



ESPAÑA

19 ES	21	NUMERO	450.333	20 A1
	22	FECHA DE PRESENTACION	30 julio 1.976	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
50-93053	1 agosto 1.975	japonesas
50-110010	12 septiembre 1.975	"
50-158388	27 diciembre 1.975	"
51-55626	15 mayo 1.976	

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D; C07D; A61K	

54 TITULO DE LA INVENCION
UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE DERIVADOS ACILADOS DE ANTIBIOTICOS

71 SOLICITANTE (S)
SANRAKU OCEAN Co., Ltd.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
7-banchi, Takara-cho, 1-chome, Chuo-ku, Tokyo, Japon.

72 INVENTOR (ES)
Rokuro Okamoto, Tsomoru Fukumoto, Akira Takamatsu, Tomio Takeuchi Todos de nacionalidad japonesa.

73 TITULAR (ES)
El mismo solicitante.

74 REPRESENTANTE
DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU.

1 UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE DERIVADOS ACI-
LADOS DE ANTIBIOTICOS MACROLIDOS DE 16-ESLABONES

RESUMEN DE LA INVENCION

5 Un procedimiento nuevo para la obtención de derivados
acilados de antibióticos macrólidos, que incluye derivados
nuevos de tilosina, angolamicina y espiramicina, y las sa-
les de adición ácida de éstos por acilación bioquímica de
por lo menos una de las posiciones 3- y 4"- de antibióticos
10 macrólidos de 16 eslabones, que consiste en la reacción bio-
química que utiliza los microorganismos del género Strepto-
myces elegidos por su capacidad recientemente encontrada
para dicha acilación y la recuperación de los derivados a
partir de la mezcla de reacción mediante métodos habituales
para la recuperación de antibióticos macrólidos.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

(1) Campo de la invención

20 Un procedimiento nuevo para la obtención de derivados
acilados de antibióticos macrólidos, que incluye derivados
nuevos de tilosina, angolamicina y espiramicina, y las sales
de adición ácida de los mismos por acilación bioquímica de
por lo menos una de las posiciones 3- y 4"- de antibióticos
macrólidos de 16 eslabones, que consiste en la reacción bio-
química que utiliza los microorganismos del género Strepto-
25 myces elegidos por su capacidad recientemente encontrada
para dicha acilación y la recuperación de los derivados a
partir de la mezcla de reacción mediante métodos habituales
para la recuperación de antibióticos macrólidos.

(2) Descripción de las técnicas precedentes

30 Hay dos ejemplos precedentes comunicados en relación
con el procedimiento para la acilación microbiana de anti-

1 bióticos macrólidos de 16 eslabones; es decir, que utilizan
espiramicina y YL-704. El procedimiento que utiliza espira-
micina se expone en la Patente Norteamericana Nº 2.943.024
"Preparation of spiramycin III", Patente Norteamericana Nº
5 2.943.025 "Preparation of spiramycin II", Patente Francesa
Nº 1.262.571 "Transformation biochimique de la spiramycin I
en spiramycin II et III" y Patente Japonesa Showa (Kokoku)
36-349 "Process for producing spiramycin II, spiramycin III
and the mixture thereof". Estas patentes tratan prácticamen-
10 te de la misma invención traducida a diferentes idiomas,
exponiendo los procedimientos en resumen;

1) un organismo que produce espiramicina de Streptomyces
ambofaciens NRRL-2420 se cultiva en el medio de cultivo a-
ñadido a la espiramicina I (que tiene radical 3-hidroxilo)
15 y a los agentes acilantes, en el cual se produce espiramici-
na II (que tiene radical 3-acetilo) y espiramicina III (que
tiene radical 3-propionilo).

2) Células cultivadas libres de espiramicina y de agentes
acilantes se suspenden en un medio de reacción, al que se
20 añade espiramicina I y los agentes acilantes. Después de
la incubación se obtiene espiramicina II y III.

3) En la obtención fermentativa de espiramicinas con los ci-
tados organismos, la adición de los agentes acilantes aumen-
ta la relación de producción de espiramicina II o III.

25 El procedimiento de acuerdo con la presente invención
es claramente distinguible en principio de las técnicas pre-
cedentes por las razones siguientes.

1) Aquellas utilizan un organismo que es un productor direc-
to de espiramicina, y el procedimiento está íntimamente li-
30 gado a la fermentación antibiótica. Puesto que las cuatro

1 cepas favorablemente utilizadas en nuestra invención no son productoras de la especie de antibiótico deseado, esto indica que nuestro procedimiento es un proceso enzimático en principio.

5 2) El substrato de antibiótico utilizado en su procedimiento está limitado a la espiramicina I que es un producto directo de su organismo, mientras que nuestro procedimiento puede emplear la mayor parte de los antibióticos macrólidos de 16 eslabones, lo que indica la naturaleza no específica de la reacción con respecto a la especificidad del substrato

10 3) Su procedimiento solamente puede llevar a cabo la transformación de la posición 3- de la espiramicina I, mientras que el nuestro puede realizar, si se pretende, la transformación simultánea de las posiciones 3- y 4"- con un organismo. Se puede conseguir una variedad mucho más amplia de productos con las combinaciones adecuadas de substrato, donador de acilo y condiciones de reacción. También es ventaja la simplicidad del procedimiento en convertir las dos posiciones funcionales simultáneamente con un sistema de célula.

15 20 Con respecto a YL-704 que pertenece a la familia de las leucomicinas, se presenta la Patente Japonesa (Kokoku) Showa 49-13992 "process for producing an antibiotics YL-704 A₁". Este procedimiento indica que un organismo elegido del grupo que consta de Streptomyces eurocidicus NIHJ-267, Streptomyces albireticuli IFO-12737, Streptomyces kitasatoensis NRRL-2486 y Streptomyces sp. MCRI-0737 se cultiva en un medio que contiene "compuesto DHP" 4"-deacilo YL-704 A₁, o compuesto DHP y L leucina, y se separa su cultivo, YL-704 A₁, que tiene un radical isovalerílico en la posición

25 30 4"- del compuesto DHP.

1 Nuestros procedimientos también son diferentes de los
suyos para la obtención de YL-704 A₁, como se describe en
el caso del procedimiento de la espiramicina, con respecto
al organismo empleado, la naturaleza enzimática del procedi-
5 miento, la no especificidad del sustrato o la variedad de
los productos deseados y en que la acilación en las posicio-
nes 3- y 4"- se puede efectuar simultáneamente con un siste-
ma de celula, lo que proporciona sustancial utilidad indus-
trial.

10 No ha habido descripción precedente de la acilación
bioquímica de la tilosina y de la angolamicina, ni de los
nuevos derivados de la tilosina, angolamicina y espiramici-
na que se reivindican en la presente invención.

15 Las posiciones 3- y 4"- de los antibióticos macrólidos
de 16 eslabones de esta especificación indican la posición
3- del anillo de 16 eslabones y la posición 4"- de la mica-
rosa del antibiótico macrólido, respectivamente.

OBJETIVOS DE LA INVENCION

20 De acuerdo con esto, es un objetivo de esta invención
proporcionar un procedimiento nuevo para la obtención de los
derivados acilados de antibióticos macrólidos mediante la
acilación bioquímica de por lo menos una de las posiciones
3- y 4"- de antibióticos macrólidos de 16 eslabones.

25 Otro objetivo de esta invención es proporcionar un pro-
cedimiento para la obtención de un compuesto nuevo, incluyen-
do un derivado nuevo de la tilosina, angolamicina o espira-
micina, que tiene actividad para controlar la infección.

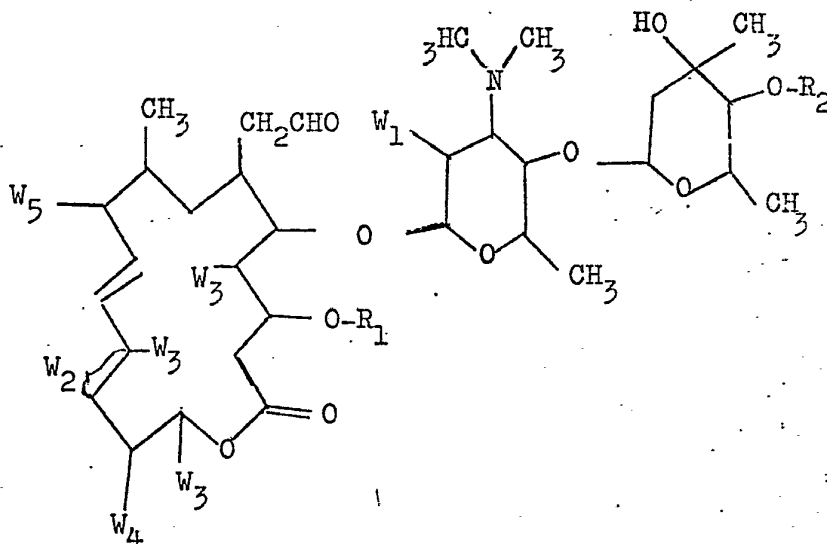
30 Todavía otro objetivo de esta invención es proporcio-
nar una nueva composición farmacéutica, una composición vete-
rinaria, y una composición aditivo de piensos y el método

1 para su utilización

RESUMEN DE LA INVENCION

5 (1) La presente invención proporciona un procedimiento para la obtención de compuestos de antibióticos macrólidos de 16 eslabones que tienen por lo menos un radical acilo en las posiciones 3- y 4"-, que consiste en cultivar el organismo del género Streptomyces que posee la actividad de acilar las posiciones 3-y4"- de antibióticos macrólidos de 16 eslabones de fórmula:

10

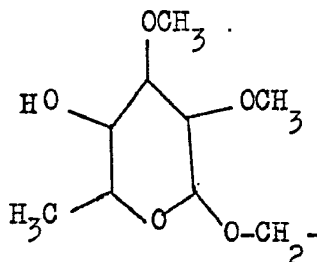


15

20

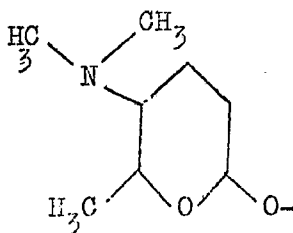
en la que ambos, R₁ y R₂, son hidrógeno o uno de ellos es hidrógeno y el otro es un radical acilo C₂-C₅; W₁ es hidrógeno o hidroxilo; W₂ es un doble enlace o un grupo -O-; W₃ es hidrógeno, metilo, etilo o metoxilo; W₄ es hidrógeno o un radical de fórmula

25



30

1 y W_5 es O= o un radical de fórmula



5 mediante un microorganismo que pertenece al género Streptomyces y que es capaz de acilar por lo menos un radical hidroxilo en la posición 3- y 4" del sustrato de antibiótico macrólido de 16 eslabones en presencia de donadores de acilo C₂-C₅".

10 en un medio utilizado habitualmente para cultivar los organismos de dicho género, realizando la acilación en una combinación de fuentes enzimáticas, por ejemplo, células de cria y de no cria de dicho organismo cultivado o las preparaciones enzimáticas de las mismas, el sustrato antibiótico de antibióticos macrólidos de 16 eslabones que tienen por lo menos un radical hidroxilo en las posiciones 3- y 4"- y el radical acilo donador de compuestos acilo de C₂-C₅, por ejemplo CoAs de acilo y sus precursores metabólicos, y la recuperación de los productos acilados a partir de la mezcla de reacción por medio de métodos habitualmente empleados para la recuperación de antibióticos macrólidos.

15 (2) De este modo se proporciona mediante la presente invención un procedimiento para la obtención de nuevos compuestos acilados de tilosina y angolamicina, es decir, 3-acetiltilosina, 3-acetil-4"-n-butiriltilosina, 3-acetil-4"-isovaleriltilosina, 3-propioniltilosina, 3-propionil-4"-n-butiriltilosina, 3-propionil-4"-isovaleriltilosina, 4"-n-butiriltilosina, 4"-isovaleriltilosina, 3-acetilangolamicina, 3-acetil-4"-n-butirilangolamicina, 3-acetil-4"-isovalerilangolamicina, 3-propionilangolamicina, 3-propionil-4"-n-butirilangolamicina,

25

30

1 golamicina, 3-propionil-4"-isovalerilangolamicina, 4"-n-butirilangolamicina, 4"-isovalerilangolamicina, y las sales de adición ácida de los mismos no tóxicas, aceptables desde el punto de vista farmacéutico que

5 (a) inhiben el crecimiento de microorganismos que incluyen aislantes bacterianos resistentes a los medicamentos, y

10 (b) producen niveles altos en sangre sostenidos mediante administración oral y entérica, y el procedimiento para la obtención de compuestos acilados de espiramicina, es decir, 3-acetilespiramicina I (espiramicina II), 3-propionilespiramicina I (espiramicina III), 3-acetil-4"-n-butirilespiramicina I, 3-acetil-4"-isovalerilespiramicina I, 3-propionil-4"-n-butirilespiramicina I, 3-propionil-4"-isovalerilespiramicina I, 4"-n-butirilespiramicina I, 4"-isovalerilespiramicina I, entre los cuales los últimos 6 compuestos son nuevos, y las sales de los mismos no tóxicas aceptables desde el punto de vista farmacéutico.

15 (3) Otras incorporaciones de la presente invención proporcionan una composición farmacéutica y una composición veterinaria contra la infección debida a microorganismos gram-positivos y una composición de aditivos a los alimentos para administración a hombres y animales que contienen uno de tales compuestos en cantidad suficiente para controlar las enfermedades infecciosas producidas por microorganismos gram-positivos o para estimular el crecimiento de los animales.

20 (4) Todavía otras incorporaciones de la presente invención proporcionan un método para controlar quimioterapéuticamente enfermedades infecciosas debidas a microorganismos gram-positivos en hombres y animales mediante administración de uno de tales compuestos a dichos hombres y animales en dosis

30

1 suficiente para controlar dichas infecciones, y para esti-
mular el crecimiento de los animales.

BREVE DESCRIPCION DE LOS ESQUEMAS

5 Las Figs. 1 y 2 muestran los espectros de absorción
ultravioleta de la 4"-n-butiriltilosina y de la 3-acetil-4"-
isovaleriltilosina, respectivamente.

10 Las Figs. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 muestran los espec-
tros de absorción infrarrojo de 3-acetiltilosina, 3-acetil-
4"-n-butiriltilosina, 3-acetil-4"-isovaleriltilosina, 3-pro-
pioniltilosina, 3-propionil-4"-n-butiriltilosina, 3-propio-
nil-4"-isovaleriltilosina, 4"-n-butiriltilosina y 4"-isova-
leriltilosina, respectivamente.

15 Las Figs. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18 son los es-
pectros de RMN (Cl_3CD) de los compuestos mostrados en las
figuras para los espectros de absorción infrarrojo en aquel
orden respectivamente.

Las Figs 19, 20 y 21 son los espectros de masas de io-
nización química de 3-acetiltilosina, 3-propioniltilosina
y 3-acetil-4"-isovaleriltilosina, respectivamente.

20 Las Figs. 22 y 23 son los espectros de RMN C^{13} de 3-ace-
tiltilosina y 3-acetil-4"-isovaleriltilosina.

Las Figs. 24 y 25 muestran los espectros de absorción
UV de 3-acetilangolamicina y 3-acetil-4"-isovalerilangola-
micina.

25 Las Figs. 26 y 27 muestran los espectros de absorción
IR de 3-acetilangolamicina y 3-acetil-4"-isovalerilangolami-
cina.

Las Figs. 28 y 29 muestran los espectros de RMN de 3-
acetilangolamicina y de 3-acetil-4"-isovalerilangolamicina.

30 La Fig. 30 muestra el espectro de absorción UV de 4"-

1 isovalerilespiramicina II.

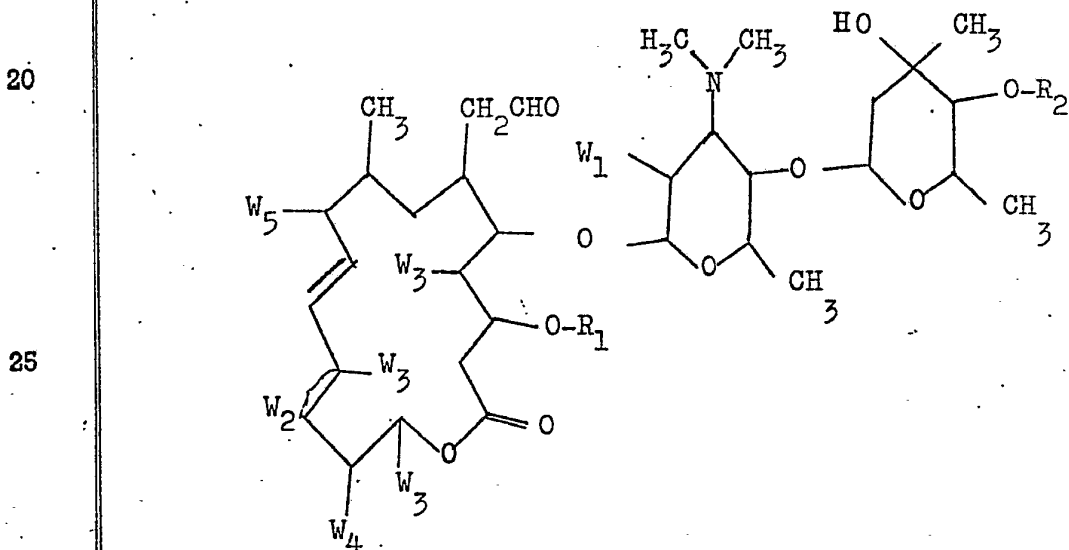
La Fig. 31 muestra el espectro de absorción IR de la 4"-isovalerilespiramicina II.

5 La Fig. 32 muestra el espectro de RMN de la 4"-isovalerilespiramicina II.

La Fig. 33 muestra la cromatografía en capa fina de derivados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones en relación con la presente invención.

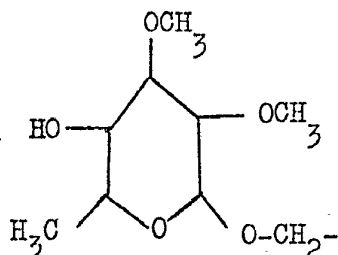
DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

10 Esta invención se refiere a un procedimiento nuevo para la acilación bioquímica de antibióticos macrólidos de 16 eslabones. Mas particularmente, se refiere a un procedimiento para obtener los derivados acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones que tienen por lo menos un radical acilo de números de carbono C_2-C_5 en las posiciones 3- y 4"-
15 que consiste en criar el organismo del género Streptomyces que tiene la actividad de acilar las posiciones 3- y 4"- de antibióticos macrólidos de 16 eslabones de fórmula:

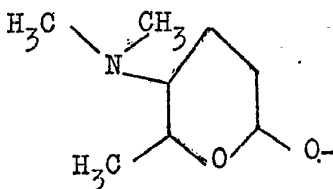


30 en la que ambos, R₁ y R₂, son hidrógeno o uno de ellos es hidrógeno y el otro es un radical acilo C_2-C_5 ; W₁ es hidrógeno

1 o hidroxilo; W_2 es un doble enlace o un grupo -O-; W_3 es hidrógeno, metilo, etilo o metoxilo; W_4 es hidrógeno o un radical de fórmula



y W_5 es O= o un radical de fórmula



15 mediante un microorganismo que pertenece al género Streptomyces y que es capaz de acilar por lo menos un radical hidroxilo en la posición 3- y 4" del sustrato de antibiótico macrólido de 16 eslabones en presencia de donadores de acilo C_2-C_5 " en un medio empleado para criar los organismos de dicho género, la realización de tal reacción de acilación en una mezcla de gérmenes enzimáticos, por ejemplo, células de cria y de no cria de los citados organismos cultivados o las preparaciones enzimáticas de los mismos, el sustrato antibiótico de antibióticos macrólidos de 16 eslabones que ha de ser acilado que tiene por lo menos un radical hidroxilo en las posiciones 3- y 4"-, y los compuestos donadores de radical acilo de acilo C_2-C_5 , por ejemplo CoAs de acilo y sus precursores metabólicos, y la recuperación de los productos acilados a partir de la mezcla de reacción por medio de métodos habitualmente empleados para la recuperación de antibióticos macrólidos.

20

25

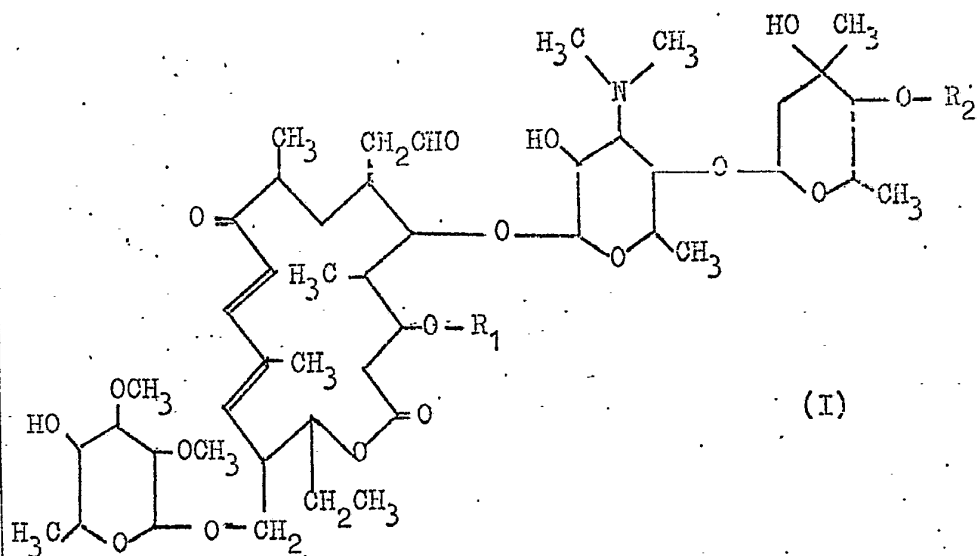
30

1 La invención especialmente se refiere a un procedi-
miento para la obtención de derivados acilados de tilosina,
angolamicina y espiramicina que tienen la fórmula general
I, II y III respectivamente,

5

10

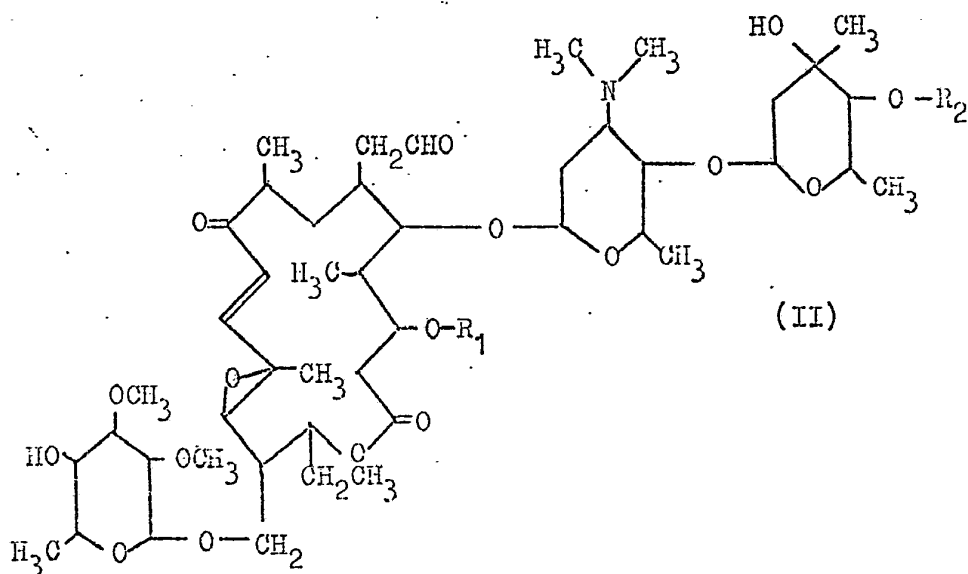
15



20

25

30



1

5

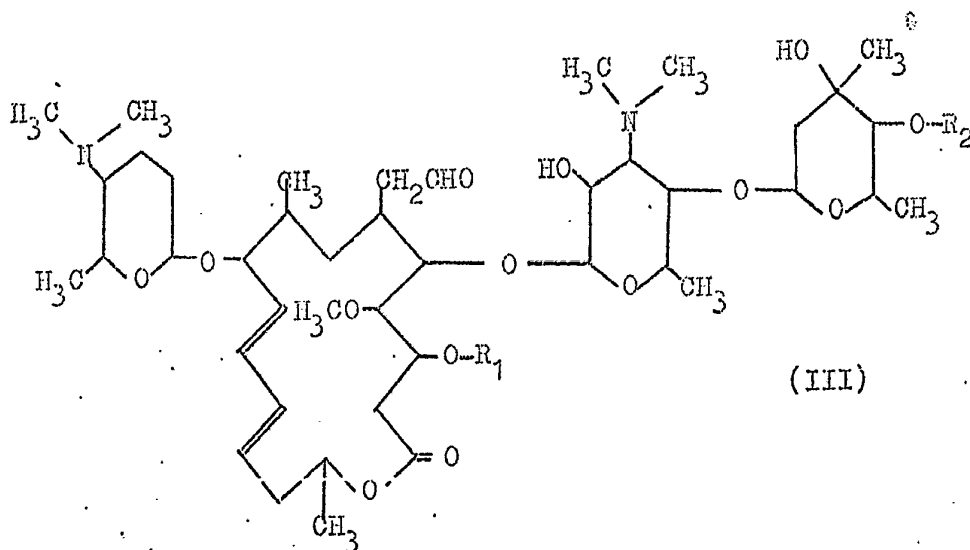
10

15

20

25

30



en las que R_1 es hidrógeno, radical acetilo o radical propionilo y R_2 es hidrógeno, radical n-butilírico o radical isovalerílico, excluyéndose el caso en el que R_1 y R_2 son ambos hidrógeno, las sales de adición ácida de los mismos no tóxicas aceptables desde el punto de vista farmacéutico; y las composiciones farmacéuticas, veterinarias y las composiciones de aditivos de alimentos de los mismos para administración a hombres y animales.

