

Nº 361.027



22.

SECCION TECNICA
REGISTRACION I. P. C.
CLASE A-61
SUBCLASE K

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: ELI LILLY AND COMPANY

RESIDENCIA: 740 South Alabama Street, INDIANAPOLIS,
Indiana, EE.UU.

ENUNCIADO: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION
DE UN ADUCTO DE UN ANTIBIOTICO DE MA
CROLIDA".

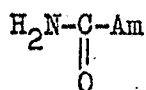
Prioridad: Patente estadounidense n.º 687.498 del 4.12.67.



1

Este invento proporciona un procedimiento para la preparación de un aducto de un antibiótico de macrolida conteniendo aldehído y una urea, que consiste en mezclar la urea y el antibiótico en un medio neutro o básico, en cantidades suficientes para proporcionar por lo menos 2 moles de urea por mol de antibiótico, estando representada dicha urea por la fórmula:

5



10

donde Am es -NH-R, siendo R fenilo, toliilo, halofenilo o trifluormetilfenil; o $\text{N} \begin{array}{l} \text{R}' \\ \text{R}'' \end{array}$, donde R' y R'' son independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₄ o alquenilo C₃-C₄, no pasando de 4 la suma de los átomos de carbono en R' y R''.

15

Varios antibióticos de macrolida contienen un grupo aldehído. Entre estos se encuentran la tilosina (patente estadounidense número 3.178.341, publicada el 13 de mayo de 1965) y los miembros de la serie de la leucomicina (Tetrahedron Letters, 1967, página 609), espiramicinas A, B, C y D (patentes estadounidenses número 3.000.785, publicada el 19 de septiembre de 1961 y 3.105,794, publicada el 1 de octubre de 1963), carbomicina (patente estadounidense 2.796.379, publicada el 18 de junio de 1957), carbomicina B (patente estadounidense número 2.785.104, publicada el 12 de marzo de 1957), etc. Estos antibióticos también contienen otros grupos activos; por ejemplo, la tilosina, contiene, además, un grupo cetona, un grupo lactona, grupos amina, grupos éter y grupos hidroxilo, así como uniones glicosídicas e insaturaciones etilénicas. Debido

20

25

30



1 a la presencia de un número tan elevado de funciones acti-
vas en cada uno de los antibióticos de macrolida, han sur-
gido problemas de estabilidad que han limitado su uso te-
5 rapeúatico. En particular, estos antibióticos de macrolida
sufren una serie de reacciones hidrolíticas ácidas y
también están sometidas a la degradación por oxidación. La
protección de los puntos sometidos a cambios químicos en
las diversas macrolidas ha sido objeto de considerable es-
tudio en los últimos años.

10 Además, se ha encontrado que el tratamiento
de los rumiantes con antibióticos por vía oral es afectado
por el hecho de que la flora del rumen puede alterar la
naturaleza de la molécula de antibiótico. Por ejemplo, se
ha encontrado que los organismos rumiantes tienen la capa-
15 cidad de reducir el grupo aldehído presente en muchos de
estos antibióticos de macrolida a un grupo alcohol prima-
rio. Con el antibiótico tilosina, este producto de trans-
formación es conocido por tilosina D (también AM-684, des-
crita en la patente estadounidense número 3.321.368, pu-
20 blicada el 23 de mayo de 1967). La tilosina D es mucho me-
nos activa antibióticamente que la tilosina normal y tie-
ne un espectro antibiótico algo distinto. La protección
del grupo aldehído de las transformaciones producidas por
los organismos del rumen durante el tratamiento terapéuti-
co de los mismos con antibióticos de macrolida como la ti-
25 losina, aumentaría mucho la eficacia terapéutica de estos
antibióticos.

