

443272

PATENTE DE INVENCIÓN

Case. No. 25.185

Int. Cl.² C07D/A61K

Memoria Descriptiva

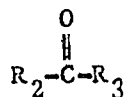
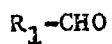
sobre:

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR DERIVADOS
ALQUILADOS DEL ANTIBIOTICO BMI23.

Solicitante: AMERICAN CYANAMID COMPANY, entidad norteamericana,
residente en Berdan Avenue, Township of Wayne,
Estado de New Jersey, EE.UU. de A.

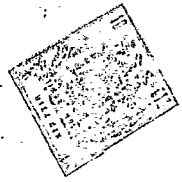


La presente invención se relaciona con un nuevo grupo de antibióticos y, más particularmente, se relaciona con una nueva serie de agentes antibacterianos potentes que derivan de una alquilación reductiva del antibiótico BML23γ con un aldehído o cetona de las siguiente fórmulas generales:





- donde R_1 es hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior halo sustituido, alqueno inferior, fenilo, fenilo monosustituido, fenilalquilo inferior, 2-furilo, 2-furilo metil sustituido, 2-tienilo, 2-tienilo metil sustituido,
5. 2-pirrilo, 2-pirrilo metil sustituido, 2-piridilo o 2-quinolilo; R_2 es alquilo inferior, alquilo inferior halo sustituido o fenilalquilo inferior; R_3 es alquilo inferior, alquilo inferior halo sustituido, alqueno inferior, cicloalquilo inferior, fenilo, fenilo monosustituido, fenil
10. alquilo inferior o fenil monosustituido alquilo inferior; y R_2 y R_3 tomados juntamente representan tetrametileno, pentametileno o hexametileno. Grupos alquilo inferior y alquilo inferior halo sustituidos apropiados contemplados por la presente invención son aquellos que tienen hasta 6
15. átomos de carbono en donde halo es ejemplificado por cloro, bromo, e iodo tales como metilo, etilo, isopropilo, s-butilo, n-amilo, diclorometilo, 2-bromoetilo, 2,3-diodopropilo, γ -cloropropilo, etc. Grupos alqueno inferior apropiados son aquellos que tienen hasta 4 átomos de carbono
20. tales como vinilo, alilo, propenilo, isopropenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, isobutenilo, etc. Grupos de cicloalquilo inferior apropiados son ciclopentilo, ciclohexilo, y cicloheptilo. Grupos fenilo monosustituidos apropiados contemplados por la presente invención son, por
25. ejemplo, p-acetamidofenilo, m-nitrofenilo, m-mercaptofeni-



lo, o-anisilo, p-anisilo, o-tolilo, p-tolilo y similares en donde fenilo alquilo inferior es ejemplificado por bencilo, α -feniletilo, y β -feniletilo. Grupos fenil monosubstituidos alquilo inferior apropiados pueden ser o, m, ó p-clorobencilo, α -(p-aminofenil)etilo, β -(m-nitrofenil)etilo, etc. Grupos 2-furilo metil substituidos, 2-tienilo, y 2-pirriilo apropiados que pueden emplearse son, por ejemplo, 5-metil-2-furilo, 3,4-dimetil-2-furilo, 4-metil-2-tienilo, 3,5-dimetil-2-tienilo, 5-metil-2-pirriilo, 1,3,4-trimetil-2-pirriilo, y similares.

El procedimiento de alquilación reductiva por el cual pueden prepararse los nuevos agentes antibacterianos de la presente invención se lleva a cabo como sigue. Se disuelve antibiótico BM123 γ , BM123 γ_1 , ó BM123 γ_2 en un solvente apropiado tal como agua, metanol, metilcellosolve, o mezclas de los mismos, se agrega luego una cantidad en exceso de una cantidad equimolar del descado aldehido o cetona seguido por la adición de una suficiencia reductiva de cianoborohidruro de sodio. El pH de la mezcla de reacción se mantiene a 6,0-8,0 con ácido mineral diluido durante el curso de la reacción. Luego de 1 a 24 hr a temperatura ambiente ((10°-35°C), la mezcla de reacción se evapora hasta sequedad en vacío y el residuo se tritura con metanol y se filtra. El filtrado se diluye con acetona y el producto sólido que se precipita se separa por filtración

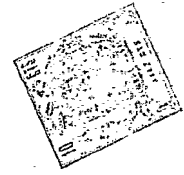


y se seca en vacío.

Aldehidos que pueden así emplearse en el procedimiento precedente son, por ejemplo, acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído, isobutiraldehído, crotonaldehído, valeraldehído, benzaldehído, p-cianobenzaldehído, salicilaldehído, cinamaldehído, tricloroacetaldehído, etc. Cetonas que pueden así emplearse en el procedimiento precedente son, por ejemplo, acetona, 2-butanona, 1,3-dibromoacetona, cloroacetona, acetofenona, m-cloroacetofenona, p-bromoacetofenona, p-trifluormetilacetofenona, m-nitroacetofenona, p-dimetilaminoacetofenona, etc.

Los productos se obtienen a partir de las mezclas de reacción de alquilación reductiva mediante procedimientos convencionales tales como precipitación, concentración, extracción por solvente o combinaciones de estos procedimientos. Luego de aislación, los productos pueden purificarse mediante cualquiera de los métodos generalmente conocidos para purificación. Estos incluyen recristalización con diversos solventes y sistemas de solventes mixtos, técnicas cromatográficas, y distribución a contracorriente, todos los cuales se emplean generalmente para este propósito.

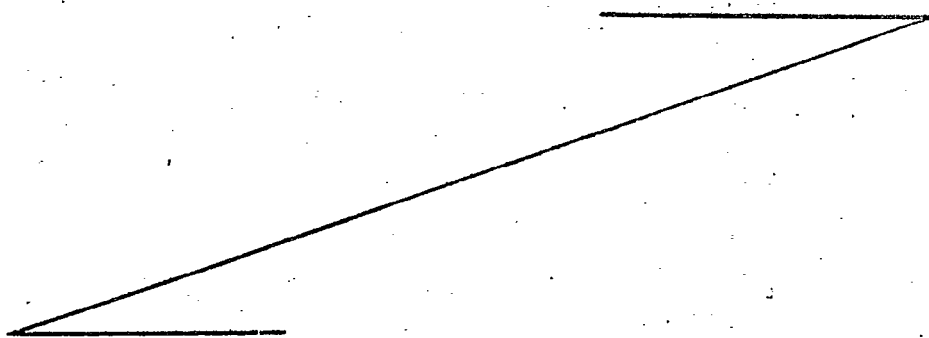
Los agentes antibacterianos novedosos de la presente invención son bases orgánicas y por lo tanto son capaces de formar sales de adición de ácido con una variedad



- de reactivos formadores de sales orgánicas e inorgánicas. Así, sales de adición de ácido, formadas por mezcla de la base libre antibacteriana con hasta tres equivalentes de un ácido, preferiblemente en un solvente neutro, son formadas con ácidos tales como ácido sulfúrico, fosfórico, fumarico, tartárico, acético, benzoico, glucónico, ascórbico, y ácidos relacionados. Las sales de adición de ácido de los agentes antibacterianos de la presente invención son, en general, sólidos cristalinos relativamente solubles en agua, metanol y etanol pero son relativamente insolubles en solventes orgánicos no polares tales como dietil éter, benceno, tolueno, y similares. Para propósitos de la presente invención, las bases libres antibacterianas son equivalentes a sus sales de adición de ácido no tóxicas.
- 5.
- 10.
- 15.

Los antibióticos designados BML23 β ₁, BML23 β ₂, BML23 γ ₁ y BML23 γ ₂ se forman durante el cultivo bajo condiciones controladas de una nueva cepa de una especie indeterminada de Nocardia. Esta nueva cepa productora de antibiótico fue aislada de una muestra de tierra de jardín recogida en

20.





- Oceola, Iowa, y es mantenida en la colección de cultivo de Lederle Laboratories Division, American Cyanamid Company, Pearl River, New York, como Cultivo N° BML23. Un cultivo viable del nuevo microorganismo ha sido depositado en el
5. Laboratorio de Colección de Cultivo, Northern Utilization research and Development Division, United States Department of Agriculture, Peoria, Illinois, y ha sido agregado su colección permanente. Es libremente asequible al público en este depósito bajo su número de accesoión NRRL 5646. De aquí
10. en adelante MBL23 β se refiere a una mezcla en cualquier proporción de BML23 β ₁ y BML23 β ₂, y BML23 γ se refiere a una mezcla en cualquier proporción de BML23 γ ₁ y BML23 γ ₂.
- La siguiente es una descripción general del microorganismo Nocardia sp., NRRL 5646 en base a características
15. de diagnóstico observadas. Las observaciones se hicieron de las características culturales, fisiológicas, y morfológicas del organismo de acuerdo con los métodos detallados por Shirling y Gottlieb, Internat. J. of Syst. Bacteriol. 16:213-240 (1966). La composición química del cultivo
20. se determinó mediante los procedimientos indicados por Lechevalier y otros, Advan. Appl. Microbiol, 14:47-72 (1971). Los colores descriptivos subrayados y las designaciones de brizna de color son tomadas de Jacobson y otros, Color Harmony Manual, 3ra. ed. (1948), Container Corp. of America, Chicago, Illinois, Los detalles descriptivos son re-
- 25.



gistrados en las Tablas I a V seguidamente.

Cantidad de Desarrollo

- Moderado en extracto de levadura, asparagina dextrosa, ágaros de Benedict, Bennett, patata-dextrosa y Weinstein; leve en ágaros de Hickey y Tresner, pasta de tomate, harina de avena, y pabulum, y un indicio de desarrollo en sales inorgánicas-almidón, ágaros de copos de avena de Kuster, solución de Czupok, y arroz.

Micelio Aéreo

10. Micelio aéreo blanquizco cuando está presente; producido solamente en extracto de levadura, asparagina-dextrosa, ágaros de Benedict, Bennett, y patata-dextrosa.

Pigmentos Solubles

No se produjeron pigmentos solubles.

15. Color de reverso

Incoloro a tonos amarillentos.

Reacciones Fisiológicas Micelancas

20. Ninguna licuefacción de gelatina; nitratos reducidos a nitritos en 7 días; pigmentos de melanoide no formados en ágar de peptona-hierro; ninguna peptonización o formación de grumos en leche púrpura; tolerancia de NaCl en ágar de extracto de levadura $\bar{>}$ 4% peso, $\bar{<}$ 7%; temperatura óptima de desarrollo 32°C. Utilización de fuente de carbón, de acuerdo con el método de Pridham and Gootlieb
25. [J. Bacteriol. 56:107-114 (1948)] como sigue: buena utili-



5. zación de glicerol, salicina, d-trehalosa y dextrosa; utilización regular de i-inositol; y pobre a ninguna utilización de d-fructosa, maltosa, adonitol, l-arabinosa, lactosa, d-manitol, d-melibiosa, d-rafinosa, l-ramnosa, sucrosa y d-xilosa.

Composición Química

10. El organismo pertenece al tipo de pared celular IV, es decir contiene ácido meso-2,6-diaminopimélico y tiene un diseño de azúcar de célula total tipo A, es decir, contiene arabinosa y galactosa. Extractos de células totales metiladas, cuando se someten a cromatografía de gas, demostraron diseños de ácido graso similares a aquellos producidos por Hocardia asteroides ATCC 3308.

Micromorfología

15. El micelio aéreo surge de micelio de sustrato como elementos flexuosos moderadamente largos escasamente ramificados que comúnmente terminan en espirales primitivos alargados. Los elementos flexuosos están irregularmente segmentados en secciones cortas elípticas a cilíndricas
20. (esporos?) que se desarticulan fácilmente. Las porciones terminales de espirales están menos claramente segmentadas. Los segmentos generalmente varían de 0,8-1,7 μ m x 0,3-0,5 μ m, promediando 0,4 μ m x 1,2 μ m.

Diagnósis

25. Las características morfológicas del Cultivo N°



- BMI23 son difíciles de observar e interpretar debido al pobre desarrollo de micelio aéreo en la mayoría de los medios. Por lo tanto, se da considerable importancia, debido a la necesidad, al análisis químico para determinar
5. la relación genérica del organismo. En base al sistema propuesto por Lechevalier y otros, el Cultivo N° BMI23 contiene ácido meso-2,6-diaminopimélico en sus células totales y el análisis de azúcar demuestra que está presente arabinosa y galactosa. Por lo tanto, el cultivo pertenece al tipo de pared celular IV. Una comparación del diseño de cromatografía de gas del Cultivo N° BMI23 con aquél de Nocardia asteroides ATCC 3308 muestra que los dos eran notablemente similares. Otras características del Cultivo N° BMI23 que están de acuerdo con el concepto de Nocardia, son su desarrollo aéreo fragmentado en ciertos medios y la total ausencia de desarrollo aéreo en la mayoría de los medios. En virtud de la carencia de un criterio adecuado para la caracterización de Nocardia al nivel de especies, no se ha realizado en ningún intento
 10. de hacer esta determinación. Por lo tanto, el cultivo N° BMI23 será considerado como una especie indeterminada de Nocardia hasta que tal diagnóstico sea factible.
 - 15.
 - 20.



TABLA I

Características de Cultivo de Nocardia sp. MRRL 5646

Medio	Incubación: 14 días		Temperatura: 32°C	Observaciones
	Cantidad de crecimiento	Micelio Aéreo y/o Esporos		
Agar de extracción de levadura	Moderado	Micelio aéreo blanquecino, leve	Ninguno	Áreas oscuras en micelio de substrato. Colonias formadas en micelio superficial
Agar Micky y Tremer	Leve	Sin micelio aéreo	Ninguno	Incoloro a áreas periféricas de colonias que se vuelven amarillentas
Agar de Aspara gina dextrosa	Moderado	Indicio de micelio aéreo blanquecino	Ninguno	Superficie levemente arrugada
Agar de Benedict	Moderado	Micelio aéreo blanquecino leve	Ninguno	Colonias abundantes formadas en micelio superficial
Agar de Bennett	Moderado	Vestigio de micelio aéreo blanquecino	Ninguno	Superficie levemente arrugada
Agar de almidón sales inorgánicas	Vestigio	Sin micelio aéreo	Ninguno	Incoloro

TABLA I

Características de Cultivo de <u>N</u>			
Incubación: 14 días			
Medio	Cantidad de Crecimiento	Micelio Aereo y/o Esporos	Pigmento Soluble
Agar de extracto de levadura	Moderado	Micelio aereo blancuzco, leve	Ninguno
Agar Hickey y Tresner	Leve	Sin micelio aereo	Ninguno
Agar de Asparagina dextrosa	Moderado	Indicio de micelio aereo blancuzco	Ninguno
Agar de Benedict	Moderado	Micelio aereo blancuzco leve	Ninguno
Agar de Bennett	Moderado	Vestigio de micelio aereo blancuzco	Ninguno
Agar de almidón sales inorgánicas	Vestigio	Sin micelio aereo	Ninguno



TABLA I

Cultivo de Nocardia sp. NRRL 5646

14 días		Temperatura: 32°C	
Color Aereo	Pigmento Soluble	Color de Reverso	Observaciones
blanco, leve	Ninguno	<u>Mostaza</u> (3 ic)	Áreas oscurecidas en micelio de substrato. Cornios formados en micelio superficial
blanco	Ninguno	Incoloro a verde ana rillante	Áreas periféricas de colonias que se vuelven verde oliva
de micelio blanco	Ninguno	<u>Ambar</u> (3 lc)	Superficie levemente arrugada
de micelio blanco	Ninguno	<u>Canela raído</u> (4 gc)	Cornios abundantemente formados en micelio superficial
de micelio blanco	Ninguno	<u>canello</u> (3 ic)	Superficie levemente arrugada
blanco	Ninguno	Incoloro	

TABLA I (Cont.)

Agar de copos de Indicio avena	Sin micelio aereo	Ninguno	Incoloro
Agar de solución Indicio Czapck	Sin micelio aereo	Ninguno	Incoloro
Agar de patata y Moderado destruosa	Micelio aereo blan cuzco leve	Ninguno	Camello (3 ic)
Agar de harina Leve de avena y pasta de tomate	Sin micelio aereo	Ninguno	Incoloro
Agar de Pablum Leve	Sin micelio aereo	Ninguno	Incoloro
Agar de arroz Indicio	Sin micelio aereo	Ninguno	Incoloro
Agar de Weinstein Moderado	Sin micelio aereo	Ninguno	Incoloro a amarillento

Agar de copos de avena	Indicio	Sin r
Agar de solución Czapok	Indicio	Sin r
Agar de patata y dextrosa	Moderado	Micel cuzco
Agar de harina de avena y pasta de tomate	Leve	Sin r
Agar de Fablum	Leve	Sin r
Agar de arroz	Indicio	Sin r
Agar de Weinstein	Moderado	Sin r



TABLA I (Cont.)