La acilación de antibióticos es uno de los métodos prácticos para obtención de especies y derivados de antibióticos nuevos. Sin embargo, la acilación tiene que producirse de una forma uniforme y por ello requiere otras etapas, por ejemplo, la protección selectiva de restos funcionales, para obtener el producto deseado que se ha de acilar en posiciones particulares. Por otra parte, el procedimiento bioquímico lleva a cabo la acilación selectiva solamente en posiciones predeterminadas debido a la especificidad de las reacciones enzimáticas y el rendimiento normalmente es alto. Los inventores presentes han hecho una investigación completa sobre una de tales reacciones bioquímicas, especial-

1 mente sobre la acilación de antibióticos macrólidos, y han
encontrado que una serie de microorganismos puede acilar
específicamente ambas posiciones 3- y 4"- de antibióticos
de 16 eslabones. El descubrimiento de la existencia de ta-
5 les microorganismos y las reacciones enzimáticas por los in-
vestigadores presentes es nuevo y el primero de su clase.
Estas reacciones se estudiaron posteriormente para estable-
cer la transformación bioquímica industrial de antibióticos
macrólidos y se aplicó en particular a la obtención de de-
10 rivados de tilosina, angolamicina y espiramicina.

Experimento 1

Se prepara un medio de la composición siguiente: 40 g
de harina de soja, 50 g de glucosa, 1 g de extracto de le-
vadura, 0,5 g de $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,5 g de PO_4HK_2 en 1.000 ml
15 de agua (pH 7,0). Se esterilizan a 120°C durante 20 minutos.
100 ml del medio, colocados en un matraz de cultivo para a-
gitación de 500 ml de volumen, al que a continuación se ino-
cula Streptomyces thermotolerans ATCC 11416 y se somete a
cultivo a 37°C en condiciones de agitación. Después de un
20 cultivo de un día, tiempo después del cual se consume apro-
ximadamente la mitad de la glucosa, se añade una disolución
de leucomicina A_1 a la concentración final en el medio de
2 g/l y se lleva a cabo la reacción durante otras 6 horas.
La mezcla de reacción obtenida se clarifica por centrifuga-
25 ción, se ajusta a un pH 8,5 con hidróxido sódico diluido
y se extrae con un volumen igual de acetato de etilo. El
extracto se concentra a aproximadamente un tercio del volu-
men original a presión reducida y una porción se coloca en
forma de gotas sobre una placa de gel de sílice de capa fi-
30 na (Merck Co.®). A continuación se desarrolla mediante una

1 mezcla disolvente de n-hexano: acetona: metanol: benceno: acetato de etilo (30: 10: 8: 25: 20) completamente seca y se sumerge en ácido sulfúrico del 10 % y se calienta. Se detectan dos manchas con valores de Rf de aproximadamente 0,50
5 y 0,65 que se atribuyen a leucomicina A₁ y leucomicina A₃ (3-acetilleucomicina A₁) respectivamente por comparación analítica con muestras auténticas.

Experimento 2

10 Células criadas en el Experimento 1 (justamente antes de la adición de los antibióticos) se recogen por centrifugación, se lavan una vez con disolución tampón de fosfato 0,05 M de un pH de 6,5 y se resuspenden en la misma disolución tampón con mas glucosa en la concentración de 2 g/litro. La concentración de células en la disolución reguladora es
15 aproximadamente de 10 gramos de materia seca/litro. A continuación se añaden leucomicina V y L-leucina en concentración de 0,5 g/litro y 1 g/litro respectivamente, y se lleva a incubación aerobia en condiciones similares a las utilizadas para el cultivo de la célula. Tres horas después se concluye la reacción, y se continua mediante los procedimientos
20 descritos en el Experimento 1. Sobre una placa de cromatografía en capa fina aparecen dos manchas poseyendo cada una un valor de Rf de aproximadamente 0,3 y 0,65 que se identifican como el sustrato, leucomicina V, y el producto, leucomicina A₃ (3-acetil-4"-isovalerilleucomicina V).
25

Experimento 3

Células obtenidas y lavadas según el Experimento 2 se suspenden en una pequeña cantidad de dicha disolución reguladora de fosfato y se homogeniza mediante el uso de una
30 prensa francesa, a partir de lo cual se obtiene un líquido

1 sobrenadante por centrifugación a 3000 X G durante 10 minu-
tos. A una disolución diluida del líquido sobrenadante se
añaden leucomicina U y Coenzima A de isovalerilo (mas ade-
lante Coenzima A se abrevia a CoA) ambas en concentraciones
5 de 0,2 g/litro, y se lleva a cabo la reacción como en el
Experimento 2. La obtención de leucomicina A₃ (4"-isovaleril-
leucomicina U) se confirma mediante un cromatograma en capa
fina.

Experimento 4

10 Porciones de 20 ml de la disolución diluida del lí-
quido sobrenadante homogeneizado de células obtenida como
en el Experimento 3 se colocan en cada uno de 27 matraces
Erlenmeyer de 500 ml de volumen, estando numerados los ma-
traces del 1 al 27. A los matraces se añaden tres clases
15 de antibióticos, cada uno de ellos en cantidad de 20 mg:
tilosina que se añade a los matraces 1-9, angolamicina a
los matraces 10-18 y espiramicina I a los matraces 19-27.
También se añade CoAs de acilo en cantidad de 20 mg para ca-
da especie; La CoA de acetilo se añade a los matraces 2, 11
20 y 20, la CoA de propionilo a los matraces 3, 12 y 21, la
CoA de n-butirilo a los matraces 4, 13 y 22, la CoA de iso-
valerilo a los matraces 5, 14 y 23, CoA de acetilo y CoA de
n-butirilo a los matraces 6, 15, y 24, CoA de acetilo
y CoA de isovalerilo a los matraces 7, 16 y 25, CoA de pro-
25 pionilo y CoA de n-butirilo a los matraces 8, 17 y 26, y
CoA de propionilo y CoA de isovalerilo a los matraces 9, 18
y 27. No se añade CoA de acilo a los matraces 1, 10 y 19.

30 Se lleva a cabo la incubación durante 3 horas a 37°C
en condiciones de agitación suaves después de lo cual la di-
solución que ha reaccionado se hace débilmente alcalina y

1 se extrae cada una con 30 ml de acetato de etilo. Los ex-
tractos se concentran a aproximadamente 2 ml a presión redu-
cida, y los concentrados se colocan sobre placas de capa fi-
na, y se continua el desarrollo como en el Experimento 1.

5 Después del desarrollo, las placas secas se iluminan con
una lámpara de UV, enfocando la mancha del producto princi-
pal sobre la placa. Los productos principales se disuelven
en acetona; evaporando la acetona y quedando por lo tanto
el producto principal, los materiales del cual se disuelven
10 todos en agua débilmente ácida. Después de hacerlas débil-
mente alcalinas, las disoluciones se extraen con benceno,
y los extractos se concentran a sequedad para obtener de
7 a 10 mg de producto principal a partir de cada matraz,
aproximadamente 50 mg de polvo de cada producto se obtienen
15 empleando varios matraces para cada reacción, la identifica-
ción de los cuales se consigue por medio de varios análisis
tales como espectros UV, espectros IR, espectros de RMN,
puntos de fusión, poder rotatorio, liberación del ácido or-
gánico por cromatografía de gases y valor del Rf por cromatografía
20 en capa fina que se indica en la figura 33 en la
que los números 1 a 27 son respectivamente las manchas de
los que aparecen entre paréntesis en la Tabla 1. Los resul-
tados se resumen en la Tabla 1, que muestra la relación en-
tre los antibióticos del substrato, la CoA de acilo y los
25 productos principales.

La reacción de acilación de antibióticos macrólidos
de acuerdo con la presente invención requiere la presencia
de y el contacto con tres componentes básicos, que son, una
preparación activa de enzimas para dicha acilación en forma
30 de células o preparación de enzimas, los antibióticos macró-

Tabla 1

Matraz Nº	Substrato	CoA de acilo	Producto principal
1	Tilosina	Ninguna	Tilosina (1)
5	"	CoA de acetilo	3-acetiltilosina(4)
3	"	CoA de propionilo	3-propioniltilosi- na (7)
4	"	CoA de n-butirilo	4"-n-butiriltilo- sina (2)
5	"	CoA de isovalerilo	4"-isovaleriltilo- sina (3)
10	"	CoA de acetilo + CoA de n-butirilo	3-acetil-4"-n-bu- tiriltilosina (5)
7	"	CoA de acetilo + CoA de isovalerilo	3-acetil-4"-isova- leriltilosina (6)
8	"	CoA de propionilo + CoA de n-butirilo	3-propionil-4"-n- butiriltilosina (8)
15	"	CoA de propionilo + CoA de isovalerilo	3-propionil-4"-iso- valeriltilosina (9)
10	Angolamicina	Ninguna	Angolamicina (10)
11	"	CoA de acetilo	3-acetilangolami- cina (13)
12	"	CoA de propionilo	3-propionilangola- micina (16)
20	"	CoA de n-butirilo	4"-n-butirilangola- micina (11)
14	"	CoA de isovalerilo	4"-isovalerilango- lamicina (12)
15	"	CoA de acetilo + CoA de n-butirilo	3-acetil-4"-n-buti- rilangolamicina(14)
25	"	CoA de acetilo + CoA de isovalerilo	3-acetil-4"-isovale- rilangolamicina(15)
17	"	CoA de propionilo + CoA de n-butirilo	3-propionil-4"-n-bu- tirilangolamici- na (17)
18	"	CoA de propionilo + CoA de isovalerilo	3-propionil-4"-iso- valerilangolami- cina (18)
30			

1	19	Espiramicina I Ninguna	Espiramicina I (19)
	20	" CoA de acetilo	3-acetilespiramicina I (espiramicina II) (22)
5	21	" CoA de propionilo	3-propionilespiramicina I (espiramicina III) (25)
	22	" CoA de n-butirilo	4"-n-butirilespiramicina I (20)
	23	" CoA de isovalerilo	4"-isovalerilespiramicina I (21)
10	24	" CoA de acetilo + CoA de n-butirilo	3-acetil-4"-n-butirilespiramicina I (4"-n-butirilespiramicina II) (23)
	25	" CoA de acetilo + CoA de isovalerilo	3-acetil-4"-isovalerilespiramicina I (4"-isovalerilespiramicina II) (24)
15	26	" CoA de propionilo + CoA de n-butirilo	3-propionil-4"-n-butirilespiramicina I (4"-n-butirilespiramicina III) (26)
	27	" CoA de propionilo + CoA de isovalerilo	3-propionil-4"-isovalerilespiramicina I (4"-isovalerilespiramicina III) (27)

20 lidos de 16 eslabones como substrato, por ejemplo, tilosina, angolamicina o espiramicina y un donador de acilo. La siguiente descripción expresa en detalle la ejecución de la presente invención.

25 Los organismos que poseen la citada actividad acilante se seleccionan de depósitos de cultivo de cepas y también a partir de aislados sin cultivar ensayando los citados organismos acerca de la actividad acilante. Los organismos que poseen elevada actividad acilante y preferiblemente empleables en esta invención pertenecen al género Streptomyces y las cepas como ejemplo entre los cultivos depositados

30

1 son:

Streptomyces thermotolerans ATCC 11416

Streptomyces fungicidicus subsp. espinomiceticus ATCC
21574

Streptomyces hygroscopicus ATCC 21582

5

Streptomyces mycarofaciens ATCC 21454

10

Los variantes y los mutantes obtenidos natural o artificialmente a partir de dichos organismos que poseen la citada actividad también se utilizan en la presente invención. Por ejemplo, mutantes que poseen actividad acilante mejorada se pueden obtener mediante técnicas habitualmente utilizadas para mutación y selección microbiana.

15

En la presente invención estos organismos se cultivan empleando el procedimiento general utilizado para el cultivo de cepas del género Streptomyces pero se deben emplear condiciones adecuadas a fin de obtener amplia potencia de acilación de la citada actividad enzimática. El medio de cultivo preferiblemente contiene fuentes carbonadas tales como glucosa, maltosa, sacarosa, almidón o jarabe de malta, alcoholes tales como etanol y glicerina, aceites, grasas y ceras, de origen vegetal o animal, ácidos orgánicos tales como ácido acético y ácido cítrico y las sales de éstos, pero otros compuestos asimilables que sirven como tal fuente carbonada también se pueden emplear. Estos compuestos se

25

utilizan solos o en mezclas de dos o mas a concentraciones de 0,5-10 g/dl generalmente y de 2-6 g/dl preferiblemente, dependiendo de la clase de compuesto empleado. Las fuentes

30

de nitrógeno preferiblemente empleadas son compuestos orgánicos ricos en proteínas de origen animal, vegetal o microbiano tales como la caseína, peptona, productos harinosos,

1 obtenidos a partir de semilla de soja, maiz, semilla de al-
godón y las preparaciones a partir de fermentos y bacterias,
y varios compuestos inorgánicos utilizados habitualmente
como fuentes de nitrógeno tales como las sales de amonio.
5 También se pueden emplear otros compuestos ricos en nitróge-
no que se pueden asimilar por el organismo. Estas fuentes
de nitrógeno se utilizan aisladamente o en mezclas de dos
o mas en el medio a concentraciones de 0,1-10 g/dl. Con ma-
teriales orgánicos la concentración preferida es de 1-5 g/dl,
10 y con compuestos inorgánicos, ésta se establece mas baja.
El medio también contiene sales inorgánicas, tales como fos-
fatos, sales de magnesio, sales minerales y materiales esti-
muladores del crecimiento tales como extracto de fermentos,
extrato de carne y vitaminas o materiales ricos en vitami-
15 nas. Se utilizan en concentraciones de 0,01-0,5 g/dl, depen-
diendo de la clase de organismo y de la composición del me-
dio empleadas. El cultivo de los organismos se lleva a cabo
aeróbicamente por medio de aireación y agitación. El pH del
medio se mantiene en el intervalo de 4,5-9,0, preferiblemen-
20 te de 6,0-8,0.

La temperatura de cultivo se mantiene a 20-45°C, sien-
do la temperatura preferida la de 20-35°C con cepas de Strept-
omyces en general y en especial de 30-40°C con Streptomyces
thermotolerans. La actividad acilante de antibióticos macró-
25 lidos de 16 eslabones por los organismos de acuerdo con la
presente invención se produce en la primera fase de creci-
miento y se conserva después de cesar el crecimiento. Se en-
cuentra actividad específica especialmente elevada para la
acilación del radical 3-hidroxilo en células procedentes de
30 la primera a la última fase de crecimiento y para la acila-

1 ción del radical 4"-hidroxilo se encuentra desde la última
fase de crecimiento hasta el estado de poscrecimiento.

5 Como se muestra en los experimentos 1-4, la reacción
de acilación se puede llevar a cabo con células en condicio-
nes de crecimiento asociado o en reposo, ya en el medio de
cultivo o después de la separación del medio, o con distin-
tas formas de preparaciones enzimáticas, por ejemplo, célu-
las secas, homogeneizado de células, y disolución sobresa-
dante obtenida a partir del homogeneizado y de las prepara-
10 ciones de enzimas. También se pueden emplear preparaciones
enzimáticas inmovilizadas tales como las fijadas en políme-
ros de amidas acrílicos. Como resultado de los estudios so-
bre la naturaleza de la acilación citada se ha revelado que
se incluyen independientemente dos sistemas de enzimas en
15 tal reacción de acilación. Estos son la transferasa de 3-a-
cil de macrólidos y la transferasa de 4"-acil de macrólidos,
como se denominan por los inventores presentes, que trans-
fieren los radicales acilo a los radicales 3- y 4"-hidroxi-
lo, respectivamente de antibióticos macrólidos de 16 eslabo-
20 nes. Estos sistemas de enzimas catalizan la citada transfe-
rencia de forma no específica respecto de la clase de radi-
cal acilo; sin embargo, tienen preferencias respectivas por
cada radical acilo de modo que la transferasa de 3-acilo de
macrólidos transfiere preferiblemente el radical acetilo,
25 el radical propionilo y el radical n-butirilo, en este or-
den, mientras que la transferasa de 4"-acilo de macrólidos
prefiere el radical isovalerilo, el radical n-butirilo y el
radical propionilo en este orden.

30 El donador de acilo utilizado en la reacción de acila-
ción de esta invención incluye la CoA de acilo, que sirve

1 como un donador directo del radical acilo que se incorpora,
y los compuestos precursores de tal CoA de acilo a partir
de los cuales se obtiene la CoA de acilo respectiva en la
5 preferiblemente utilizadas son CoA de acetilo, CoA de pro-
pionilo, CoA de n-butirilo y CoA de isovalerilo, y sus com-
puestos precursores son ácidos orgánicos tales como ácido
acético, ácido propiónico, ácido n-butírico y ácido isovale-
rílico, y las sales de éstos tales como las potásicas, sodi-
10 cas y amónicas, etc, sus ésteres tales como los de metanol,
etanol, etc y las amidas de los mismos. También se incluyen
aminoácidos tales como ácido α -aminobutírico, norvalina,
L-leucina, y cetoácidos tales como ácido α -cetobutírico y
ácido α -cetovalerílico.

15 En general, las CoAs de acilo se añaden al medio de
reacción cuando la reacción se realiza con un sistema enzi-
mático que tiene una capacidad pobre para generar la CoA
de acilo respectiva a partir de CoA y los precursores de
acilo. Sin embargo, los compuestos precursores de acilo se
20 utilizan cuando el sistema para regenerar la CoA de acilo
que interesa está trabajando a pleno rendimiento, por ejem-
plo, en condiciones de crecimiento celular y similares. La
cantidad de donador de acilo añadido al medio de reacción
normalmente es equivalente o próximo a la relación molar
25 del sustrato antibiótico en el caso de CoA de acilo, y en
una relación molar superior, por ejemplo, relación molar de
3-10, en el caso de compuestos precursores. Células vivas
pueden producir CoA de acetilo a partir de fuentes carbona-
das a través de su ciclo metabólico, de aquí que, si hay
30 suficiente cantidad de fuente carbonada en la reacción que

1 emplea células vivas ya en el caldo de cultivo o en forma
de suspensión de células, la acetilación, normalmente, pro-
cede mediante el uso de CoA de acetilo formada endógenamen-
te. Asimismo, en tal sistema de reacción la CoA de propioni-
5 lo y otras CoAs se obtienen en una cantidad mucho mas peque-
ña que la CoA de acetilo, siendo observada también en la
mezcla de reacción una pequeña cantidad de tales productos
acilados. En el caso en el que se empleen en la reacción
CoAs de acilo, una vez completa la reacción, se puede recu-
10 perar la CoA a partir del medio de reacción por métodos ha-
bitualmente utilizados para separar CoA y se puede volver
a utilizar en la síntesis de CoA de acilo.

Los antibióticos substratos para la citada acilación
se añaden a la mezcla de reacción en formas tales como en
15 una disolución en agua, en fluidos acuosos débilmente áci-
dos, en disolventes que ejercen poco efecto desfavorable so-
bre la reacción, por ejemplo, metanol y etanol o en forma
de mezclas de disolventes acuosos, suspensiones, papilla o
polvos finos. La concentración de compuestos antibióticos
20 utilizados en la mezcla de reacción es de 0,1-50 g/litro,
y preferiblemente de 0,5-30 g/litro. Los antibióticos que
se pueden emplear en esta invención son los que tienen es-
tructura de macrólidos de 16 eslabones y dos compuestos azú-
cares unidos en la posición 5- del anillo de macrólido, por
25 ejemplo, leucomicinas, maridomicinas, espiramicinas, angola-
micina, tilosina, carbomicina A y carbomicina B, en los que
por lo menos un radical en las posiciones 3- y 4"- es hidro-
xilo natural o hidroxilo producido por métodos químicos o
bioquímicos.

30 Las condiciones químicas y físicas de la reacción de

1 acilación citada son prácticamente idénticas a las condicio-
nes favorables para el cultivo de células de cada organismo
incluidas en las reacciones enzimáticas a propósito para ta-
les células particulares. La temperatura de reacción es de
5 25-43°C, preferiblemente de 28-40°C, y el pH se mantiene
en el intervalo de 5,0-8,5, preferiblemente de 5,5-8,0 pa-
ra la acilación en la citada posición 3- y de 6,5-8,5 para
la acilación en la citada posición 4"-. El uso de una diso-
lución reguladora adecuada es aconsejable para el manteni-
10 miento del valor del pH deseado en el caso de reacciones
de los tipos de no crecimiento de células. Las disoluciones
reguladoras habitualmente empleadas para reacciones enzimá-
ticas generales, tales como disolución reguladora de fosfa-
tos, disolución reguladora de citrato, etc, se pueden emplear;
15 sin embargo, el uso de disolución reguladora de acetato o
las que contienen un radical acetilo en su composición se
deben limitar solamente a las reacciones de acetilación.
El periodo de reacción normalmente es desde 30 minutos a
20 10 horas.