30 También se ha encontrado que la administración oral
de antibióticos, incluidas las macrolidas y las tetracikli-



1 nas, a los animales rumiantes, ya sea con fines terapéuticos
o para aumentar la eficacia de la alimentación o la ganancia
de peso, va acompañada habitualmente de efectos secundarios
indeseables. Estos antibióticos, cuando se administran en
5 proporciones a las que son útiles para los fines citados,
afectan perjudicialmente a la flora del rumen. En consecuen-
cia, el mecanismo digestivo del rumiante es perturbado y ha-
bitualmente los animales dejan de comer, con o sin ataques
de diarrea, etc. Por ejemplo, Bell et al., J. Anim. Sci.
10 9, 647 (1950) y Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. 76, 284
(1951) han encontrado que la administración de clorotetra-
ciclina reduce la capacidad de digestión de las fibras cru-
das y de la materia seca en las vacas. La importancia del
rumen en la digestión de fibras (constituídas casi comple-
15 tamente de celulosa dietética) difícilmente puede ser sobre-
estimada y la depresión del proceso de digestión de la celu-
losa hace que el crecimiento del animal sea más lento, re-
duce la producción de leche, etc. Análogos resultados han
sido obtenidos por Luther et al. ("European Symposium on
20 Antibiotics and New Growth Factors in Animal Nutrition",
Roma, Italia, 10-12 de Mayo de 1955) para los antibióticos
polimixina B, cloroanfenicol, bacitracina, dihidroestrepto-
micina, oxitetraciclina, penicilina G y carbomicina. Final-
mente, en ciertos ensayos in vitro, Hungate et al., J. Anim.
25 Sci. 14, 997 (1955) encontraron que la presencia de niveles
elevados de clorotetraciclina reducía los productos de fer-
mentación totales con una flora de rumen típica.

Además de los estudios citados, se ha admitido que
frecuentemente se produce un periodo de anorexia, con o sin
diarrea, en las etapas iniciales del tratamiento antibióti-
30



1

co por vía oral de los rumiantes maduros. Estos efectos secundarios indeseables se han encontrado también cuando se administran a los rumiantes antibióticos de macrolida, incluida la tilosina.

5

De las consideraciones anteriores se deduce que sería del máximo interés un método mejorado de administración de antibióticos a los rumiantes por vía oral.

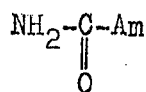
10

Los aductos de antibiótico-urea descritos aquí contienen 2 moléculas de una urea por cada molécula de antibiótico de macrolida conteniendo aldehído. Aunque debe entenderse que los aquí denominados aductos son compuestos definidos y que tiene lugar una reacción entre el grupo aldehído del antibiótico y 2 moléculas de una urea, como evidencia la desaparición de la señal característica del aldehído en el espectro de resonancia magnética nuclear de aducto.

15

Las ureas útiles para la preparación de nuestros nuevos aductos, en los que se combinan dos moles de urea con cada mol de antibiótico de macrolida que contiene un grupo aldehído, están representadas por la siguiente fórmula:

20



I.

25

donde Am es -NH-R siendo R un miembro del grupo formado por fenilo, tolilo, halofenilo y trifluormetilfenil; o $\text{N} \begin{cases} \text{R}' \\ \text{R}'' \end{cases}$, donde R' y R'' son miembros iguales o diferentes del grupo formado por hidrógeno, alquilo C₁-C₄ y alqueno C₃-C₄, no pasando de 4 la suma de los átomos de carbono en R' y R''. Como grupos representados por R citaremos o-tolilo, m-tolilo, p-tolilo, o-clorofenil, m-bromofenil, p-flúorfenil y similares. Como grupos representados por R' y R'' citaremos metilo, etilo, ali

30



1 lo, n-propilo, isopropilo, n-butilo y similares. Las ureas
útiles en la preparación de los aductos de este invento son
N-metilurea, N,N-dietilurea, N-n-butilurea, N-alilurea,
5 N-crotilurea, N-metil-N-alilurea, N-fenilurea, N-(p-cloro-
fenil)urea, N-(o-tolil)urea, N-(p-trifluormetilfenil)urea y
similares.