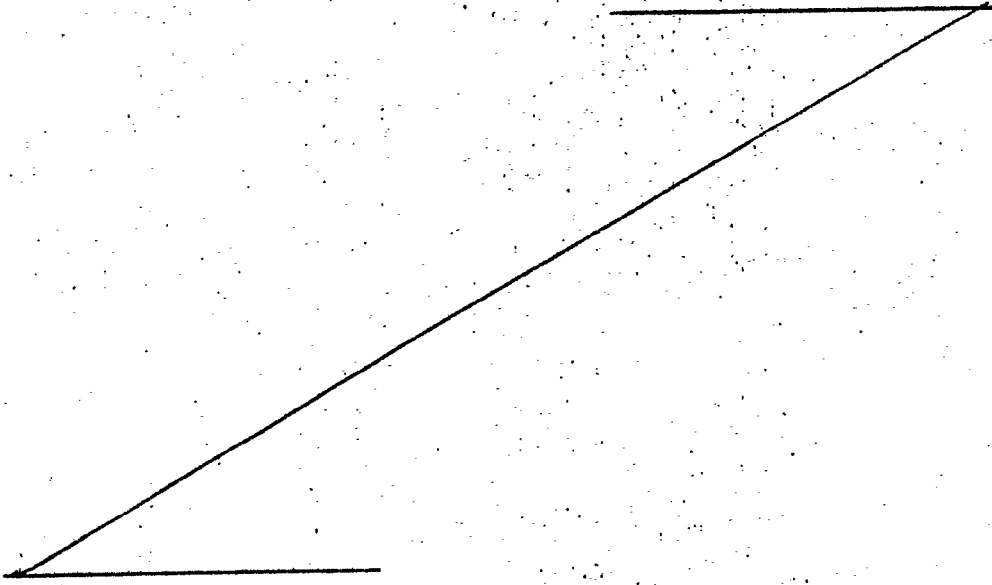
io	Sin micelio aereo	Ninguno	Incoloro
io	Sin micelio aereo	Ninguno	Incoloro
ado	Micelio aereo blan cuzco leve	Ninguno	<u>Camelio</u> (3 ie)
e	Sin micelio aereo	Ninguno	Incoloro
e	Sin micelio aereo	Ninguno	Incoloro
io	Sin micelio aereo	Ninguno	Incoloro
ado	Sin micelio aereo	Ninguno	Incoloro a amarillento



TABLA II

Micromorfología de Nocardia sp. NRRL 5646

Medio	Estructura de Micelio aereo y/o esporíferos
Agar de Extracto de Levadura	El micelio aereo surge de micelio de substrato como elementos flexuosos escasamente ramificados que comúnmente terminan alargados. Los elementos flexuosos están irregularmente segmentados en secciones cortas (esporos?) que se desarticulan fácilmente. Las porciones terminales de espiral están menos claramente segmentadas. Los segmentos generalmente varían de 0,8-1,7 μ m x 0,3-0,5 μ m, promediando 0,4 μ m X 1,2 μ m.





III
 Reacción de Nocardia sp. NRRL 5646

TABLA
 Reacción Fisiológica Mi

Medio	Período de Incubación	Cantidad	de Crecimiento	Reacción Fisiológica
Gelatina	7 días		Leve	Sin licuefacción
Gelatina	14 días		Buena	Sin licuefacción
Caldo de Nitrató Orgánico	7 días		Buena	Nitratos reducidos a nitritos
Caldo de Nitrató orgánico	14 días		Buena	Nitratos reducidos a nitritos
Agar de peptonas-hierro	24-48 hr		Buena	Ningún pigmento de melanina reducido
Leche púrrura	7 días		Buena	Sin peptonización o fermentación de grupo
Agar de extracto levadura mas (4, 7, 10 y 13%) NaCl	7 días		buena	Tolerancia de NaCl $\frac{5}{7}$ 4% pero $\frac{7}{7}$

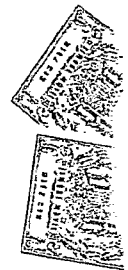
TABLA

III

Reacción Fisiológica Mi

scelanc

Medio	Período de Inculación	Cantidad	de Cre
Gelatina	7 días		Leve
Gelatina	14 días		Buena
Caldo de Nitra- to Orgánico	7 días		Buena
Caldo de nitra- to orgánico	14 días		Buena
Agar de peptona -hierro	24-48 hr		Buena
Leche púrpura	7 días		Buena
Agar de extracto levadura mas (4, 7, 10 y 13%) NaCl	7 días		Moderada



TABLA

III

Características Micológicas de *Nocardia* sp. NRRL 5646

<u>Cantidad</u>	<u>de Crecimiento</u>	<u>Reacción Fisiológica</u>
	Leve	Sin licuefacción
	Buena	Sin licuefacción
	Buena	Nitratos reducidos a nitritos
	Buena	Nitratos reducidos a nitritos
	Buena	Ningún pigmento de melanina reducido
	Buena	Sin peptonización o formación de grumo
	Moderada	Tolerancia de NaCl = 4% pero = 7% > 4% pero < 7%



TABLA IV

Diagrama de Utilización de Fuente de Carbono de Nocardia
sp. HJL 5646

Incubación: 10 días Temperatura: 32°C

<u>Fuente de Carbono</u>	<u>Utilización *</u>
Adonitol	0
l-Arabinosa	0
Glicerol	3
<u>d</u> -Fructosa	1
<u>i</u> -Inositol	2
Lactosa	0
<u>d</u> -Manitol	0
Salicina	2
<u>d</u> -Melibiosa	0
<u>d</u> -Rafinosa	0
Ramnosaa	0
Maltosa	1
Sucrosa	0
<u>d</u> -Trehalosa	3
<u>d</u> -Xilosa	0
Dextrosa	3
Control negativo	0

* 3- Buena utilización 2- Aceptable utilización
1- Pbre utilización 0-Ninguna utilización

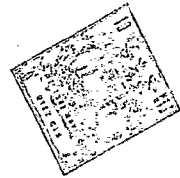


TABLA V

Composición Química de *Nocardia* sp. NRRL 5646

<u>Tipo de Pared Celular</u>	<u>Constituyentes Principales</u>
Tipo IV	meso-DAP, arabinosa, galactosa

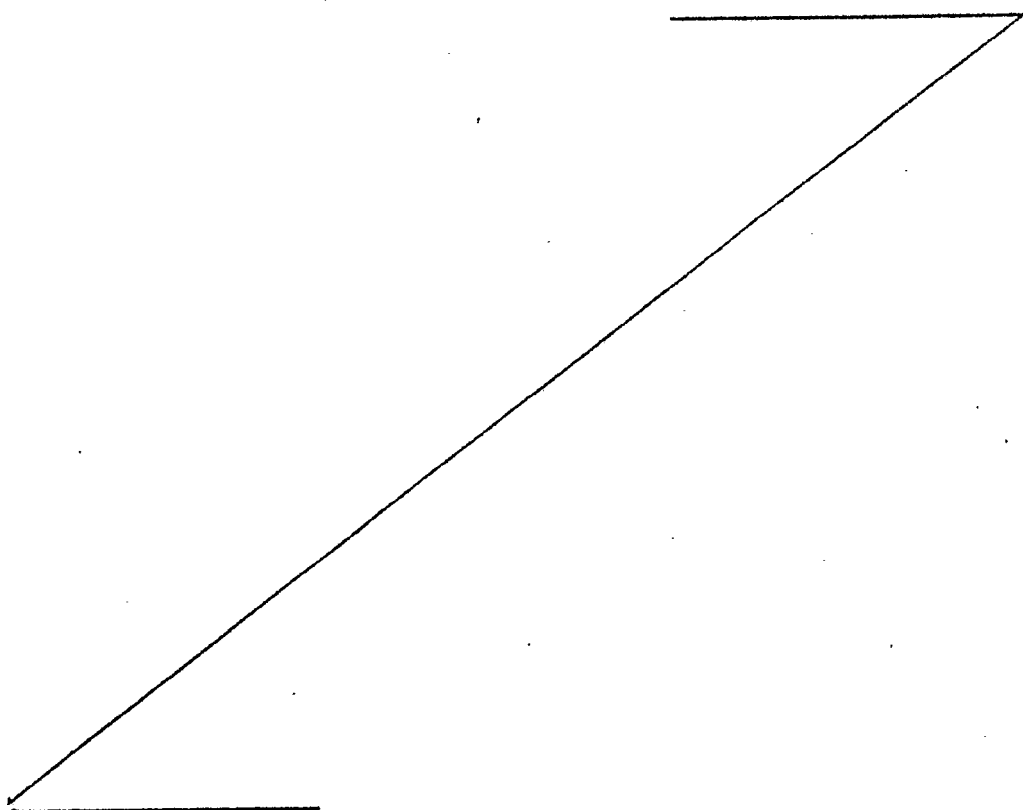
5. La producción de BMI23 β y BMI23 γ está limitada a este organismo particular o a otro organismo que responden totalmente a las características microscópicas y de desarrollo precedentes que se indican solo con propósitos ilustrativos. En realidad, pueden utilizarse mutantes producidos a partir de este organismo mediante diversos medios tales como exposición a radiación de rayos X, radiación de ultravioleta, mostaza de nitrógeno, actinofages, y similares. Un cultivo viable de una especie de mutante típica tal ha sido depositado en el Laboratorio de Colección de Cultivo de Northern Utilization Research and Development Division, United States Department of Agriculture, Peoria, Illinois, y ha sido agregado a su colección permanente bajo el número de accesión NRRL 8050. Si bien las características culturales, fisiológicas y morfológicas de NRRL 8050 son substancialmente iguales a aquellas de NRRL5646, se producen cantidades en aumento de BMI23 γ durante la fermentación aeróbica. También, NRRL 8050 varía del NRRL 5646 ini-
- 10.
- 15.
- 20.

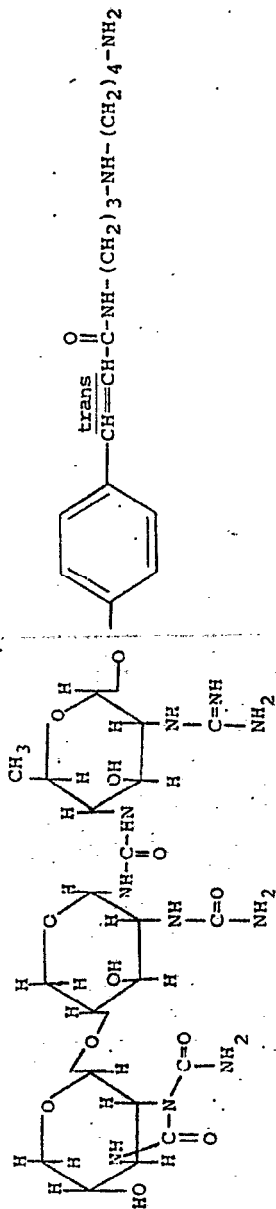
cial como sigue:

- (a) una reducción más lenta de nitrato a nitritos; y
- (b) producción de un pigmento de micelio de color

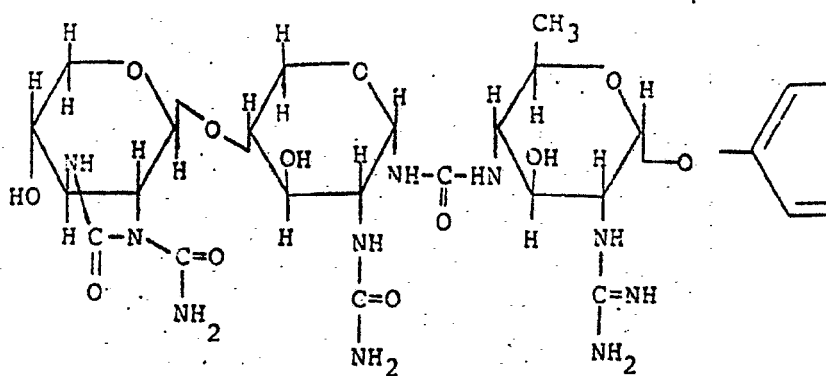
canela rosewood en ágar de Bennett y extracto de levadura.

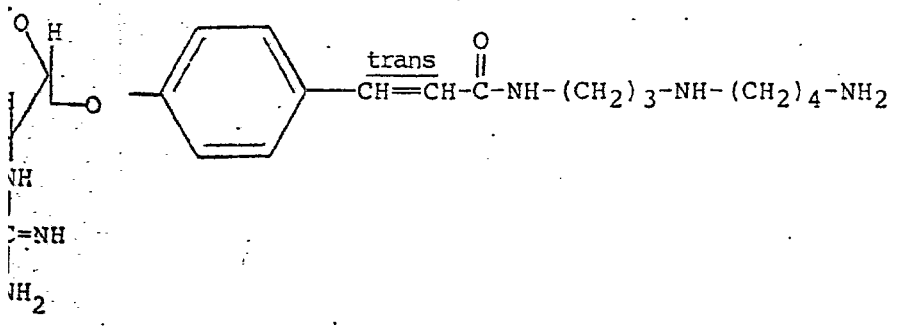
5. Los nuevos agentes antibacterianos de la presente invención son, en general, sólidos cristalinos de solubilidad relativamente limitada en solventes no polares tales como dietil éter y hexano, pero considerablemente más solubles en solventes tales como agua y alcoholes inferiores. Los
10. antibióticos $BM123\gamma_1$ y $BM123\gamma_2$ son isómeros estructurales y pueden ser representados por las siguientes fórmulas estructurales:



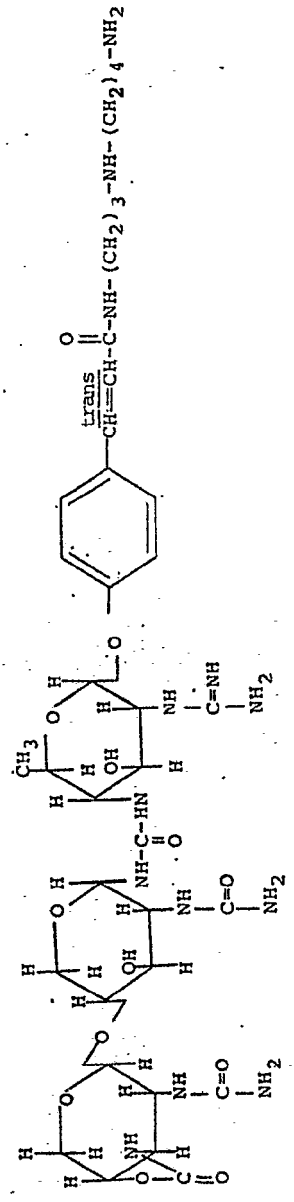


BMI2391

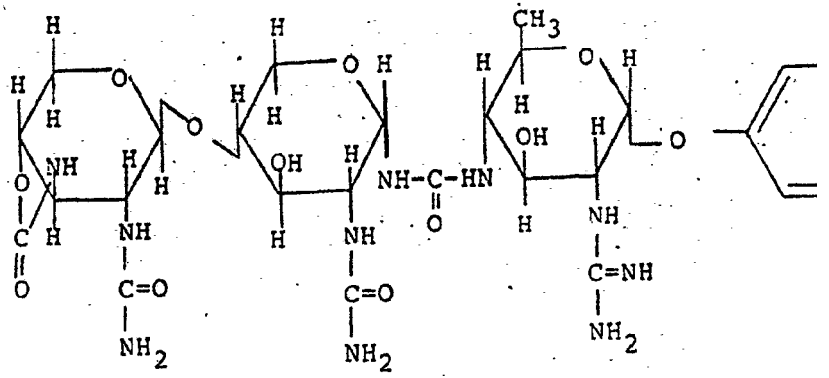


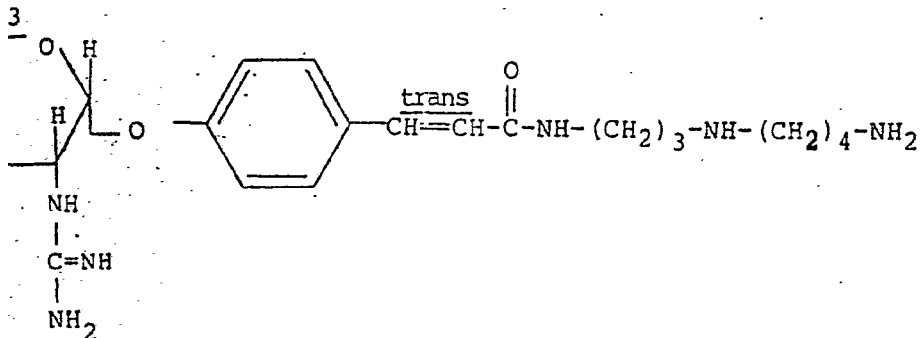


BMI237₁



BML237₂

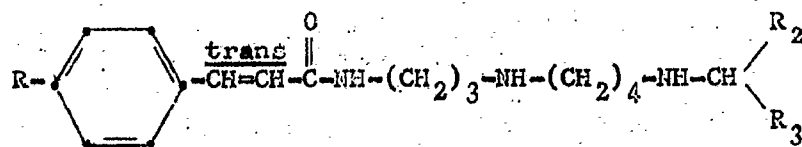




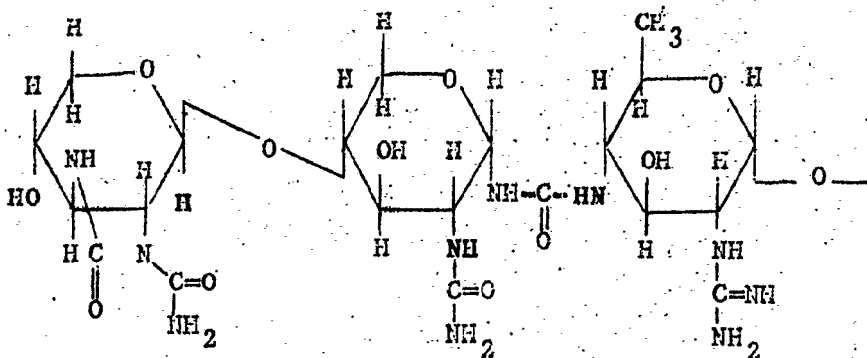
BML237₂



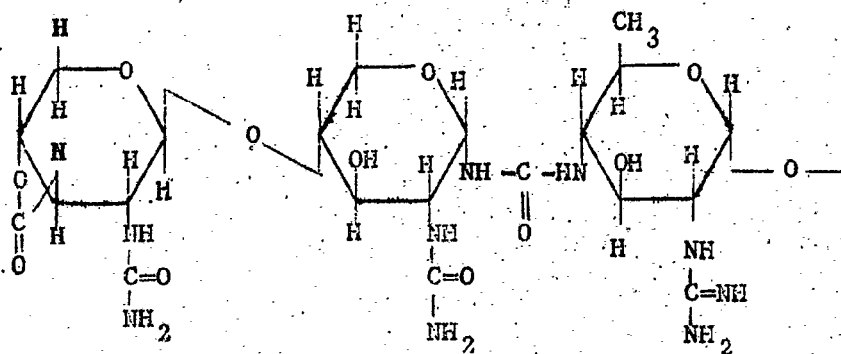
La alquilación reductiva de BML23γ, y BML23γ₁ δ BML23γ₂ con cetonas tienen lugar en la cadena lateral de espermadina para formar derivados de la fórmula:



