos sin disolver. El caldo filtrado contiene Filosina en la cantidad de unos 250 mcg/ml de caldo.

15

20

Ejemplo 2

Preparación de Filosina

25

Se obtuvo un cultivo esporulado de NRRL 2702 mediante el desarrollo del organismo en un agar nutricio que tenía la composición siguiente:

30

	<u>Agar pasta de tomate-harina de avena</u>		
	Pasta de tomate	20 g	
30	30	Harina de avena precocida	20 g



252350

- 3/15

Agar

15 g

Se añade agua para hacer un volumen total de

1 l.

El agar inocula con esporas de NRRL 2702 y se incuba el agar inclinado inoculado durante 3 días a una temperatura de unos 30° C. Después de la incubación, el cultivo esporulado en el agar inclinado se cubre con agua y la superficie se raspa suavemente para separar las esporas obteniendo una suspensión acuosa de esporas.

Aplicando técnicas asépticas, la mitad del inóculo obtenido de una muestra de agar se utiliza para inocular una porción de 500 ml de un medio de cultivo vegetativo esterilizado que tenía la siguiente composición, contenido en un matraz de Erlenmeyer de 2 l:

Sólidos de maceración de maíz Levadura I

Glucosa	15 g
Sólidos de maceración de maíz	5 g
Levadura	5 g
Carbonato cálcico	3 g
Se añade agua para dar un volumen total de	1 l

La incubación se lleva a cabo a 28° C durante 48 horas agitando a 110 ciclos por minuto en un agitador oscilante que tenía una carcera de 5 cm. 950 cc del inóculo vegetativo del matraz se añadieron asépticamente como medio de inoculación a 950 l del medio sólido de maíz levadura I estéril descrito anteriormente contenido en un tanque de fermentación de hierro de unos 1400 l. Se añaden al medio de cultivo 0,1 l. de antifoam A (un producto anti-espuma vendido por la Dow Corning Company) para evitar la formación excesiva de espuma, añadiendo nuevas cantidades durante la fermentación a medida que se necesiten. El medio inoculado se fermentó durante 24 horas a una temperatura

252350



de 28° C. Durante la fermentación, el medio se aireó con aire estéril a razón de 0,77 m³ por minuto y se agitó con dos agitadores de 40 cm que actuaban a 160 revoluciones por minuto.

5 a un fermentador de hierro de unos 6.500 l se le añadieron 4.550 l de un medio que tenía la composición siguiente:

Sólidos de maíz Soja XII

Glucosa	30 kg
Concentrado de aceite de soja	15 kg
Sólidos de maceración de maíz	5 kg
Aceite de soja crudo	10 kg
Carbonato cálcico	2 kg
Cloruro sódico	5 kg
Se añade agua hasta hacer un volumen total de	1000 l.

10

15

20

25

30

El medio se inocula con 355 l del inóculo desarrollado en el tanque de fermentación. La fermentación se realiza a 28° C durante 4 días. La espuma se evita mediante la adición de "Larex" no. 1 (un producto anti-espumante vendido por Swift and Company) cuando sea necesario. El medio de fermentación se airea mediante la adición de aire estéril a razón de 3,6 m³/minuto y se agita, con dos agitadores de 60 cm que actúan a 130 revoluciones por minuto. Se añaden 270 kg de "Siflo" (un auxiliar de filtración de tierra de diatomeas vendido por The Siflo Company) a 3300 litros del caldo y la mezcla se filtra. El filtrado se ajusta a pH 8,5 mediante la adición de hidróxido sódico al 20 por 100, se añaden 1900 litros de cloroformo la mezcla se agita durante 30 minutos y la capa de cloroformo que se halla en forma de emulsión se decanta. La extracción con cloroformo se repite dos veces con porciones de 1900 litros de cloroformo. Las emulsiones de cloroformo que contienen la tilosina se combinan y se hacen pasar por

252350



un separador De Laval para romper la emulsión. La solución cloro-
roformica separada obtenida se concentra en vacio hasta un volu-
men de 25 l y las impurezas se separan en parte haciendo pasar el
concentrado por una columna de 15 cm de diámetro que contenia 10
5 kg de carbón activo como el que vende la Pittsburgh Coke and Che-
mical Company. La columna de carbón se lava con 16 l de cloroformo.
Las soluciones cloroformicas salientes combinadas que con-
tienen la Tilosina se concentran en vacio hasta 2 l y el concen-
trado de cloroformo se añade lentamente con agitación a 20 l de
10 eter de petróleo, que hace precipitar la Tilosina. Después de
agitar la mezcla durante 15 minutos, se filtra para separar el
precipitado blanco amorfo de Tilosina que después de seco en va-
cío pesa aproximadamente 1.070 g.