Entre los antibióticos de macrolida que contienen
un grupo aldehído que reacciona con dos moles de una urea
de fórmula I se encuentran la tilosina, macrocina, desmico-
10 sina, lactenocina, carbomicina, carbomicina B, nidamicina
(desacetilmagnomicina B), espiramicina A, B, C y D y miem-
bros de la serie de leucomicina, leucomicina A₁₋₈.

Los aductos de bis-urea de este invento se preparan
saturando soluciones acuosas o alcohólicas que contienen el
15 antibiótico de macrolida, generalmente en forma de sal, con
la urea. Se produce un jarabe espeso que se deja a la tem-
peratura ambiente hasta que el análisis, preferiblemente por
cromatografía en capa delgada, indica que prácticamente to-
do el antibiótico se ha transformado en un aducto de bis-
20 urea. Cuandó el procedimiento analítico indica que la forma-
ción del aducto es prácticamente completa, el producto se
aisla diluyendo la mezcla de reacción con 1-2 volúmenes de
agua, ajustando el pH de la mezcla acuosa a 9,0 aproxima-
damente y después saturando la mezcla con cloruro sódico. El
25 precipitado resultante se separa por filtración o por otros
medios convencionales y se purifica por disolución en un di-
solvente orgánico, generalmente cloroformo, lavando la capa
orgánica con agua, separando dicha capa orgánica y eliminan-
do los disolventes de la misma a presión reducida. El resi-
30 duo sólido amorfo resultante puede ser cristalizado después



1

en un disolvente orgánico anhidro para dar el aducto deseado en forma de sólido cristalino blanco.

5

Los aductos de antibiótico-urea aquí descritos proporcionan un método de administración de antibióticos a rumiantes por vía oral en el que el antibiótico es administrado en forma de un derivado que es esencialmente estable a la degradación química en el rumen y también antibióticamente inactivo pero que, al pasar al cuajar, se convierte en una sustancia antibióticamente activa, con lo que dicho antibiótico puede ejercer su efecto total terapéutico o promotor del desarrollo sin perturbar la microflora del rumen.

10

15

20

25

30

Las ventajas de este invento están representadas por el uso de un aducto de bis-urea de un antibiótico de macrolida, el aducto de tilosina-bis-urea, en el tratamiento de las infecciones causadas a los rumiantes por los organismos Gram-positivos, enfermedades relacionadas con el CRD, etc., o para aumentar la ganancia de peso o la eficacia de la alimentación o ambos a la vez. Estos aductos de bis-urea de los antibióticos de macrolida son prácticamente inactivos como antibióticos y no afectan al crecimiento o metabolismo de importante microflora del rumen. Además, son químicamente estables, siendo resistentes a la hidrólisis al pH prácticamente neutro del rumen. Sin embargo, cuando estos aductos de bis-urea pasan al cuajar ácido, son químicamente inestables a los pH encontrados allí y se hidrolizan rápidamente para dar el antibiótico original o, en algunos casos, una mezcla de antibiótico original más un producto de degradación ácida del antibiótico original que presenta actividad antibiótica. En otras palabras, nuestro invento hace que la administración de antibióticos a los ru-



1 miantes sea similar a la administración por vía oral de
antibióticos a animales no rumiantes, en cuyo último caso,
el antibiótico activo pasa inmediatamente al estómago que
5 tiene un pH ácido y del cual puede ser absorbido, ya sea
como tal o como producto de la degradación ácida del anti-
biótico.

Por lo tanto, puede ser administrado un antibiótico
a un rumiante por vía oral sin perturbar la microflora
del rumen y por consiguiente sin producir trastornos intes-
10 tinales, anorexia y diarrea o cualquiera de estos síntomas,
puesto que es probablemente la destrucción del equilibrio
microfloral del rumen lo que conduce a estos efectos secun-
darios indeseables diversos que acompañan a la administra-
ción de antibióticos a los rumiantes, ya que la microflora
15 particular que es perturbada invariablemente comprende los
organismos que digieren la celulosa. Mediante nuestro inven-
to, se consiguen los efectos completos terapéuticos y/o de
promoción del desarrollo o de eficacia de la alimentación
del antibiótico, sin ninguno de los efectos secundarios in-
deseables que se producen habitualmente.