5. donde R es una porción molecular de las fórmulas:



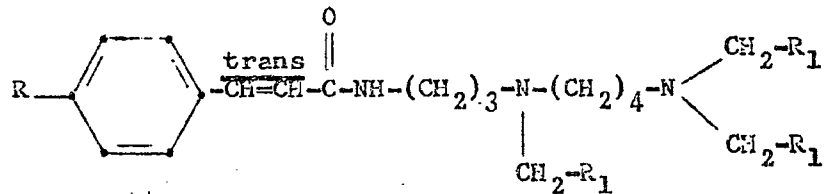
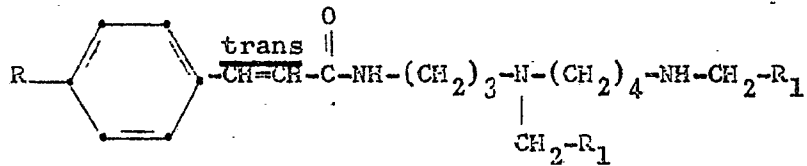
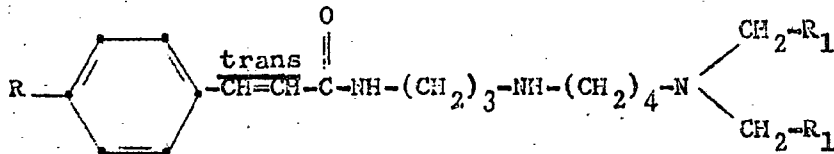
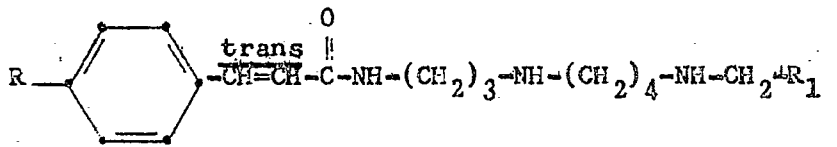
6





y R_2 y R_3 son como se han definido anteriormente aquí. La alquilación reductiva de BML23 γ , BML23 γ_1 ó BML23 γ_2 con aldehidos tiene lugar en la cadena lateral de espermadina para formar derivados mono-, di-, y tri-substituidos de las fórmulas:

5.



donde R y R_1 son como se han definido anteriormente aquí.

La utilidad de los derivados alquilados de BML23 γ



- es demostrada por su capacidad de controlar infecciones le-
tales sistémicas en ratones. Estas nuevas substancias demues-
tran una elevada actividad antibacteriana in vivo en rato-
nes contra Escherichia coli US311 cuando se administran me-
5. diante una única dosis subcutánea a grupos de ratones de
CF-1 de las granjas Carworth, que pesan aproximadamente 20
g, infectados intraperitonealmente con una dosis letal de
estas bacterias en una dilución de TSP de caldo de soja de
tripticase de un cultivo de sangre de TSP de 5 hr. En la
10. Tabla VI siguiente se indica la actividad in vivo de produc-
tos típicos de la presente invención (preparados a partir
de los reactivos de carbonilo indicados) contra Escherichia
coli US311 en ratones. La actividad se expresa en términos
de la DE₅₀ o la dosis en mg/kg del peso corporal requeri-
15. do para proteger 50% de los ratones contra E. coli.

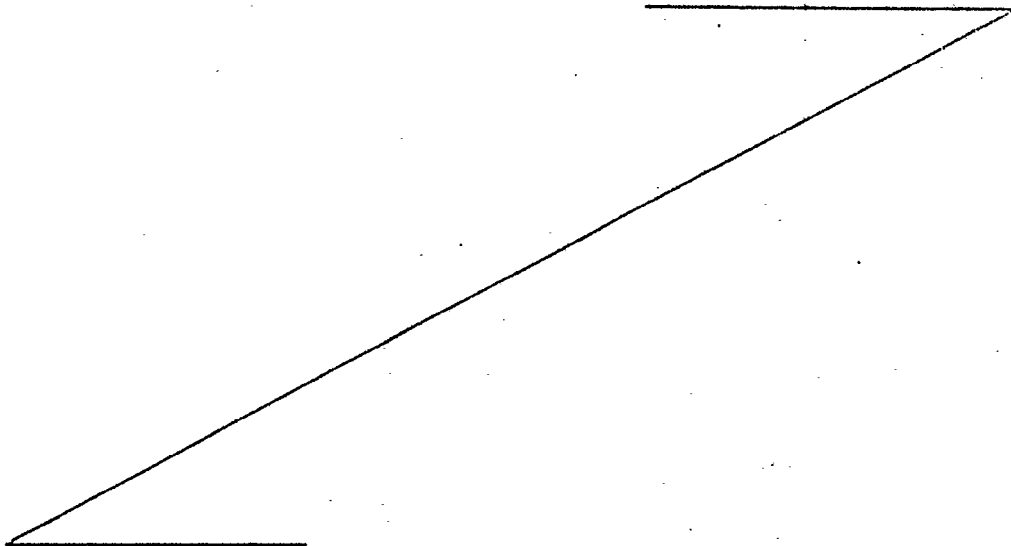




TABLE VI

Reactivo de Carbonilo Empleado	Nombre del Derivado	DE ₅₀ (en mg/kg por peso corporal)
1-dipropilamino-2-propanona	1-metil-2-(N,N-dipropilamino)-etil-BMI23Y	C, 3
1-cloro-3-pentanona	1-etil-3-cloropropil-BMI23Y	C, 12
ciclooctanona	ciclooctil-BMI23Y	C, 18
4-metil-2-pentanona	1, 3-dimetilbutil-BMI23Y	< C, 12
fenilacetona	1-metil-2-feniletal-BMI23Y	C, 18
trans-4-fenil-3-buten-2-ona	1-metil-3-fenilpropen(-2-)-il-BMI23Y	O, 25
1-ciclohexil-1-propanona	1-ciclohexilpropil-BMI23Y	C, 37
6-metil-5-hepten-2-ona	1, 5-dimetilhexen(4-)-il-BMI23Y	C, 06
3-metil-2-pentanona	1, 2-dimetilbutil-BMI23Y	C, 12
5-metil-2-hexanona	1, 4-dimetilperetil-BMI23Y	C, 12
3-etil-2-pentanona	1-etil-2-etilbutil-BMI23Y	O, 18
3, 5-dimetil-2-octanona	1, 2, 4-trimetilheptil-bml23Y	O, 37
k3-octanona	1-etilhexil-BMI23Y	C, 18

Reactivo de Carbonilo Empleado

No

1-dipropilamino-2-propanona

1-m
amir

1-cloro-3-pentanona

1-cl
EM14

ciclooctanona

cicl

4-metil-2-pentanona

1,3-

fenilacetona

1-m

trans-4-fenil-3-buten-2-ona

1-m
il-B

1-ciclohexil-1-propanona

1-ci

6-metil-5-hepten-2-ona

1,5-
123v

3-metil-2-pentanona

1,2-

5-metil-2-hexanona

1,4-

3-etil-2-pentanona

1-m

3,5-dimetil-2-octanona

1,2,

k3-octanona

1-et

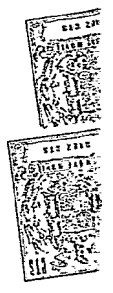
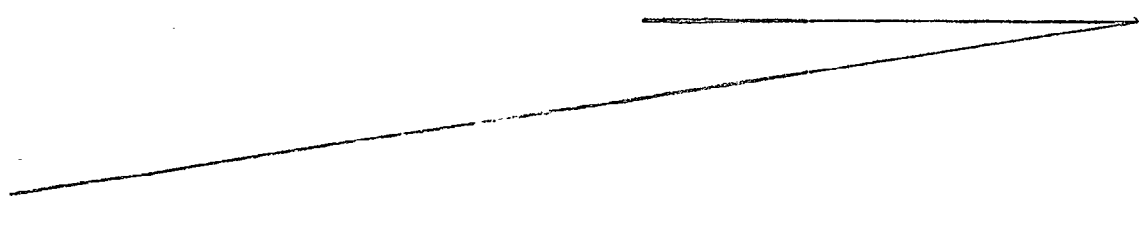


TABLE VI

<u>Empleado</u>	<u>Nombre del Derivado</u>	<u>DE₅₀ en mg/kg</u> <u>por peso cor-</u> <u>poral</u>
nona	1-metil-2-(N,N-dipropil- amino)-etil-BM123v	0,3
	1-etil-3-cloropropil- BM123v	0,12
	ciclooctil-BM123v	0,18
	1,3-dimetilbutil-BM123v	<0,12
	1-metil-2-feniletal-BM123v	0,18
-ona	1-metil-3-fenilpropen(-2-) il-BM123v	0,25
a	1-ciclohexilpropil-BM123v	0,37
	1,5-dimetilhexen(4-)il-BM 123v	0,06
	1,2-dimetilbutil-BM123v	0,12
	1,4-dimetilpentil-BM123v	0,12
	1-metil-2-etilbutil-BM123v	0,18
	1,2,4-trimetilheptil-bm123v	0,37
	1-etilhexil-BM123v	0,18



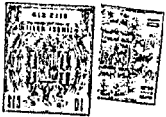


TABLA VI (Cont.)

3-metil-2-hexanona	1,2-dimetilpentil-BMI23Y	0,18
3-indolilacetona	1-metil-2-(6-indolil)etil BMI23Y	0,12
2-pentanona	1-metilbutil-BMI23Y	< 0,12
2-butanona	1-metilpropil-BMI23Y	< 0,12
2-ciclopentona (-1-)-il- acetona	1-metil-2-ciclopenten(-2-)- il-etil-BMI23Y	< 0,12
acetona	isopropil-BMI23Y	< 0,12
3-decanona	1-etil-octil-BMI23Y	0,25
3-undecanona	1-etilnonil-BMI23Y	0,38
2-acetacototoluidida	1-metil-2- α - β -etilcarbamoil- etil-BMI23Y	0,25
resitil óxido	1,3-dimetilbuten(-2)-il-BMI23Y	0,3
metoxiacetona	1-metil-2-metoxietil-BMI23Y	0,3
ciclohexilacetona	1-metil-2-ciclohexil-etil-BMI23Y	0,18
4-(p-hidroxifenil)-2- butanona	1-metil-3-(4-hidroxifenil)etil- BMI23Y	0,3

3-metil-2-hexanona	1,2
3-indolilacetona	1-m BML
2-pentanona	1-m
2-butanona	1-m
2-ciclopenten(-1)il- acetona	1-m il-e
acetona	isop
3-decanona	1-et
3-undecanona	1-et
<u>o</u> -acetoacetotoluidida	1-ne etil
mesitil óxido	1,3-
metoxiacetona	1-ne
ciclohexilacetona	1-ne
4-(p-hidroxifenil)-2- butanona	1-ne BML2



TABLA VI (Cont.)

1,2-dietilpentil-BM123γ	0,18
1-metil-2-(β-indolil)etil BM123γ	0,12
1-metilbutil-BM123γ	< 0,12
1-metilpropil-BM123γ	< 0,12
1-metil-2-ciclopenten(-2)- il-etil-BM123γ	< 0,12
isopropil-BM123γ	< 0,12
1-etiloctil-BM123γ	0,25
1-etilnonil-BM123γ	0,38
1-metil-2-o-tolilcarbamoil- etil-BM123γ	0,25
1,3-dietilbuten(-2)il-BM123γ	0,3
1-metil-2-metoxietil-BM123γ	0,3
1-metil-2-ciclohexiletal-BM123γ	0,18
1-metil-3-(4-hidroxiifenil)etil- BM123γ	0,3

TABLA VI (Cont.)

1-(1-ciclohexil)fosfinilmetilhexil-BM123Y	0,3
1,3-dimetilpentil-BM123Y	< 0,12
2,2,4,4-tetrametilciclopentil-BM123Y	0,75
2,4,4-trimetilciclopentil-BM123Y	0,3
2-ciclopentilciclopentil-BM123Y	0,37
2-(1-ciclohexen)ciclohexil-BM123Y	0,19
3-t-pentilciclopentil-BM123Y	0,5
2-ciclohexilciclohexil-BM123Y	0,75
2-etilciclohexil-BM123Y	0,19
1,2,3-trimetilpropil-BM123Y	< 0,12
1-metildecil-BM123Y	> 2
4-tetrahidrotiopianil-BM123Y	0,38
3,5-dimetilciclohexil-BM123Y	< 0,12
1-metiltridecil-BM123Y	2,0

dimetil(2-oxoheptil)fosfonato
4-metil-2-hexanona
2,2,4,4-tetrametilciclopentanonona
2,4,4-trimetilciclopentanona
2-ciclopentilciclopentanona
2-(ciclo-1-hexenil)ciclohexanona
3-t-pentilciclopentanona
2-ciclohexilciclohexanona
2-etilciclohexanona
3,3-dimetil-2-butanona
2-undecanona
tetrahidrotiopian-4-ona
3,5-dimetilciclohexanona
2-tetradecanona

	<u>TAI</u>
dimetil(2-oxoheptil)fosfonato	1- $\sqrt{}$ (hexil
4-metil-2-hexanona	1,3-
2,2,4,4-tetrametilciclopentanonona	2,2, BM12
2,4,4-trimetilciclopentanonona	2,4,
2-ciclopentilciclopentanonona	2-cic
2-(ciclo-1-hexenil)ciclohexanonona	2-(1-
3-t-pentilciclopentanonona	3-t-
2-ciclohexilciclohexanonona	2-cic
2-otilciclohexanonona	2-ot
3,3-dimetil-2-butanona	1,2,
2-undecanona	1-ne
tetrahidrotiopiran-4-ona	4-te
3,5-dimetilciclohexanonona	3,5-
2-tetradecanona	1-ne

TABLA VI (Cont.)

onato	1-[(dimetoxifosfinil)metil]- hexil-BM123γ	0,3
	1,3-dimetilpentil-BM123γ	< 0,12
enta-	2,2,4,4-tetrametilciclopentil- BM123γ	0,75
nona	2,4,4-trimetilciclopentil-BM123γ	0,3
ona	2-ciclopentilciclopentil-BM123γ	0,37
hexano	2-(1-ciclohexen)ciclohexil-BM123γ	0,19
	3-t-pentilciclopentil-BM123γ	0,5
a	2-ciclohexilciclohexil-BM123γ	0,75
	2-etilciclohexil-BM123γ	0,19
	1,2,2-trimetilpropil-BM123γ	< 0,12
	1-metildecil-BM123γ	> 2
	4-tetrahidrotiopiranil-BM123γ	0,38
	3,5-dimetilciclohexil-BM123γ	< 0,12
	1-metiltridecil-BM123γ	2,0



TABLA VI (Cont.)