La Tilosina amorfa se cristaliza disolviéndola en 355 ml
15 de acetona, filtrando la mezcla acetónica para separar una ligera
turbidez y añadiendo lentamente la mezcla acetónica filtrada con
agitación suave a 20 ml de agua a 5° C. La solución acuosa, ace-
tónica resultante de Tilosina se deja estar a temperatura ambien-
te con agitación suave para permitir que la acetona se evapore
20 lentamente, con lo cual cristaliza la Tilosina. Los cristales de
Tilosina se separan por filtración y se secan en vacio a tempera-
tura ambiente. Funden aproximadamente a 127-132° C.

Ejemplo 3

Preparación del tartrato de Tilosina

5 g de Tilosina cristalizada se disolvieron en 100 ml de
acetona y se añadió con agitación 1,5 de ácido d-tartárico disuel-
tos en 20 ml de acetona. La solución se dejó estar a temperatura
30 ambiente con lo cual el tartrato de Tilosina cristalizó de la so-

252350



lución. Los cristales del tartrato de Tilosina se separaron por filtración, se lavaron con acetona y se secaron al aire. El rendimiento de sal es 5,5 g. La sal cristalizada funde a unos 140-145° C.

5

Ejemplo 4

Preparación del gluconato de Tilosina

1,03 g de glucono-delta-lactona se disuelven en 10 ml de agua y la solución acuosa se calienta a 85° C durante 2 horas para provocar la hidrólisis de la lactona a ácido glucónico. A la solución acuosa se le añaden 15 ml de metanol caliente. A la mezcla acuosa metanólica se le añaden con agitación 5 g de cristales de Tilosina disueltos en 10 ml de metanol. La mezcla de Tilosina-metanol se deja estar durante la noche a temperatura ambiente. El metanol se elimina de la mezcla por evaporación en vacío. Una vez eliminado el metanol, se añaden 40 ml de agua a la mezcla de Tilosina acuosa. La mezcla diluida se filtra y el filtrado que contiene la Tilosina se seca por congelación dando 5,3 g de un sólido blanco formado por el gluconato de Tilosina. El gluconato de Tilosina funde aproximadamente a 114-117° C.

15

20

Ejemplo 5

Preparación del clorhidrato de Tilosina

25

390 mg de Tilosina se disuelven en 200 ml de éter. La mezcla etérea se acidula por adición de 0.082 ml de ácido clorhídrico 12 N. El precipitado del clorhidrato de Tilosina que se forma se separa por filtración se lava con éter y se seca en vacío. El clorhidrato de Tilosina se recristaliza de una mezcla etanol-éter.

30

252350



El clorhidrato de Tilosina funde aproximadamente a 141-145° C.

Ejemplo 6

Preparación del ester acético de la Tilosina

5

14,3 g de Tilosina se disuelven en 97 ml de acetona que
contengan 15,3 g de bicarbonato potásico. Se añaden lentamente
con agitación a la solución de Tilosina 4,4 ml de cloruro de ace-
tilo en 5 ml de acetona, durante un período de 25 minutos. La
10 mezcla de reacción, agitada lentamente, se deja estar a temperatu-
ra ambiente durante 3 horas, después de cuyo período la mezcla
agitada se vierte sobre hielo triturado. La mezcla que contiene
Tilosina acetylada se extrae dos veces con volúmenes de 75 ml de
benceno. Los extractos bencénicos combinados se concentran len-
tamente por evaporación con lo cual el ester acético de la Ti-
10 losina cristaliza. El ester cristalizado se recrystaliza de ben-
ceno.

El análisis del ester acético de Tilosina recrystaliza-
do indica que tiene un contenido de acetilo de 0,22 por 100 en
20 peso y un pK^a de aproximadamente 5,1 (éste y los demás valores
del pK^a de los compuestos de este invento indicados aquí han
sido determinados por valoración electrométrica en una solución
de dietilformamida-agua, 2:1 en volumen).