20 Las siguientes descripciones ilustran mas algunos pro-
cedimientos de la citada acilación que se comportan favora-
blemente para obtener como ejemplos, los derivados de la ti-
losina de la presente invención.

(1) 4"-n-butiriltilosina.

25 Los organismos anteriormente mencionados se cultivan
en un medio que contiene concentraciones restringidas de
fuentes de carbono y de nitrógeno y cuando las fuentes de
carbono están casi completamente agotadas, se añade tilosi-
na al caldo en una cantidad que exceda la capacidad de acti-
30 vidad de acilación de la posición 3- en las células juntamen-

1 te con CoA de n-butirilo o sus precursores.

La reacción se lleva a cabo prácticamente en las mismas condiciones que en el cultivo de células. Una parte del substrato añadido se acetila para formar 3-acetiltilosina, mientras la otra parte permanece sin acetilar. Mientras tanto tiene lugar la butirilación concurrente del radical 4"-hidroxilo que da lugar a la formación de 4"-n-butiriltilosina y una pequeña cantidad de 3-acetil-4"-n-butiriltilosina, de la cual se separa el primer producto.

5
10 (2) 4"-isovaleriltilosina.

En una acilación realizada de modo similar a (1), el uso de CoA de isovalerilo o de sus precursores como donadores de acilo ocasiona la formación de 4"-isovaleriltilosina en el fluido de reacción.

15 (3) 3-acetiltilosina

Para la obtención de 3-acetiltilosina, el organismo, por ejemplo, Streptomyces thermotolerans ATCC 11416, se cultiva en un medio que contiene una cantidad mas que suficiente de fuentes de carbono y de nitrógeno. Cuando se alcanza el máximo crecimiento y todavía quedan en cantidades sustanciales las fuentes de carbono, se añade tilosina al medio en una cantidad limitada que no exceda la capacidad de la actividad de acetilación de las células. Manteniendo agitación y aireación vigorosa desde el principio hasta el fin de la reacción acompañada por el crecimiento de las células, la acetilación tiene lugar por el uso de la CoA de acetilo reproducida en las células, produciendo 3-acetiltilosina.

20
25 (4) 3-acetil-4"-n-butiriltilosina.

(i) Los organismos antedichos se cultivan en un medio que contiene una cantidad mas bien restringida de fuente de
30

1 carbono y una cantidad equilibrada de fuente de nitrógeno
hasta que la concentración de fuentes de carbono disminuye
al nivel mínimo, en cuyo momento se añade tilosina o 3-ace-
ttiltilosina en cantidad que no exceda la capacidad de acila-
5 ción de las células juntamente con CoA de n-butilirilo o sus
compuestos precursores tales como un donador de radical n-
butirilo. Se lleva a cabo la reacción hasta que el substrato
de antibiótico se acila completamente, y se separa el
producto acilado, la 3-acetil-4"-n-butiriltilosina.

10 ii) Utilizando 4"-butiriltilosina como substrato, se
lleva a cabo la reacción prácticamente de la misma manera
que en (3) para la obtención de 3-acetiltilosina que rinde
acetilación en el radical 3-hidroxilo, es decir, la 3-ace-
til-4"-n-butiriltilosina.

15 (5) 3-acetil-4"-isovaleriltilosina

Para la obtención de 3-acetil-4"-isovaleriltilosina
se pueden emplear prácticamente los mismos métodos que en
(4) i) e ii) en los cuales se utilizan la CoA de isovaleri-
lo o sus compuestos precursores como donador de acilo en i)
20 y se utiliza 4"-isovaleriltilosina como substrato en ii).

(6) 3-propioniltilosina

25 Para la obtención de 3-propioniltilosina, los organis-
mos anteriormente mencionados se cultivan en un medio que
contiene una cantidad restringida de fuente de carbono y u-
na cantidad mas que suficiente de fuente de nitrógeno. Cuan-
do las fuentes de carbono están ya casi completamente agota-
das se añade la tilosina del substrato al caldo cultivado en
cantidad que no exceda la capacidad de propionilación de las
células, juntamente con donadores propionilantes, es decir,
30 CoA de propionilo o sus precursores. La reacción se lleva a

1 cabo hasta completa propionilación.

(7) 3-propionil-4"-n-butiriltilosina.

5 La 3-propionil-4"-n-butiriltilosina se puede obtener en dos etapas. Primero se obtiene la 3-propioniltilosina a partir de tilosina por el método de (6).

10 Cuando la primera reacción casi se ha completado se añaden al medio un donador de n-butirilo, es decir, CoA de n-butirilo o su precursor, y una pequeña cantidad de fuente de carbono, si es necesario, y se lleva a cabo la reacción aerobia. De este modo se obtiene 3-propionil-4"-n-butirilti-

15 losina. Es innecesario decir, que también se puede obtener en una sola etapa añadiendo 3-propioniltilosina, como sustrato, a la mezcla de células cultivadas, junto con los citados donadores de acilo.

(8) 3-propionil-4"-isovaleriltilosina.

20 De un modo similar al de (7) el uso de un donador de isovalerilo, es decir, CoA de isovalerilo, o su compuesto precursor, en lugar de un donador de n-butirilo, permite la obtención de 3-propionil-4"-isovaleriltilosina.

25 Los compuestos acilados obtenidos a partir de antibióticos macrólidos de 16 eslabones, de acuerdo con esta invención, se pueden aislar, purificar y formular aplicando los métodos generalmente empleados en la obtención de cada uno de los antibióticos macrólidos de 16 eslabones.

30 Para la separación de derivados de tilosina, la mezcla de reacción, después de débil acidificación si es necesario, se separa de las células y otras partículas insolubles por métodos tales como filtración y centrifugación. A continuación la disolución clarificada se ajusta a un pH neutro o

1 débilmente alcalina y se extrae con disolventes inmiscibles
en el agua, por ejemplo, acetato de etilo, tolueno y bence-
no, que se utilizan habitualmente para la extracción de an-
tibióticos macrólidos. Para la ulterior eliminación de impu-
5 rezas procedentes de la mezcla de reacción, el extracto se
mezcla con agua acidificada o disolución reguladora para
transferir los derivados de tilosina a una fase acuosa, en
la cual se repite la extracción anterior.

10 Una serie de derivados de tilosina presentes en el
extracto se separan por varios métodos de diferenciación
de antibióticos macrólidos. En el caso de que sus coeficien-
tes de partición entre agua y disolventes orgánicos difieran
claramente, se emplean métodos tales como extracción en con-
tracorriente y extracción separativa. Por otra parte, si los
15 coeficientes son marginales, se aplican métodos cromatográ-
ficos que utilizan gel de sílice, resinas de cambio iónico,
etc. eligiéndolos de acuerdo con el tipo de especies deri-
vadas contenidas en el extracto.

20 Los citados derivados de tilosina se obtienen en for-
ma sólida mediante la concentración ordinaria de tal diso-
lución de antibiótico hasta sequedad o mediante cristaliza-
ción. Para cristalizar los derivados citados en una forma
altamente pura, la preparación impura se disuelve en disol-
25 ventos orgánicos tales como acetona y metanol, y a continua-
ción la disolución se añade gradientemente a un líquido tal
como agua y n-hexano en el que el derivado es difícilmente
soluble. La cristalización también es posible utilizando
disolventes tales como éter etílico y una mezcla de éter
30 etílico y éter de isopropionilo que presenta baja solubili-
dad de los derivados citados.

1 Los derivados de angolamicina, espiramicina y otros
antibióticos obtenidos de modo similar también se separan
y purifican mediante el uso de métodos similares a los uti-
lizados para los derivados de la tilosina. Para la cristali-
5 zación de los derivados, también se pueden emplear los di-
solventes tales como tolueno, benceno y acetato de etilo.

Ocho derivados de tilosina desarrollados mediante es-
ta invención, es decir, 3-acetiltilosina, 3-acetil-4"-n-bu-
tiriltilosina, 3-acetil-4"-isovaleriltilosina, 3-propionil-
10 tilosina, 3-propionil-4"-n-butiriltilosina, 3-propionil-4"-
isovaleriltilosina, 4"-n-butiriltilosina y 4"-isovaleriltilo-
sina se demuestra que son compuestos nuevos como resulta-
do de los estudios sobre sus propiedades fisicoquímicas,
estructuras químicas, etc. El análisis y las determinaciones
15 fisicoquímicas incluyen análisis elemental, punto de fusión,
poder rotatorio específico, espectro ultravioleta, espec-
tro infrarrojo, resonancia magnético nuclear (RMN), RMN de
 C^{13} , espectro de masas (ionización química), liberación de
los ácidos orgánicos en condiciones alcalinas (detección
20 por cromatografía de gases), solubilidad en disolventes,
reacción de desarrollo de color, basicidad de compuestos,
aspecto y forma cristalina. El peso molecular se obtiene co-
mo QM^+ (ion cuasi molecular) por análisis mediante espectros
de masas ionizado químicamente. Los resultados se muestran
25 en la Tabla 2 y en las figuras 1-23.

Los espectros ultravioleta muestran poca diferencia
entre los ocho compuestos como se muestra en el ejemplo de
4"-n-butiriltilosina (Fig. 1) y 3-acetil-4"-isovaleriltilo-
sina (Fig. 2). Los picos de absorción máxima están entre
30 182-285 nm, lo mismo que la tilosina, lo que indica que no

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de derivados de la tilosina

Compuestos	3-acetiltilosina	3-acetil-4"-n-butiriltilosina	3-acetil-4"-iso-valeriltilosina	3-propionil-tilosina
Análisis				
(1) Aspecto	Polvos cristalinios blancos			
(2) Análisis elemental (valor calculado) (%)	C: 60,25(60,17) H: 8,27(8,31) O: 29,98(30,06) N: 1,50(1,46)	C: 60,70(60,75) H: 8,39(8,33) O: 29,51(29,56) N: 1,40(1,36)	C: 61,05(61,08) H: 8,33(8,41) O: 29,23(29,17) N: 1,39(1,34)	C: 60,45(60,54) H: 8,46(8,40) O: 29,59(29,62) N: 1,50(1,44)
(3) Peso molecular por espectroscopía de masas	958	1028	1042	972
(4) Punto de fusión	214-219°C	177-181°C	180-184°C	187-192°C
(5) Poder rotatorio específico [α]_D²⁴ Disolución de metanol (1%)	-33,9	-31,1	-34,3	-31,2
(6) Espectro de absorción ultravioleta 1% EtOH E1cm	λ _{máx.} 282 nm 235	λ _{máx.} 282 nm 240	λ _{máx.} 282 nm 222 Figura 1	λ _{máx.} 282 nm 236
(7) Espectros de absorción infrarrojo (pastilla de KBr) (cm⁻¹)	3440, 2950, 2920, 2865, 2835, 2790, 1733, 1716, 1667, 1620, 1588, 1443, 1403, 1360, 1265, 1262, 1198, 1123, 1075, 1043, 1010, 987, 953, 925, 893, 838	3500, 3440, 2980, 2940, 2890, 2860, 2500, 2730, 1750, 1675, 1631, 1557, 1456, 1382, 1375, 1360, 1320, 1305, 1260, 1244, 1174, 1089, 1057, 1020, 984, 968, 925, 902, 849	3510, 3440, 2980, 2940, 2815, 2845, 2800, 2750, 1741, 1676, 1612, 1558, 1457, 1418, 1377, 1320, 1313, 1277, 1242, 1142, 1147, 1122, 1040, 1057, 1030, 1010, 982, 921, 842	3460, 2980, 2945, 2880, 2850, 2800, 2730, 1744, 1724, 1680, 1633, 1601, 1459, 1417, 1383, 1374, 1366, 1345, 1327, 1319, 1301, 1281, 1259, 1168, 1145, 1133, 1120, 1087, 1067, 1052

1

5

10

15

20

25

30

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de derivados de la tilosina

Compuestos Análisis	β-acetiltilosina	3-acetil-4"-n-butiriltilosina	3-acetil-4"-iso-valeriltilosina
(1) Aspecto	Polvos cristalinos blancos		
(2) Análisis elemental (valor calculado) (%)	C: 60,25(60,17) H: 8,27(8,31) O: 29,98(30,06) N: 1,50(1,46)	C: 60,70(60,75) H: 8,39(8,33) O: 29,51(29,56) N: 1,40(1,36)	C: 61,05(61,08) H: 8,33(8,41) O: 29,23(29,17) N: 1,39(1,34)
(3) Peso molecular por espectroscopía de masas	958	1028	1042
(4) Punto de fusión	214-219°C	177-181°C	180-184°C
(5) Poder rotatorio específico $[\alpha]_D^{24}$ Disolución de metanol (1%)	-33,9	-31,1	-34,3
(6) Espectro de absorción ultravioleta $E_{1\%}^{1\text{cm}}$	MeOH $\lambda_{\text{máx}}$ 282 nm 235	EtOH $\lambda_{\text{máx}}$ 282 nm 240	EtOH $\lambda_{\text{máx}}$ 282 nm 222 Figura 2
(7) Espectros de absorción infrarrojo (pastilla de BrK) (cm^{-1})	3440, 2960, 2920 2865, 2835, 2790 2710, 1733, 1716 1667, 1620, 1588 1443, 1403, 1360 1295, 1265, 1235 1159, 1138, 1123 1078, 1043, 1010 987, 953, 925, 893, 838	3500, 3440, 2980 2940, 2890, 2860 2800, 2730, 1750 1675, 1631, 1597 1456, 1382, 1376 1360, 1320, 1305 1280, 1260, 1244 1174, 1089, 1057 1020, 984, 968, 925, 902, 849	3510, 3440, 2980 2940, 2885, 2840 2800, 2720, 1740 1676, 1632, 1598 1457, 1418, 1370 1320, 1303, 1270 1242, 1172, 1140 1122, 1088, 1050 1030, 1000, 982 921, 900, 842

amínicas de derivados de la tilosina

3-acetil-4"-n-butiriltilosina	3-acetil-4"-iso-valeriltilosina	3-propioniltilosina
alinos blancos		
C: 60,70(60,75) H: 8,39(8,33) O: 29,51(29,56) N: 1,40(1,36)	C: 61,05(61,08) H: 8,33(8,41) O: 29,23(29,17) N: 1,39(1,34)	C: 60,45(60,54) H: 8,46(8,40) O: 29,59(29,62) N: 1,50(1,44)
1028	1042	972
177-181°C	180-184°C	187-192°C
-31,1	-34,3	-31,2
$\lambda_{\text{EtOH máx}}$ 282 nm 240	$\lambda_{\text{EtOH máx}}$ 282 nm 222 Figura 2	$\lambda_{\text{EtOH máx}}$ 282 nm 236
3500, 3440, 2980 2940, 2890, 2860 2800, 2730, 1750 1675, 1631, 1597 1456, 1382, 1376 1360, 1320, 1305 1280, 1260, 1244 1174, 1089, 1057 1020, 984, 968, 925, 902, 849	3510, 3440, 2980 2940, 2885, 2845 2800, 2720, 1741 1676, 1632, 1598 1457, 1418, 1377 1320, 1303, 1277 1242, 1172, 1147 1122, 1088, 1057 1030, 1000, 982 921, 900, 842	3460, 2980, 2945 2880, 2850, 2800 2730, 1744, 1724 1680, 1633, 1601 1459, 1417, 1383 1374, 1360, 1345 1327, 1319, 1301 1281, 1259, 1168 1145, 1133, 1120 1087, 1067, 1053

	Fig. 3	Fig. 4	Fig. 5	Fig. 6	1018, 598, 598 580, 560, 534 501, 543, 610 784
(8) R ₂ N (Cl ₃ OD) 60 MHz	Fig. 11	Fig. 12	Fig. 13	Fig. 14	
(9) Ácidos orgá- nicos detec- tados por cromatogra- fía de gases	ácido acético	ácido acético y ácido n-butírico	ácido acético y ácido isovalérico	ácido propiónico	
(10) Solubilidad	Solubles en alcoholes inferiores, por ejemplo, etanol; acetona, por ejemplo, acetona; éteres, por ejemplo, éter etílico; ésteres, por ejemplo, acetato de etilo; benceno y tolueno; Difícilmente solubles en n-hexano y éter de petróleo; Solubles en agua ácida; Difícilmente solubles en agua neutra; Difícilmente solubles en agua alcalina.				
(11) Reacción de desarrollo de color	Molisch (+); ácido sulfúrico concentrado (+); Minihárina (-); Millon (-) Sakaguchi (-); Biuret (-)				
(12) Alcalinidad	Compuestos alcalinos				
(13) Disolvente utilizado para la cristaliza- ción	Tolueno	Eter etílico	Eter etílico	Eter etílico	

1

5

10

15

20

25

30

1

5

10

15

20

25

30

	Fig. 3	Fig. 4	Fig. 5
(8) RMN (Cl_3CD) 60 MHz	Fig. 11	Fig. 12	Fig. 13
(9) Ácidos orgánicos detectados por cromatografía de gases	ácido acético	ácido acético y ácido n-butírico	ácido acético y ácido isovalérico
(10) Solubilidad	Solubles en alcoholes inferiores, por ejemplo, etanol, acetona; éteres, por ejemplo, éter etílico, acetato de etilo; benceno y tolueno; Difícilmente solubles en n-hexano y éter de petróleo Solubles en agua ácida; Débilmente solubles en agua neutra; Difícilmente solubles en agua alcalina.		
(11) Reacción de desarrollo de color	Molisch (+); ácido sulfúrico concentrado (+); Ninhidrina (-); Sakaguchi (-); Biuret (-)		
(12) Alcalinidad	Compuestos alcalinos		
(13) Disolvente utilizado para la cristalización	Tolueno	Eter etílico	Eter etílico

1018, 998, 988
 980, 960, 934
 901, 843, 810
 784

Fig. 4	Fig. 5	Fig. 6
Fig. 12	Fig. 13	Fig. 14
ácido acético y ácido n-butírico	ácido acético y ácido isovalérico	ácido propiónico
Alcoholes inferiores, por ejemplo, etanol; cetonas, por ejemplo, acetona; éteres, por ejemplo, éter etílico; ésteres, por ejemplo, acetato de etilo; benceno y tolueno;		
Solubles en n-hexano y éter de petróleo;		
Insolubles en agua ácida;		
Solubles en agua neutra;		
Solubles en agua alcalina.		
Reacción con ácido sulfúrico concentrado (+); Ninhidrina (-); Millon (-); Biuret (-)		
Solubles en agua alcalina		
Eter etílico	Eter etílico	Eter etílico

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de derivados de la tilosina

Compuestos	3-propionil-4"-n-butiriltilosina	3-propionil-4"-isovaleriltilosina	4"-n-butiriltilosina	4"-isovaleriltilosina
Análisis				
(1) Aspecto	Polvos cristalinos blancos			
(2) Análisis elemental (valor calculado) (%)	C: 61,05(61,08) H: 8,37(8,41) O: 29,25(29,17) N: 1,33(1,34)	C: 61,53(61,40) H: 8,46(8,49) O: 28,70(28,78) N: 1,31(1,33)	C: 61,03(60,90) H: 8,55(8,48) O: 28,94(28,20) N: 1,48(1,42)	C: 61,33(61,24) H: 8,65(8,57) O: 28,56(28,72) N: 1,46(1,40)
(3) Peso molecular por espectroscopia de masas	1042	1056	986	1000
(4) Punto de fusión	182-188°C	180-186°C	147-151°C	154-157°C
(5) Poder rotatorio específico α_D^{24} Disolución de metanol (1%)	-35,2	-33,2	-53,4	-50,8
(6) Espectro de absorción ultravioleta E _{1%} ^{1cm}	$\lambda_{\text{máx}}$ EtOH 282 mm 210.	$\lambda_{\text{máx}}$ EtOH 282 mm 227	$\lambda_{\text{máx}}$ EtOH 285 mm 214 Figura 1	$\lambda_{\text{máx}}$ EtOH 284 mm 217
(7) Espectros de absorción infrarrojo (pastilla de BrC) (cm ⁻¹)	3435, 2975, 2940, 2885, 2845, 2730, 1731, 1670, 1626, 1592, 1404, 1374, 1270, 1172, 1055, 965, 843	3490, 2970, 2940, 2885, 2845, 2795, 2710, 1670, 1627, 1450, 1412, 1372, 1318, 1148, 1058, 981, 843	3490, 2970, 2880, 2790, 2715, 1724, 1680, 1568, 1449, 1406, 1375, 1313, 1170, 1121, 1083, 980, 923, 842, 805	3497, 2955, 2880, 2790, 2730, 1740, 1681, 1628, 1457, 1412, 1279, 1229, 1169, 1055, 1028, 1018, 920, 864, 800
	Fig. 7	Fig. 8	Fig. 9	Fig. 10

1

5

10

15

20

25

30

1 Tabla 2. Propiedades físicoquímicas de derivados de la tilosina

Compuestos Análisis	3-propionil-4"- n-butiriltilosi- na	3-propionil-4"- isovaleriltilosi- na	4"-n-butiriltilo- sina
(1) Aspecto	Polvos cristalinos blancos		
(2) Análisis ele- mental (valor calculado) (%)	C: 61,05(61,08) H: 8,37(8,41) O: 29,25(29,17) N: 1,33(1,34)	C: 61,53(61,40) H: 8,46(8,49) O: 28,70(28,78) N: 1,31(1,33)	C: 61,03(60,90) H: 8,55(8,48) O: 28,94(29,20) N: 1,48(1,42)
(3) Peso molecu- lar por espec- troscopía de masas	1042	1056	986
(4) Punto de fu- sión	182-188°C	180-186°C	147-151°C
(5) Poder rota- torio espe- cífico α _D ²⁴ Disolución de metanol (1%)	-35,2	-33,2	-53,4
(6) Espectro de absorción ultravioleta E _{1%} ^{1cm}	λ _{máx} EtOH 282 nm 210	λ _{máx} EtOH 282 nm 227	λ _{máx} EtOH 285 nm 214 Figura 1
(7) Espectros de absorción in- frarrojo (pastilla de BrK) (cm ⁻¹)	3435, 2975, 2940 2885, 2845, 2795 2730, 1731, 1670 1626, 1592, 1450 1404, 1374, 1318 1270, 1172, 1086 1055, 1019, 980 965, 923, 900 843	3490, 3440, 2970 2940, 2885, 2845 2795, 2710, 1735 1670, 1627, 1595 1450, 1412, 1372 1318, 1300, 1171 1148, 1122, 1087 1058, 1025, 1005 981, 921, 900 843	3490, 2970, 2880, 2840, 2715, 1724, 1625, 1588, 1406, 1375, 1266, 1170, 1083, 1055, 980, 963, 905, 842
	Fig. 7	Fig. 8	Fig. 9