20 Específicamente, cuando se administra a las vacas
el aducto de bis-urea de tilosina a razón de 250 mg/vaca
diarios, la depresión inicial en la ingestión de alimentos,
como ocurre cuando se administra tilosina sola, es pequeña
o nula, y tampoco se observa ningún efecto apreciable sobre
25 la digestión de la celulosa ni sobre la utilización del ni-
trógeno no proteínico. Además, no se producen diarrea ni
pérdida del apetito.

En la realización del procedimiento de nuestro in-
30 vento, empleando tilosina como ejemplo de antibiótico útil,



1 se administra a las vacas, corderos o cabras, aducto de ti-
2 losina-bis-urea a razón de 1 a 1000 mg/animal diarios, depen-
3 diendo de si se desea un efecto terapéutico rápido o si el
4 antibiótico se administra al animal simplemente para aumen-
5 tar la ganancia de peso y su salud general o para aumentar
6 la eficacia de la alimentación o para ambos fines, como par-
7 te de un programa general de alimentación. Los animales ru-
8 miantes a los que se administran estos niveles de aducto de
9 tilosina-bis-urea, presentan todos los favorables resulta-
10 dos que serían de esperar de la administración del antibió-
11 tico però sin ninguno de los efectos secundarios habitual-
12 mente asociados con la administración de tilosina sola.

13 En la administración del aducto de tilosin-bis-
14 urea o de otros aductos de bis-urea y macrolida o de otros
15 derivados antibióticos estables en medio básico a los anima-
16 les rumiantes, los compuestos se mezclan como tales con el
17 pienso. También pueden ser recubiertos con gelatina u
18 otro material similar y después mezclados con el pienso. Fi-
19 nalmente, pueden ser administrados en forma de bolas como
20 es costumbre en la administración de dosis terapéuticas de
21 antibióticos a los animales bovinos.

22 La siguiente tabla indica la ausencia de efectos
23 del aducto de tilosina-bis-urea, una forma típica de un an-
24 tibiótico, estable frente a las bases y antibióticamente
25 inactiva, sobre los organismos digestivos de la celulosa en
26 el rumen. En esta demostración, se prepara un inoculum a
27 partir del licor del rumen recogido de un novillo fistuloso
28 mantenido a un régimen con gran proporción en sustancias no
29 digestibles. En la preparación de este inoculum, el conte-
30 nido del rumen se cuela a través de cuatro capas de cedazo;



22

1 el residuo que queda en el cedazo se vuelve a suspender en
 un volumen igual de tampón de fosfato-carbonato a 37°C y de
 nuevo se cuele por el cedazo. El licor de rumen resultante
 se deja en reposo durante unos 30 minutos, durante cuyo tiempo
 5 po los protozoos se sedimentan en el fondo mientras que pequeñas
 cantidades de materia en partículas ascienden a la
 superficie. Se separan los protozoos y la fase líquida y se
 utilizan como inoculum del rumen. Antes de su uso, el inoculum
 se diluye con un volumen igual de un tampón de fosfato-
 10 to-bicarbonato previamente saturado con dióxido de carbono
 que contiene los siguientes ingredientes:

Composición de la mezcla tampón nutritiva

	<u>Ingrediente</u>	<u>g/litro</u>
	NaH ₂ PO ₄	0,316
15	KH ₂ PO ₄	0,152
	NaHCO ₃	2,260
	KCl	0,375
	NaCl	0,375
	MgSO ₄	0,112
20	CuCl ₂	0,038
	FeSO ₄	0,008
	MnSO ₄	0,004
	ZnSO ₄	0,004
	CuSO ₄	0,002
25	CoCl ₂	
	CuCl ₂	0,001