25

Ejemplo 7

Preparación del ester acético de Tilosina

200 g de Tilosina se añaden a una mezcla de 457 ml de
anhidrido acético y 200 g de acetato sódico anhidro fundido. La
30 mezcla se deja estar a temperatura ambiente durante 3 días. La

252350



mezcla de reacción se vierte sobre hielo triturado y se neutraliza por adición de bicarbonato potásico. La mezcla neutralizada se extrae con 2 l de benceno. El extracto de benceno que contiene el ester acético de la Tilosina se lava con solución de bicarbonato potásico al 5 por 100, lavando a continuación 3 veces con agua. El extracto bencénico lavado que contiene el ester acético de Tilosina se concentra en vacío a unos 100 ml. El concentrado de benceno se añade a unos 3 l de eter de petróleo que hace precipitar el ester acético de la Tilosina. El precipitado formado por el ester acético de la Tilosina se separa por filtración y se disuelve en 210 l de cloroformo. La solución cloroformica se decolora con carbón y se añaden 10 volúmenes de eter de petróleo para precipitar la Tilosina acilada. El precipitado formado por el ester acético de la Tilosina se separa de la mezcla por filtración, se disuelve en 52 l de acetato de etilo y la solución de acetato de etilo se introduce en una columna de alúmina lavada con ácido que tenga un diámetro de 13 cm y altura de 110 cm. La alúmina sobre la que se adsorbe el ester acético de Tilosina se lava con acetato de etilo. El ester acético de Tilosina adsorbido se eluye con una mezcla metanol-acetato de etilo (1:9 v/v) y el eluato que contiene el ester acético de Tilosina se evapora a sequedad en vacío. El residuo seco formado por ester acético de Tilosina amorfo se purifica disolviéndolo en eter isopropílico caliente y enfriando la solución para que precipite el ester. Los análisis de ester acético de Tilosina purificado indican que tiene un contenido en acetilo de 0,91 por 100 en peso y un pk^a de 5,2, aproximadamente.

Ejemplo 3

252350



- 3 M

Preparación de Desmicosina

20 g de Filosina cristalizada se ponen en suspensión en
5 500 ml de agua destilada y se ajusta el pH de la suspensión a pH
2,6 añadiendo gota a gota ácido clorhídrico 12 N. La mezcla se
deja estar a temperatura ambiente durante 3 días después de lo
cual el pH de la mezcla se ajusta a pH 3,5 mediante la adición de
carbonato sódico sólido. La mezcla alcalina se extrae 4 veces con
10 porciones de 100 ml de cloroformo. Los extractos de cloroformo
combinados se lavan dos veces con 250 ml de agua destilada. Los
lavados se desechan y el extracto lavado de Desmicosina se eva-
pora a sequedad en vacío. El residuo seco formado por Desmico-
sina se disuelve en 75 ml de cloroformo y la solución cloroformi-
ca se filtra para separar una pequeña cantidad de material inso-
luble que se desecha. El filtrado que contiene Desmicosina se
concentra en vacío a unos 40 ml y se enfría a una temperatura de
unos 5° C con lo cual cristaliza la Desmicosina. Los cristales
de Desmicosina se separan por filtración y se secan dando un ren-
15 dimiento de 16,3 g de Desmicosina cristalizada. La preparación
cristalizada de Desmicosina es un solvato de cloroformo que con-
tiene aproximadamente cantidades equimolares de cloroformo y de
Desmicosina.

Los cristales del solvato cloroformico de Desmicosina
25 así obtenidos pueden recristalizarse de cloroformo o también de
acetonitrilo. Los cristales solvatados con cloroformo funden apro-
ximadamente a 95-115° C.

Los cristales solvatados de Desmicosina cuando se calien-
tan a 75° C en vacío durante 2 horas pierden el cloroformo dando
30 Desmicosina no solvatada cristalizada. Los cristales sin solva-

252350



tar funden a unos 105-115° C. La valoración electrométrica indica que el peso molecular de la Desmicosina es de 786 ± 30.