5

10

15

20

25

30

Químicas de derivados de la tilosina

3-propionil-4"- isovaleriltilosina	4"-n-butirilti- losina	4"-isovalerilti- losina
Linos blancos		
C: 61,53(61,40) H: 8,46(8,49) O: 28,70(28,78) N: 1,31(1,33)	C: 61,03(60,90) H: 8,55(8,48) O: 28,94(29,20) N: 1,48(1,42)	C: 61,33(61,24) H: 8,65(8,57) O: 28,56(28,79) N: 1,46(1,40)
1056	986	1000
180-186°C	147-151°C	154-157°C
-33,2	-53,4	-50,8
$\lambda_{\text{EtOH máx}}$ 282 nm 227	$\lambda_{\text{EtOH máx}}$ 285 nm 214 Figura 1	$\lambda_{\text{EtOH máx}}$ 284 nm 217
0 3490, 3440, 2970 5 2940, 2885, 2845 0 2795, 2710, 1735 0 1670, 1627, 1595 8 1450, 1412, 1372 6 1318, 1300, 1171 1148, 1122, 1087 1058, 1025, 1005 981, 921, 900 843	3490, 2970, 2935 2880, 2840, 2790 2715, 1724, 1680 1625, 1588, 1449 1406, 1375, 1313 1266, 1170, 1121 1083, 1055, 1019 980, 963, 923 905, 842	3497, 2965, 2935 2880, 2840, 2790 2730, 1740, 1730 1681, 1629, 1595 1457, 1412, 1374 1317, 1299, 1279 1169, 1145, 1121 1083, 1055, 1028 1018, 1000, 983 964, 920, 900
Fig. 8	Fig. 9	Fig. 10

(8) FMN (Cl ₃ CD) 60 MHz	Fig. 15	Fig. 16	Fig. 17	Fig. 18
(9) Acidos orgánicos detectados por cromatografía de gases	ácido propiónico y ácido n-butírico	ácido propiónico y ácido isovalérico	ácido n-butírico	ácido isovalérico
(10) Solubilidad	Solubles en alcoholes inferiores, por ejemplo, etanol; cetonas, por ejemplo, acetona; éteres, por ejemplo, éter etílico; ésteres, por ejemplo, acetato de etilo; benceno y tolueno; Difícilmente solubles en n-hexano y éter de petróleo; Solubles en agua ácida; Débilmente solubles en agua neutra; Difícilmente solubles en agua alcalina.			
(11) Reacción de desarrollo de color	Molisch (+); ácido sulfúrico concentrado (+); Ninhidrina (-); Millon (-); Sakaguchi (-); Biuret (-)			
(12) Alcalinidad	Compuestos alcalinos			
(13) Disolvente utilizado para la cristalización	Eter etílico	Eter etílico	Eter isopropílico-éter etílico	Eter isopropílico-éter etílico

1

5

10

15

20

25

30

1
5
10
15
20
25
30

(8) RMN (Cl_3CD) 60 MHz	Fig. 15	Fig. 16	Fig. 17
(9) Ácidos orgánicos detectados por cromatografía de gases	ácido propiónico y ácido n-butírico.	ácido propiónico y ácido isovalérico	ácido n-butírico
(10) Solubilidad	<p>Solubles en alcoholes inferiores, por ejemplo, etanol; por ejemplo, acetona; éteres, por ejemplo, éter etílico; por ejemplo, acetato de etilo; benceno y tolueno;</p> <p>Difícilmente solubles en n-hexano y éter de petróleo;</p> <p>Solubles en agua ácida;</p> <p>Débilmente solubles en agua neutra;</p> <p>Difícilmente solubles en agua alcalina.</p>		
(11) Reacción de desarrollo de color	Molisch (+); ácido sulfúrico concentrado (+); Ninhidrina (-); Sakaguchi (-); Biuret (-)		
(12) Alcalinidad	Compuestos alcalinos		
(13) Disolvente utilizado para la cristalización	Eter etílico	Eter etílico	Eter isopropílico-éter etílico

Fig. 16	Fig. 17	Fig. 18
- ácido propiónico y ácido isovalérico	ácido n-butírico	ácido isovalérico
<p>alcoholes inferiores, por ejemplo, etanol; cetonas, por ejemplo, acetona; éteres, por ejemplo, éter etílico; ésteres, por ejemplo, acetato de etilo; benceno y tolueno; solubles en n-hexano y éter de petróleo; solubles en agua ácida; solubles en agua neutra; solubles en agua alcalina.</p>		
<p>ácido sulfúrico concentrado (+); Ninhidrina (-); Millon (-); Biuret (-)</p>		
<p>soluciones alcalinas</p>		
Eter etílico	Eter isopropílico-éter etílico	Eter isopropílico-éter etílico

1 hay cambio estructural en la estructura de la cetona y del
doble enlace del anillo de macrólido.

A partir de la detección de los ácidos orgánicos libe-
rados mediante cromatografía de gases y a partir de los da-
tos analíticos de peso molecular, se demuestra que los com-
puestos tienen una estructura básica en común: tilosina que
tiene una o dos especies de radicales acilantes, es decir,
radicales de acetilo, propionilo, n-butirilo o isovalerilo.

Además, a partir del análisis de los datos de los es-
pectros IR y de los espectros de RMN, se confirma la estruc-
tura presentada anteriormente de derivados de tilosina de
fórmula general I. Los datos de espectrometría de masas de
ionización química se muestran para la 3-acetiltilosina
(Fig. 19) y para la 3-propioniltilosina (Fig. 20) como ejem-
plos de derivados 3-acilados y para la 3-acetil-4"-isovale-
rilitilosina (Fig. 21) como ejemplos de derivados 3- y 4"-a-
cilados. Se hacen las asignaciones de todos los fragmentos
en la comparación de los datos con la tilosina, que revela
la fragmentación de enlaces C_5-O , $O-C_1''$ y $O-C_1'''$, la deshidra-
tación y desacilación en ambos, la tilosina y los derivados.
De este modo se demuestra que el radical acetilo y el radi-
cal propionilo están enlazados al anillo de macrólido y que
el radical isovalerilo está enlazado al anillo de micarosa.
Los datos referentes a otros compuestos que no se exponen
aquí también dan las mismas conclusiones.

Los ejemplos de espectros de RMN de C^{13} se muestran
con la 3-acetiltilosina (Fig 22) para derivados 3-acilados
y con la 3-acetil-4"-isovalerilitilosina (Fig. 23) para los
derivados 3- y 4"-acilados (25,2 MHz). Como resultado de la
asignación de señales, en comparación con las de la tilosina,

1 se deduce también que el radical acetilo se une en la posi-
ción 3- del anillo de macrólido y el radical isovalerilo se
une en la posición 4"- de la micarosa. Otros compuestos tam-
bién dan datos similares que muestran la posición de enlace
5 del radical propionilo y del radical n-butirilo e identifi-
can las estructuras químicas.

Se emprendieron otras comparaciones entre los deriva-
dos de esta invención y los productos químicos sintetizados
de acuerdo con técnicas precedentes previamente divulgadas.
10 En la Patente Japonesa (Kokoku) Showa 36-22649 titulada
"Method for producing tylosin", refiriéndose al Ejemplo 4,
se describe la síntesis química de un éster acetilado de
tilosina mediante el uso de cloruro de acetilo, advirtiéndose
se que el contenido en peso del radical acetilo es de 8,22%
15 (en peso) y que el valor de pK es aproximadamente 5,1 (de-
terminación electrométrica con la disolución en dimetilforma-
mida-H₂O = 2:1 en volumen). En el Ejemplo 5 referido de la
misma Patente, también se describe la síntesis de la tilosi-
na acetilada mediante el uso de anhídrido acético como agen-
te acetilante; siendo el contenido en acetilo 8,91 (en peso)
20 y el valor de pK aproximadamente 5,2. Por lo tanto, la sín-
tesis química de la tilosina acetilada se efectua de acuer-
do con los métodos anteriores y se hace comparación con los
compuestos correspondientes de acuerdo con la presente in-
vención respecto de sus valores de Rf en un cromatograma
25 de capa fina empleando placa Art 5715 (Merck Co[®]) y el di-
solvente desarrollante de acetato de etilo: etanol: piridi-
na (85:15:2 en volumen).

De acuerdo con esto, la 3-acetiltilosina obtenida en
30 esta invención da un valor de Rf de 0,59, mientras que la

1 tilosina acetilada en el Ejemplo 4 referido de la citada Pa-
tente da 0,71 y el producto en el Ejemplo 5 referido de la
citada Patente da 0,70, 0,75 y 0,83, que es indicativo de
5 la mezcla de tres compuestos. Otras determinaciones también
confirman la diferencia de la 3-acetiltilosina de esta in-
vención con los productos químicos. Asimismo en el Ejemplo
referido de la citada Patente, la tilosina propionilada sin-
teticada químicamente se muestra que tiene un punto de fu-
sión de 101-111°C. Este valor es claramente diferenciado
10 del valor de 187-192°C para la 3-propioniltilosina obtenida
en esta invención.

Los resultados de los análisis físicoquímicos y de ter-
minaciones de los derivados acetilados de angolamicina y
espiramicina obtenidos en esta invención se presentan en
15 las Tablas 3 y 4, respectivamente.

Los ejemplos de espectro UV, espectro IR y espectro
de RMN se muestran en las figuras 24 a 32 para la 3-acetil-
angolamicina, 3-acetil-4"-isovalerilangolamicina y 3-acetil-
4"-isovalerilespiramicina I. Siguiendo procedimientos de
20 identificación similares a los de dichos derivados de tilo-
sina, se confirmaron las estructuras químicas como en las
fórmulas generales II y III para los derivados acetilados
de angolamicina y espiramicina de acuerdo con esta invención

Los espectros antimicrobianos de los nuevos derivados
25 de tilosina, angolamicinas y espiramicina de esta invención
se muestran en las Tablas 5, 6 y 7, respectivamente regis-
trando concentraciones de inhibidores de crecimiento míni-
mas (MIC, mcg/ml). Estos compuestos poseen comparativamente
un espectro antibacteriano amplio frente a bacterias gram-
positivas. Se ensayó en animales la toxicidad de estos com-
30

Tabla 3-1

Compuestos	3-acetilamino- lamicina	3-propionil- amcolomicina	3-acetil-7"-n- butirilamino- lomicina	3-acetil-4"-iso- valerilamino- micina
Análisis				
(1) Aspecto	Polvos cristalinos blancos forma cristalina: agujas			
(2) Análisis elemental (valor calculado) (%)	C: 60,23 (60,17) H: 8,25 (8,31) O: 30,10 (30,06) N: 1,42 (1,46)	C: 60,48 (60,54) H: 8,47 (8,40) O: 29,64 (29,62) N: 1,41 (1,44)	C: 60,70 (60,75) H: 8,40 (8,33) O: 29,51 (29,56) N: 1,39 (1,36)	C: 61,15 (61,08) H: 8,35 (8,41) O: 29,15 (29,17) N: 1,31 (1,34)
(3) Peso molecular por espectroscopia de masas	958	972	1028	1042
(4) Punto de fusión	217-222°C	208-215°C	171-176°C	169-175°C
(5) Espectro de absorción ultravioleta	λ máx. MeOH 240 nm E ₁ % 152 Fig. 24	λ máx. MeOH 240 nm E ₁ % 153	λ máx. MeOH 240 nm E ₁ % 143	λ máx. MeOH 240 nm E ₁ % 122 Fig. 25
(6) Espectros de absorción infrarrojo (estileno) (cm ⁻¹)	3450, 2970, 2930, 2800, 2855, 2750, 1740, 1728, 1695, 1625, 1455, 1415, 1368, 1347, 1304, 1243, 1164, 1122, 1087, 1050, 993, 973, 861, 835, 507, 410, 365, 319, 719 Fig. 26	3450, 2975, 2935, 2885, 2840, 2155, 2730, 1740, 1727, 1698, 1627, 1455, 1413, 1384, 1370, 1345, 1302, 1167, 1137, 1124, 1088, 1050, 993, 985, 975, 862, 837, 507, 456, 410, 365, 319, 715, 715 Fig. 27	3500, 3410, 2975, 2845, 2810, 2785, 2750, 1735, 1698, 1625, 1455, 1375, 1303, 1240, 1173, 1127, 1050, 1073, 1025, 992, 910, 855, 715, 715 Fig. 28	3450, 2975, 2940, 2885, 2840, 2795, 2725, 1732, 1412, 1375, 1304, 1242, 1170, 1127, 1086, 1072, 1052, 995, 978, 925, 913, 853, 753, 715 Fig. 29
(7) Espectros de resonancia magnética nuclear	Fig. 28			Fig. 29

1

5

10

15

20

25

30

Tabla 3-1

Compuestos Análisis	3-acetilango- lamicina	3-propionil- angolamicina	3-acetil- γ -n- butirilango- lamicina
(1) Aspecto	Polvos cristalinos blancos forma cristalina: ag		
(2) Análisis elemental (valor calculado) (%)	C: 60,23(60,17) H: 8,25(8,31) O: 30,10(30,06) N: 1,42(1,46)	C: 60,48(60,54) H: 8,47(8,40) O: 29,64(29,62) N: 1,41(1,44)	C: 60,70(60,75) H: 8,40(8,33) O: 29,51(29,56) N: 1,39(1,36)
(3) Peso molecular por espectroscopía de masas	958	972	1028
(4) Punto de fusión	217-222°C	208-215°C	171-176°C
(5) Espectro de absorción ultravioleta	λ MeOH máx. 240 nm E ₁ ^{1%} cm 152 Fig 24	λ MeOH máx. 240 nm E ₁ ^{1%} cm 153	λ MeOH máx. 240 nm E ₁ ^{1%} cm 143
(6) Espectros de absorción infrarrojo (pastilla de BrK) (cm ⁻¹)	3450, 2970, 2930 2880, 2835, 2785 2730, 1740, 1728 1695, 1625, 1455 1413, 1368, 1347 1304, 1243, 1164 1122, 1087, 1050 993, 973, 962 935, 907, 856 810, 785, 753 719 Fig 26	3450, 2975, 2935 2885, 2840, 2785 2730, 1740, 1727 1696, 1627, 1455 1413, 1384, 1370 1345, 1302, 1167 1137, 1124, 1088 1050, 999, 985 975, 962, 937 907, 856, 810 786, 752, 715	3500, 3450, 2975 2945, 2890, 2840 2785, 2730, 1735 1698, 1625, 1455 1375, 1308, 1240 1173, 1127, 1090 1073, 1055, 1025 992, 975, 930 910, 850, 750 715
(7) Espectros de resonancia magnética nuclear	Fig. 28		

1

5

10

15

20

25

30

Tabla 3-1

3-propionil-angolamicina	3-acetil-4"-n-butirilangolamicina	3-acetil-4"-iso-valerilangolamicina
sólidos blancos forma, cristalina: agujas		
C: 60,48(60,54) H: 8,47(8,40) O: 29,64(29,62) N: 1,41(1,44)	C: 60,70(60,75) H: 8,40(8,33) O: 29,51(29,56) N: 1,39(1,36)	C: 61,15(61,08) H: 8,35(8,41) O: 29,19(29,17) N: 1,31(1,34)
972	1028	1042
208-215°C	171-176°C	169-175°C
$\lambda_{\text{MeOH máx.}}$ 240 nm $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 153	$\lambda_{\text{MeOH máx.}}$ 240 nm $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 143	$\lambda_{\text{MeOH máx.}}$ 240 nm $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 122 Fig. 25
3450, 2975, 2935 2885, 2840, 2785 2730, 1740, 1727 1696, 1627, 1455 1413, 1384, 1370 1345, 1302, 1167 1137, 1124, 1088 1050, 999, 985 975, 962, 937 907, 856, 810 766, 752, 715	3500, 3450, 2975 2945, 2890, 2840 2785, 2730, 1735 1698, 1625, 1455 1375, 1308, 1240 1173, 1127, 1090 1073, 1055, 1025 992, 975, 930 910, 850, 750 715	3490, 2975, 2940 2885, 2840, 2795 2725, 1735, 1698 1625, 1456, 1412 1375, 1304, 1242 1170, 1127, 1088 1072, 1052, 995 978, 925, 913 853, 753, 715 Fig. 27
		Fig. 29

1	(8) Ácidos orgánicos detectados por cromatografía de gases	ácido acético	ácido propiónico	ácido acético y ácido n-butírico	ácido acético y ácido isovalérico
5	(9) Solubilidad	Solubles en tolueno, benceno, acetato de etilo, metanol y acetona; débilmente solubles en éter etílico; difícilmente solubles en n-hexano y éter de petróleo; solubles en agua ácida; solo débilmente solubles en agua neutra; y difícilmente solubles en agua alcalina.			
10	(10) Reacciones de desarrollo de color	Hollisch (+), ácido sulfúrico concentrado (+), Himámina (-), Biuret (-), Millon (-) y Sakaguchi (-)			
15	(11) Alcalinidad	Compuestos alcalinos			
20	(12) Disolvente utilizado para la cristalización	Acetato de etilo	tolueno o benceno	acetato de etilo o benceno	acetato de etilo o benceno

Notas: 1) Detección de los ácidos orgánicos por cromatografía de gases: se preparan las disoluciones en disolución de KOH 0,5 N-etanol, se tratan a 70-75°C durante 20 minutos y se utilizan para el análisis.

2) Los cristales obtenidos a partir de los disolventes en (12) se utilizaron para los ensayos en (1) - (11).

3) Los pesos moleculares se obtuvieron como M_n a partir de espectros de masas de ionización química que utilizan CH_4 como gas reactivo.

1
5
10
15
20
25
30

(8) Acidos orgánicos detectados por cromatografía de gases	ácido acético	ácido propiónico	ácido acético y ácido n-butírico
(9) Solubilidad	Solubles en tolueno, benceno, acetato de etilo, metar débilmente solubles en éter etílico; difícilmente solubles en n-hexano y éter de petróleo; solubles en agua ácida; solo débilmente solubles en agua alcalina.		
(10) Reacciones de desarrollo de color	Molisch (+), ácido sulfúrico concentrado (+), Ninhidrín Millon (-) y Sakaguchi (-)		
(11) Alcalinidad	Compuestos alcalinos		
(12) Disolvente utilizado para la cristalización	Acetato de etilo	tolueno o benceno	acetato de etilo o benceno

Notas: 1) Detección de los ácidos orgánicos por cromatografía de gases: soluciones en disolución de KOH 0,5 N-etanol, se tratan a 70 minutos y se utilizan para el análisis.

2) Los cristales obtenidos a partir de los disolventes en (12) los ensayos en (1) - (11).

3) Los pesos moleculares se obtuvieron como OM^+ a partir de la espectrometría de masas que utilizan CH_4 como gas reactivo.

ácido propiónico	ácido acético y ácido n-butírico	ácido acético y ácido isovalérico
<p>eno, benceno, acetato de etilo, metanol y acetona; ales en éter etílico; lubles en n-hexano y éter de petróleo; a ácida; solo débilmente solubles en agua neutra; y difícil en agua alcalina.</p>		
<p>ido sulfúrico concentrado (+), Minhidrina (-), Biuret (-), kaguchi (-)</p>		
<p>alcalinos</p>		
tolueno o benceno	acetato de etilo o benceno	acetato de etilo o benceno

orgánicos por cromatografía de gases: se preparan las di-
 sión de KOH 0,5 N-etanol, se tratan a 70-75°C durante 20 mi-
 n el análisis.

a partir de los disolventes en (12) se utilizaron para
 (1).

se obtuvieron como OM^+ a partir de espectros de masas de
 utilizan CH_4 como gas reactivo.

Tabla 3-2

Compuestos Análisis	3-propionil-4"- n-butirilango- lenicína	3-propionil-4"- isovaleril- golanicína	4"-n-butiril- angolanicína	4"-isovaleril- angolanicína
(1) Aspecto	Polvos cristalinós blancos			
(2) Análisis elemental (valor calculado)	C: 61,23(61,08) H: 8,33(8,41) O: 29,06(29,17) N: 1,38(1,34)	C: 61,43(61,40) H: 8,45(8,49) O: 28,77(28,78) N: 1,35(1,33)	C: 60,48(60,90) H: 8,50(8,48) O: 29,26(29,20) N: 1,40(1,42)	C: 61,20(61,24) H: 8,53(8,57) O: 29,05(29,79) N: 1,42(1,40)
(3) Peso molecular por espectroscopía de masas	1042	1056	986	1000
(4) Espectro de absorción ultravioleta	MeOH 240 nm máx.	240 nm	240 nm	240 nm
(5) Ácidos orgánicos detectados por cromatografía de gases	ácido propiónico y ácido n-butírico	ácido propiónico y ácido isovalérico	ácido n-butírico	ácido isovalérico
(6) Solubilidad	Solubles en benceno, tolueno, acetato de etilo, metanol y acetona; débilmente solubles en éter etílico; difícilmente solubles en n-hexano y éter de petróleo; solubles en agua ácida; solo débilmente solubles en agua neutra; y difícilmente solubles en agua alcalina.			
(7) Reacción de control de color	Lolich (+), ácido sulfúrico concentrado (+), anhidrina (-), biuret (-) Millon (-) y Sakaguchi (-)			
(8) Alcalinidad	Compuerter cleslinos			
(9) Disolvente utilizado para el análisis	Acetato de etilo o benceno	Acetato de etilo o benceno	éter etílico	éter etílico

1

5

10

15

20

25

30

Tabla 3-2

1
5
10
15
20
25
30

Compuestos Análisis	3-propionil-4"- n-butilangolam amicina	3-propionil-4"- isovalerilan- golamicina	4"-n-butil- angolamicina
(1) Aspecto	Polvos cristalinos blancos		
(2) Análisis elemental (valor calculado) (%)	C: 61,23(61,08) H: 8,33(8,41) O: 29,06(29,17) N: 1,38(1,34)	C: 61,43(61,40) H: 8,45(8,49) O: 28,77(28,78) N: 1,35(1,33)	C: 60,48(60,90) H: 8,50(8,48) O: 29,26(29,20) N: 1,40(1,42)
(3) Peso molecular por espectroscopía de masas	1042	1056	986
(4) Espectro de absorción ultravioleta	MeOH máx. 240 nm	240 nm	240 nm
(5) Ácidos orgánicos detectados por cromatografía de gases	ácido propiónico y ácido n-butírico	ácido propiónico y ácido isovalérico	ácido n-butírico
(6) Solubilidad	Solubles en benceno, tolueno, acetato de etilo, metar débilmente solubles en éter etílico; difícilmente solubles en n-hexano y éter de petróleo; solubles en agua ácida; solo débilmente solubles en agua alcalina.		
(7) Reacción de desarrollo de color	Molish (+), ácido sulfúrico concentrado (+), Minhidri Millon (-) y Sakaguchi (-)		
(8) Alcalinidad	Compuestos alcalinos		
(9) Disolvente utilizado para la cristalización	Acetato de etilo o benceno	Acetato de etilo o benceno	éter etílico

Tabla 3-2

3-propionil-4"-isovalerilangolamicina	4"-n-butirilangolamicina	4"-isovalerilangolamicina
cristalinos blancos , , , ,		
C: 61,43(61,40) H: 8,45(8,49) O: 28,77(28,78) N: 1,35(1,33)	C: 60,48(60,90) H: 8,50(8,48) O: 29,26(29,20) N: 1,40(1,42)	C: 61,20(61,24) H: 8,53(8,57) O: 28,85(28,79) N: 1,42(1,40)
1056	986	1000
240 mm	240 mm	240 mm
ácido propiónico y ácido isovalérico	ácido n-butírico	ácido isovalérico
<p>eno, tolueno, acetato de etilo, metanol y acetona; les en éter etílico; ubles en n-hexano y éter de parroleo; ácida; solo débilmente solubles en agua neutra; y difícil- n agua alcalina.</p>		
<p>o sulfúrico concentrado (+), anhidrina (-), biuret (-) aguchi (-)</p>		
<p>es alcalinos</p>		
Acetato de etilo o benceno	éter etílico	éter etílico