Al inoculum diluido se añade celulosa a razón de
 5 g/litro y urea a razón de 1 g/litro. La mezcla se incuba
 en atmósfera de dióxido de carbono durante 30 minutos. A continuación
 se sacan partes alícuotas de 25 ml y se colocan en
 pequeños matraces de incubación provistos de unas válvulas
 30



22

1 de gas de un solo paso para permitir que el exceso de gas
escape y mantener las condiciones anaerobias. Se añaden diver-
sos productos antibióticos en proporciones variables al ma-
traz de incubación y se realiza ésta durante 24 horas. Al
5 final de la incubación se registra el pH. A continuación se
añaden a cada matraz 5 ml de ácido metafosfórico al 20 %.
Se congela el contenido de los matraces, a continuación se
descongela y finalmente se centrifuga. Se recupera una mues-
tra del líquido que sobrenada para determinar por cromato-
10 grafía de gases los ácidos grasos volátiles de cadena cor-
ta. El contenido restante del matraz se mezcla con 20 ml de
ácido acético al 80 % y 2 ml de ácido nítrico y la mezcla se
calienta a 130°C durante 30 minutos para digerir todo el ma-
terial excepto la celulosa. Después del periodo de calefac-
15 ción, se añaden 20 ml de alcohol etílico al contenido de ca-
da matraz y se centrifuga el material insoluble, predominan-
temente celulosa.

Se añaden a los matraces tilosina, clorotetraci-
clina y oxitetraciclina, a una concentración de 1 mcg/ml. El
20 aducto de tilosina-bis-urea se añade al matraz en una pro-
porción tal que dé 1 microgramo de tilosina por mililitro
después de la hidrólisis del aducto. Uno de los matraces se
reserva como control. La Tabla I dada a continuación con-
tiene los resultados de esta experiencia. En la tabla, la
25 columna 1 da el tratamiento y la columna 2 el porcentaje
medio de celulosa digerida (3 incubaciones).



22

1

TABLA I

<u>Tratamiento</u>	<u>Porcentaje medio de celulosa digerida</u>
Aducto de tilosina-bis-urea	69,6
Tilosina	30,3
Clorotetraciclina	12,9
Oxitetraciclina	16,8
Control	76,3

5

10

La Tabla II da el efecto de los mismos antibióticos sobre la producción de ácidos grasos volátiles. En la Tabla II, la columna 1 da el tratamiento y la columna 2 el número medio de micromoles/ml de ácidos grasos volátiles.

TABLA II

<u>Tratamiento</u>	<u>Acidos grasos volátiles producidos por término medio, $\mu\text{M/ml}$</u>
Aducto de tilosina-bis-urea	27,0
Tilosina	8,6
Clorotetraciclina	3,4
Oxitetraciclina	2,0
Control	29,2

15

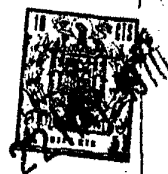
20

25

Por los resultados de la experiencia anterior puede verse que el aducto de tilosina-bis-urea tiene un efecto pequeño o nulo sobre el porcentaje de celulosa digerida o sobre la producción de ácidos grasos volátiles por la flora del rumen, mientras que los otros antibióticos, incluida la tilosina sola, tienen un efecto perjudicial sobre ambas actividades del rumen.

30

El aducto de tilosina-bis-urea también ha demostrado ser muy eficaz en el uso real en la práctica. Los resultados indicados en la Tabla III fueron obtenidos en una ex-



1 periencia de alimentación de 28 días de duración, con novi-
llos de 1 año sometidos a un régimen rico en sustancias no
digestibles. En la tabla la columna 1 da el número de novi-
llos sometidos a cada régimen de alimentación, la columna 2
5 el nivel diario de antibiótico, caso de utilizar alguno, por
novillo, la columna 3 las libras (kg) ganadas por cada novi-
llo diariamente, la columna 4 las libras (kg) de pienso por
novillo y por día y la columna 5 las libras (kg) de pienso
por libra (kg) de aumento de peso.