Ejemplo 9

Preparación de Desmicosina

5 A 5 g de Tilosina se le añaden 100 ml de ácido clorhídrico 0,1 N y la mezcla se calienta a 40° C durante 1 hora, durante cuyo tiempo la Tilosina se convierte en Desmicosina. La mezcla
10 se alcaliniza débilmente por adición lenta de solución de hidróxido sódico al 10 por 100 y la Desmicosina se aísla y purifica por el procedimiento descrito en el ejemplo 8.

Ejemplo 10

Preparación del ester propiónico de Tilosina

15 2,5 g de Tilosina cristalizada y 0,55 g de N.N'- dicitclohexilcarbodiimida se disolvieron en 40 ml de diclorometano. A la solución de Tilosina se le añadieron con agitación 0,4 g de
20 ácido propiónico y la mezcla de reacción se dejó estar durante 20 horas. Después del período de reacción, la mezcla se filtró para separar el precipitado que aparece. El precipitado se desecha. El filtrado se lava sucesivamente 2 veces con 20 ml de solución acuosa de bicarbonato sódico al 5 por 100 y 2 veces con p
25 porciones de 20 ml de agua. El filtrado lavado se seca con sulfato magnésico anhidro, se filtra y se evapora a sequedad. El residuo seco formado por el ester propiónilico de la Tilosina se
30 disuelve en 20 ml de acetona caliente, la solución se enfría a unos 5° C y se filtra. La solución acetónica filtrada que contiene el ester propiónico de la Tilosina se evapora a sequedad en

252350



vacío dando el propionilo de la Tilosina que funde a 101-111° C y tiene un pk'a aproximadamente de 5,2.

Ejemplo 11

5 Preparación del ester acetilico de la Desmicosina

1,9 g de Desmicosina y 0,55 g de N,N'-d ciclohexilcarbo-
diimida se disolvieron en 40 ml de dicloro-metano. A la solución
de Desmicosina se le añadieron con agitación 0,3 g de ácido acé-
10 tico y la mezcla de reacción se dejó estar durante 6 horas. La
mezcla de reacción se trato siguiendo el procedimiento descrito
en el ejemplo 10. El producto formado por el ester acetilico de
Desmicosina tiene un punto de fusión de 97-127° C y un pk'a de
aproximadamente 6,3.

15

Ejemplo 12

Preparación del ester propiónilico de Desmicosina

El ester propionilico de Desmicosina se prepara por reac-
20 ción entre el ácido propiónico y la Desmicosina siguiendo el pro-
cedimiento descrito en el ejemplo 11, El ester propionilico de
la Desmicosina funde aproximadamente a 115-127° C y tiene un pk'a
de aproximadamente 6,3.

25

Ejemplo 13

Preparación del clorhidrato de Desmicosina

Un gramo de Desmicosina se disuelve en 200 ml de eter. A
la solución etérea se le añaden lentamente con agitación 0,11 ml
30 de ácido clorhídrico 12 N. En la mezcla acidulada aparece un

252350



precipitado blanco del clorhidrato de Desmicosina; se separa por filtración, se lava dos veces con eter y se seca en vacío. El clorhidrato de Desmicosina funde aproximadamente a 140-153° C y tiene un pk'a de aproximadamente 8.

Ejemplo 14

Preparación del bisulfato de Desmicosina

2 g de Desmicosina se disuelven en 200 ml de eter y se añaden lentamente con agitación a la mezcla etérea 0,08 ml de ácido sulfúrico 36 N. Aparece un precipitado blanco del bisulfato de Desmicosina, que se separa por filtración, se lava dos veces con eter y se seca en vacío. El bisulfato de Desmicosina funde aproximadamente a 142-159° C y tiene valores del pk'a de aproximadamente 5,4 y 8,0.

Ejemplo 15

Preparación del tartrato de Desmicosina

Un grano de Desmicosina se disuelve en 50 ml de éter y se añaden lentamente con agitación 0,2 g de ácido d-tartárico en 100 ml de eter. Aparece un precipitado blanco del tartrato de Desmicosina, que se separa por filtración, se lava dos veces con eter y se seca en vacío. El tartrato funde aproximadamente a 122-136° C y tiene valores del pk'a de aproximadamente 5,35, 6,35 y 8,0.