Tabla 4-1

Compuestos Análisis	4"-n-butiril- espiramicina I	4"-isovaleril- espiramicina I	4"-n-butiril- espiramicina II	4"-isovaleril- espiramicina II
(1) Aspecto	Polvos blancos			
(2) Análisis elemental (valor calculado) (%)	C: 61,73 (61,82) H: 8,88 (8,83) O: 26,28 (26,28) N: 3,11 (3,07)	C: 62,13 (62,18) H: 8,95 (8,91) O: 25,92 (25,89) N: 3,00 (3,02)	C: 61,58 (61,61) H: 8,70 (8,65) O: 26,75 (26,81) N: 2,97 (2,93)	C: 62,03 (61,96) H: 8,72 (8,74) O: 26,35 (26,41) N: 2,93 (2,89)
(3) Peso molecular (espectroscopia de masas)	913	927	955	969
(4) Espectros de absorción ultravioleta E _{1%} ^{1cm}	λ MeOH 231 nm máx.	231 nm	231 nm	231 nm FIG 30 292
(5) Ácidos orgánicos detectados por cromatografía de gases	Ácido n-butírico	Ácido isovalérico	Ácido acético y ácido n-butírico	Ácido acético y ácido isovalérico
(6) Solubilidad	Solubles en metanol, etanol, acetona, tolueno, benceno, acetato de etilo y éter; difícilmente solubles en n-hexano, ciclohexano y éter de petróleo.			
(7) Reacciones de desarrollo de color	Molisch(+), ácido sulfúrico concentrado (+), ninhidrina (-), Biuret (-), Millon (-).			
(8) Alcalinidad	Compuestos alcalinos			
(9) Disolvente utilizado para cristalización	Ciclohexano			
(10) Espectro IR	FIG. 31			
(11) Espectro UV	FIG. 32			

1

5

10

15

20

25

30

Tabla 4-1

1	Compuestos Análisis	4"-n-butiril- espiramicina I	4"-isovaleril- espiramicina I	4"-n-butiril- espiramicina II
5	(1) Aspecto	Polvos blancos		
	(2) Análisis elemental (valor calculado) (%)	C: 61,73(61,82) H: 8,88(8,83) O: 26,28(26,28) N: 3,11(3,07)	C: 62,13(62,18) H: 8,95(8,91) O: 25,92(25,89) N: 3,00(3,02)	C: 61,58(61,61) H: 8,70(8,65) O: 26,75(26,81) N: 2,97(2,93)
10	(3) Peso molecular (espectroscopía de masas)	913	927	955
15	(4) Espectros de absorción ultravioleta $E_{1\text{cm}}^{1\%}$	λ MeOH máx. 231 nm	231 nm	231 nm
20	(5) Ácidos orgánicos detectados por cromatografía de gases	Ácido n-butírico	ácido isovalérico	ácido acético y ácido n-butírico
20	(6) Solubilidad	Solubles en metanol, etanol, acetona, tolueno, benceno y éter; difícilmente solubles en n-hexano, ciclohexano y éter		
25	(7) Reacciones de desarrollo de color	Molisch(+), ácido sulfúrico concentrado (+), Vanhídri Million (-).		
25	(8) Alcalinidad	Compuestos alcalinos		
	(9) Disolvente utilizado para cristalización	Ciclohexano		
30	(10) Espectro IR			
30	(11) Espectro RMN			

Tabla 4-1

4"-isovaleril- espiramicina I	4"-n-butiril- espiramicina II	4"-isovaleril- espiramicina II
s blancos		
C: 62,13(62,18) H: 8,95(8,91) O: 25,92(25,89) N: 3,00(3,02)	C: 61,58(61,61) H: 8,70(8,65) O: 26,75(26,81) N: 2,97(2,93)	C: 62,00(61,96) H: 8,72(8,74) O: 26,35(26,41) N: 2,93(2,89)
927	955	969
231 nm	231 nm	231 nm Fig 30 292
ácido isova- lérico	ácido acético y ácido n-bu- tírico	ácido acético y ácido iso- valérico
sol, etanol, acetona, tolueno, benceno, acetato de etilo solubles en n-hexano, ciclohexano y éter de petróleo.		
ácido sulfúrico concentrado (+), Ninhidrina (-), Biuret (-),		
s alcalinos		
		Fig. 31
		Fig. 32

Tabla 4-2

1

5

10

15

20

25

30

Compuestos Análisis	4"-n-butiril- espiramicina III	4"-isovaleril- espiramicina III
(1) Aspecto	Polvos blancos	
(2) Análisis elemen- tal (valor calcu- lado (%))	C: 61,90(61,96) H: 8,80(8,74) O: 26,36(26,41) N: 2,94(2,89)	C: 62,26(62,30) H: 8,30(8,82) O: 26,10(26,03) N: 2,84(2,85)
(3) Peso molecular (espectroscopía de masas)	969	983
(4) Espectros de ab- sorción ultravio- leta E 1% 1cm	λ MeOH máx. 231 nm	λ MeOH máx. 231 nm
(5) Acidos orgánicos detectados por cromatografía de gases	ácido propiónico y ácido n-butí- rico	ácido propiónico y ácido isovalé- rico
(6) Solubilidad	Solubles en metanol, etanol, acetona, tolueno, benceno y acetato de etilo; difícilmente solubles en n-hexano, ciclohexano y éter de petróleo.	
(7) Reacciones de de- sarrollo de color	Molisch (+), ácido sulfúrico concen- trado (+), Ninhidrina (-), Biuret(-) y Millon (-)	
(8) Alcalinidad	Compuestos alcalinos	
(9) Disolvente utili- zado para la cristalización	ciclohexano	

1 puestas y los valores LD₅₀ en ratones por administración in-
travenosa fueron mas que 400 mg/kg con todos los compuestos.
En experimentos terapéuticos en ratones, infectados a mano
por Staphylococcus aureus Smith, los valores ED₅₀ fueron
5 menores que 50 mg/kg (p.o.) con todos los derivados de anti-
bióticos citados.

Una de las ventajas particulares de los citados deri-
vados de tilosina y angolamicina sobre antibióticos macró-
lidos conocidos es su clara actividad antimicrobiana frente
10 a bacterias resistentes a medicamentos. Los resultados de
algunos de tales ensayos se incluyen en las tablas 5, 6 y 7.

Tabla 5 Espectros antimicrobianos

Concentración inhibidora del cre-
cimiento mínima (mcg/ml)

15 Cepa ensayada	Compuesto	3-acetil tilosina	3-acetil 4"-n-bu- tiril- tilosina	3-acetil 4"-isovā leril- tilosina	3-pro- pionil- tilo- sina
20	(1) <u>Candida albicans</u> IAM 4905	> 250	> 250	> 250	>250
	(2) <u>Candida tropicalis</u> IAM 4924	>250	>250	>250	>250
	(3) <u>Pseudomonas flures- cens</u> NIHJB 254	>250	>250	>250	>250
	(4) <u>Esherichia coli</u> (Na- tional Institute of Health)	250	250	125	250
25	(5) <u>Proteus morganii</u> (The institute for Infectious Diseases)	>250	>250	>250	>250
	(6) <u>Staphylococcus au- reus</u> FAD 209P	0,25	0,25	0,49	0,25
30	(7) <u>Staphylococcus au- reus</u> Smith	0,12	0,25	0,49	0,12

1	(8) <u>Bacillus cereus</u> ATCC 9634	0,49	0,98	1,95	0,25
	(9) <u>Bacillus megaterium</u> HRL B-938	0,25	0,49	0,49	<0,12
	(10) <u>Sarcina lutea</u> ATCC 9341	<0,12	<0,12	0,25	<0,12
5	(11) <u>Micrococcus flavus</u> I	<0,12	0,25	0,25	<0,12
	(12) <u>Corynebacterium bo-</u> <u>vis</u> 1810	0,25	0,50	0,50	0,25
	(13) <u>Mycobacterium smeg-</u> <u>matis</u> ATCC 607	7,81	1,95	3,91	3,91
10	(14) <u>Bacillus subtilis</u> ATCC 6633	0,49	0,49	0,98	0,25
	(15) <u>Staphylococcus au-</u> <u>reus</u> [±] MS 9610	>250	250	62,5	>250
	(16) <u>Staphylococcus au-</u> <u>reus</u> [±] MS 8710	250	15,6	15,6	62,5
15	(17) <u>Streptococcus pyo-</u> <u>genes</u> [±] MH 771	125	15,6	3,91	62,5

Nota: [±] indica cepa resistente a los medicamentos
(método de dilución de caldo)

20

25

30

Tabla 5. Espectros antimicrobianos

Concentración inhibidora del crecimiento mínima (mcg/ml)

Compuesto	3-pro- pionil 4"-n- buti- rilti- losina	3-pro- pionil 4"-iso- vale- rilti- losina	4"-n- buti- rilti- losina	4"-iso- vale- rilti- losina	Tilo- sina
(1) <u>Candida albicans</u> IAM 4905	>250	>250	>250	>250	>250
(2) <u>Candida tropicalis</u> IAM 4924	>250	>250	>250	>250	>250
(3) <u>Pseudomonas fluorescens</u> NIHJB 254	>250	>250	>250	>250	>250
(4) <u>Escherichia coli</u> (National Institute of Health)	250	250	125	125	250
(5) <u>Proteus morganii</u> (The Institute for infectious Diseases)	>250	>250	>250	>250	>250
(6) <u>Staphylococcus aureus</u> FAD209P	0,98	0,49	0,25	0,49	0,49
(7) <u>Staphylococcus aureus</u> SMITH	0,25	1,95	0,25	0,25	0,25
(8) <u>Bacillus cereus</u> ATCC 9634	1,95	0,98	0,98	0,98	0,49
(9) <u>Bacillus megaterium</u> NRRL B-938	0,49	0,49	0,49	0,98	0,25
(10) <u>Sarcina lutea</u> ATCC 9347	<0,12	0,25	0,25	<0,12	0,12
(11) <u>Micrococcus flavus</u> I	0,25	0,49	0,49	0,25	0,12
(12) <u>Corynebacterium bovis</u> 1810	0,50	1,00	0,98	0,50	0,50
(13) <u>Mycobacterium smegmatis</u> ATCC 607	3,91	3,91	3,91	3,91	7,81
(14) <u>Bacillus subtilis</u> ATCC 6633	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49

1	(15) <u>Staphylococcus aureus</u> [#] MS 9610	250	62,5	>250	62,5	>250
	(16) <u>Staphylococcus aureus</u> [#] MS 8710	31,3	15,6	62,5	15,6	>250
5	(17) <u>Streptococcus pyogenes</u> [#] MH 771	15,6	3,91	15,6	7,80	250

(Método de dilución de caldo)

Nota: # indica cepa resistente a los medicamentos

Tabla 6. Espectros antimicrobianos

Concentración inhibidora del crecimiento mínima (mcg/ml)

Compuesto Cepa ensayada	3-acetil- angola- micina	3-acetil- 4"-n-buti- rilangola- micina	3-acetil- 4"-isova- lerilango- lamicina	3-pro- pionil- angola- micina
15 (1) <u>Candida albicans</u> IAM 4905	>250	>250	>250	>250
(2) <u>Candida tropicalis</u> IAM 4924	>250	>250	>250	>250
(3) <u>Pseudomonas fluo- rescens</u> NIHJB 254	>250	>250	>250	>250
20 (4) <u>Escherichia coli</u> (National Institu- te of Health)	>250	>250	>250	>250
(5) <u>Proteus morganii</u> (The Institute for Infectious Disea- ses).	>250	>250	>250	>250
25 (6) <u>Staphylococcus au- reus</u> FAD209P	1,95	0,98	0,63	0,98
(7) <u>Staphylococcus aureus</u> SMITH	1,95	0,98	0,63	0,98
(8) <u>Bacillus cereus</u> ATCC 9634	1,95	0,98	1,25	0,98
30 (9) <u>Bacillus cereus</u> NHL B-938	0,98	0,49	0,63	0,49

1	(10) <u>Sarcina lutea</u> ATCC 9341	0,98	0,49	0,63	0,49
	(11) <u>Micrococcus flavus</u> I	0,98	0,98	0,63	0,49
	(12) <u>Corynebacterium bovis</u> 1810	3,91	1,95	0,31	0,98
5	(13) <u>Mycobacterium smogmatis</u> ATCC 607	1,95	1,95	0,98	3,91
	(14) <u>Bacillus subtilis</u> ATCC 6633	1,95	0,98	0,63	0,49
	(15) <u>Staphylococcus aureus</u> [#] MS 9610	>250	250	62,5	>250
10	(16) <u>Staphylococcus aureus</u> [#] MS 8710	>250	31,5	31,5	>250
	(17) <u>Streptococcus pyogenes</u> [#] MH 771	>250	15,6	7,8	250

(Método de dilución de caldo)

Nota: [#] indica cepa resistente a los medicamentos

Tabla 6. Espectros antimicrobianos

Concentración inhibidora del crecimiento mínima (mcg/ml)

Compuesto	3-pro- pionil 4"-n-bu- tiril- angola- micina	3-pro- pionil 4"-iso- vale- rilan- gola- micina	4"-n- buti- rilan- gola- mici- na	4"-iso- vale- rilan- golami- cina	Angola- micina
Cepa ensayada					
25	(1) <u>Candida albicans</u> IAM 4905	>250	>250	>250	>250
	(2) <u>Candida tropicalis</u> IAM 4924	>250	>250	>250	>250
	(3) <u>Pseudomonas fluorescens</u> NIHJB 254	>250	>250	>250	>250
30	(4) <u>Escherichia coli</u> (National Institute of Health)	>250	>250	>250	>250

1	(5) <u>Proteus morganii</u> (The Institute for Infectious Diseases)	>250	>250	>250	>250	>250
	(6) <u>Staphylococcus aureus</u> FAD209P	0,63	0,98	0,98	0,98	0,98
5	(7) <u>Staphylococcus aureus</u> SMITH	0,98	1,95	0,49	0,98	0,49
	(8) <u>Bacillus cereus</u> ATCC 9634	0,98	1,95	0,98	0,98	0,98
	(9) <u>Bacillus megaterium</u> NCTC B-938	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49
10	(10) <u>Sarcina lutea</u> ATCC 9341	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	(11) <u>Micrococcus flavus</u> I	0,25	0,49	0,25	0,25	0,25
	(12) <u>Corynebacterium bovis</u> 1810	0,49	0,98	0,98	0,98	0,98
15	(13) <u>Mycobacterium smegmatis</u> ATCC 607	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95
	(14) <u>Bacillus subtilis</u> ATCC 6633	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49
	(15) <u>Staphylococcus aureus</u> [‡] MS 9610	250	62,5	250	62,5	250
20	(16) <u>Staphylococcus aureus</u> [‡] MS 8710	31,5	15,6	31,5	15,6	250
	(17) <u>Streptococcus pyogenes</u> [‡] MH771	15,6	7,8	15,6	7,8	125

(Método de dilución de caldo)

25 Nota: [‡] indica cepa resistente a los medicamentos

1

Tabla 7. Espetros antimicrobianos

Concentración inhibidora del crecimiento mínima (mcg/ml).

5

10

15

20

25

30

Compuesto	Espira- micina II	4"-n-buti- rilespi- micina II	4"-isova- lerilespi- ramicina II	Espira- micina III
Cepa ensayada				
(1) <u>Candida albicans</u> IAM 4905	>250	>250	>250	>250
(2) <u>Candida tropicalis</u> IAM 4924	>250	>250	>250	>250
(3) <u>Pseudomonas fluorescens</u> NIHJB 254	>250	>250	>250	>250
(4) <u>Escherichia coli</u> (National Institute of Health)	250	250	250	250
(5) <u>Proteus morganii</u> (The Institute for Infectious Diseases)	>250	>250	>250	>250
(6) <u>Staphylococcus aureus</u> FAD 209P	0,98	0,98	0,98	0,98
(7) <u>Staphylococcus aureus</u> SMITH	0,49	0,98	0,49	0,49
(8) <u>Bacillus cereus</u> ATCC 9634	3,91	3,91	3,91	3,91
(9) <u>Bacillus megaterium</u> NRRL B-938	1,95	1,95	1,95	1,95
(10) <u>Sarcina lutea</u> ATCC 9341	0,49	0,49	0,49	0,25
(11) <u>Micrococcus flavus</u> I	0,49	0,49	0,49	0,25
(12) <u>Corynebacterium bovis</u> 1810	0,49	0,98	0,49	0,49
(13) <u>Mycobacterium smegmatis</u> ATCC607	0,98	0,98	0,98	0,98
(14) <u>Bacillus subtilis</u> ATCC 6633	1,95	1,95	1,95	1,95
(15) <u>Staphylococcus aureus</u> MS 9610	>250	>250	>250	>250

1	(16) <u>Staphylococcus aureus</u> [‡] MS 8710	>250	>250	>250	>250
	(17) <u>Streptococcus pyogenes</u> [‡] MH771.	>250	125	31,3	>250

5 (Método de dilución de caldo)
 Nota: [‡] indica cepa resistente a los medicamentos

Tabla 7. Espectros antimicrobianos
 Concentración inibidora del crecimiento mínima (mcg/ml)

10	Compuesto Cepa ensayada	4"-n- buti- riles- pirami- cina III	4"-iso- vale- riles- pirami- cina III	4"-n- buti- riles- pirami- cina I	4"-iso- valeril- espira- micina I	Espira- micina I
15	(1) <u>Candida albicans</u> IAM 4905	>250	>250	>250	>250	>250
	(2) <u>Candida tropicalis</u> IAM 4924	>250	>250	>250	>250	>250
	(3) <u>Pseudomonas fluorescens</u> NIHJB254	>250	>250	>250	>250	>250
20	(4) <u>Escherichia coli</u> (National Institute of Health)	250	250	250	250	125
	(5) <u>Proteus morgani</u> (The Institute for Infectious Diseases)	>250	>250	>250	>250	>250
25	(6) <u>Staphylococcus aureus</u> FAD209F	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
	(7) <u>Staphylococcus Aureus</u> SMITH	0,98	0,98	0,49	0,49	0,25
	(8) <u>Bacillus cereus</u> ATCC 9634	3,91	3,91	3,91	3,91	3,91
30	(9) <u>Bacillus megaterium</u> NRRL B-938	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95

1	(10) <u>Sarcina lutea</u> ATCC 9341	0,49	0,49	0,49	0,49	0,25
	(11) <u>Micrococcus</u> <u>Flavus I</u>	0,49	0,49	0,49	0,49	0,25
	(12) <u>Corynebacterium</u> <u>bovis 1810</u>	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
5	(13) <u>Mycobacterium</u> <u>smegmatis</u> ATCC 607	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
	(14) <u>Bacillus subtilis</u> ATCC 6633	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95
	(15) <u>Staphylococcus</u> <u>aureus</u> [‡] MS 9610	>250	>250	>250	>250	>250
10	(16) <u>Staphylococcus</u> <u>aureus</u> [‡] MS 8710	>250	>250	>250	>250	>250
	(17) <u>Streptococcus</u> <u>pyogenes</u> [‡] MH 771	125	31,3	125	31,3	>250

15

(Método de dilución de caldo)

Nota: [‡] indica cepa resistente a los medicamentos

20

Las cepas marcadas con [‡] en las Tablas 5, 6, y 7 son las cepas aisladas de los pacientes resistentes a los medicamentos, a saber, Staphylococcus aureus MS 9610, que es resistente a angolamicina, penicilina, tetraciclina, eritromicina, leucomicina, espiramicina, josamicina y tilosina, Staphylococcus aureus MS 8710, que es resistente a angolamicina, penicilina, tetraciclina, eritromicina, leucomicina y tilosina, y Streptococcus pyogenes MH 771, que es resistente a angolamicina, eritromicina, oleandomicina, leucomicina y tilosina. Entre los citados derivados, los mencionados con radical 4"-acilo, es decir 4"-n-butiriltilosina, 4"-isovaleriltilosina, 3-acetil-4"-n-butiriltilosina, 3-acetil-4"-isovaleriltilosina, 3-propionil-4"-n-butiriltilosina, 3-pro-

25
30

1 pionil-4"-isovaleriltilosina, 4"-n-butirilangolamicina, 4"-
isovalerilangolamicina, 3-acetil-4"-n-butirilangolamicina,
3-acetil-4"-isovalerilangolamicina, 3-propionil-4"-n-buti-
rilangolamicina y 3-propionil-4"-isovalerilangolamicina e-
5 jercen una actividad antimicrobiana particularmente fuerte
frente a un amplio rango de cepas resistentes a los medica-
mentos.

Otro aspecto de las ventajas de los derivados de tilo-
sina y angolamicina es sus altos niveles en sangre en anima-
10 les. Cuando cada uno de estos compuestos se administra oral-
mente a ratones en una dosis de 100 mg/kg, la concentración
en sangre medida es 5-20 mcg/ml, un valor sustancialmente
alto en comparación con el mismo con tilosina y angolamici-
na (< 1 mcg/ml). En particular, los derivados que tienen ra-
15 dicales de n-butirilo y de isovalerilo se acreditan por su
excelente absorción a través de la administración oral. Su
concentración en sangre una hora después de la administra-
ción alcanza hasta 15-20 mcg/ml. Estas ventajas deben demos-
trar la superior utilidad terapéutica de los citados com-
20 puestos de esta invención.

Los derivados de tilosina, angolamicina y espiramicina
de acuerdo con la presente invención son compuestos básicos
y forman sus sales de adición ácida no tóxicas con varios
ácidos orgánicos tales como ácido tartárico, ácido acético,
25 ácido propiónico, ácido cítrico y ácido succínico y ácidos
inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico
y ácido fosfórico. Estas sales se obtienen, aislan, purifi-
can y formulan por los métodos generalmente empleados en la
obtención de sales de antibióticos macrólidos de 16 eslabo-
30 nes. Por ejemplo, el derivado de antibiótico citado elegido

1 y el ácido deseado se disuelven separadamente en un disol-
vente adecuado que tenga una baja solubilidad de las sales,
por ejemplo, éter etílico y acetona o su mezcla y a conti-
nuación se mezclan. La disolución se concentra, si es nece-
5 sario, y se enfría produciendo los cristales de la citada
sal de adición de ácido que se recoge y seca para obtener
un polvo blanco cristalino. Las sales resultantes presentan
solubilidad en agua mayor que los correspondientes deriva-
dos acilados de los antibióticos y se utilizan preferentemen-
10 te en una aplicación terapéutica.

Como ejemplos de tales formas de sales de adición áci-
da el clorhidrato de 3-acetil-4"-isovaleriltilosina tiene
un punto de fusión de 129-133°C y el tartrato de 3-acetil-4"-
isovaleriltilosina de 119-122°C.

15 Por su especial actividad antimicrobiana, los compues-
tos de esta invención son útiles como agentes controladores
de la infección en medicina humana y veterinaria, y se pue-
den emplear por ejemplo en control enteral, parenteral o
tópico de enfermedades infecciosas de un modo similar a los
20 medicamentos de antibióticos macrólidos conocidos. Además,
considerando la utilidad particular de la tilosina como a-
gente estimulador del crecimiento animal, los citados com-
puestos de tilosina de esta invención también se pueden em-
plear como un aditivo de alimentos en la cría de animales.