1-metoxi-1-buten-3-ona	1-metil-3-metoxipropen(-2-)il-BMI23Y	> 2,0
4-hidroxi-3-metil-2-butanona	1, 2-dimetil-3-hidroxipropil-BMI23Y	0, 12
mentona	3-metil-6- <u>i</u> sopropilciclohexil-EMI23Y	0, 38
ciclonanona	ciclononil-BMI23Y	0, 18
1-metil-2-decalona	decahidro-1-metil-2-naftil-BMI23Y	0, 25
isoforona	3, 3-dimetilciclohexen(-4-)il-BMI23Y	0, 37
3-metil-2-decalona	decahidro-3-metil-2-naftil-BMI23Y	0, 37
1-(3, 4-dimetoxifenil)-2-butanona	2-etil-2-(3, 4-dimetoxifenil)etil-BMI23Y	1, 0
1-dietilamino-3-butanona	1-metil-3-(N, N-dietilamino)propil-BMI23Y	0, 18
etil 2-cloroacetato	1-metil-2-cloro-2-carbetoetil-BMI23Y	1, 5
3-hidroxi-3-metil-2-butanona	1, 2, 2-dimetilhidroxipropil-BMI23Y	0, 18
3-pentanona	1-etilpropil-BMI23Y	0, 12



	<u>T</u>
1-metoksi-1-buten-3-ona	1-met BM123
4-hidroxi-3-metil-2-butanona	1,2-d
mentona	3-met 123y
ciclononana	ciclo
1-metil-2-decalona	decah
isoforona	3,3-d
3-metil-2-decalona	decah
1-(3,4-dimetoxifenil)-2-butanona	2-cti BM123
1-dietilamino-3-butanona	1-met BM123
etil 2-kloroacetoacetato	1-met BM123
3-hidroxi-3-metil-2-butanona	1,2,
3-pentanona	1-et:

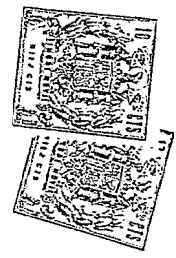


TABLA VI (Cont.)

1-metil-3-metoxipropen(-2-)il-BM123γ	> 2,0
1,2-dimetil-3-hidroxiopropil-BM123γ	0,12
3-metil-6-isopropilciclohexil-BM123γ	0,38
ciclononil-BM123γ	0,18
decahidro-1-metil-2-naftil-BM123γ	0,25
3,3-dimetilciclohexen(-4-)il-BM123γ	0,37
decahidro-3-metil-2-naftil-BM123γ	0,37
2-etil-2-(3,4-dimetoxifenil)etil-BM123γ	1,0
1-metil-3-(N,N-dietilamino)propil-BM123γ	0,18
1-metil-2-cloro-2-carbetoxietil-BM123γ	1,5
1,2,2-dimetilhidroxiopropil-BM123γ	0,18
1-etilpropil-BM123γ	0,12

ona

10-

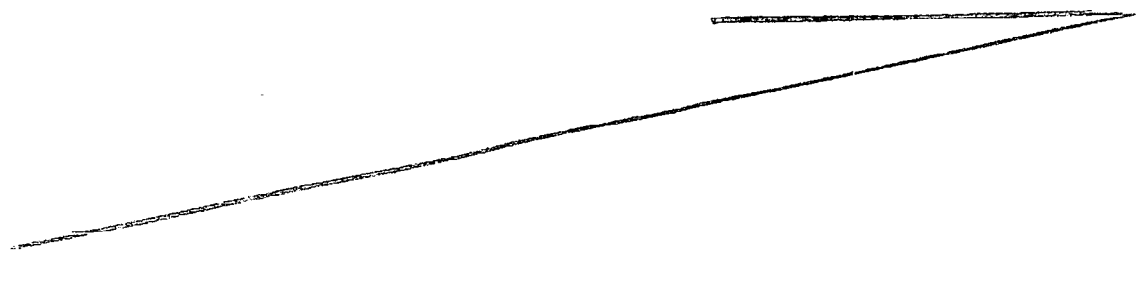




TABLE VI (Cont.)

3-metil-2-butanona	1, 2-dimetilpropil-BMI23Y	O, 19
p-clorofenilacetona	1-metil-2-(4-clorofenil)etil-BMI23Y	O, 25
N-(t-butil)acetacetamida	2-(t-butilcarbanoil)-1-metil-etil-BMI23Y	O, 38
1, 1-dimetoxiacetona	1-metil-2, 2-dimetoxietil-BMI23Y	O, 5
4-heptanona	1-propilbutil-BMI23Y	O, 25 A
3-metoxifenilacetona	1-metil-2-(3-metoxifenil)etil-BMI23Y	O, 30
ácido 1, 3-acetonadicarbo-xílico	(2-carboxi-1-carboximetil)etil-BMI23Y	O, 5
2-fenilciclohexanona	2-fenilciclohexil-BMI23Y	O, 38
fenoxi-2-propanona	1-metil-2-fenoxietil-BMI23Y	O, 3
3-butil-2-ona	1-metil-butil(-2-)il-BMI23Y	< 2, 0
dimetilaminoacetona	1-metil-2-(N, N-dimetilamino)propil-BMI23Y	1, 5
5-dietilamino-2-pentanona	1-metil-4-(N, N-dietilamino)butil-BMI23Y	O, 5

3-metil-2-butanona	1,2-d
p-clorofenilacetona	1-met BM123
N-(t-butil)acetoacetamida	2-(t- etil-
1,1-dimetoxiacetona	1-met
4-heptanona	1-pro
3-metoxifenilacetona	1-met BM123
ácido 1,3-acetonadicarbo- xilico	(2-ca BM123
2-fenilciclohexanona	2-fen
fenoxi-2-propanona	1-met
3-butin-2-ona	1-met
dimetilaminoacetona	1-met propi
5-dietilamino-2-pentanona	1-met BM123



TABLA VI (Cont.)

a	1,2-dietilpropil-BM123γ	0,19
na	1-metil-2-(4-clorofenil)etil-BM123γ	0,25
setamida	2-(t-butilcarbamoil)-1-metil- etil-BM123γ	0,38
na	1-metil-2,2-dimetoxietil-BM123γ	0,5
	1-propilbutil-BM123γ	0,25
ona	1-metil-2-(3-metoxifenil)etil-BM123γ	0,30
dicarbo-	(2-carboxi-1-carboximetil)etil-BM123γ	0,5
ona	2-fenilciclohexil-BM123γ	0,38
a	1-metil-2-fenoxietil-BM123γ	0,3
	1-metil-butin(-2-)il-BM123γ	<2,0
na	1-metil-2-(N,N-dietilamino)propil-BM123γ	1,5
entanona	1-metil-4-(N,N-dietilamino)butil-BM123γ	0,5

TABLA VI (Cont.)

2-ciclohexen-1-ona	2-ciclohexenil-BMI23Y	0,25
ciclopropilmetilcetona	1-ciclopropiletil-BMI23Y	0,25
4,4-dimetoxi-2-butanona	1-etil-3,3-dimetoxipropil-BMI23Y	0,75
1,3-dimetilacetona dicarboxilato	1-carbometoxi-2-carbometoxietil-BMI23Y	0,75
2-metoxifenilacetona	1-etil-2-(2-metoxifenil)etil-BMI23Y	0,7
acetilacetona	1-etil-2-acetiletal-BMI23Y	1,5
ciclobutanona	ciclobutil-BMI23Y	0,38
p-clorofenilacetona	1-etil-2-(4-clorofenil)etil-BMI23Y	0,25
2-octanona	1-etilheptil-BMI23Y	0,38
4-fenil-2-butanona	1-etil-3-fenilpropil-BMI23Y	0,38
5-cloro-2-pentanona	1-etil-4-clorobutil-BMI23Y	0,37
o-clorofenilacetona	1-etil-2-(2-clorofenil)etil-BMI23Y	0,37

2-ciclohexen-1-ona	2-ci
ciclopropilmetilcetona	1-ci
4,4-dimetoxi-2-butanona	1-met BM12
1,3-dimetilacetonadicarboxi- lato	1-ca BM12
2-metoxifenilacetona	1-met BM12
acetilacetona	1-met
ciclobutanona	cicl
p-clorofenilacetona	1-met BM12
2-octanona	1-met
4-fenil-2-butanona	1-met
5-cloro-2-pentanona	1-met
o-clorofenilacetona	1-met BM12



TABLA VI (Cont.)

	2-ciclohexenil-BM123γ	0,25
ia	1-ciclopropiletal-BM123γ	0,25
ia	1-metil-3,3-dimetoxipropil-BM123γ	0,75
arboxi-	1-carbonetoxi-2-carbonetoxietil-BM123γ	0,75
	1-metil-2-(2-nitrofenil)etil-BM123γ	0,7
	1-metil-2-acetiletal-BM123γ	1,5
	ciclobutil-BM123γ	0,38
	1-metil-2-(4-clorofenil)etil-BM123γ	0,25
	1-metilheptil-BM123γ	0,38
	1-metil-3-fenilpropil-BM123γ	0,38
	1-metil-4-clorobutil-BM123γ	0,37
	1-metil-2-(2-clorofenil)etil-BM123γ	0,37

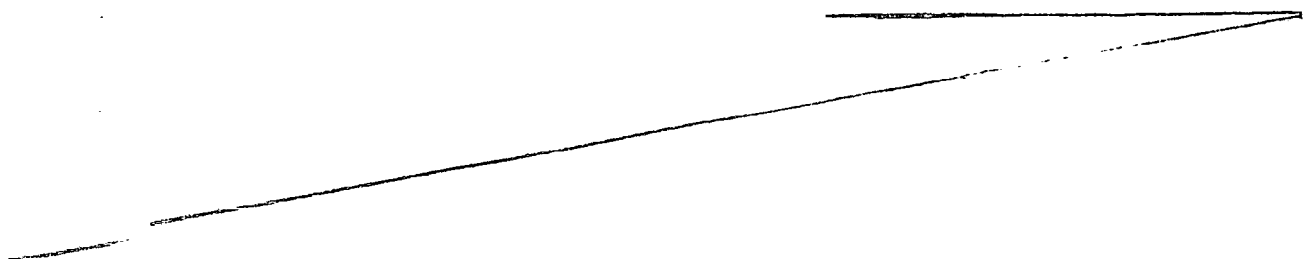




TABLA VI (Cont.)

m-clorofenilacetona	1-metil-2-(3-clorofenil)etil-BMI23Y	0,38
5-hexone-2-ona	1-metil-penten(4-)-il-BMI23Y	0,38
ciclohexanona	ciclohexil-BMI23Y	0,75
2-hexanona	1-metilpentil-BMI23Y	0,38
2-heptanona	1-metilhexil-BMI23Y	0,38
cicloheptanona	cicloheptil-BMI23Y	0,3
ciclopentanona	ciclopentil-BMI23Y	0,25
4,4-dimetil-2-pentanona	1,3,3-trimetilbutil-BMI23Y	0,18
2-acetamido-3-butanona	2-acetamido-1-metilpropil-BMI23Y	0,50
2,6-dimetil-3-heptanona	1-isopropil-4-metilpentil-BMI23Y	0,39
4-octanona	1-propilpentil-BMI23Y	0,39
3-acetilpiridina	1-(3-piridil)etil-BMI23Y	0,75
3-heptanona	1-etilpentil-BMI23Y	0,25
etil butirilacetato	1-(carbetoximetil)butil-BMI23Y	0,75

<u>m</u> -clorofenilacetona	1-ne BM12
5-hexeno-2-ona	1-ne
ciclohexanona	cicl
2-hexanona	1-ne
2-heptanona	1-ne
cicloheptanona	cicl
ciclopentanona	cicl
4,4-dimetil-2-pentanona	1,3,
2-acetamido-3-butanona	2-ac
2,6-dimetil-3-heptanona	1-is
4-octanona	1-pr
3-acetilpiridina	1-(3
3-heptanona	1-ct:
etil butirilacetato	1-(c

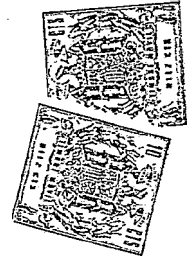


TABLA VI (Cont.)

1-metil-2-(3-clorofenil)etil-BM123γ	0,38
1-metil-penten(4-)il-BM123γ	0,38
ciclohexil-BM123γ	0,75
1-metilpentil-BM123γ	0,38
1-metilhexil-BM123γ	0,38
cicloheptil-BM123γ	0,3
ciclopentil-BM123γ	0,25
1,3,3-trimetilbutil-BM123γ	0,18
2-acetamido-1-metilpropil-BM123γ	0,50
1-isopropil-4-metilpentil-BM123γ	0,39
1-propilpentil-BM123γ	0,39
1-(3-piridil)etil-BM123γ	0,75
1-etilpentil-BM123γ	0,25
1-(carbetoximetil)butil-BM123γ	0,75

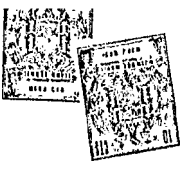
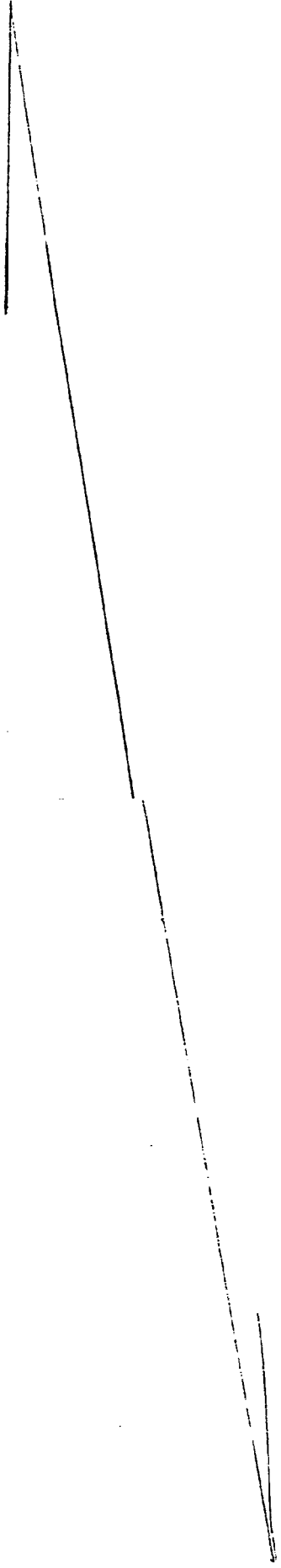


TABLA VI (Cont.)

1-bencil-4-piperidone	1-bencil-4-piperidil-BMI23Y	O,18
1-metil-4-piperidona	1-metil-4-piperidil-BMI23Y	O,75
3-metilciclopentanona	3-metilciclopentil-BMI23Y	O,25
3,3-dimetil-2-butanona	1-metil-2,2-dimetilpropil-BMI23Y	O,18
2-acetil-5-norborneno	1- $\sqrt{5}$ -norborneno(2) $\sqrt{}$ etil-BMI23Y	4 O,12
biciclo[3.2.1]octan-2-ona	biciclo[3.2.1]octanil-2-BMI23Y	4 O,25
3-quinuclidinona	3-quinuclidinil-BMI23Y	O,39
5-metoxi-2-tetralona	5-metoxil-2-tetralil-BMI23Y	O,18
4-metil-2-heptanona	1,3-dimetilhexil-BMI23Y	O,5
3,4-dimetil-2-hexanona	1,2,3-trimetilpentil-BMI23Y	O,39
1,3,3-trimetilciclopentanona	1,3,3-trimetilciclopentil-BMI23Y	O,37
acetilciclopentanona	1-ciclopentiletil-BMI23Y	O,18
5-hexen-2-ona	1-metil-hexen-4-il-BMI23Y	O,18
2-metilciclopentanona	2-metilciclopentil-BMI23Y	C,25



1-bencil-4-piperidona	1-ben
1-metil-4-piperidona	1-met
3-metilciclopentanona	3-met
3,3-dimetil-2-butanona	1-met.
2-acetil-5-norborneno	1- $\sqrt{5}$ -
biciclo[3.2.1]octan-2-ona	bicicl
3-quinuclidinona	3-quin
5-metoxi-2-tetralona	5-met
4-metil-2-heptanona	1,3-di
3,4-dimetil-2-hexanona	1,2,3-
1,3,3-trimetilciclopentanona	1,3,3-
acetilciclopentanona	1-cicl
5-hexon-2-ona	1-meti
2-metilciclopentanona	2-meti

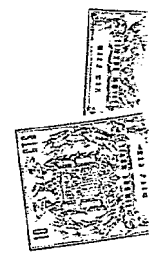


TABELA VI (Cont.)