Ejemplo 16

252350



Preparación del clorhidrato del ester acetilico de Tilosina

5 900 mg del ester acetilico de Tilosina se disuelven en 200 ml de eter. A la solución etérea se añaden lentamente con agitación 0,075 ml de ácido clorhídrico 12 N. Aparece un precipitado de clorhidrato del ester acetilico de Tilosina que se separa por centrifugación, se lava con eter y se seca en vacío. El clorhidrato del ester acetilico de Tilosina tiene un pK_a de 8,0 aproximadamente y funde a unos 122-134° C.

10

Ejemplo 17

Preparación del clorhidrato del ester acetilico de Desmicosina

15 100 mg de acetyl-desmicosina se disuelven en 20 ml de eter y se añaden con agitación a la mezcla etérea 0,1 ml de ácido clorhídrico 12 N. El precipitado blanco, formado por el clorhidrato de la acetyl-desmicosina, que se forma en la mezcla etérea acidulada, se separa por centrifugación, se lava dos veces con eter y se seca en vacío. El clorhidrato del ester acetilico de la Desmicosina tiene un punto de fusión de 145-150° C aproximadamente, un pK_a de 6,2 aproximadamente, es soluble en agua y es relativamente insoluble en eter.

20

Ejemplo 18

25 Preparación del clorhidrato del ester propiónico de Desmicosina

El clorhidrato del ester propionilico de Desmicosina se prepara siguiente el procedimiento esquematizado del ejemplo 17, a excepción de que el material de partida empleado es el ester propionilico de Desmicosina en vez del ester acetilico de Desmi-

30

252350



cosina. El clorhidrato resultante del ester propiónilico de Desnicosina tiene un punto de fusión de 145-150° C, un pk'a de 6,2 aproximadamente, es soluble en agua y es prácticamente insoluble en éter.

5 Esta solicitud que corresponde a la presentada en E.U.A. el 29 de Octubre de 1958; bajo el número 770.532, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial

10

N O T A

15

Los puntos de invención propia, nueva que se presentan para que sean objeto de la presente solicitud de Patente de Invención, por VEINTE años son los siguientes:

20

1ª.- Un método de producción de Tilosina o Desnicosina, que comprende el cultivo de una cepa de Streptomyces fradiae productora de Tilosina en un medio de cultivo que contenga fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, en condiciones aerobias suavizadas hasta que se produzca una cantidad sustancial de Tilosina por dicho organismo en el citado medio de cultivo y, si se desea, hidrolizar con ácido para formar Desnicosina.

25

2ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el organismo es Streptomyces fradiae NRRL 2702.

30

3ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el

25 23 50

3 NOV.



que el organismo es Streptomyces fraaiiae MRL 2703.

4ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo se mantiene a una temperatura de unos 25-32º C y el desarrollo del organismo se lleva a cabo durante un período de unos 2 a unos 5 días.

5ª.- Un método de producción de Tilosina, que comprende el cultivo de una cepa de Streptomyces fraaiiae productora de Tilosina en un medio de cultivo que contenga fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, en condiciones aerobias sumergidas hasta que se produzca una cantidad sustancial de Tilosina por el citado organismo en dicho medio de cultivo, y la recuperación de Tilosina de dicho medio de cultivo.

6ª.- Un método de preparación de Desmicosina que comprende hidrolizar la Tilosina con ácido diluido provocando la hidrólisis de Tilosina y la producción de Desmicosina.

7ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el ácido es ácido clorhídrico.

8ª.- Un método de producir Tilosina o Desmicosina.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede representado en el dibujo que se acompaña y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de treinta y ocho hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, - 3 NOV. 1959

P.A.