25 Los compuestos de esta invención se pueden emplear
mezclados con excipientes y cargas habituales, es decir, sus-
tancias soporte orgánicas o inorgánicas aceptables desde el
punto de vista farmacéutico adecuadas para aplicación ente-
ral, parenteral o tópica que no reaccionan nocivamente con
30 los compuestos activos.

1 Soportes adecuados desde el punto de vista farmacéu-
tico son pero no están limitados a agua, disoluciones sali-
nas alcoholes, aceites vegetales, polietilenglicoles, gela-
tina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido
5 silícico, parafinas, aceite de perfume, monoglicéridos y di-
glicéridos de ácidos grasos e hidroximetilcelulosa. Las pre-
paraciones farmacéuticas se pueden esterilizar y, si se de-
sea, mezclar con agentes auxiliares, por ejemplo, lubrican-
tes, preservativos, estabilizadores, agentes humectantes,
10 emulsores, tampones, sustancias colorantes y olorosas que
no reaccionan nocivamente con los compuestos activos.

 Los compuestos de esta invención también se pueden
emplear en formas de aditivos de alimentos tales como pre-
mezclas de alimentos en métodos de formulación habituales.

15 Se prefiere la administración oral, enteral o intra-
muscular, por ejemplo, en forma de pastillas, grageas, cáp-
sulas, jarabes y elixires, en forma de disoluciones inyec-
tables o en forma de mezclas de aditivos de alimentos para
animales incluyendo los humanos, ganado, animales de labora-
torio y domésticos caseros y aves de corral. Una dosis dia-
20 ria eficaz de los compuestos administrados oralmente a los
humanos contiene preferiblemente de 1 a 20 mg por kg de pe-
so de cuerpo. Se puede administrar en dosis única o en do-
sis divididas a lo largo del día.

25 Sin ulterior elaboración, se cree que un experto en
la materia puede, haciendo uso de la precedente descripción
utilizar la presente invención en su mas amplia extensión.
Las siguientes incorporaciones específicas preferidas, por
lo tanto, han de ser interpretadas simplemente como ilustra-
30 tivas y no limitativas del resto de la exposición en cual-

1 quier caso.

Ejemplo 1

La obtención de 4"-butiriltilosina a partir de tilosina.

5 Se prepara un medio acuoso de la composición siguiente: 2 g/dl de harina de soja, 2 g/dl de glucosa, 0,1 g/dl de extracto de levadura, 0,05 g/dl de PO_4HK_2 y 0,05 g/dl de $SO_4Mg.7H_2O$ (pH 7,0). Se esteriliza a 120°C durante 20 minutos 100 ml de este medio en un matraz Erlenmeyer de

10 500 ml, el cual se inocula con un cultivo en agar de Streptomyces thermotolerans ATCC 11416 mediante una gaza de platino. Se lleva a cabo el cultivo durante un día a 37°C en un agitador rotativo. Quince litros del medio con un agente antiespumante en una concentración de 0,05 g/dl y esterilizado a 120°C durante 15 minutos en una vasija de fermentación

15 de 30 litros se inoculan asépticamente con 100 ml de los cultivos sembrados anteriormente. El cultivo se lleva a cabo a 37°C con aireación y agitación vigorosa durante aproximadamente un día hasta que la concentración de glucosa en

20 el caldo disminuya por debajo de 0,3 g/dl, momento en el cual se añaden 60 g de tilosina y 15 g de DL-norvalina, como donador del radical n-butirilo, juntos en un litro de agua al caldo de cultivo. Se continua la reacción durante 6 horas más aproximadamente hasta completar la reacción de

25 transformación.

La mezcla de reacción así obtenida se ajusta a un pH de 3,5 con ácido sulfúrico diluido y se separa de los micelios mediante centrifugación para obtener aproximadamente 16 litros de líquido sobrenadante incluyendo el lavado. El

30 líquido sobrenadante se ajusta a un pH de 6,0 con disolu-

1 ción de hidróxido sódico diluida y se extrae a 30°C con 10
litros de benceno. Se separa la capa de benceno que contiene
la 4"-n-butiriltilosina y se extrae a 5°C con 2 litros de di-
5 solución reguladora de citrato de un pH de 3,5. La capa acuosa
recuperada, después de ajustada a un pH de 7,0 con disolu-
ción de hidróxido sódico diluida, se añade a un litro de ace-
tato de etilo para extracción, y el extracto de disolvente
se concentra y seca a vacío para obtener aproximadamente
10 5 g de un material pardo amarillento que contiene 4"-n-bu-
tiriltilosina. Este material se carga en una columna de 60
cm de longitud y 2,1 cm de diámetro rellena con Wakogen
C-200 (Wako Reagent Chemical Co^R), y se eluye con una mez-
cla de benceno:etanol (97:3). Los eluatos que contienen so-
lamente 4"-n-butiriltilosina se recogen y concentran hasta
15 sequedad a vacío. A continuación este material se disuelve
en una mezcla de éter etílico y éter isopropílico (4:1) me-
diante calentamiento y la disolución se deja en reposo para
permitir que el éter etílico se evapore gradualmente con
objeto de la formación de cristales. Se obtienen aproxima-
20 damente 1,5 g de cristales blancos de 4"-n-butiriltilosina.

Por otra parte, después de la extracción con benceno,
la capa acuosa se ajusta a un pH de 8,0 y se extrae con 15
litros de acetato de etilo a 30°C. Este extracto se mezcla
con 15 litros de disolución reguladora de citrato de un pH
25 de 3,5 a 5°C, y la capa acuosa recuperada se ajusta a un pH
de 8,0 mediante una disolución de hidróxido sódico diluida
y se extrae con 10 litros de benceno a 30°C. Los extractos
se concentran a un volumen de 150 ml a presión reducida y
se dejan en reposo a 7°C para obtener cristales de 3-acetil-
30 tilosina. Recogidos por filtración y secados a continuación

1 se obtienen 25 g de cristales blancos.

(punto de fusión: 4"-n-butiriltilosina 149°C
3-acetiltilosina 216°C)

Ejemplo 2

5 La obtención de 4"-n-butirilangolamicina a partir de angolamicina.

Se efectua una reacción de cultivo y recuperación similar a la del Ejemplo 1, sustituyendo como substrato angolamicina en vez de tilosina. Se obtienen aproximadamente
10 1,2 g de cristales blancos de 4"-n-butirilangolamicina y aproximadamente 21 g de cristales blancos de 3-acetilangolamicina.

Ejemplo 3

15 La obtención de 4"-n-butirilespiramicina I a partir de espiramicina I.

Se efectuan un cultivo y reacción similares a los del Ejemplo 1 sustituyendo como substrato espiramicina I en vez de tilosina. Se obtienen 0,9 g de cristales blancos de 4"-n-butirilespiramicina I y 18 g de polvo blanco de 3-acetilespiramicina I (espiramicina II).
20

Ejemplo 4

La obtención de 4"-isovaleriltilosina a partir de tilosina.

Se efectua un cultivo y reacción similares a los del Ejemplo 1 sustituyendo L-leucina como donador de isovalerilo en vez de DL-norvalina. A partir de 60 g de tilosina y 15 g de L-leucina, se obtienen aproximadamente 900 g de cristales blancos de 4"-isovaleriltilosina y 17 g de cristales blancos de 3-acetiltilosina.
25

30 (p.f.: 4"-isovaleriltilosina 155°C)

1 3-acetiltilosina 218°C

Ejemplo 5

La obtención de 4"-isovalerilangolamicina a partir de angolamicina.

5 Se efectúan cultivo y reacción similares a las del Ejemplo 4 sustituyendo como substrato angolamicina en vez de tilosina. Se obtienen 1,1 g de cristales blancos de 4"-isovalerilangolamicina y aproximadamente 19 g de cristales blancos de 3-acetilangolamicina.

10 Ejemplo 6

La obtención de 4"-isovalerilespiramicina I a partir de espiramicina I.

15 Se efectúan cultivo y reacción similares a las del Ejemplo 4 sustituyendo como substrato espiramicina I en vez de tilosina. Se obtienen 0,8 g de cristales blancos de 4"-isovalerilespiramicina I y aproximadamente 17 g de polvo blanco de 3-acetilespiramicina I

Ejemplo 7

20 La acetilación de un radical hidroxilo en posición 3- y la acilación de un radical hidroxilo en posición 4"-.

25 Streptomyces thermotolerans ATCC 11416 en agar se inocula en el medio sembrado que consta de la misma composición que la descrita en el Ejemplo 1 y se cultiva a 37°C en un agitador rotativo. En una vasija de fermentación de 30 litros se colocan y esterilizan 15 litros de un medio que consta de 5 g/dl de glucosa, 1 g/dl de harina de soja 0,1 g/dl de extracto de levadura, 0,1 g/dl de PO_4HK_2 , 0,1 g/dl de $SO_4Mg.7H_2O$, 0,02 g/dl de $SO_4Mn.4-6H_2O$ y 0,1 g/dl de CO_3Ca (pH 7,0). Se añaden 150 ml de dicho cultivo sembrado y se
30 cultiva a 37°C en condiciones de aireación y agitación. Des-

1 pués de 24 horas, cuando la concentración de glucosa en el
medio se hace de 2 g/dl, se vierte asépticamente 1 litro
del citado caldo en cada uno de 9 fermentadores de vasija
de volúmenes de 2 litros. A cada uno de tres fermentadores
5 de vasija se añaden 2 g de tilosina, se añaden 2 g de angolamicina a cada uno de los tres siguientes fermentadores de vasija, y se añaden 2 g de espiramicina I a cada uno de los tres últimos fermentadores de vasija. Se lleva a cabo la reacción a 37°C en condiciones de aireación y agitación.
10 Después de tres horas se investiga la transformación de los antibióticos mediante cromatografía en capa fina. Cuando se ha transformado aproximadamente la mitad de los antibióticos añadidos a los 9 fermentadores de vasija, se forman los correspondientes compuestos que tienen un radical acéti-
15 lo en la posición 3- del anillo de macrólido. En este momento se añade 1 g de cada precursor del radical acilo deseado, es decir, DL-norvalina y L-leucina a cada uno de tres fermentadores de vasija en un grupo, y se ajusta el pH a 8,0. A los otros 3 fermentadores de vasija no se añaden precur-
20 sores. La reacción se lleva a cabo en las mismas condiciones que se describió anteriormente. Después que se ha terminado la reacción, cada parte de la mezcla de reacción se extrae con acetato de etilo, y se investiga por cromatografía en
25 capa fina la relación del substrato añadido y los compuestos obtenidos. Las mezclas de reacción finales se separan respectivamente, se filtran en condiciones débilmente ácidas y los filtrados se extraen con 0,5 litros de acetato de etilo en medio débilmente alcalino a 30°C. La capa de acetato de etilo se mezcla con 1,5 litros de agua débilmente acidifi-
30 cada. La capa acuosa recuperada se extrae con 0,4 litros de

1 acetato de etilo a un pH de 7,5, y la capa de acetato de e-
 tilo se concentra y seca para obtener 1,5-1,7 g de polvo
 blanco amarillento impuro. A partir de dicho polvo, se se-
 5 paran y purifican los productos esenciales, de acuerdo con
 los métodos de purificación de n-butiriltilosina empleados
 en el Ejemplo 1, mediante cromatografía en columna con gel
 de sílice y los citados polvos de los derivados de tilosina
 se disuelven en éter etílico, los derivados de angolamicina
 en acetato de etilo, y los derivados de espiramicina en ci-
 10 clohexano con objeto de cristalizarlos y se obtienen de
 0,5-0,8 g de cristales blancos de los mismos.

La interrelación entre substratos, precursores de CoA
 de acilo y productos se muestra en la Tabla 8

Tabla 8

15 Interrelación entre substratos, precursores de CoA de acilo
 y los productos

Substratos	Precursores de CoA de acilo	Producto esencial
Tilosina	-	3-acetiltilosina
20 tilosina	DL-norvalina	3-acetil-4"-n-butiriltilosina
tilosina	L-leucina	3-acetil-4"-isovaleriltilosina
angolamicina	-	3-acetilangolamicina
angolamicina	DL-norvalina	3-acetil-4"-n-butirilangola- micina
25 angolamicina	L-leucina	3-acetil-4"-isovalerilangola- micina
espiramicina I	-	espiramicina II
espiramicina I	DL-norvalina	4"-n-butirilesperamicina II
espiramicina I	L-leucina	4"-isovalerilesperamicina II

30

1 Ejemplo 8

Acilación en las posiciones 3- y 4"-.

5 Se prepara un cultivo de siembra que consta de la misma composición que la del Ejemplo 1 utilizando los mismos microorganismos. En un fermentador de vasija de un volumen total de 20 litros se colocan y esterilizan 10 litros de un medio que consta de 2 g/dl de almidón, 1 g/dl de peptona, 1 g/dl de extracto de levadura, 0,2 g/dl de PO_4HK_2 , 0,02 g/dl de $SO_4Mg.7H_2O$, 0,02 g/dl de $SO_4Mn.4-6H_2O$ y C, 1 g/dl de CO_3Ca (pH 7,0). Se inoculan 300 ml del citado cultivo de siembra y su cultivo se lleva a cabo a 37°C en condiciones de aireación y agitación. Después de 30 horas, el crecimiento de los microorganismos alcanza la fase estacionaria y cuando la glucosa añadida casi se ha consumido completamente (después de 36 horas), se vierten asépticamente 15 500 ml del caldo en cada uno de 9 fermentadores de vasija de un litro de volumen total. Se lleva a cabo la reacción añadiendo 500 mg de tilosina a cada uno de 3 fermentadores de vasija, se añaden 500 mg de angolamicina a cada uno de los tres siguientes fermentadores de vasija y 500 mg de espiramicina I a cada uno de los 3 últimos fermentadores de 20 vasija, y a cada uno de los 9 fermentadores de vasija se añaden 100 mg de ácido α -amino butírico y se lleva a cabo la reacción en las mismas condiciones que el cultivo. Durante la reacción, se examina intermitentemente la velocidad de transformación mediante cromatografía en capa fina. Después de 6 horas los substratos de antibióticos añadidos están casi completamente acilados en los correspondientes 25 compuestos que tienen un radical propionilo en la posición 3-. En este momento, se añade glucosa a todos los fermenta- 30

1 dores de vasija en la concentración de 1 g/dl y se ajusta el pH de la mezcla de reacción a 8,0.

5 Se continua la reacción añadiendo 200 mg de cada uno de DL-norvalina y L-leucina respectivamente a cada uno de los tres fermentadores de vasija que contienen tilosina. El tercer fermentador se deja como control. Lo mismo se aplica al grupo de fermentadores que contienen angolamicina y espiramicina I. Se continua la reacción del mismo modo que se describió anteriormente. Después de 48 horas de cultivo (es decir, 12 horas después de la adición de los anti-
10 bióticos), se termina la reacción. A partir de las mezclas de reacción se aíslan los productos principales por métodos similares a los del Ejemplo 7. Se obtienen 70-120 mg de cristales blancos de los productos que se muestran en la
15 Tabla 9.

Tabla 9

Interrelación entre substratos, precursores de CoA de acilo, y los productos

Substratos	precursores de CoA de acilo		Producto esencial
	acilación del radical hidroxilo en posición 3-	acilación del radical hidroxilo en posición 4"-	
Tilosina	ácido α -aminobutírico	-	3-propioniltilosina
25 Tilosina	ácido α -aminobutírico	DL-norvalina	3-propionil-4"-n-butiltilosina
Tilosina	ácido α -aminobutírico	L-leucina	3-propionil-4"-isovaleriltilosina
Angolamicina	ácido α -aminobutírico	-	3-propionilangolamicina
30 Angolamicina	ácido α -aminobutírico	DL-norvalina	3-propionil-4"-n-butilangolamicina

1	Angolamicina	ácido α -aminobutírico	L-leucina	3-propionil-4"-isovalerilangolamicina
	Espiramicina I	ácido α -aminobutírico	-	Espiramicina III
5	Espiramicina I	ácido α -aminobutírico	DL-norvalina	4"-n-butirilespiramicina III
	Espiramicina I	ácido α -aminobutírico	L-leucina	4"-isovalerilespiramicina III

Nota: Los derivados de tilosina, angolamicina y espiramicina que se obtienen en los Ejemplos 1-3 se analizan respectivamente y las estructuras se identifican mediante espectro UV, espectro IR, espectro de RMN, espectro de masas, punto de fusión, rotación específica, análisis elemental, cromatografía de gases de ácidos orgánicos que se desprenden por hidrólisis alcalina, etc., y si es necesario, los compuestos se comparan e identifican respectivamente por determinación de puntos de fusión mixtos y mediante cromatografía en capa fina.

Ejemplo 9

Se cultiva el mismo microorganismo que en el Ejemplo 1 utilizando los mismos métodos de cultivo, y se centrifugan 10 litros de caldo cultivado para recoger las células, que se suspenden en 5 litros de disolución reguladora de fosfato (pH 7,0). En cada uno de 46 matraces de 500 ml de volumen se colocan 100 ml de la citada suspensión en la disolución reguladora. Se añaden a dichos matraces 100 mcg/ml de substratos y 0,1 g/dl de precursores de acilo, según se indica en la Tabla 10 y se lleva a cabo la reacción durante 12 horas a 37°C en condiciones de agitación. Las mezclas que han reaccionado se ajustan hasta que están débilmente alcalinas y se extraen los productos con benceno para ana-

1 lizarlos por cromatografía en capa fina. Los productos se
 identifican por comparación con derivados auténticos de
 tilosina, angolamicina y espiramicina; empleando técnicas
 de desarrollo en paralelo y de desarrollo de doble mancha.
 5 La interrelación entre el substrato, los precursores de
 acilo y los productos se muestra en la Tabla 10

Tabla 10-1

Interrelación entre substratos, precursores de acilo y pro-
 ductos

10	Substratos	Precursores de acilo	Productos
	Tilosina	ácido α -cetobutírico	3-propioniltilosina
	Tilosina	propionato sódico	3-propioniltilosina
	4"-n-butiriltilosina	ácido α -cetobutírico	3-propionil-4"-n-butiriltilosina
15	4"-n-butiriltilosina	propionato sódico	3-propionil-4"-n-butiriltilosina
	4"-isovaleriltilosina	ácido α -cetobutírico	3-propionil-4"-isovaleriltilosina
	4"-isovaleriltilosina	propionato sódico	3-propionil-4"-isovaleriltilosina
20	3-acetiltilosina	ácido α -ceto-n-valérico	3-acetil-4"-n-butiriltilosina
	3-acetiltilosina	n-butirato sódico	3-acetil-4"-n-butiriltilosina
	3-acetiltilosina	n-butirato de etilo	3-acetil-4"-n-butiriltilosina
	3-acetiltilosina	n-butirilamida	3-acetil-4"-n-butiriltilosina
25	Tilosina	ácido isovalérico	4"-isovaleriltilosina
	Tilosina	isovalerato de etilo	4"-isovaleriltilosina
	Tilosina	isovalerilamida	4"-isovaleriltilosina
	3-acetiltilosina	ácido isovalérico	3-acetil-4"-isovaleriltilosina

1	3-acetiltilosina	isovalerato de etilo	3-acetil-4"-isovaleriltilosina
	3-acetiltilosina	isovalerilamida	3-acetil-4"-isovaleriltilosina

5

Tabla 10-2

Interrelación entre sustratos, precursores de acilo y productos

	Substratos	Precursores de acilo	Productos
10	Angolamicina	ácido α -cetobutírico	3-propionilangolamicina
	Angolamicina	propionato sódico	3-propionilangolamicina
15	4"-n-butilangolamicina	ácido α -cetobutírico	3-propionil-4"-n-butilangolamicina
	4"-n-butilangolamicina	propionato sódico	3-propionil-4"-n-butilangolamicina
	4"-isovalerilangolamicina	ácido α -cetobutírico	3-propionil-4"-isovalerilangolamicina
	4"-isovalerilangolamicina	propionato sódico	3-propionil-4"-isovalerilangolamicina
20	3-acetilangolamicina	ácido α -ceto-n-valérico	3-acetil-4"-n-butilangolamicina
	3-acetilangolamicina	ácido n-butírico	3-acetil-4"-n-butilangolamicina
	3-acetilangolamicina	n-butilato de etilo	3-acetil-4"-n-butilangolamicina
25	3-acetilangolamicina	n-butililamida	3-acetil-4"-n-butilangolamicina
	Angolamicina	ácido isovalérico	4"-isovalerilangolamicina
	Angolamicina	isovalerato de etilo	4"-isovalerilangolamicina
30	Angolamicina	isovalerilamida	4"-isovalerilangolamicina
	3-acetilangolamicina	ácido isovalérico	3-acetil-4"-isovalerilangolamicina

1	3-acetilangolamicina	isovalerato de etilo	3-acetil-4"-isovalerilangolamicina
	3-acetilangolamicina	isovalerilamida	3-acetil-4"-isovalerilangolamicina

5

Tabla 10-3

Interrelación entre sustratos, precursores de acilo y productos

	Substratos	Precursores de acilo	Productos
10	Espiramicina I	ácido α -cétobutírico	espiramicina III
	Espiramicina I	propionato sódico	espiramicina III
15	4"-n-butirilespiramicina I	ácido α -cétobutírico	4"-n-butirilespiramicina III
	4"-n-butirilespiramicina I	propionato sódico	4"-n-butirilespiramicina III
	4"-isovalerilespiramicina I	ácido α -cétobutírico	4"-isovalerilespiramicina III
	4"-isovalerilespiramicina I	propionato sódico	4"-isovalerilespiramicina III
20	Espiramicina II	ácido α -ceto-n-valérico	4"-n-butirilespiramicina II
	Espiramicina II	ácido n-butírico	4"-n-butirilespiramicina II
	Espiramicina II	n-butirato de etilo	4"-n-butirilespiramicina II
	Espiramicina II	n-butirilamida	4"-n-butirilespiramicina II
25	Espiramicina I	ácido isovalérico	4"-isovalerilespiramicina I
	Espiramicina I	isovalerato de etilo	4"-isovalerilespiramicina I
	Espiramicina I	isovalerilamida	4"-isovalerilespiramicina I
30	Espiramicina II	ácido isovalérico	4"-isovalerilespiramicina II

1	Espiramicina II	isovalerato de etilo	4"-isovalerilespiramicina II
	Espiramicina II	isovalerilamida	4"-isovalerilespiramicina II

5 Ejemplo 10

10 Como microorganismos se emplearon Streptomyces thermotolerans ATCC 11416, Streptomyces fungicidicus subsp. espinomuceticus ATCC 21574, Streptomyces hygrosopicus ATCC 21582 y Streptomyces mycarofaciens ATCC 21454 respectivamente y su cultivo y reacción se llevan a cabo de modo similar excepto en la temperatura de cultivo como sigue:

15 Se emplea el mismo medio que en el Experimento 1. La Streptomyces thermotolerans ATCC 11416 se cultiva a 37°C y las otras cepas se cultivan a 28°C en un agitador rotativo. Después de 30 horas, se filtran 1.200 ml del caldo (12 matraces) para recoger las células vivas, que se suspenden en 1.200 ml de disolución reguladora de clorhidrato de tris(hidroximetil)-aminometano (pH 7,2 M/10) y se rompen las células mediante una prensa francesa. Se colocan 3 ml de cada
20 una de las citadas disoluciones reguladoras que contienen las células destruidas en fermentadores de tubo de ensayo del tipo L. A cada fermentador se añaden 40 mcg/ml de antibióticos como sustrato y a continuación distintas clases de CoA de acilo que se registran en la Tabla 11 en sus concentraciones molares equivalentes. Los fermentadores se agitan del principio al final de la reacción durante una hora. La reacción se finaliza añadiendo una disolución reguladora de glicina-NaOH. Los productos se extraen con benceno y se identifican del mismo modo que en el Experimento.
25 Se obtienen resultados similares con los microorganismos

30

1 descritos anteriormente.