	1-bencil-4-piperidil-BM123γ	0,18
	1-metil-4-piperidil-BM123γ	0,75
	3-metilciclopentil-BM123γ	0,25
ia	1-metil-2,2-dimetilpropil-BM123γ	0,18
	1- $\sqrt{5}$ -norborneno(2)etil-BM123γ	0,12
ona	biciclo $\sqrt{3.2.1}$ octanil-2-BM123γ	0,25
	3-quinuclidinil-BM123γ	0,39
	5-metoxil-2-tetralil-BM123γ	0,18
	1,3-dimetilhexil-BM123γ	0,5
ia	1,2,3-trimetilpentil-BM123γ	0,39
antanona	1,3,3-trimetilciclopentil-BM123γ	0,37
	1-ciclopentiletil-BM123γ	0,18
	1-metil-hexen-4-il-BM123γ	0,18
	2-metilciclopentil-BM123γ	0,25

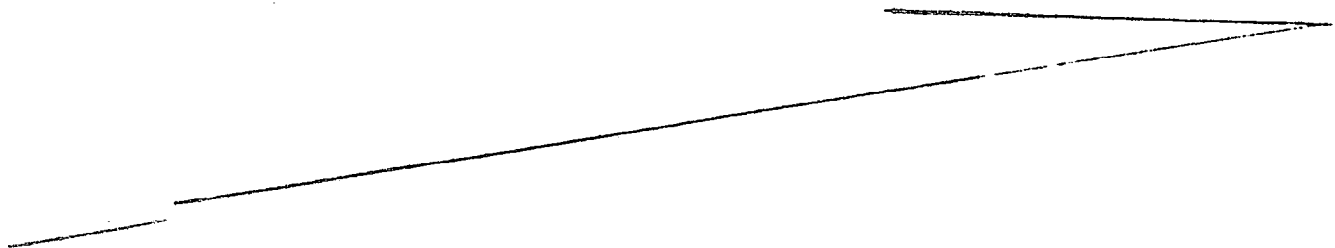
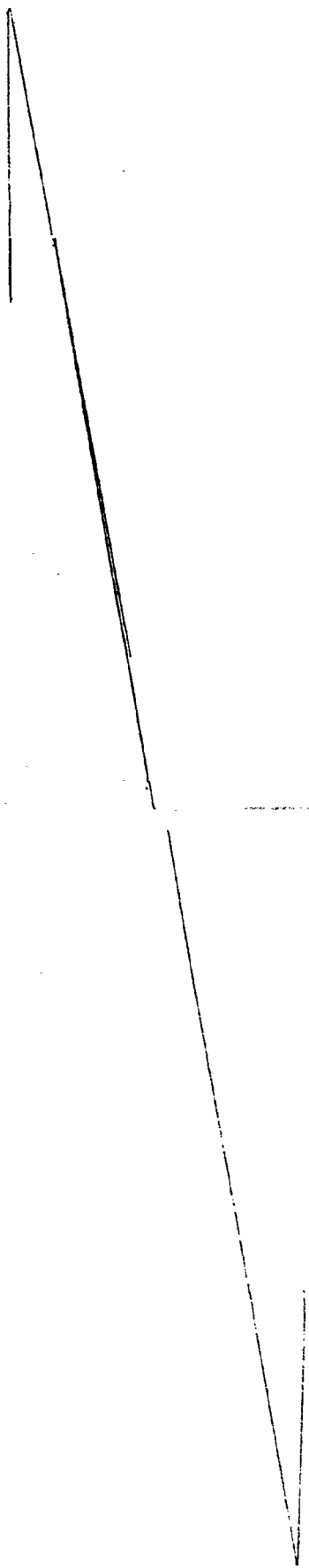




TABLA VI (Cont.)

2,4-dimetilciclopentanona	2,4-dimetilciclopentil-BMI23y	O,18
2-etilciclopentanona	2-etilciclopentil-BMI23y	O,12
2-adamantona	adamantil-2-BMI23y	O,25
3-hexanona	1-etilbutil-BMI23y	O,39
etil-2-metilacetatoacetate	1-metil-2-carboetoxipropil-BMI23y	O,18
norbornanona	norbornil-BMI23y	O,18
5-hexeno-2-ona	1-metil-5-pentenil-BMI23y	O,18
3-hidroxi-2-butenona	1-metil-2-hidroxiopropil-BMI23y	O,37
4-hidroxi-3-metil-2-butanona	1-metil-2-(3-hidroxil-2-metilpropil)-BMI23y	O,18
2-nonanona	1-metiloctil-BMI23y	O,37
5-hidroxi-2-pentanona	1-metil-4-hidroxibutil-BMI23y	O,18
2-decanona	1-metilnonil-BMI23y	O,18
4-t-butilciclohexanona	4-t-butilciclohexil-BMI23y	O,12
2-etilcicliciclohexanona	2-etilcicliciclohexil-BMI23y	O, 12



	<u>TABI</u>
2,4-dimetilciclopentanona	2,4-
2-etilciclopentanona	2-et
2-adamantona	adam
3-hexanona	1-et
etil-2-metilacetoacetato	1-me EM12
norbornanona	norb
5-hexeno-2-ona	1-me
3-hidroxi-2-butanona	1-me
4-hidroxi-3-metil-2-butanona	1-me EM12
2-nonanona	1-me
5-hidroxi-2-pentanona	1-me
2-decanona	1-me
4-t-butilciclohexanona	4-t-l
2-etilidenciclohexanona	2-et

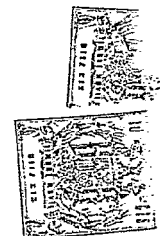


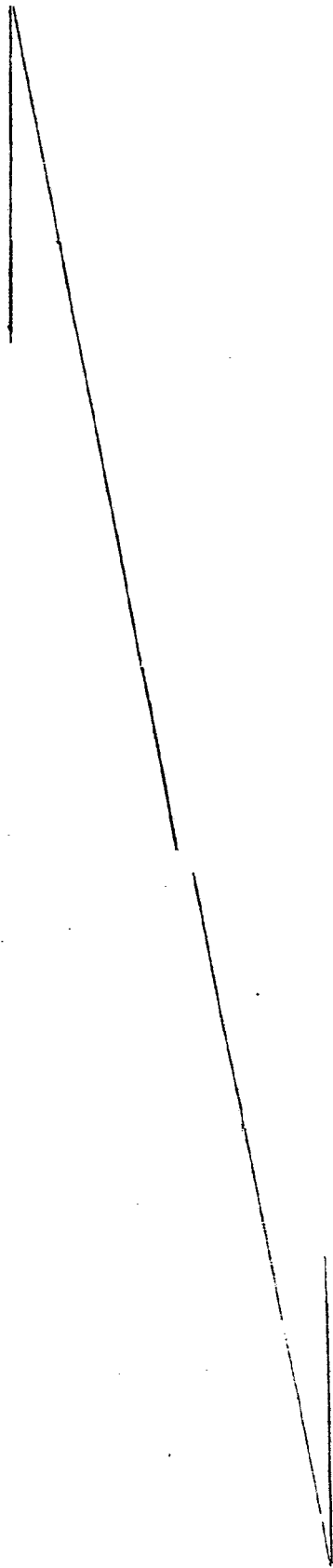
TABLA VI (Cont.)

na	2,4-dimetilciclopentil-BM123γ	0,18
	2-etilciclopentil-BM123γ	0,12
	adamantil-2-BM123γ	0,25
	1-etilbutil-BM123γ	0,39
	1-metil-2-carboctoxipropil-BM123γ	0,18
	norbornil-BM123γ	0,18
	1-metil-5-pentenil-BM123γ	0,18
	1-metil-2-hidroxipropil-BM123γ	0,37
mona	1-metil-2-(3-hidroxi-2-metilpropil)-BM123γ	0,18
	1-metiloctil-BM123γ	0,37
	1-metil-4-hidroxibutil-BM123γ	0,18
	1-metilnonil-BM123γ	0,18
	4-t-butilciclohexil-BM123γ	0,12
	2-etilidenciclohexil-BM123γ	0, 12



TABLA VI (Cont.)

fenilacetaldehido	2-feniletil-BMI23Y	O, 18
p-metoxifenilacetaldehido	2-(p-metoxifenil)etil-BMI23Y	O, 18
2-etilhexanal	2-etilhexil-BMI23Y	O, 37
2,2-dimetilbutanal	2,2-dimetilbutil-BMI23Y	O, 12
2,2-dimetilpropenal	2,2-dimetilpropil-BMI23Y	O, 18
2-etil-2-butanal	2-etil-2-butenil-BMI23Y	O, 10
trans-2-metil-2-butanal	trans-2-metil-2-butenil-BMI23Y	O, 18
1-metilciclo-3-hexenilmetanal	(1-metilciclo-3-hexenil)metil-BMI23Y	O, 18
trans-2-metil-2-pentenal	trans-2-metil-2-pentenil-BMI23Y	O, 18
formaldehido	metil-BMI23Y	C, 12
acetaldehido	etil-BMI23Y	O, 38



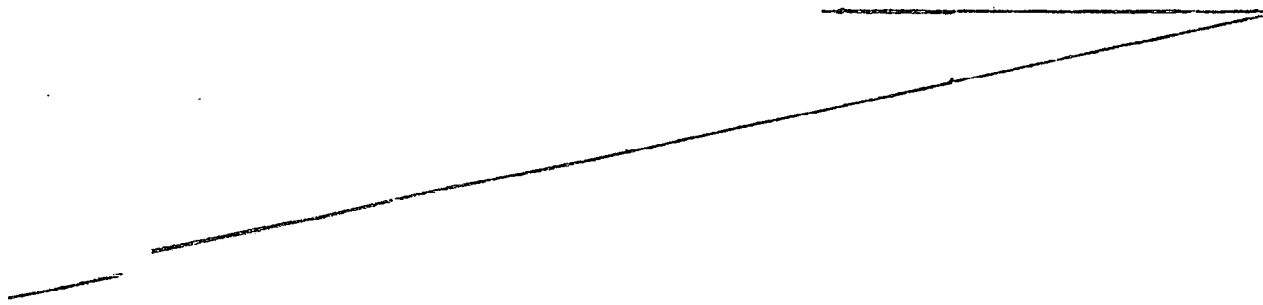
T

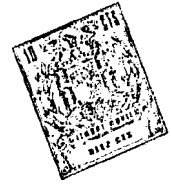
fenilacetaldedo	2-feni.
p-metoxifenilacetaldedo	2-(p-m)
2-etilhexanal	2-etil
2,2-dimetilbutanal	2,2-dir
2,2-dimetilpropanal	2,2-dir
2-etil-2-butenal	2-etil-
<u>trans-2-metil-2-butenal</u>	<u>trans-2</u>
1-metilciclo-3-hexenilmetanal	(1-meti BM123y
<u>trans-2-metil-2-pentonal</u>	<u>trans-2</u>
formaldedo	metil-B
acetaldedo	etil-BM



TABLA VI (Cont.)

	2-feniletíl-BM123γ	0,18
ido	2-(p-metoxifeníl)etil-BM123γ	0,18
	2-etílhexíl-BM123γ	0,37
	2,2-dimetílbutíl-BM123γ	0,12
	2,2-dimetílpropíl-BM123γ	0,18
	2-etíl-2-buteníl-BM123γ	0,18
l	<u>trans</u> -2-metil-2-buteníl-BM123γ	0,18
metanal	(1-metilciclo-3-hoxeníl)metil-BM123γ	0,18
al	<u>trans</u> -2-metil-2-penteníl-BM123γ	0,18
	metil-BM123γ	0,12
	etil-BM123γ	0,38





Procedimiento de Fermentación Seleccionado para Producir
Primordialmente BML238 y BML23y

El cultivo de Nocardia sp. NRRL 8050 puede llevarse a cabo en una amplia variedad de medios de cultivo líquido.

5. Los medios que son útiles para la producción de los anti-bióticos incluyen una fuente asimilable de carbono tal como almidón, azúcar, melaza, glicerol, etc; una fuente asimilable de nitrógeno tal como proteína, hidrolizado de proteína, polipéptidos, aminoácidos, licor macerado de maíz, etc; y aniones y cationes inorgánicos tales como potasio, magnesio, calcio, amonio, sulfato, carbonato, fosfato, cloruro etc. Elementos de vestigio tales como boro, molibdeno, cobre, etc; son suministrados como impurezas de otros constituyentes en los medios. La aeración en tanques y botellas es proporcionada forzando aire estéril a través o sobre la superficie del medio fermentador. Además la agitación en tanques es provista por un impulsor mecánico. Puede agregarse según sea necesario un agente antiespumante, tal como Hodag^R.
10. etc; y aniones y cationes inorgánicos tales como potasio, magnesio, calcio, amonio, sulfato, carbonato, fosfato, cloruro etc. Elementos de vestigio tales como boro, molibdeno, cobre, etc; son suministrados como impurezas de otros constituyentes en los medios. La aeración en tanques y botellas es proporcionada forzando aire estéril a través o sobre la superficie del medio fermentador. Además la agitación en tanques es provista por un impulsor mecánico. Puede agregarse según sea necesario un agente antiespumante, tal como Hodag^R.
15. es proporcionada forzando aire estéril a través o sobre la superficie del medio fermentador. Además la agitación en tanques es provista por un impulsor mecánico. Puede agregarse según sea necesario un agente antiespumante, tal como Hodag^R.

20. Preparación de inóculo para BML238 y BML23y

- Se preparan un inóculo de Nocardia sp NRRL 8050 primario en un frasco agitador inoculando 100 ml de medio líquido estéril en un frasco de 500 ml con raspaduras o lavados de esporos de una platina de ágar del cultivo. Se utiliza generalmente el siguiente cultivo:
- 25.



Bacto-triptona	5 g
Extracto de levadura	5 g
Extracto de carne	3 g
Glucosa	10 g
Agua hasta	1000 ml

5.

Los frascos fueron incubados a una temperatura de 25-29°C, preferiblemente 28°C y se agitaron vigorosamente en un agitador giratorio durante 30 a 48 hr. Los inóculos luego se transfieren en tubo de cultivo con tapa de rosca

10.

estériles y se almacenan por debajo de -18°C. Este banco de inóculo vegetativo es utilizado en lugar de raspaduras de platina para inoculación de frascos agitadores adicionales para la preparación de esta primera etapa del inóculo.

15.

Estos inóculos de primera etapa de frasco son utilizados para sembrar tandas de 12 lt del mismo medio en fermentadores de vidrio de 20 lt. La masa de inóculo es aireada con aire estéril mientras se continúa el desarrollo durante 30 a 48 hr.

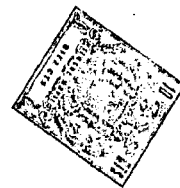
20.

Las tandas de 12 lt de los inóculos de segunda etapa son utilizadas para sembrar fermentadores de tanque que contienen 300 lt del siguiente medio líquido estéril para producir la tercera y final etapa del inóculo:

25.

Solubles de carne	15 g
Sulfato de amonio	3 g
Fosfato de potasio dibásico	3 g
Carbonato de calcio	1 g
Heptahidrato de sulfato de magnesio	1,5 g
Glucosa	10 g
Agua hasta	1000 ml

La glucosa se esteriliza separadamente.



El inóculo de tercera etapa es aireado a 0,4 - 0,8 lt de aire estéril por litro de caldo por minuto, y la mezcla fermentadora es agitada por un impulsor accionado a 150 - 300 revoluciones por minuto. La temperatura se mantiene a 25-29°C, generalmente 28°C. El desarrollo se continúa durante 48 a 72 hr, en cuyo momento el inóculo es utilizado para sembrar una fermentación de tanque de 3000 lt.

Fermentación de Tanque para BML23β y BML23γ

10. Para la producción de BML23β y BML23γ en fermentadores de tanque, se utiliza preferiblemente el siguiente medio de fermentación:

	Solubles de carne	30 g
	Sulfato de amonio	6 g
	Fosfato de potasio dibásico	6 g
15.	Carbonato de calcio	2 g
	Heptahidrato de sulfato de magnesio	3 g
	Glucosa	20 g
	Agua hasta	1000 ml

La glucosa se esteriliza separadamente

20. Cada tanque se inocula con 5 a 10% del inóculo de tercera etapa hecho según se describió bajo la preparación del inóculo. La masa de fermentación se mantiene a una temperatura de 25-28°C, generalmente 26°C. La masa se airea con aire estéril a un régimen de 0,3-0,5 lt de aire estéril por litro de masa por minuto y se agita mediante un impulsor accionado a 70 a 100 revoluciones por minuto. La fer-

25.



mentación se deja continuar durante 65-90 hr y la masa se cosecha.

La presente invención se describirá con mayor detalle en combinación con los siguientes ejemplos específicos.

5.