10

TABLA III

Nº de no- villos en cada gru- po	Nivel diario de antibióti- co en el pienso	Libras(kg) ganadas por novillo y por día	Libras(kg) de pienso por novillo y por día	Libras(kg) de pienso/ libras(kg) de aumento de peso
11	Ninguno	1,33 (0,603)	20,7 (9,389)	15,5
15	Tilosina, 250 mg	1,38 (0,626)	21,1 (9,571)	15,3
11	Aducto de ti- losina-bis-urea conteniendo 250 mg de actividad de tilosina	1,50 (0,680)	21,2 (9,617)	14,1

20

Como puede verse en los datos de la tabla anterior,
los novillos que reciben el aducto de tilosina-bis-urea
aumentan más de peso por día que los otros novillos que re-
ciben una cantidad equivalente de tilosina o los de un gru-
po de control y que también aumenta la eficacia de la alimen-
tación (cantidad de pienso por libras (o kg) aumentados).
25 Además, los novillos que reciben el aducto de tilosina-bis-
urea no presentan ninguno de los efectos secundarios indesea-
bles antes descritos.

25

30

El aducto de tilosina-bis-urea puede ser utilizado
para tratar a los animales rumiantes que sufren diversos



1 aunque también pueden ser patógenos, pero en menor grado,
E. faurei, E. intracata y E. parva.

5 El aducto de bis-urea de otros antibióticos de ma-
crolida que contienen un grupo aldehído, comprendidos la
magnamicina, espiramicina A, macrocina, desmicosina, lacte-
nocina, carbomicina, carbomicina B, nidamicina, otros miem-
bros de la serie de la espiramicina y miembros de la serie
de la leucomicina, pueden ser preparados de forma análoga.
10 Estos aductos pueden ser administrados por vía oral a los
rumiantes con fines terapéuticos o para aumentar la ganancia
de peso y/o la eficacia de la alimentación en un programa de
engorde normal de rumiantes, de la misma forma que se hace
con el aducto de tilosina-bis-urea. Estos otros aductos de
bis-urea también son fundamentalmente estables al pH del ru-
men y antibióticamente inactivos, pero al pasar al cuajar,
15 son hidrolizados al antibiótico original que entonces puede
actuar como tal. Como ocurre con el aducto de tilosina-bis-
urea, los efectos secundarios que acompañan a su administra-
ción son mínimos. La dosis utilizada es la misma que en el
caso del aducto de tilosina-bis-urea.
20

Resultará evidente para los expertos en la técnica
que pueden prepararse otros derivados de diversos antibióti-
cos, estables frente a las bases y antibióticamente inacti-
vos, cuya utilidad ya ha sido demostrada en el engorde del
ganado vacuno y otros rumiantes, por ejemplo derivados de
25 resinas cambiadoras de ión, sales de adición con ácidos in-
solubles en las bases y similares.

A continuación se ilustra la preparación de aductos
de bis-urea de antibióticos de macrolida específicos.
30

10
22 MAY 1978

1

EJEMPLO 1

Aducto de tilosina-bis-urea

5

Se disuelven 100 g de tartrato de tilosina en una solución que contiene 100 g de urea en 100 ml de agua. La mezcla resultante se deja en reposo hasta que la cromatografía en capa delgada indica que la formación del aducto es prácticamente completa. Para realizar la cromatografía en capa delgada, se emplea como substrato gel de sílice con un sistema disolvente de dietilamina/acetato de etilo 1:9. En este sistema, el aducto de tilosina-bis-urea permanece en el origen mientras que la tilosina se mueve inmediatamente detrás del frente de disolvente.