En la Tabla 11 se muestra la interrelación entre los substratos, la CoA de acilo y los productos.

Tabla 11-1

5 Interrelación entre substratos, CoA de acilo y productos

Substratos	CoA de acilo	Productos
Tilosina	CoA de acetilo	3-acetiltilosina
Tilosina	CoA de propionilo	esencialmente 3-propioniltilosina
Tilosina	CoA de n-butirilo	esencialmente 4"-n-butiriltilosina
Tilosina	CoA de isovalerilo	4"-isovaleriltilosina
3-acetiltilosina	CoA de acetilo	Sin reacción
3-acetiltilosina	CoA de n-butirilo	3-acetil-4"-n-butiriltilosina
3-acetiltilosina	CoA de isovalerilo	3-acetil-4"-isovaleriltilosina
3-propioniltilosina	CoA de n-butirilo	3-propionil-4"-n-butiriltilosina
3-propioniltilosina	CoA de isovalerilo	3-propionil-4"-isovaleriltilosina
4"-n-butiriltilosina	CoA de acetilo	3-acetil-4"-n-butiriltilosina
4"-n-butiriltilosina	CoA de propionilo	3-propionil-4"-n-butiriltilosina
4"-isovaleriltilosina	CoA de acetilo	3-acetil-4"-isovaleriltilosina
4"-isovaleriltilosina	CoA de propionilo	3-propionil-4"-isovaleriltilosina

10

15

20

25

30

1

Tabla 11-2

Interrelación entre sustratos, CoA de acilo y productos

5

10

15

20

25

30

Substratos	CoA de acilo	Productos
Angolamicina	CoA de acetilo	3-acetilangolamicina
Angolamicina	CoA de propionilo	esencialmente 3-propionilangolamicina
Angolamicina	CoA de n-butililo	esencialmente 4"-n-butirilangolamicina
Angolamicina	CoA de isovalerilo	4"-isovalerilangolamicina
3-acetilangolamicina	CoA de acetilo	Sin reacción
3-acetilangolamicina	CoA de n-butililo	3-acetil-4"-n-butirilangolamicina
3-acetilangolamicina	CoA de isovalerilo	3-acetil-4"-isovalerilangolamicina
3-propionilangolamicina	CoA de n-butililo	3-propionil-4"-n-butirilangolamicina
3-propionilangolamicina	CoA de isovalerilo	3-propionil-4"-isovalerilangolamicina
4"-n-butirilangolamicina	CoA de acetilo	3-acetil-4"-n-butirilangolamicina
4"-n-butirilangolamicina	CoA de propionilo	3-propionil-4"-n-butirilangolamicina
4"-isovalerilangolamicina	CoA de acetilo	3-acetil-4"-isovalerilangolamicina
4"-isovalerilangolamicina	CoA de propionilo	3-propionil-4"-isovalerilangolamicina

	<u>Ingrediente</u>	<u>Peso (mg)</u>
1	A) 3-acetil-4"-isovalerilangolamicina	200
	Carboximetilcelulosa sódica	8
	Lactosa	172
5	Almidón de maíz	20
	Estearato magnésico	2
	B) 3-propionil-4"-n-butiriltilosina	100
	Tragacanto	4
	Lactosa	82,5
10	Almidón de maíz	10
	Talco	2
	Estearato magnésico	1,5

Ejemplo 12

15 De la manera habitual se prepararon cápsulas llenas secas adecuadas para administración oral que contienen los siguientes ingredientes.

	<u>Ingrediente</u>	<u>Peso (mg)</u>
	3-acetil-4"-isovaleriltilosina	200
20	Diluyente sólido inerte (por ejemplo, almidón, lactosa)	198
	Estearato magnésico	2

Las pastillas y cápsulas así preparadas se administran a un paciente en una dosis de 2-4 cápsulas por día.

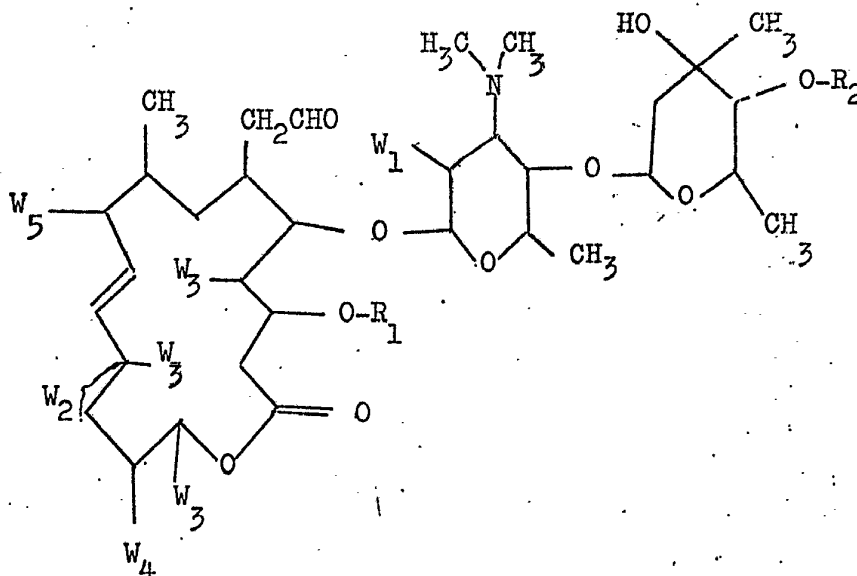
25 Los ejemplos procedentes se pueden repetir con fortuna similar sustituyendo los reactivos genéricamente y específicamente descritos y en las condiciones de trabajo de esta invención para los utilizados en los ejemplos precedentes.

30

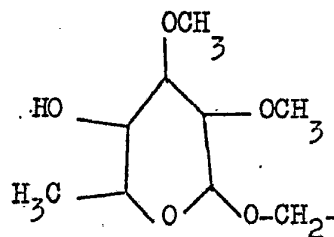
1 En resumen, la Patente de Invención que se solicita
deberá recaer sobre las siguientes

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para la obtención de derivados
acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de sa-
les de adición de ácidos de los mismos, que consiste en la
acilación de por lo menos un radical hidróxilo en las posici-
10 nes 3- y 4"- de un sustrato antibiótico macrólido, represen-
tado por la fórmula:

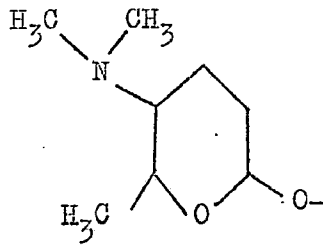


20 en la que ambos, R₁ y R₂, son hidrógeno o uno de ellos es
hidrógeno y el otro es un radical acilo C₂-C₅; W₁ es hidró-
geno o hidroxilo; W₂ es un doble enlace o un grupo -O-; W₃
es hidrógeno, metilo, etilo o metoxilo W₄ es hidrógeno o un
25 radical de fórmula



30 y W₅ es O= o un radical de fórmula

1



5

mediante un microorganismo que pertenece al género Streptomyces y que es capaz de acilar por lo menos un radical hidroxilo en la posición 3- y 4" del sustrato de antibiótico macrólido de 16 eslabones en presencia de donadores de acilo C₂-C₅."

10

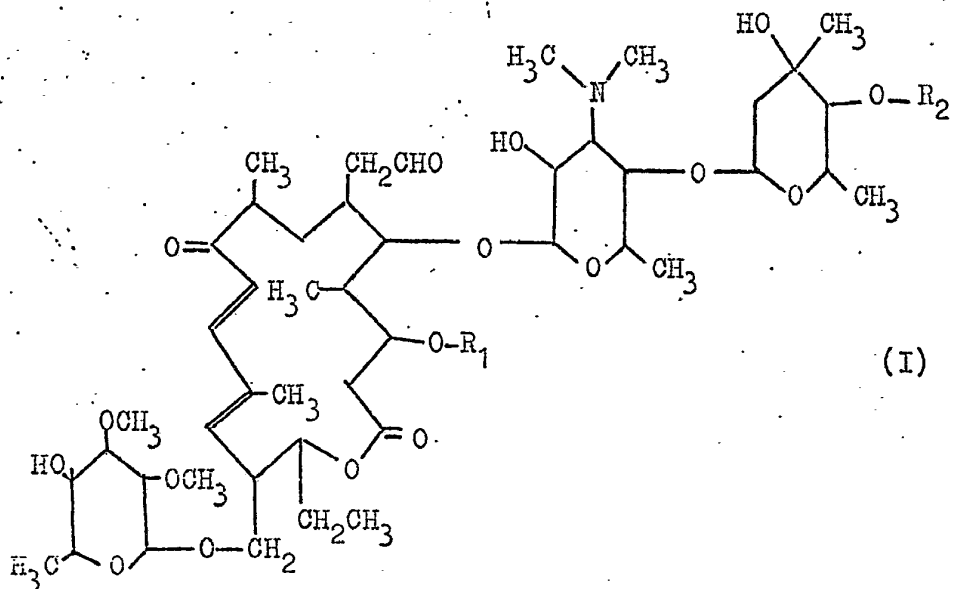
2. Un procedimiento para la obtención de derivados acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sustrato de antibiótico macrólido de 16 eslabones se elige del grupo que consta de tilosina y los derivados de la misma que tienen la fórmula general I

15

20

25

30



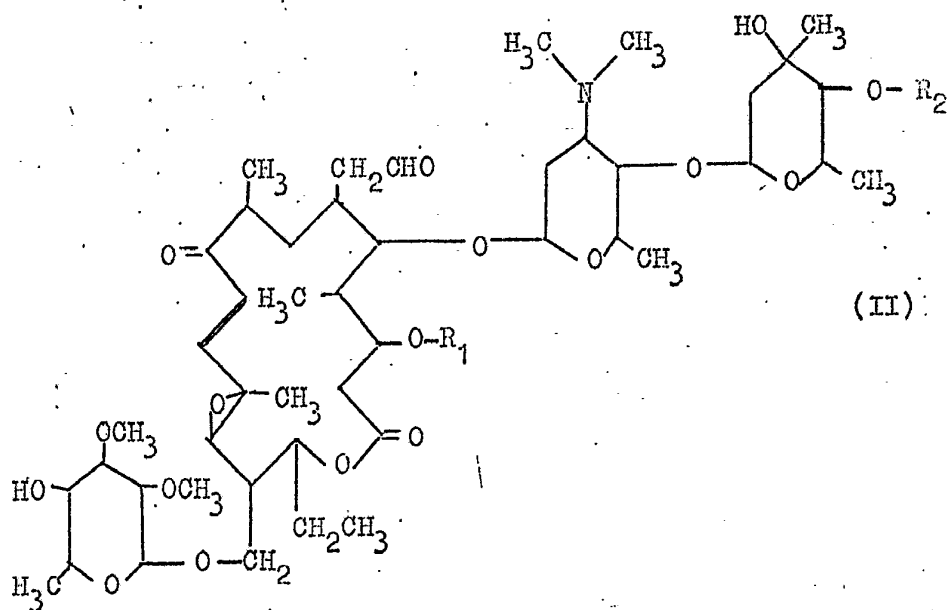
1 en la que ambos, R_1 y R_2 , son H, o uno de ellos es H y el otro es un radical acilo de C_2-C_5 .

3. Un procedimiento para la obtención de derivados acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de
5 las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el substrato de antibiótico macrólido de 16 eslabones se elige del grupo que consta de angolamicina y sus derivados que tienen la fórmula general II.

10

15

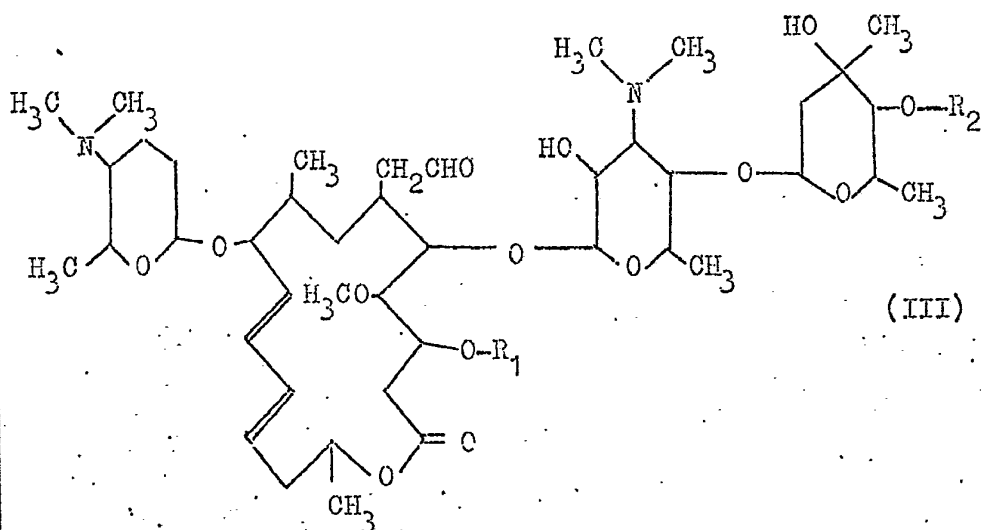
20



en la que ambos, R_1 y R_2 , son H, o uno de ellos es H y el otro es un radical acilo de C_2-C_5 .

4. Un procedimiento para la obtención de derivados acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de las
25 sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el substrato de antibiótico macrólido de 16 eslabones se elige del grupo que consta de espiremicina y sus derivados que tienen la fórmula general III.

30



en la que ambos, R_1 y R_2 , son H, o uno de ellos es H y el otro es un radical acilo de C_2-C_5 .

5. Un procedimiento para la obtención de derivados acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se utiliza un microorganismo que pertenece al género Streptomyces y es capaz de acilar por lo menos uno de los radicales hidroxilo en las posiciones 3- y 4"- del substrato de antibiótico macrólido de 16 eslabones, que se elige del grupo que consta de Streptomyces thermotolerans ATCC 11416, Streptomyces fungicidicus subsp. espinomiceticus ATCC 21574, Streptomyces mycarofaciens ATCC 21454 y Streptomyces hygroscopicus ATCC 21582 en presencia de un donador de acilo de C_2-C_5 .

25

30

6. Un procedimiento para la obtención de derivados acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que la acilación se lleva a cabo en el caldo de cultivo de un microorganismo que pertenece al género Streptomyces y que es capaz de aci-

1 lar por lo menos uno de los radicales hidroxilo en las po-
siciones 3- y 4"- del substrato de antibiótico macrólido,
de 16 eslabones, en presencia de por lo menos un donador
de acilo elegido del grupo que consta de CoA de acetilo,
5 CoA de propionilo, CoA de n-butirilo, CoA de isovalerilo y
los precursores de las CoAs de acilo.

7. Un procedimiento para la obtención de derivados a-
cilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de las
sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con la
10 reivindicación 6, en el que se ajustan una cantidad de la
fuente de carbono y de la de nitrógeno en el medio y una
clase de substrato dependiendo de los radicales acilo uti-
lizados para la acilación de los radicales hidroxilo en las
posiciones 3- y 4"- del substrato de antibiótico macrólido
de 16 eslabones.
15

8. Un procedimiento para la obtención de derivados a-
cilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de las
sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con cual-
quiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se utiliza
20 un microorganismo en forma de una suspensión de células en
un medio líquido elegido del grupo que consta de agua, diso-
lución reguladora y filtrado de caldo, en presencia de por
lo menos un donador de acilo elegido del grupo que consta
de CoA de acetilo, CoA de propionilo, CoA de n-butirilo,
25 CoA de isovalerilo y los precursores de las CoAs de acilo,
siendo preparada dicha suspensión mediante cultivo de un
microorganismo que pertenece al género Streptomyces que es
capaz de acilar por lo menos un radical hidroxilo en las
posiciones 3- y 4"- del substrato de antibiótico macrólido
30 de 16 eslabones, recogida de las células así obtenidas y

1 suspensión de las mismas en dicho medio líquido.

5 9. Un procedimiento para la obtención de derivados acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que la acilación se lleva a cabo enzimáticamente en presencia de una preparación de enzimas de un microorganismo que pertenece al género Streptomyces y es capaz de acilar por lo menos un radical hidroxilo en las posiciones 3- y 4"- del sustrato de antibiótico macrólido de 16 eslabones y en presencia de por lo menos un donador de acilo elegido del grupo que consta de CoA de acetilo, CoA de propionilo, CoA de n-butililo y CoA de isovalerilo.

10 10. Un procedimiento para la obtención de derivados acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que se acila el radical hidroxilo en la posición 3- del sustrato de antibiótico macrólido de 16 eslabones en el cual R₂ en la posición 4"- es hidrógeno o radical acilo.

15 11. Un procedimiento para la obtención de derivados acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la acilación del radical hidroxilo en la posición 3- del sustrato de antibiótico macrólido de 16 eslabones en el cual R₂ en la posición 4"- es hidrógeno, es acetilación.

20 12. Un procedimiento para la obtención de derivados acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con

25

30

1 la reivindicación 10, en el que la acilación del radical
hidroxilo en la posición 3- del substrato de antibiótico ma-
crólido de 16 eslabones en el cual R_2 en la posición 4"- es
el radical n-butililo es acetilación.

5 13. Un procedimiento para la obtención de los deriva-
dos acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y
de las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo
con la reivindicación 10, en el que la acilación del radical
10 hidroxilo en la posición 3- del substrato de antibiótico
macrólido de 16 eslabones en el cual R_2 en la posición 4"-
es el radical isovalerilo, es acetilación.

15 14. Un procedimiento para la obtención de derivados
acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de
las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con
la reivindicación 10, en el que la acilación del radical
hidroxilo en la posición 3- del substrato de antibiótico
macrólido de 16 eslabones en el cual R_2 en la posición 4"-
es hidrógeno, es propionilación.

20 15. Un procedimiento para la obtención de derivados
acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de
las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con
la reivindicación 10, en el que la acilación del radical
hidroxilo en la posición 3- del substrato de antibiótico ma-
crólido de 16 eslabones en el cual R_2 en la posición 4"-
25 es el radical n-butililo, es propionilación.

30 16. Un procedimiento para la obtención de derivados
acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de
las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con
la reivindicación 10, en el que la acilación del radical
hidroxilo en la posición 3- del substrato de antibiótico ma-

1 crólido de 16 eslabones en el cual R_2 en la posición 4"-
es el radical isovalerilo, es propionilación.

5 17. Un procedimiento para la obtención de derivados
acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de
las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con
cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que se aci-
la el radical hidroxilo en la posición 4"- del substrato
de antibiótico macrólido de 16 eslabones en el cual R_1 en
la posición 3- es hidrógeno o radical acilo.

10 18. Un procedimiento para la obtención de derivados
acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de
las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con
la reivindicación 17, en el que la acilación del radical
hidroxilo en la posición 4"- del substrato de antibiótico
15 macrólido de 16 eslabones en el cual R_1 en la posición 3-
es hidrógeno, es n-butirilación.

20 19. Un procedimiento para la obtención de derivados
acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de
las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con
la reivindicación 17, en el que la acilación del radical
hidroxilo en la posición 4"- del substrato de antibiótico
macrólido de 16 eslabones en el cual R_1 en la posición 3-
es hidrógeno, es isovalerilación.

25 20. Un procedimiento para la obtención de derivados
acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de
las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con
la reivindicación 17, en el que la acilación del radical
hidroxilo en la posición 4"- del substrato de antibiótico
macrólido de 16 eslabones en el cual R_1 en la posición 3-
30 es el radical acetilo, es n-butirilación.

1 20. Un procedimiento para la obtención de derivados
acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de
las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con
la reivindicación 17, en el que la acilación del radical
5 hidroxilo en la posición 4"- del substrato de antibiótico
macrólido de 16 eslabones en el cual R_1 en la posición 3-
es el radical acetilo, es n-butililación.

10 21. Un procedimiento para la obtención de derivados
acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de
las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con
la reivindicación 17, en el que la acilación del radical
hidroxilo en la posición 4"- del substrato de antibiótico
macrólido de 16 eslabones en el cual R_1 en la posición 3-
es el radical acetilo, es isovalerilación.

15 22. Un procedimiento para la obtención de derivados
acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y las
sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con la
reivindicación 17, en el que la acilación del radical hidro-
xilo en la posición 4"- del substrato de antibiótico macró-
20 lido de 16 eslabones en el cual R_1 en la posición 3- es el
radical propionilo, es n-butililación.

25 23. Un procedimiento para la obtención de derivados
acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de
las sales de adición ácida de los mismos de acuerdo con la
reivindicación 17, en el que la acilación del radical hidro-
xilo en la posición 4"- del substrato de antibiótico macró-
lido de 16 eslabones en el cual R_1 en la posición 3- es el
radical propionilo, es isovalerilación

30 24. Un procedimiento para la obtención de derivados
acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de

1 las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con
la reivindicación 1, en el que el radical hidroxilo en las
posiciones 3- y 4"- del substrato de antibiótico macrólido
de 16 eslabones, se acila cada uno con diferentes radicales
5 acilo.

25. Un procedimiento para la obtención de derivados
acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de
las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con
la reivindicación 24, en el que la acilación del radical
10 hidroxilo en la posición 3- del substrato de antibiótico
macrólido de 16 eslabones, es acetilación y la acilación
del radical hidroxilo en la posición 4"- del mismo es n-bu-
tirilación.

26. Un procedimiento para la obtención de derivados
15 acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de
las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con
la reivindicación 24, en el que la acilación del radical
hidroxilo en la posición 3- del substrato de antibiótico
macrólido de 16 eslabones, es acetilación y la acilación
20 del radical hidroxilo en la posición 4"- del mismo es iso-
valerilación.

27. Un procedimiento para la obtención de derivados
acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de
las sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con
la reivindicación 24, en el que la acilación del radical
25 hidroxilo en la posición 3- del substrato del antibiótico
macrólido de 16 eslabones, es propionilación y la acilación
del radical hidroxilo en la posición 4"- del mismo es n-bu-
tirilación.

30 28. Un procedimiento para la obtención de derivados

1 acilados de antibióticos macrólidos de 16 eslabones y de las
sales de adición de ácido de los mismos de acuerdo con la
reivindicación 24, en el que la acilación del radical hidro-
xilo en la posición 3- del substrato de antibiótico macróli-
5 do de 16 eslabones, es propionilación y la acilación del ra-
dical hidroxilo en la posición 4"- del mismo es isovalerila-
ción.

29. Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:

10 UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE DERIVADOS ACILADOS DE
ANTIBIOTICOS.

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva que consta de ochenta y dos
páginas mecanografiadas y dibujos que se acompañan.