EJEMPLO 1

Preparación de inóculo para BM1236 y BM123

Se preparó un medio típico utilizado para desarrollar la primera y segunda etapa de inóculo de acuerdo con la siguiente fórmula:

10.	Bacto-triptona	5 g
	Extracto de levadura	5 g
	Extracto de carne	3 g
	Glucosa	10 g
	Agua hasta	1000 ml

15. Dos frascos de 500 ml cada uno que contenía 100 ml del medio estéril precedente fueron inoculados con 5 ml cada uno de un inóculo vegetativo congelado de Mocardia sp. NRRL 8050. Los frascos se colocaron en un agitador giratorio y se agitaron vigorosamente durante 48 hr a 28°C. El
20. inóculo de frasco resultante se transfirió a un fermentador de vidrio de 16 lt que contenía 12 lt del medio estéril precedente. La masa se airió con aire estéril mientras el desarrollo se llevó a cabo durante aproximadamente 48 hr, luego de lo cual los contenidos se utilizaron para sembrar un
25. fermentador de tanque de 300 lt que contenía 300 lt del siguiente medio líquido estéril:



- | | | |
|----|-------------------------------------|---------|
| | Soluble de carne | 15 g |
| | Sulfato de amonio | 3 g |
| | Fosfato de potasio dibásico | 3 g |
| | Carbonato de calcio | 1 g |
| 5. | Heptahidrato de sulfato de magnesio | 1,5 g |
| | Glucosa | 10 g |
| | Agua hasta | 1000 ml |

La glucosa se esteriliza separadamente

- La tercera etapa de la masa de inóculo se aireó con
10. aire estéril rociado en el fermentador a 0,4 lt de aire por litro de masa por minuto. La agitación se suministró mediante un impulsor accionado de 240 revoluciones por minuto. La masa se mantuvo a 28°C y se utilizó Hodag[®] FD82 como un agente desespumante. Luego de 48 hr de tiempo de desarrollo la masa de inóculo se utilizó para sembrar una
15. fermentación de 3000 lt.

EJEMPLO 2

Fermentación Empleando *Nocardia* sp. NRRL 8050 y Medio que Favorece la Producción de BML238 y BML239

20. Se preparó un medio de fermentación de acuerdo con la siguiente fórmula:

- | | | |
|-----|-----------------------------|------|
| | Solubles de carne | 30 g |
| | Sulfato de amonio | 6 g |
| | Fosfato de potasio dibásico | 6 g |
| 25. | Carbonato de calcio | 2 g |



Heptahidrato de sulfato de magnesio 3 g
Glucosa 20 g
Agua hasta 1000 ml

La glucosa se esteriliza separadamente

5. El medio de fermentación se esterilizó a 120°C con vapor a presión de 1,41 kg/cm² durante 60 min. El pH del medio luego de esterilización era de 6,9 . Se inoculó un medio estéril de 300 lt en un fermentador de tanque de 4000 lt con 300 lt de inóculo tal como se describe en el
10. Ejemplo 1, y la fermentación se llevó a cabo a 26°C utilizando Hodag[®] FD82 como un agente desespumante. La aeración se suministró a un régimen de 0,35 lt de aire estéril por litro de masa por minuto. La masa se agitó mediante un impulsor accionado 70-72 revoluciones por minuto. Al
15. término de 67 hr de tiempo de fermentación la masa se cosechó.

EJEMPLO 3

Aislación de BML238 y BML23y

20. Una porción de 3000 lt de masa de fermentación preparada como se describe en el Ejemplo 2, pH 4,3, se reguló a pH 7,0 con hidróxido de sodio y se filtró utilizando tierra de diatomeas al 5% con un auxiliar de filtro. La torta se lavó con aproximadamente 100 lt de agua y se descartó. El filtrado y lavado combinado se bombeó hacia arriba
25. a través de tres columnas de acero inoxidable paralelas



- de 21 cm x 122 cm cada una conteniendo 15 lt de resina CM Sephadex[®] C-25 $\overline{Na^+}$ (un gel de intercambio catiónico de dextra-epiclorhidrina entrecruzado obtenible de Pharmacia Fine Chemicals, Inc.). Las columnas cargadas se lavaron
5. con un total de aproximadamente 390 lt de agua y luego se desarrollaron con 200 lt de cloruro de sodio acuoso al 1% seguido por 560 lt de cloruro de sodio acuoso al 5%. El levigado de cloruro de sodio acuoso al 5% se clarificó por filtración a través de tierra de diatomeas y el filtrado
10. clarificado se hizo pasar a través de una columna de vidrio de 22 cm x 152 cm que contenía 25 lt de Darco[®] G-60 (malla de 20-40) granular (un carbón activado granular obtenible de Atlas Chemical Industries, Inc). La columna cargada se lavó con 120 lt de agua y luego se desarrolló con 120 lt
15. de metanol acuoso al 15% seguido por 340 lt de metanol acuoso al 50% y luego 120 lt de acetona acuosa al 50%. El levigado de metanol acuoso al 15% se concentró en vacío hasta aproximadamente 7 lt de una fase acuosa y el pH se reguló de 4,5 a 6,0 con resina de Amberlite[®] IR-45 (OH⁻) (una
20. resina de intercambio aniónico del tipo de polistireno-poliamina débilmente básica). La resina se eliminó por filtración y el filtrado se concentró en vacío hasta aproximadamente 1 lt y luego se liofilizó para proporcionar 18 g
25. del material que consistía primordialmente de BML23₁ junto con una pequeña cantidad de BML23₂ (primordialmente BML23₂).



- El levigado de metanol acuoso al 50% se reguló de pH 4,65 a 6,0 con resina Amberlite[®] IR-45 (OH⁻). La resina se eliminó por filtración y el filtrado se concentró en vacío hasta aproximadamente 6,3 lt y luego se liofilizó para proporcionar 213 g del material que consistía primordialmente BMI23γ. el levigado de acetona acuosa al 50% se reguló de pH 4,0 a 6,0 con resina de Amberlite[®] IR-45 (OH⁻). La resina se eliminó por filtración y el filtrado se concentró en vacío para proporcionar 1,5 lt y luego se liofilizó para proporcionar 56 g de BMI23γ impura.
- 5.
- 10.

EJEMPLO 4

Purificación Adicional de BMI23γ

- Se vertió una suspensión de CM Sephadex[®] C-25 $\frac{1}{4}$ en cloruro de amonio acuoso al 2% sobre una columna de vidrio de diámetro de 2,6 cm hasta una altura de resina de aproximadamente 62 cm. El exceso de cloruro de amonio acuoso al 2% se desagotó y una muestra de 5,0 g de BMI23γ preparado como se describió en el Ejemplo 3 se disolvió en aproximadamente 10 ml de cloruro de amonio acuoso al 2% y se aplicó a la columna. La columna luego se levigó con un gradiente de 6 lt cada uno de 2% y 4% de cloruro de amonio acuoso. Se recogieron automáticamente cada 15 min fracciones de aproximadamente 75 ml cada una. El antibiótico BMI23γ se ubicó midiendo el efluente en el ultra-violeta y por bioautografía de disco de papel sumergidos en
- 15.
- 20.
- 25.



placas grandes de ágar sombreadas con especie AD de Klebsiella pneumoniae. La mayoría de BM123y se ubicó entre las fracciones 71-107 inclusive.

Se suspendieron 130 ml de Darco [®] G-60 (malla de 2040)

5. granular en agua, se transfirió a una columna de vidrio, se dejó depositar y el exceso de agua se dejó desagotar. Las fracciones 84-96 inclusive de la cromatografía con CM Sephadex precedente se combinaron y se hicieron pasar a través de la columna de carbón granular. La columna cargada se lavó
10. con 600 ml de agua y luego se desarrolló con 1 lt de acetona acuosa al 50%. Los levigados, ambos de los cuales contenían BM123y, se concentraron hasta fases acuosa en vacío y se liofilizaron para proporcionar un total de 886 mg de BM123y como la sal de clorhidrato. Una muestra microanalítica se obtuvo sometiendo el material precedente a una repetición del procedimiento precedente.
- 15.

20. El antibiótico BM123y no posee un punto de fusión definido, pero una descomposición verbal comienza en la vecindad de 200°C. Un microanálisis de la muestra equilibrada durante 24 hr en una atmósfera a 22,2°C que contenía una humedad relativa de 23% proporcionó C, 39,44%, H, 6,10%; N, 16,19%; Cl(ionic), 11,54%; pérdida al secarse, 8,19%. En agua BM123y proporcionó un máximo de absorción de U.V. a 286 nm con $E_{1cm}^{1\%} = 250$. La posición de este máximo no cambió con el pH. BM123y tiene una rotación específica de $[\alpha]_D^{25} = +71^\circ$ (C = 0,97 en agua).
- 25.

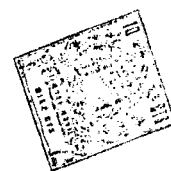


El antibiótico BM123γ exhibió una absorción característica en la reacción del infrarrojo del espectro a las siguientes longitudes de onda: 770, 830, 870, 930, 980, 1035, 1105, 1175, 1225, 1300, 1340, 1370, 1460, 1510, 1555, 1605, 1660, 1740, 2950, y 3350 cm^{-1} . Un espectro de absorción de infrarrojo convencional de BM123γ preparado en un gránulo de KBr se indica en la Fig. 1 de los dibujos que se acompañan.

EJEMPLO 5

10. Aislación de BM123γ

Una suspensión de CM Sephadex[®] C-25 $\sqrt{\text{Na}^+}$ en 2% de cloruro de sodio acuoso se vertió en una columna de vidrio de un diámetro de 2,6 cm hasta una altura de resina de aproximadamente 70 cm. El exceso de cloruro de sodio acuoso al 2% se desagotó y 4,11 g de una muestra que contenía primordialmente BM123γ₁ junto con algo de BM123γ₂ y otras impurezas, preparada como se describió en el Ejemplo 3, se disolvió en aproximadamente 10 ml de cloruro de sodio acuoso al 2% y se aplicó a la columna en la columna luego se levigó con un gradiente entre 4 lt cada uno de cloruro de sodio acuoso 2% y 1%. Se recogieron automáticamente cada 15 min fracciones de aproximadamente 75 ml cada una. El antibiótico BM123γ se ubicó midiendo el efluente de la columna en el ultravioleta y por bioautografía de discos de papel sumergidos en placas grandes de ágar sembradas con cepas AD de



Klebsiella pneumoniae. La mayoría de BML23 γ se ubicó entre fracciones 64-90 inclusive; las fracciones iniciales(64-80) contenían una mezcla de BML23 γ_1 y BML23 γ_2 mientras que las fracciones posteriores (81-90) contenían esencialmente

5. BML23 γ_1 .

Se suspendieron en agua 100 ml de Darco[®] G-60 (de malla 20-40) granular, se transfirió a una columna de vidrio, se dejó depositar y el exceso de agua se dejó desagotar. Las fracciones 81-90 inclusive de la cromatografía de

10. CM Sephadex precedente se combinaron y se hicieron pasar a través de una columna de carbono granular. La columna cargada se lavó con 500 ml de agua y luego se desarrolló con 500 ml de metanol acuoso al 10% seguido por 1 lt de metanol acuoso al 50%. El levigado de metanol acuoso al 50%,

15. que contenía la mayoría de BML23 γ_1 , se reguló de pH 5,9 a 6,0 con resina de Amberlite[®] IR-45 (OH⁻¹). La resina se eliminó por filtración y el filtrado se concentró en vacío hasta una fase acuosa y se liofilizó para proporcionar 294 mg de BML23 γ_1 blanco como la sal de clorhidrato.

20. El antibiótico BML23 γ_1 no posee un punto de fusión definido, pero una descomposición gradual comienza en la vecindad de 200°C. Un microanálisis de la muestra equilibrada durante 24 hr en una atmósfera a 22,2°C que contenía 60% de humedad relativa proporcionó C, 37,84%; H, 5,73%; N, 15,58%; Cl(iónico), 10,01%; pérdida al secarse 10,45%.

25. En metanol BML23 γ_1 proporcionó un máximo de absorción de



U.V. a 286 nm con $E_1^{1\%} = 225$. La posición de este máximo no cambió con el pH. BML23 γ_1 tiene una rotación específica de $+55^\circ$ ($C=0,803$ en agua).

5. El antibiótico BML23 γ_1 exhibió una absorción característica en la región del infrarrojo del espectro a las siguientes longitudes de onda: 770, 830, 870, 930, 980, 1045, 1080, 1110, 1125, 1175, 1225, 1305, 1345, 1380, 1465, 1515, 1560, 1605, 1660, 1730, 2950 y 3350 cm^{-1} . Un espectro de absorción de infrarrojo convencional de BML23 γ_1 preparado en un gránulo de KBr se indica en la Fig. 2 de los dibujos que se acompañan. Un espectro de resonancia magnética protónica convencional de BML23 γ_1 determinado en una solución de D_2O en un espectrómetro de 100 megaciclos se indica en la Fig. 4 de los dibujos que se acompañan.
- 10.

EJEMPLO 6

Aislación de BML23 γ_2

15. Una muestra de 25 g que contenía primordialmente BML23 γ_2 y BML23 β , preparada como se describe en el Ejemplo 3, se disolvió en aproximadamente 120 ml de cloruro de sodio acuoso al 2% y se aplicó a una columna que contenía 1800 ml de CM Sephadex ^(R) C-25 $[Na^+]$ en cloruro de sodio acuoso al 2%. La columna luego se levigó con un gradiente entre 20 lt cada uno de cloruro de sodio acuoso al 2% y 4%. Los 12 litros iniciales del levigado se recogieron en una botella grande y se descartaron. Luego se recogieron fracciones de aproximadamente 800 ml cada una automáticamente
- 20.
- 25.



- cada 40 min. El antibiótico BM123 γ se ubicó midiendo las fracciones de columna en el ultravioleta. La mayoría de BM123 γ se ubicó entre las fracciones 7-18 inclusive; las fracciones iniciales (7-15) contenían esencialmente BM123 γ_2
5. puro y las fracciones posteriores (16-18) contenían una mezcla de BM123 γ_1 y BM123 γ_2 .
- Se suspendieron en agua 600 mil de Darco[®] G-60 (malla de 20-40) granular, se transfirió a una columna de vidrio, se dejó depositar y el exceso de agua se dejó desagotar.
10. Las fracciones 7-15 inclusive de la cromatografía de CM Sephadex precedente se combinaron y se hicieron pasar a través de la columna de carbono granular. La columna cargada se lavó con 3 lt de agua y luego se desarrolló con 3 lt de metanol acuoso al 10% seguido por 6 lt de etanol acuoso al 50%. El levigado de metanol acuoso al 10% se reguló de pH 5,8 a 6,0 con resina de Amberlite[®] IR 45 (OH⁻). La resina se eliminó por filtración y el filtrado se concentró en vacío hasta una fase acuosa y se liofilizó para proporcionar 595 mg de BM123 γ_2 amorfo blanco como la sal
15. de clorhidrato. El levigado de metanol acuoso al 50% se reguló de pH 4,6 a 6,1 con resina de Amberlite[®] IR 45 (OH⁻). La resina se eliminó por filtración y el filtrado se concentró en vacío hasta una fase acuosa y se liofilizó para proporcionar 3,645 g de BM123 γ_2 amorfo blanco escazamente me-
20. nos puro como la sal de clorhidrato.
- 25.



El antibiótico BML23 γ ₂ no posee un punto de fusión definido, pero la descomposición gradual comienza en la vecindad de 200°C. Un microanálisis de la muestra equilibrada durante 24 hr en una atmósfera de 22,2°C que contenía 60% de humedad relativa proporcionó C, 36,14%, H, 5,67%; N, 15,1%; Cl(iónico), 11,11%; pérdida al secarse 10,87%. En metanol, BML23 γ ₂ proporcionó de máximo de absorción de U.V. a 286 nm con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 220$. La posición de estemáximo no cambió con el pH. BML23 γ ₂ tenía una rotación específica de +60° (C = 0,851 en agua).

El antibiótico BML23 γ ₂ exhibió una absorción característica en la región del infrarrojo del espectro a las siguientes longitudes de ondas : 770, 830, 870, 950, 980, 1035, 1110, 1175, 1225, 1285, 1345, 1380, 1470, 1515, 1560, 1605, 1660, 1755, 2950 y 3350 cm^{-1} . Un espectro de absorción de infrarrojo convencional de BML23 γ ₂ preparado en un gránulo de KBr se indica en la Fig. 3 de los dibujos que se acompañan. Un espectro de resonancia magnética protónica convencional de BML23 γ ₂ determinado en una solución de D₂O en un espectrómetro de 100 megacíclos se indica en la Fig. 5 de los dibujos que se acompañan.