Alberto de Elzaburu
Por Poder

RESEARCH REPORT

FIG. 1

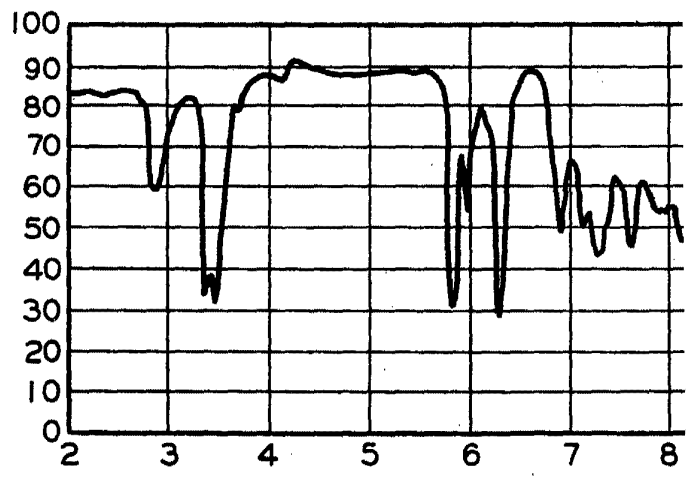
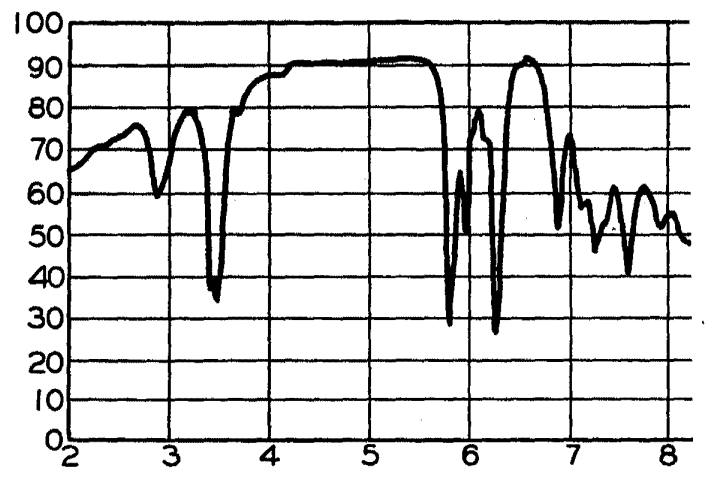
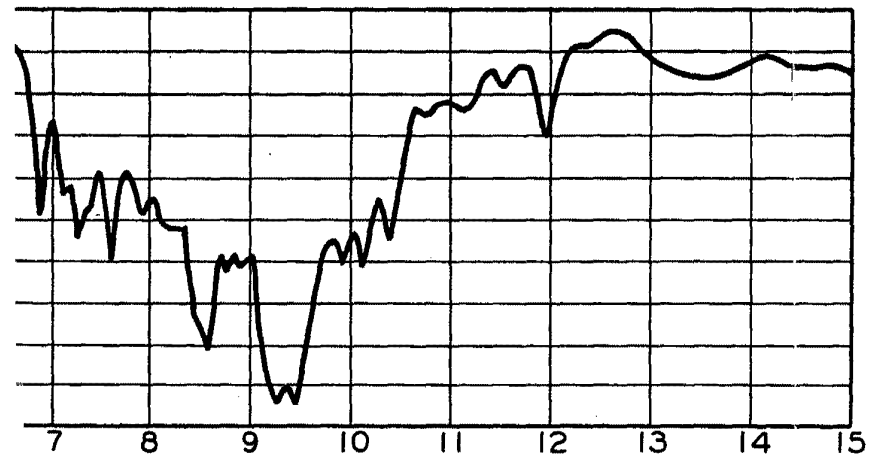
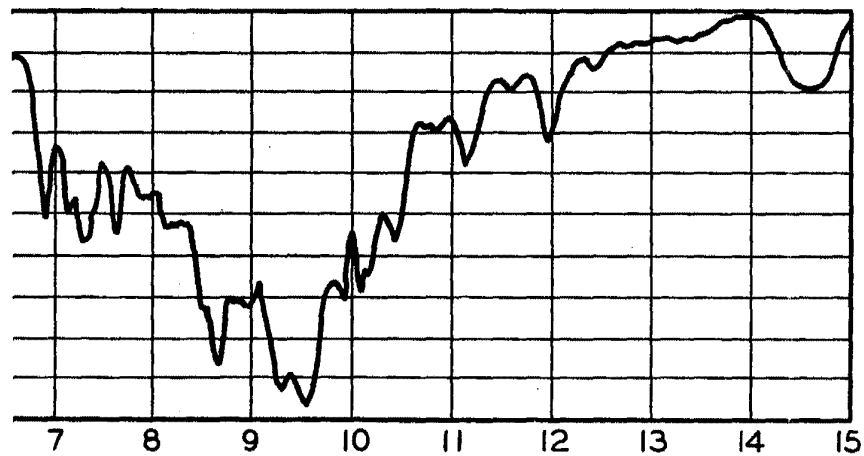


FIG. 2





25 23 50



Alberto de Elizaburu
 Pol. Postal