10

15

20

25

30

El aducto de tilosina-bis-urea se aísla de la mezcla de reacción añadiendo dos volúmenes de agua a la misma y después ajustando el pH de la solución a 9 aproximadamente con solución acuosa de hidróxido sódico al 10 %. A continuación se agrega cloruro sódico sólido hasta que precipita el aducto crudo de tilosina-bis-urea en forma de una goma sólida de color amarillento, que se separa por filtración. La torta del filtro se disuelve en cloroformo y la solución clorofórmica se lava con agua y se seca. Se separa el cloroformo a presión reducida para dar aducto de tilosina-bis-urea en forma de sólido amorfo de color amarillo pálido que se seca a fondo a presión reducida para eliminar la mayor parte del cloroformo residual posible. El sólido seco se disuelve después en acetona seca a razón de 5 ml por gramo de sólido y la solución resultante se enfría. El aducto de tilosina-bis-urea cristaliza en forma de agujas blancas que se separan por filtración, p.f. 220-222°C.



22 MAY 1970

1

Análisis para $C_{47}H_{83}N_5O_{18}$:

Calculado: C, 56,22; H, 8,39; N, 6,96

Encontrado: C, 56,05; H, 8,32; N, 6,72

5

El espectro de resonancia magnética nuclear del aducto no presenta ningún protón atribuible al grupo aldehído. El aducto es microbiológicamente inactivo contra los organismos que se utilizan rutinariamente para ensayar la tilosina.

10

La tilosina se regenera químicamente a partir de su aducto con bis-urea disolviendo este último en una solución acuosa mantenida a un pH comprendido entre 4 y 7 mediante tampones normales. También se obtiene algo de desmicosina, producto de la hidrólisis ácida de la tilosina.

15

El aducto de tilosina-bis-(N-metilurea) se prepara sustituyendo la urea en el procedimiento anterior por N-metilurea.

20

Otras ureas representadas por la fórmula I pueden ser utilizadas en lugar de la urea o N-metilurea en el ejemplo anterior para formar aductos de bis-urea con los antibióticos de macrolida. Entre estas ureas que forman un aducto de bis-urea se encuentran la alilurea, N,N-dietilurea, etilurea y N-metil-N-n-propilurea. Todas estas ureas son solubles en agua y el procedimiento anterior puede ser utilizado sin modificación para preparar el aducto con bis-urea. Con otras ureas como la N-(m-tolil)urea, N-fenilurea, N-(t-butil)urea y N-(p-trifluormetilfenil)urea, se emplean soluciones alcohólicas de la urea y de la sal de tilosina en lugar de soluciones acuosas.

25

30



22.3.11.13

1

EJEMPLO 2

Aducto de magnamicina-bis-urea

5

10

15

20

25

Se disuelven 2 g de magnamicina en 5,0 ml de solución acuosa saturada de urea mantenida a un pH comprendido entre 5,0 y 5,5 mediante la adición de solución acuosa de ácido clorhídrico al 10 % cuando es necesario. Después de permanecer a la temperatura ambiente durante 12 días, la solución se diluye con 4 volúmenes de agua. La solución acuosa se extrae con porciones de 40 ml de cloroformo a los siguientes valores de pH: 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 y 7,0. El pH de la solución se ajusta en la forma deseada antes de cada extracción mediante la adición de solución acuosa de hidróxido sódico al 10 %. El aducto de urea se encuentra presente en cada uno de estos extractos, pero solamente los extractos tomados a pH 6,5 y 7,0 están esencialmente exentos de magnamicina. Los extractos a estos valores de pH mayores se combinan y el aducto de magnamicina-bis-urea se aísla y purifica por el método empleado para el aducto de tilosina-bis-urea en el Ejemplo 1. Se obtienen 0,5 g de un sólido blanco con el espectro típico de la magnamicina en el ultravioleta ($\epsilon_{240\text{m}\mu}^{\text{max}} = 13.000$). El espectro RMN del aducto carece de la señal propia del protón del aldehído. El bioensayo del aducto de bis-urea indica que es inactivo contra los organismos empleados en el ensayo normal de la magnamicina.

La magnamicina se recupera a partir del aducto de magnamicina-bis-urea calentando en autoclave éste a 120°C durante 20 minutos y pH = 5.