EJEMPLO 7

Partición por Papel y Cromatografía de Capa Delgada de BML23 β y BML23 γ

Los antibióticos BML23 pueden distinguirse por cro-



matografía de papel. Para este propósito tiras de Whatman N° 1 fueron manchadas con una solución de agua o metanol de las sustancias y se equilibraron durante 1 a 2 hr en presencia de ambas fases superior e inferior. Las tiras se desarrollaron durante la noche con la fase (orgánica) inferior obtenida mezclando fenol al 90%:m-cresol:ácido acético:piridina:agua (100:25:4:4:75 en volumen). Las tiras desarrolladas se retiraron de la cámara cromatográfica se secaron al aire durante 1 a 2 hr, se lavaron con éster para eliminar fenol residual y se bioautografiaron en placas grandes de ágar sembradas con cepa AD de Klebsiella pneumoniae. Valores Rf representativos se indican en la Tabla VII siguiente:

TABLA VII

15.	<u>Componente</u>	<u>RF</u>
	BM123 γ	0,85
	BM123 β	0,50, 0,70

El componente β era una mezcla de dos antibióticos utilizando este sistema. BM123 β estaba compuesto de un antibiótico principal (Rf = 0,50) denominado BM123 β_1 y un antibiótico menor (Rf = 0,70) denominado BM123 β_2 .

Los antibióticos BM123 también pueden distinguirse por cromatografía de capa delgada. Para este propósito placas prerrecubiertas de Cellulose F[®] (0,10 mm de espesor), una forma de celulosa de capa espesa suministrada por EM



Laboratories, Inc., Elmsford, New York, fueron manchadas con una solución de agua de la sustancia a ser cromatografiada (aproximadamente 20-40 microgramos por mancha). Las placas se desarrollaron durante la noche con el solvente obtenido mezclando 1-butanol:agua:piridina:ácido acético (15:12:10:1 en volumen). Las placas desarrolladas se retiraron de la cámara cromatográfica y se secaron al aire durante aproximadamente 1 hr. Los antibióticos fueron detectados utilizando ya sea reactivos rociadores de ninhidrina o Sakaguchi. Valores Rf representativos se indican en la Tabla VIII siguiente:

TABLA VIII

<u>Componente</u>	<u>Rf</u>
BMI23 γ	0,17, 0,23
15. BMI23 β	0,08, 0,14

Ambos BMI23 β y BMI23 γ eran una mezcla de dos componentes utilizando este sistema. BMI23 β estaba compuesto de un componente principal (Rf = 0,08) que era BMI23 β_1 y un componente menor (Rf = 0,14) que era BMI23 β_2 . El componente menos polar de BMI23 γ (Rf = 0,23) era BMI23 γ_1 y el componente más polar (Rf = 0,17) era BMI23 γ_2 .

EJEMPLO 8

Procedimiento General para la Alquilación Reductiva del Antibiótico BMI23 γ

25. A una solución agitada de 100 mg de antibiótico



- BMI23y en 20 ml de metanol se agregan 5 ml (o 5 g) del aldehído o cetona apropiada y 100 mg de cianoborohidruro de sodio. El pH de la solución resultante se mantiene a aproximadamente 7,0 con cloruro de hidrógeno metanólico 0,1N
5. durante un período de 3 a 24 hr. La reacción se mide por cromatografía de capa delgada hasta la desaparición de BMI23y. La mezcla de reacción luego se filtra y el filtrado se evapora hasta sequedad. El residuo se tritura con 3 ml de metanol y se filtra. El filtrado se diluye con
10. 50 ml de acetona y el precipitado que se forma se separa por filtración y se seca. El solvente de metanol puede reemplazarse por 20 ml de agua siempre que el aldehído o cetona de partida sean solubles en agua.

EJEMPLO 9

15. Preparación de metil-BMI23y
- A una solución de 1,0 g de BMI23y y 2,5 ml de solución de formaldehído acuoso al 37% en 50 ml de agua se agregan en porciones, 400 mg de cianoborohidruro de sodio. El pH de la mezcla de reacción se mantiene a 7,0 con ácido clorhídrico 1M durante esta adición. La mezcla de reacción se
20. agita 10 min adicionales a temperatura ambiente y luego se evapora hasta sequedad en vacío. El residuo se tritura con 20 ml de metanol, se filtra y el filtrado se diluye con 250 ml de acetona. El producto se precipita se separa por
25. filtración y se seca; rendimiento, 667 mg.



EJEMPLO 10

Preparación de isopropil-DM123y

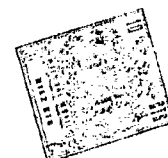
A una solución de 200 mg de DM123y en 30 ml de metanol se agregan 5 ml de acetona. A esta solución se agregan 5. 139 mg de cianoborohidruro de sodio y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 min. Durante este tiempo el pH de la mezcla de reacción se mantiene entre 7,4 y 7,8 mediante la adición de cloruro de hidrógeno metanólico 0,1N. La pequeña cantidad de precipitado que se formó se separó por filtración y el filtrado se evaporó hasta sequedad en vacío. El residuo se trituró con 2 ml de metanol y se filtró. El filtrado se diluyó con 100 ml de acetona y el producto sólido que se separó se eliminó por filtración y se secó; rendimiento, 184 mg.

15.

EJEMPLO 11

Preparación de β -feniletil-DM123y

A una solución de 200 mg de DM123y en 15 ml de agua y 25 ml de acetonitrilo se agregaron una solución de 2 ml de fenilacetaldehido en 4 ml de etanol. A esto se agregaron 20. 103 mg de cianoborohidruro de sodio. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min durante cuyo tiempo el pH de la mezcla se mantuvo a 7 con ácido clorhídrico 0,2N. La mezcla de reacción luego se filtró y el filtrado se evaporó hasta sequedad en vacío. El 25. residuo se trituró con 2 ml de metanol y se filtró. El



filtrado se diluyó con 100 ml de acetona y el producto que se separó se eliminó por filtración y se secó; rendimiento, 180 mg.

EJEMPLO 12

5. Preparación de 1,3,3-trimetilbutil-BMI23y

a una solución de 200 mg de BMI23y clorhidrato en 50 ml de metanol se agregaron 3 ml de 4,4-dimetil-2-pentona y 106 mg de cianoborohidruro de sodio. La solución de reacción se mantuvo a pH 7 mediante la adición por gotas de cloruro de hidrógeno metanólico. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 hr y se filtró. El filtrado se evaporó hasta sequedad en vacío. El residuo se disolvió en 3 ml de metanol, se diluyó con 50 ml de acetona y se filtró, rendimiento 125 mg.

10.

EJEMPLO 13

Preparación de 1-metilfenetil-BMI23y

A una solución de 200 mg de BMI23y en 50 ml de metanol se agregaron 5 ml de fenilacetona. A esta solución se agregaron 170 mg de cianoborohidruro de sodio y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 1/2 hr. Durante este tiempo el pH de la mezcla de reacción se mantuvo a 7,0 con metanol saturado con gas cloruro de hidrógeno. La mezcla de reacción se concentró a aproximadamente 5 ml en volumen, se diluyó con 2 ml de metanol, y se filtró. El filtrado se vertió en 100 ml de acetona y el

20.

25.



producto sólido que se separó se eliminó por filtración y se secó; rendimiento, 233 mg.

EJEMPLO 14

Preparación de 1-metilnonil-BM123γ

5. Se agregó cianoborohidruro de sodio (100 mg) a una solución de BM123γ y 2-decanona (1 ml) en 40 ml de metanol. El pH de la solución se reguló a 7,0 y se mantuvo a 7,0 ± 0,2 mediante la adición de cloruro de hidrógeno metanólico 0,1N según fue necesario. Luego de 19,5 hr la mezcla de
10. reacción se filtró y el filtrado se concentró en vacío a 30°C. El residuo se suspendió en 5 ml de metanol y se filtró. El filtrado se agregó a 50 ml de acetona. El sólido blancuzco que se precipitó se recogió por filtración, se lavó con acetona, y se secó en vacío. El rendimiento de 1-
15. metilnonil-BM123γ crudo fue de 167 mg.

EJEMPLO 15

Preparación de 1,3-dimetilbutil-BM123γ

- A una solución de 210 mg de BM123γ en 50 ml de metanol se agregaron 5 ml de metil isobutil cetona. A esta so-
20. lución se agregaron 166 mg de cianoborohidruro de sodio y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 hr. Durante este tiempo el pH de la mezcla de reacción se mantuvo a 7,0 con metanol saturado con gas cloruro de hidrógeno. La mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad en
25. vacío. El residuo se trituroó con 2 ml de metanol y se fil-



tró. El filtrado se diluyó con 100 ml de acetona y el producto sólido que se separó se eliminó por filtración y se secó; rendimiento, 210 mg.

EJEMPLO 16

5. Preparación de 2-norbornil-BM123γ

Se agregó cianoborohidruro de sodio (100 mg) a una solución de BM123γ (200 mg) y 2-norbornanona (400 mg) en 40 ml de metanol. El pH de la solución se reguló a 7,0 con cloruro de hidrógeno metanólico 0,1N. El pH se mantuvo a 7,0 ± 0,2 mediante la adición de cloruro de hidrógeno 0,1N según fue necesario. Luego de 12,5 hr la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró en vacío a 35°C. El residuo se suspendió en 5 ml de metanol y se filtró. El filtrado se agregó a 50 ml de acetona. El sólido blanqueado que se precipitó se recogió por filtración, se lavó con acetona y se secó en vacío. El rendimiento de 2-norbornil-BM123γ crudo fue de 175 mg.

EJEMPLO 17

Preparación de isopropil-BM123γ

20. Una mezcla de 50 mg de BM123γ₁, 5 ml de acetona y 60 mg de cianoborohidruro de sodio en 35 ml de metanol se agitó a temperatura ambiente durante 40 min. El pH de la solución se mantuvo a 7 mediante la adición por gotas de una solución de cloruro de hidrógeno metanólico. La mezcla se evaporó hasta sequedad en vacío. El residuo se trituró

25.



con 5 ml de metanol y la solución resultante se diluyó con 50 ml de acetona; rendimiento, 49 mg.

EJEMPLO 18

Preparación de isopropil-BMI23γ₂

5. Una mezcla de 41 mg de BMI23γ₂, 5 ml de acetona y 50 mg de cianoborohidruro de sodio en 35 ml de metanol se agitó a temperatura ambiente durante 40 min. El pH de la solución se mantuvo a 7 mediante la adición por gotas de una solución de cloruro de hidrógeno metanólico (saturada).
10. La mezcla se filtró y se evaporó hasta sequedad en vacío. El residuo se trituroó con 5 ml de metanol y la solución resultante se diluyó con 50 ml de acetona; rendimiento, 46 mg.

EJEMPLO 19

15. Preparación de 1-metil-2-fenil-etil-BMI23γ₂

- Una mezcla de 200 mg de BMI23γ₂, 5 ml de fenil-acetona y 170 mg de cianoborohidruro de sodio en 50 ml de metanol se agitó a temperatura ambiente durante 3 hr y 45 min. Durante este tiempo el pH de la mezcla de reacción se mantuvo a 7 con la adición por gotas de una solución de cloruro de hidrógeno metanólico (saturada). La mezcla se evaporó hasta sequedad en vacío. El residuo se trituroó con 5 ml de metanol y la solución de metanol resultante se diluyó con aproximadamente 50 ml de acetona; rendimiento
- 20.
25. 233 mg.



EJEMPLO 20

Preparación de (2-etilciclopentil)-BM123γ

- Una solución de 200 mg de BM123γ, 3 ml de 2-etilciclopentanona y 101 mg de cianoborohidruro de sodio en 50 ml de alcohol metílico se almacenó a temperatura ambiente durante 18 hr. Durante este tiempo el pH de la solución se mantuvo a 7 mediante la adición de una solución saturada de cloruro de hidrógeno en metanol. La mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad. El residuo se trituró con 3 ml de metanol, se filtró y el filtrado se diluyó con 40 ml de acetona, rendimiento, 157 mg.
- 5.
- 10.

EJEMPLO 21

Preparación de 3,5-dimetilciclohexil-BM123γ

- Una solución de 200 mg de BM123γ, 5 ml de 3,5-dimetilciclohexanona y 200 mg de cianoborohidruro de sodio en 50 ml de metanol se almacenó a temperatura ambiente durante 1 hr. Durante este tiempo el pH de la solución se mantuvo a 7 durante la adición de una solución saturada de cloruro de hidrógeno en metanol. La reacción se trituró con 3 ml de metanol, se filtró y el filtrado se diluyó con 40 ml de acetona, rendimiento 200 mg.
- 15.
- 20.

EJEMPLO 22

Preparación de 2,4-dimetilciclopentil-BM123γ

- Una solución de 206 mg de BM123γ, 3 ml de 2,4-dimetilciclopentanona y 104 mg de cianoborohidruro de sodio en
- 25.



- 50 ml de metanol se almacenó a temperatura ambiente durante 6 hr. Durante este tiempo el pH de la solución se mantuvo a 7 mediante la adición de una solución saturada de cloruro de hidrógeno en metanol. La reacción se trituró con 3 ml de metanol, y se filtró y el filtrado se diluyó con 40 ml de acetona, rendimiento 101 mg.

EJEMPLO 23

Preparación de 2-etilciclohexil-BMI23γ

- Una solución de 200 mg de BMI23γ, 5 ml de 2-etilciclohexanona y 213 mg de cianoborohidruro de sodio en 50 ml de metanol se almacenó a temperatura ambiente durante 3 hr. Durante este tiempo el pH de la solución se mantuvo a 7 mediante la adición de cloruro de hidrógeno saturado en metanol. La reacción se trituró con 3 ml de metanol, se filtró y el filtrado se diluyó con 40 ml de acetona, rendimiento 200 mg.

EJEMPLO 24

Preparación de 3-metilciclohexil-BMI23γ

- Una solución de 200 mg de BMI23γ, 1,5 ml de 3-metilciclohexanona y 200 mg de cianoborohidruro de sodio en 50 ml del metanol se almacenó a temperatura ambiente durante 2 hr. Durante este tiempo el pH de la solución se mantuvo a 7 mediante la adición de una solución saturada de cloruro de hidrógeno en metanol. La reacción se trituró con 3 ml de metanol, se filtró y el filtrado se diluyó



con 40 ml de acetona, rendimiento 200 mg.

EJEMPLO 25

Preparación de 2,4,4-trimetilciclopentil-BM123γ

Una solución de 200 mg de BM123γ, 5 ml de 2,4,4,-tri-
5. metilciclopentanona y 179 mg de cianoborohidruro de sodio
en 50 ml de metanol se almacenó a temperatura ambiente du-
rante 24 hr. durante este tiempo el ph de la solución se
mantuvo a 7 mediante la adición de una solución saturada
de cloruro de hidrógeno en metanol. La reacción se tritu-
10. ró con 3 ml de metanol, se filtró y el filtrado se diluyó
con 40 ml de acetona, rendimiento 176 mg.

EJEMPLO 26

Preparación de 2-propilciclohexil-BM123γ

Una solución de 200 mg de BM123γ, 3 ml de 2-propil-
15. ciclohexanona y 157 mg de cianoborohidruro de sodio en 50
ml de metanol se almacenó a temperatura ambiente durante
4 hr. Durante este tiempo el pH de la solución se mantuvo
a 7 mediante adición de una solución saturada de cloruro
de hidrógeno en metanol. La reacción se trituró con 3 ml
20. de metanol, se filtró y el filtrado se diluyó con 40 ml de
acetona, rendimiento 75 mg.

EJEMPLO 27

Preparación de 2-metilciclopentil-BM123γ

Una solución de 211 mg de BM123γ, 3 ml de 2-metil-
25. ciclopentanona y 98 mg de cianoborohidruro de sodio en 50

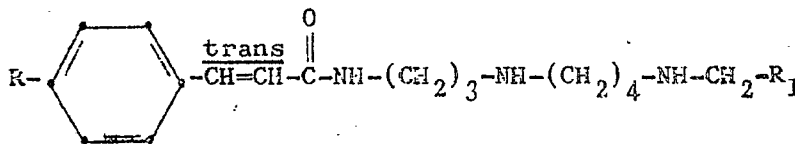


ml de metanol se almacenó a temperatura ambiente durante 3,5 hr. Durante este tiempo el pH de la solución se mantuvo a 7 mediante la adición de una solución saturada de cloruro de hidrógeno en metanol. La reacción se trituró con 3 ml de metanol, se filtró y el filtrado se diluyó con 40 ml de acetona, rendimiento 157 mg.

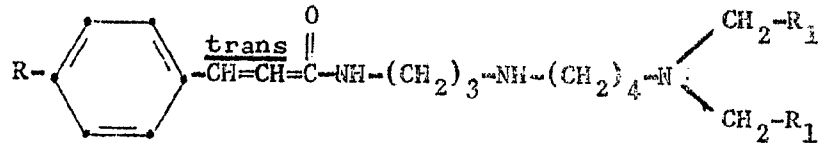
- N O T A -

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a dos So licitudes de Patente, presentadas en EE.UU. de A., con fechas y números siguientes: 5 de diciembre de 1.974, nº 529,862 y, 12 de septiembre de 1.975, nº 612.975, acciéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita PATENTE DE INVENCION en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR DERIVADOS ALQUILADOS DEL ANTIBIOTICO BM123; caracterizándose por lo siguiente:

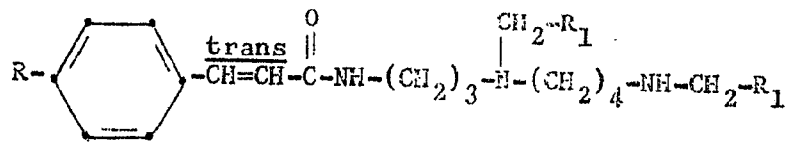
1.- Procedimiento para preparar derivados alquilados del antibiótico BM123, de fórmulas:



(I)

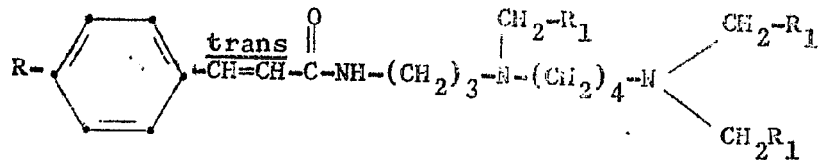


(II)



(III)

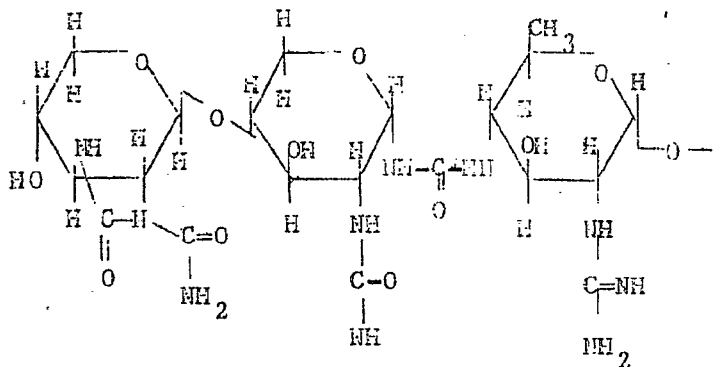
5.



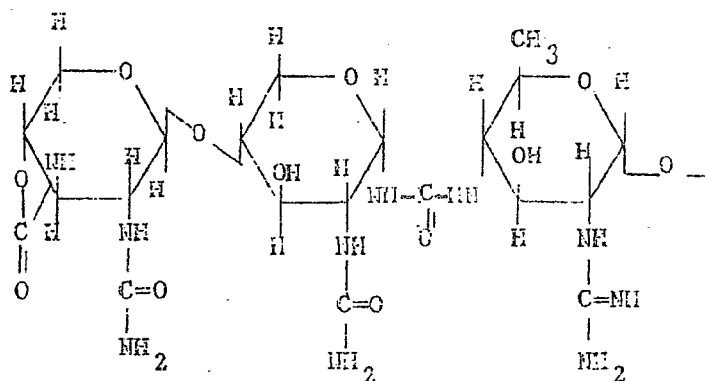
(IV)

en donde R_1 es hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior halo sustituido, alqueno inferior, fenilo, fenilo monosustituido, fenilalquilo inferior, 2-furilo, 2-furilo metil sustituido, 2-tienilo, 2-tienilo metil sustituido, 2-pirrilo, 2-pirrilo metil sustituido, 2-piridilo o 2-quinolilo; y R es una porción molecular de la fórmula:

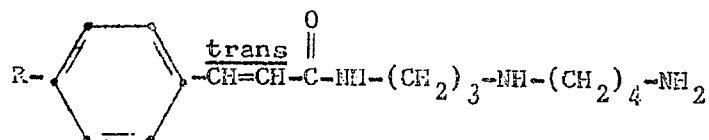
R



6

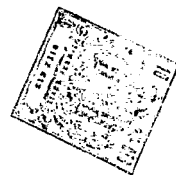


caracterizado porque comprende alquilar una amina de fórmula:

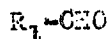


en donde R es como se ha definido anteriormente aquí con

R₃

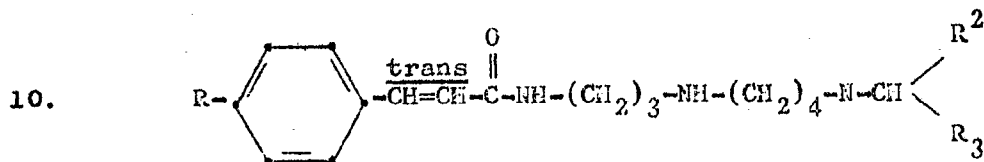


un aldehido de la fórmula:

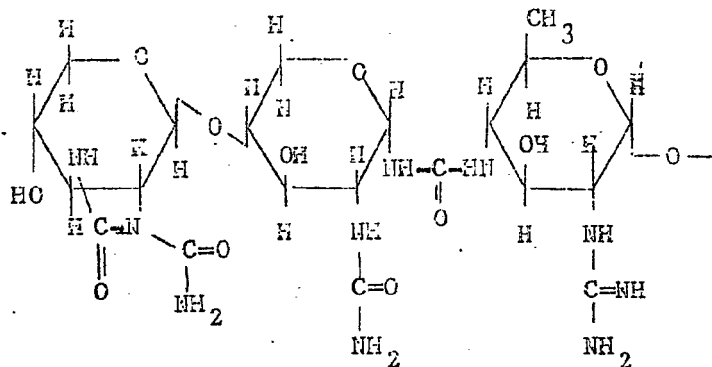


5. en donde R_1 es como se ha definido anteriormente aquí en presencia de un agente reductor en un solvente inerte para los reactivos durante un período de tiempo suficiente para que tenga lugar un grado substancial de alquilación reductiva.

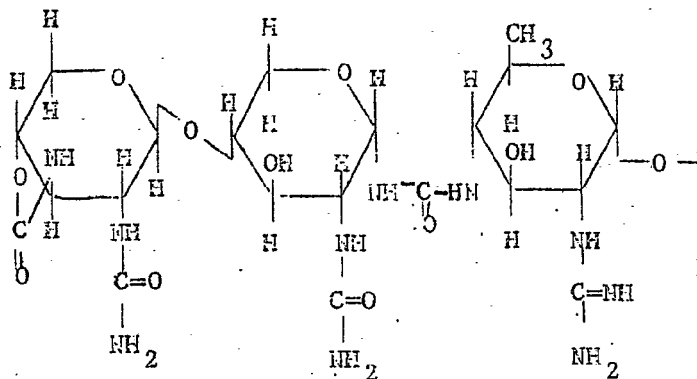
2.- Procedimiento para preparar compuestos de la fórmula:



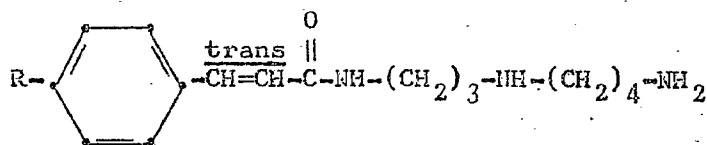
15. en donde R_2 es alquilo inferior, alquilo inferior halo sustituido o fenil alquilo inferior; R_3 es alquilo inferior, alquilo inferior halo sustituido, alquenilo inferior, cicloalquilo inferior, fenilo, fenilo monosustituido, fenil alquilo inferior o fenil monosustituido alquilo inferior; y R_2 y R_3 tomados juntamente representan tetrametileno, pentametileno o hexametileno; y R es una porción molecular de las fórmulas:



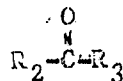
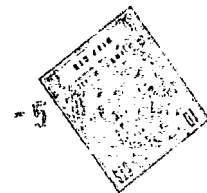
6



que comprende alquilar una amina de la fórmula:



donde R es como se ha definido anteriormente aquí con una cetona de la fórmula:



en donde R₂ y R₃ son como se han definido anteriormente aquí en presencia de un agente reductor en un solvente inerte para los reactivos durante un período de tiempo suficiente para que tenga lugar un grado substancial de alquilación reductiva.

5.

3.- Procedimiento para preparar derivados alquilados del antibiótico BM123, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 62 hojas escritas a máquina por una sola cara.

10.

-5 DIC. 1975

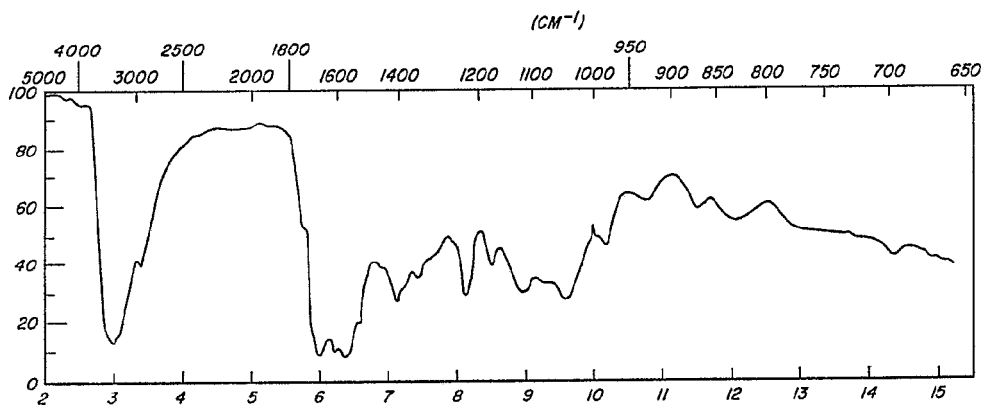
Madrid,

AMERICAN CYANAMID COMPANY

GÓMEZ ACEBO Y RODEY
Firmado: L. Goia Fernández



ESCALA VARIABLE

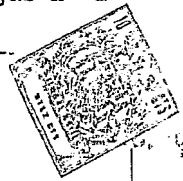


BMI237 KBr

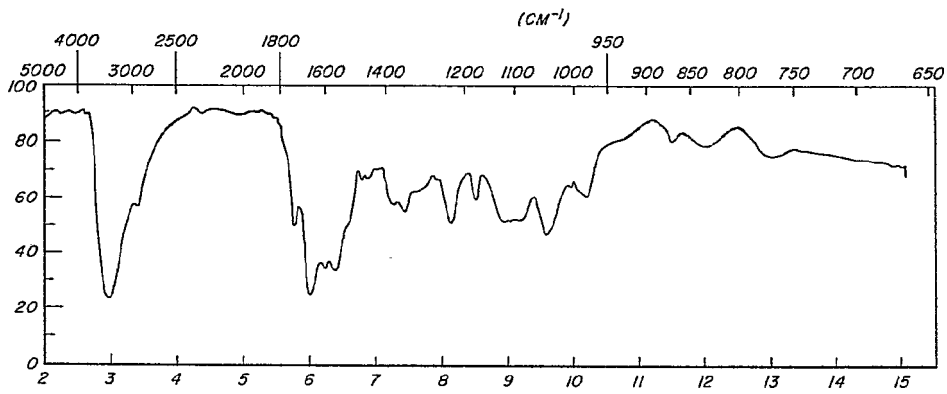
FIG. 1

Madrid - 5 DIC. 1975

Dr. P. Elmerich, L. García Vazquez



ESCALA
VARIABLE



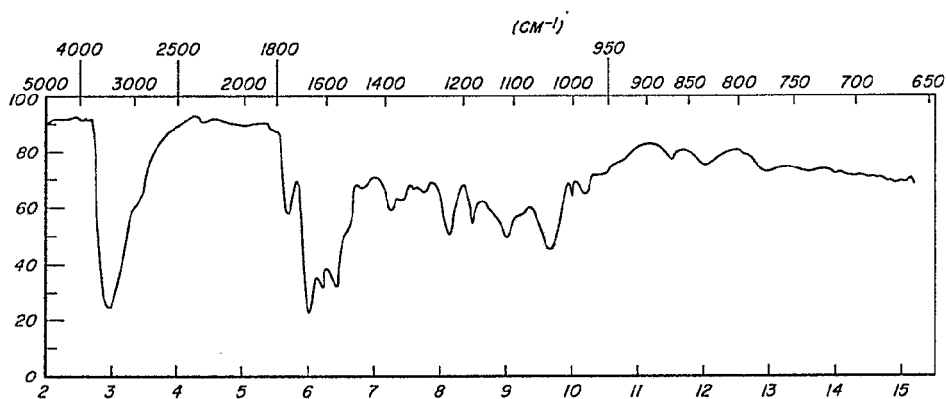
BM1237, KBr

FIG. 2

-5 MAR. 1975
maurid
S. E. Elmer
S. E. Elmer & Co. Inc. President



ESCALA
VARIABLE



BMI237₂ KBr

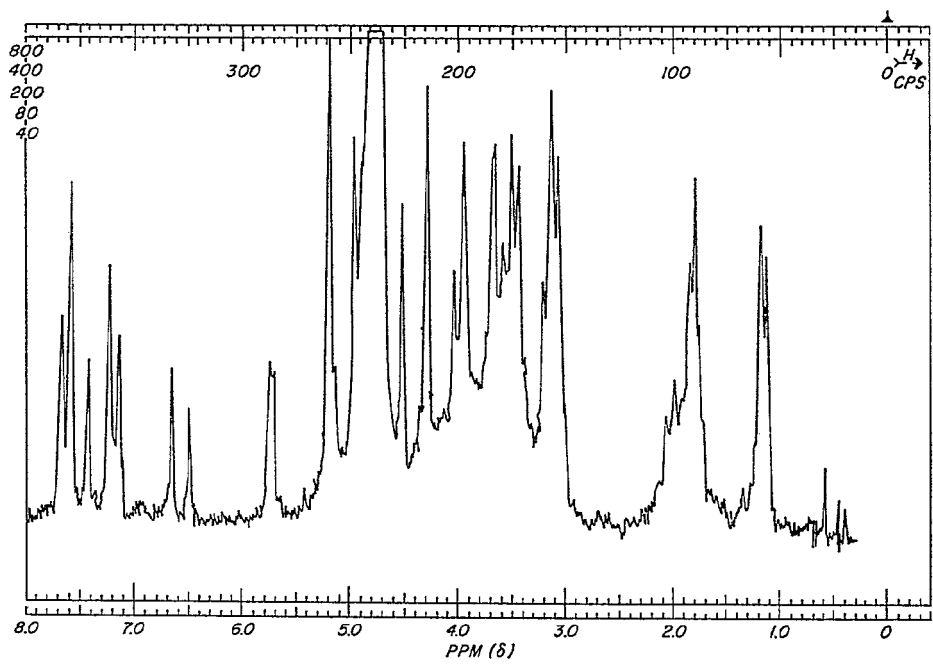
FIG. 3

May 6 5 1975

[Handwritten signature]
E. M. Femandez L. Gesta Fernández



ESCALA
VARIABLE



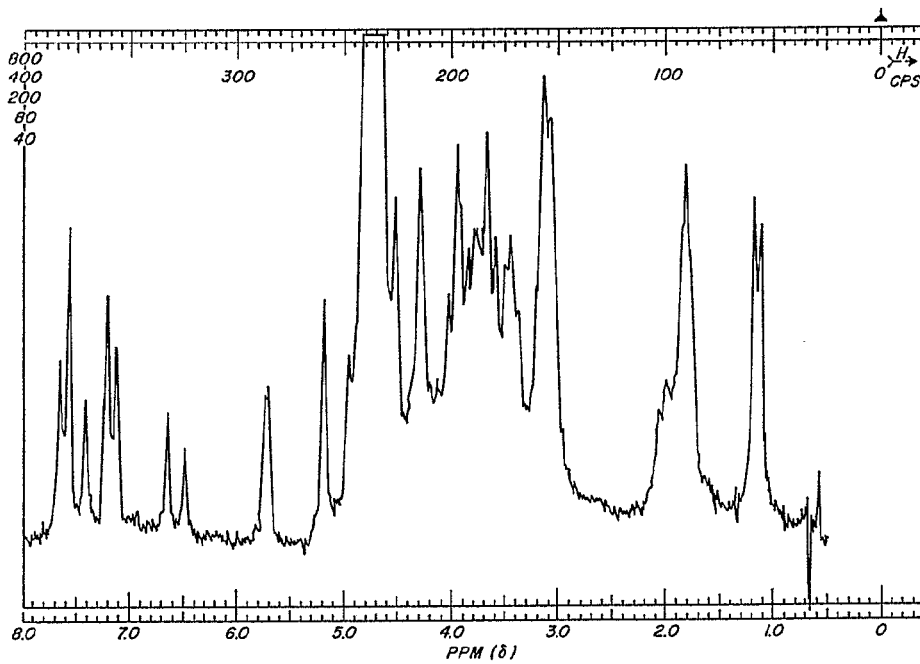
BM1237, D₂O
FIG. 4

MADE IN DIC. 1975

Firmador: L. Gaita Fernández
[Handwritten signature]



ES
VALENTIA



BM1237₂ D₂O
FIG. 5

1975
Firmado: L. Goala Fernández