EJEMPLO 3

Aducto de espiramicina-bis-urea

30

Se disuelven 2 g de espiramicina A en 50 ml de so-



1 lución acuosa saturada de urea que se mantiene a un pH com-
prendido entre 4,5 y 5,0 mediante la adición de solución
acuosa de ácido clorhídrico al 10 % cuando es necesario. Des-
pués de permanecer a la temperatura ambiente durante 12 días,
5 la solución se diluye con cuatro volúmenes de agua y se somete
a un procedimiento de extracción a pH variable como en
el Ejemplo 2, con la excepción de que los extractos se obtie-
nen a los siguientes valores de pH: 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0,
8,5 y 9,0. Para cada extracción se emplean 40 ml de cloro-
10 formo. Los extractos a pH 8,0, 8,5 y 9,0 se combinan para
dar 1,0 g de aducto de espiramicina-bis-urea en forma de
sólido blanco. El espectro ultravioleta del aducto es prác-
ticamente igual al de la espiramicina A sin reaccionar
($\epsilon_{230m\mu}^{max} = 23.000$). El espectro RMN es comparable al de la
15 espiramicina A, excepto en la desaparición de la señal del
protón de aldehído.

El aducto de espiramicina-bis-urea se convierte en
espiramicina disolviendo 20 mg del mismo en 1 ml de etanol,
añadiendo 4 ml de tampón a pH 5,5 y tratando la mezcla en
20 autoclave durante 20 minutos a 120°C.

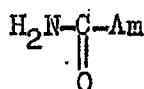
Los aductos de bis-urea de otros antibióticos de
macrolida conteniendo un grupo aldehído, comprendidas la
macrocin, desmicosina, lactenocina, carbomicina, carbomi-
cina B, nidamicina, otros miembros de la serie de la espi-
ramicina y miembros de la serie de la leucomicina, pueden
25 ser preparados de forma similar.

En resumen, la Patente de Invención que se solici-
ta deberá recaer sobre las siguientes:



REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de un aducto de un antibiótico de macrolida conteniendo aldehído y una urea, caracterizado por mezclar la urea y el antibiótico en un medio neutro o básico, en cantidades suficientes para proporcionar por lo menos dos moles de urea por mol de antibiótico, estando representada dicha urea por la fórmula:



donde Am es -NH-R, siendo R fenilo, toliilo, halofenilo o trifluormetilfenil; o $\text{N} \begin{array}{l} \text{R}' \\ \text{R}'' \end{array}$ donde R' y R'' son independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₄ o alquenilo C₂-C₄, no pasando de 4 la suma de los átomos de carbono en R' y R''.

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, caracterizado por saturar una solución acuosa o alcohólica del antibiótico de macrolida con urea, mantener la solución saturada a la temperatura ambiente hasta que la reacción es completa, diluir la mezcla de reacción con agua, ajustar el pH de la mezcla a 9 aproximadamente y precipitar, separar y purificar el producto.

3. Un procedimiento según la Reivindicación 2, caracterizado porque el antibiótico de macrolida se encuentra en forma de sal.

4. Un procedimiento según las Reivindicaciones 1, 2 ó 3, caracterizado porque el antibiótico de macrolida es tilosina, macrocina, desmicosina, lactenocina, carbomicina, carbomicina B, nidamicina, una de las espiramicinas A, B, C o D o leucomicina A₁₋₈.

5. Un procedimiento según la Reivindicación 1,



1 caracterizado porque el antibiótico de macrolida es tilo-
sina.

5 6. Un procedimiento según la reivindicación 4
caracterizado porque el antibiótico de macrolida es desmi-
cosina.

7. Se reivindica por último como objeto sobre
el que ha de recaer la patente de invención que se solicita:
"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN ADUCTO DE UN AN-
TIBIOTICO DE MACROLIDA".

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

Madrid, 3 diciembre 1.968

BERNARDO UNGRIA

P.D.

15

20

25

30