15

Madrid, 30 julio 1.976

BERNARDO UNGRIA

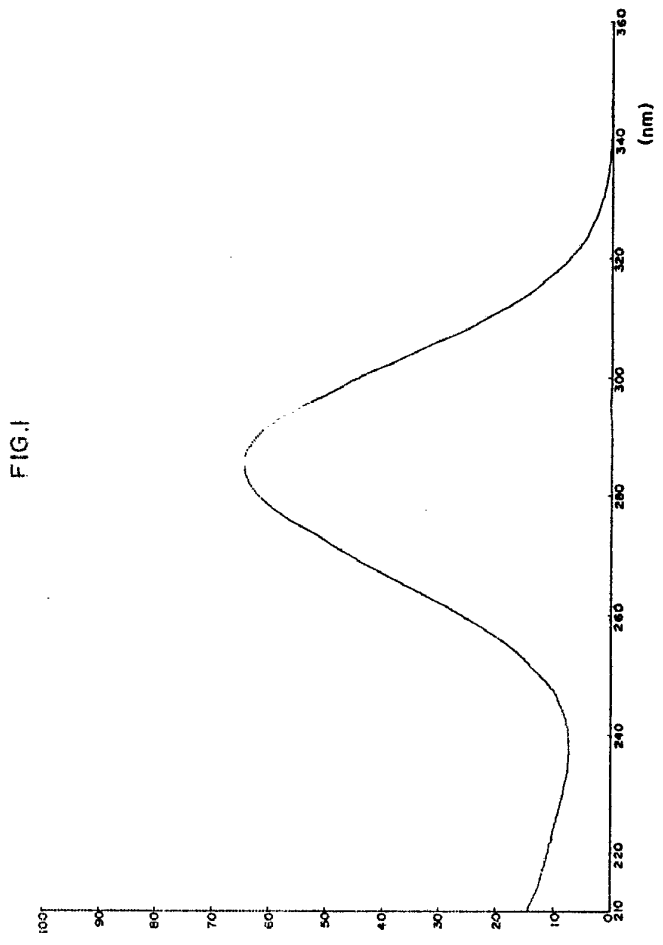
P.P.



20

25

30



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE JULIO DE 1976
BERNARDO UNGRICH
P. P.

FIG. 1

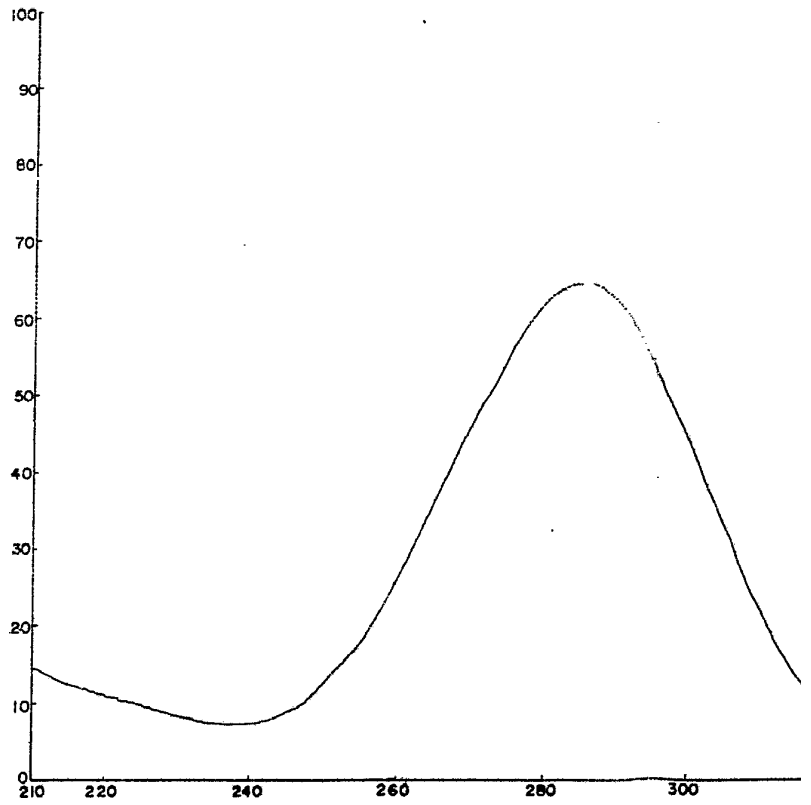
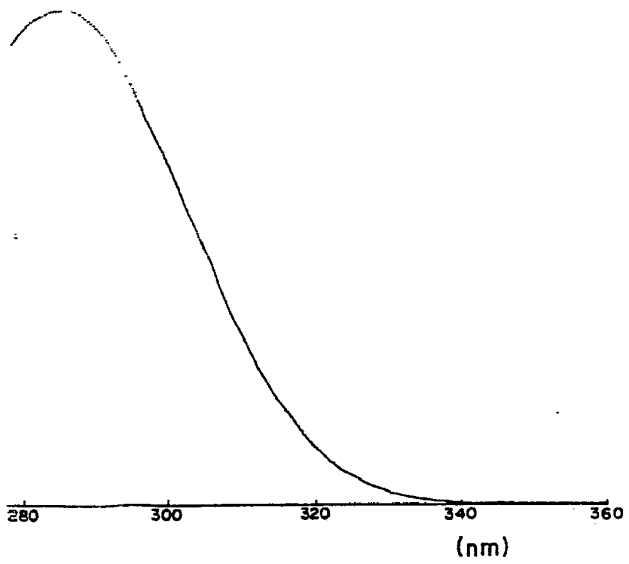
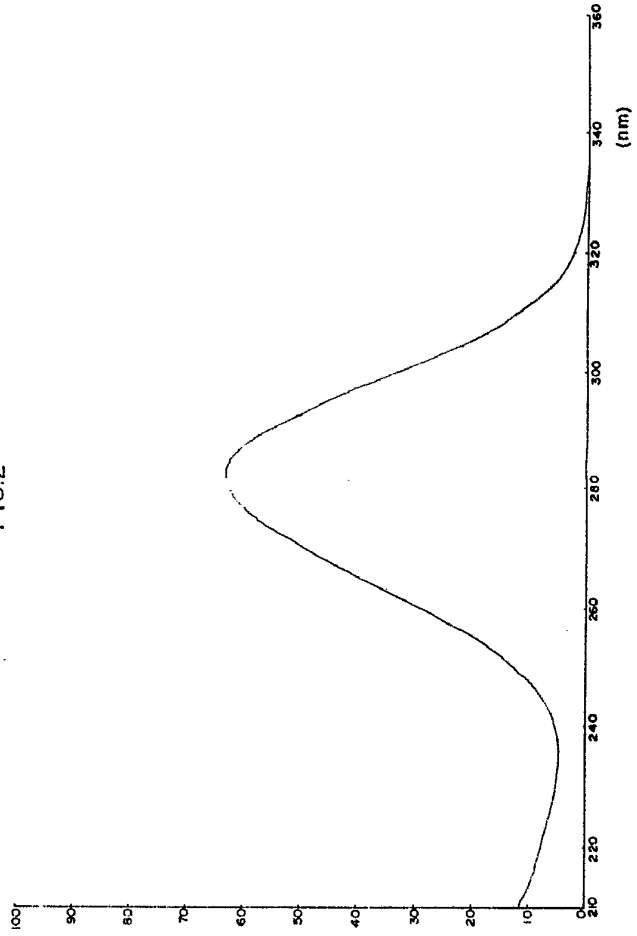


FIG. I



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
BERNARDO UNGRÍA
P. P.

FIG.2



ESCALA VARIABLE
MADRID 30 DE JULIO DE 1976.
BERNARDO UNGER
P.R.

FIG.2

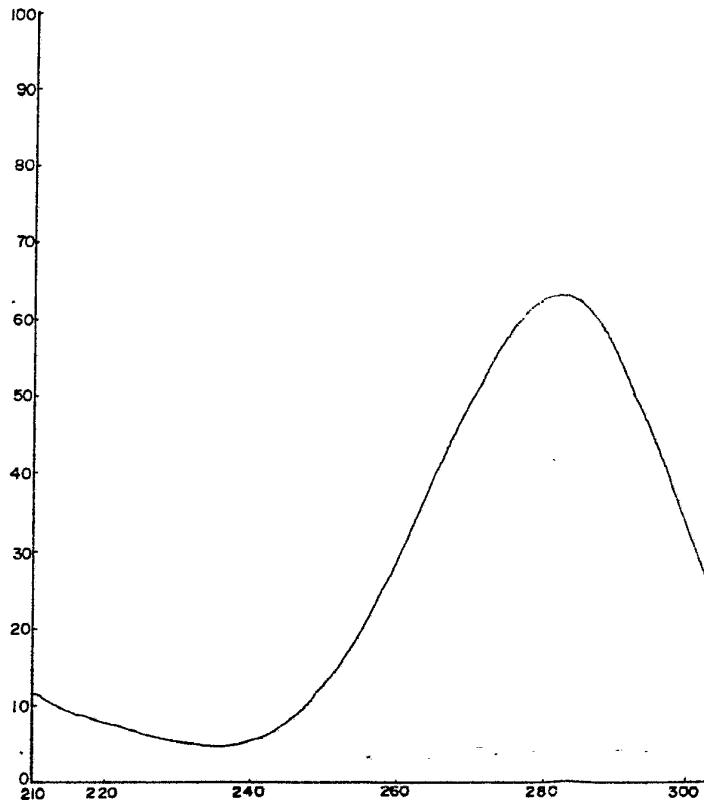
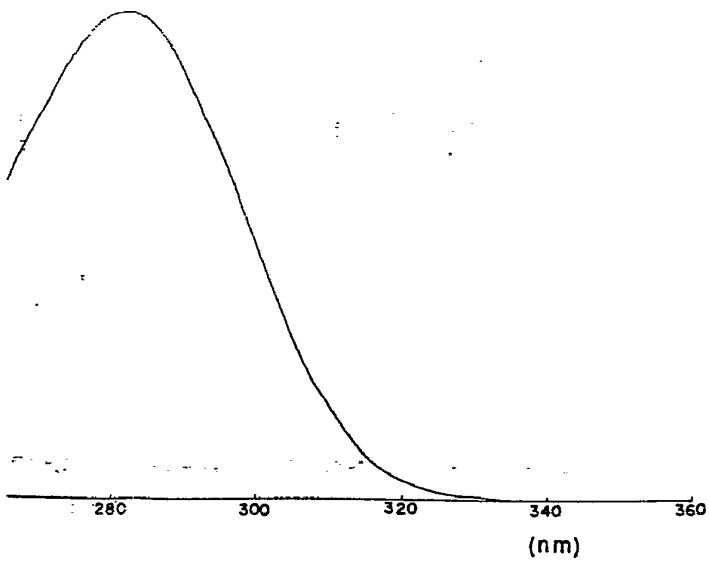
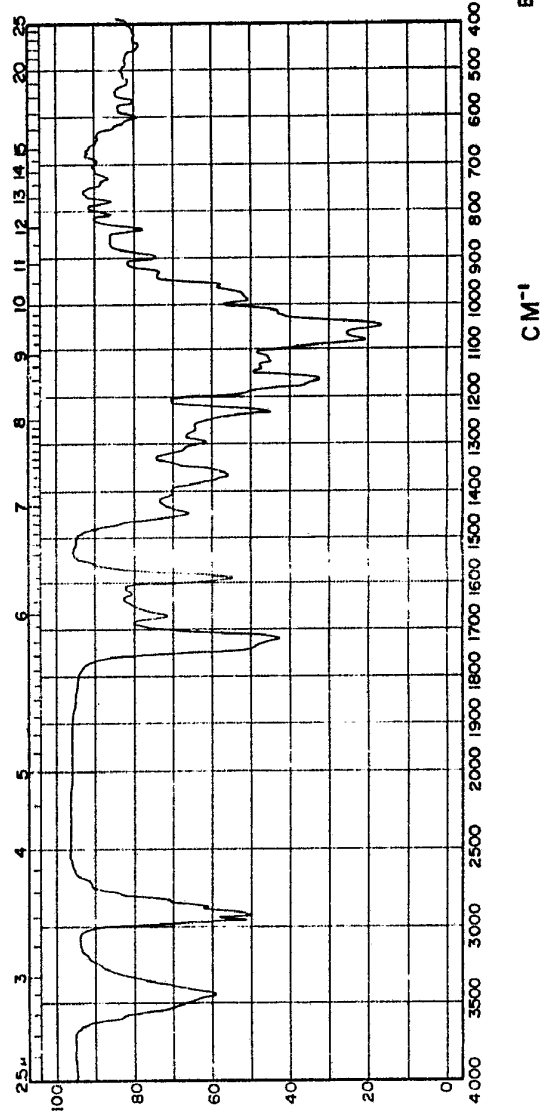


FIG.2



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976.
BERNARDO UNGRIG
P. R.

FIG.3



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
BERNARDO URGOLA
F. P.

FIG.3

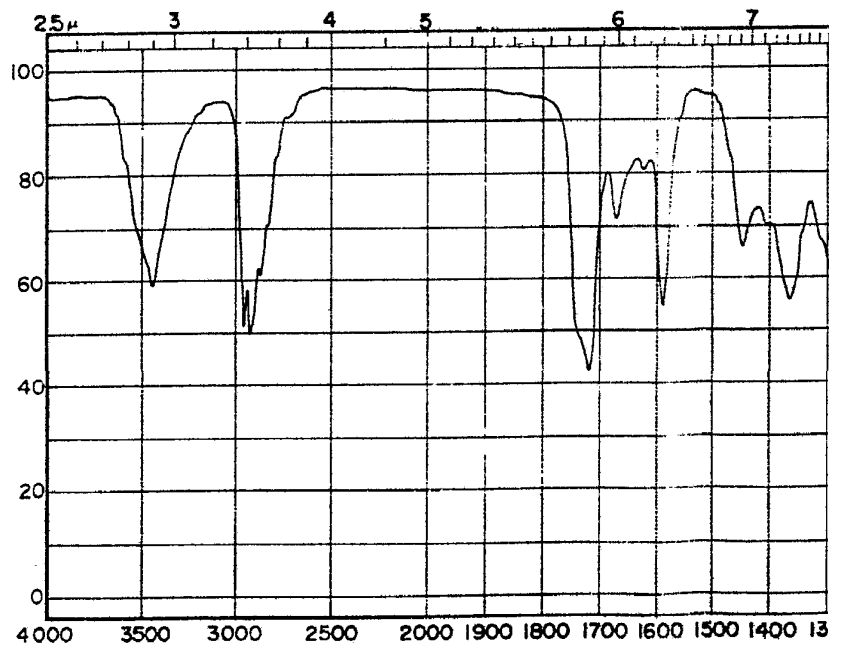
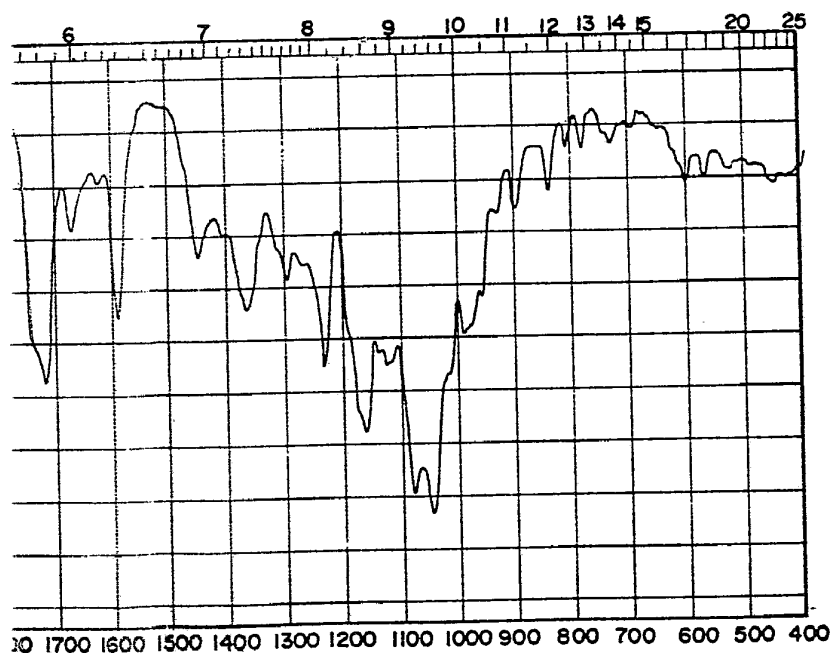


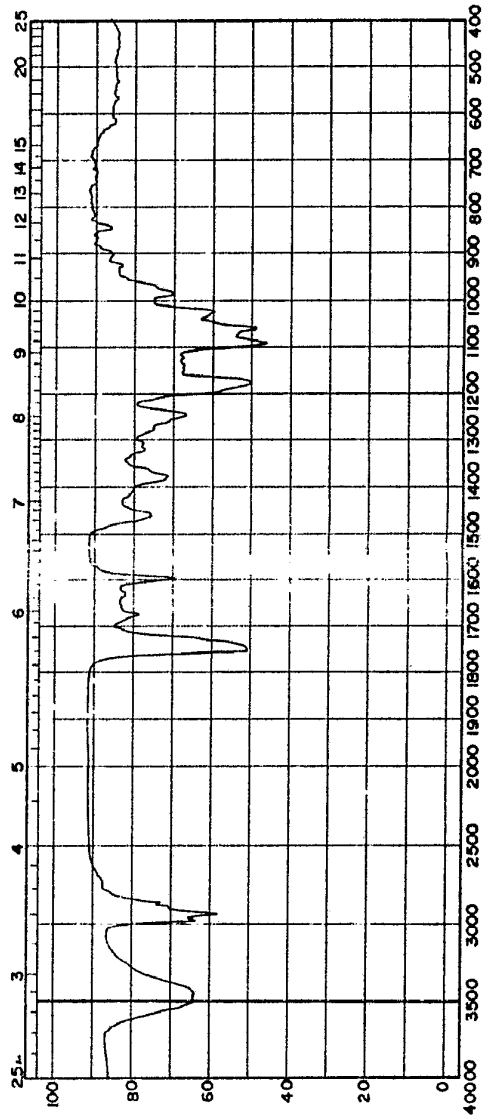
FIG.3



CM^{-1}

ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
BERNARDO UNGRÍA
F. E.

FIG.4



CM⁻¹

ESCALA VARIABLE
MADRID 30.7.76 Julio DE 1976
INSTITUTO DE CARBON
MADRID

FIG. 4

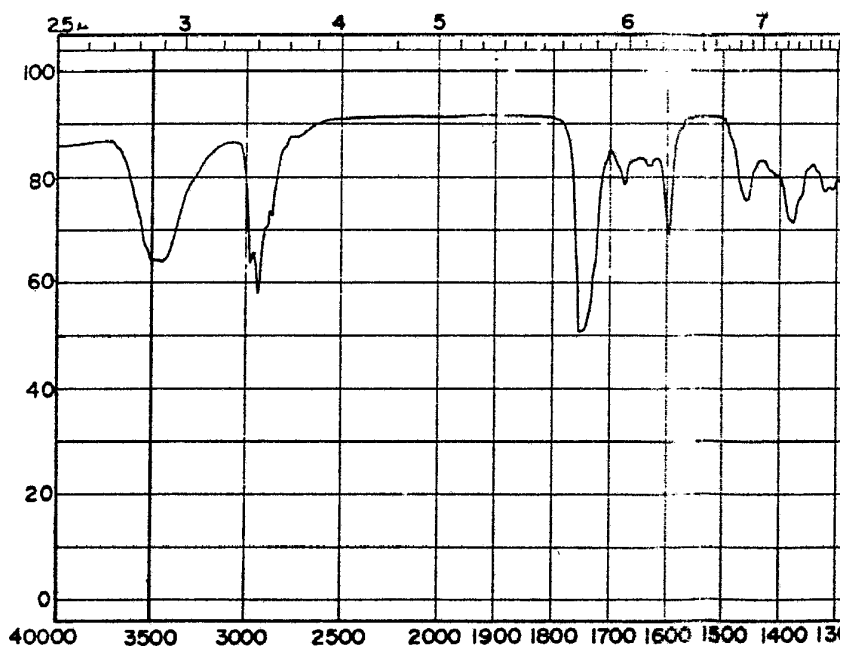
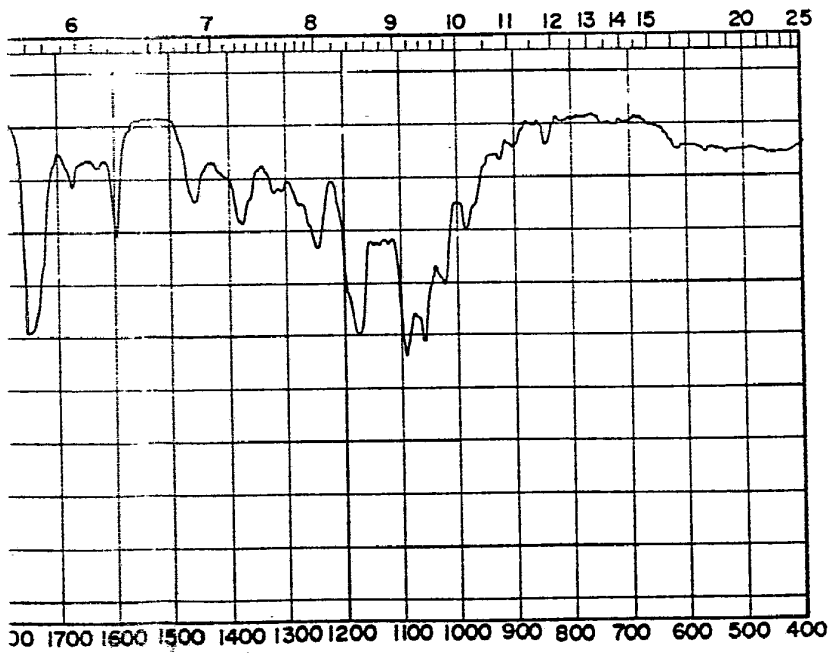


FIG. 4



CM^{-1}

ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
BERNARDO UNGER
P. P.

FIG. 5

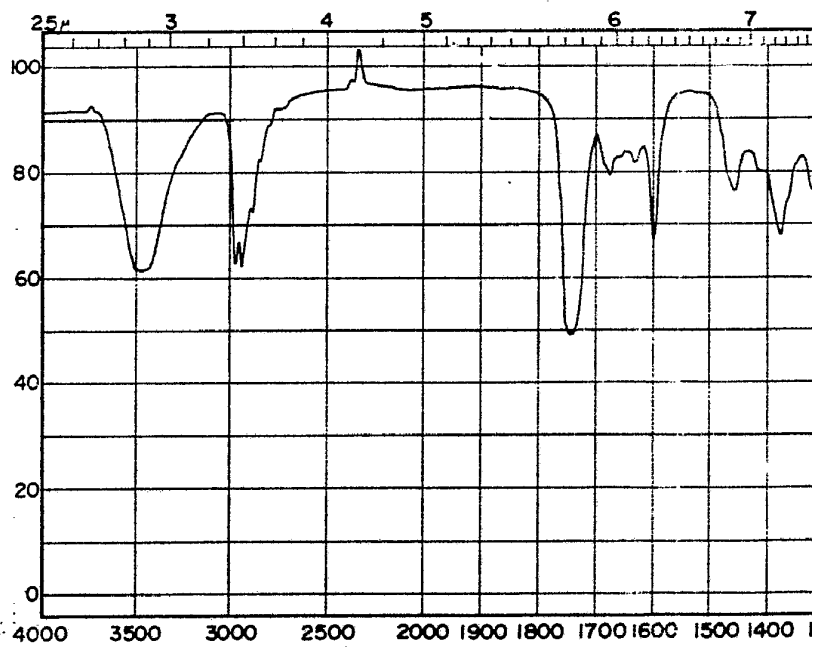
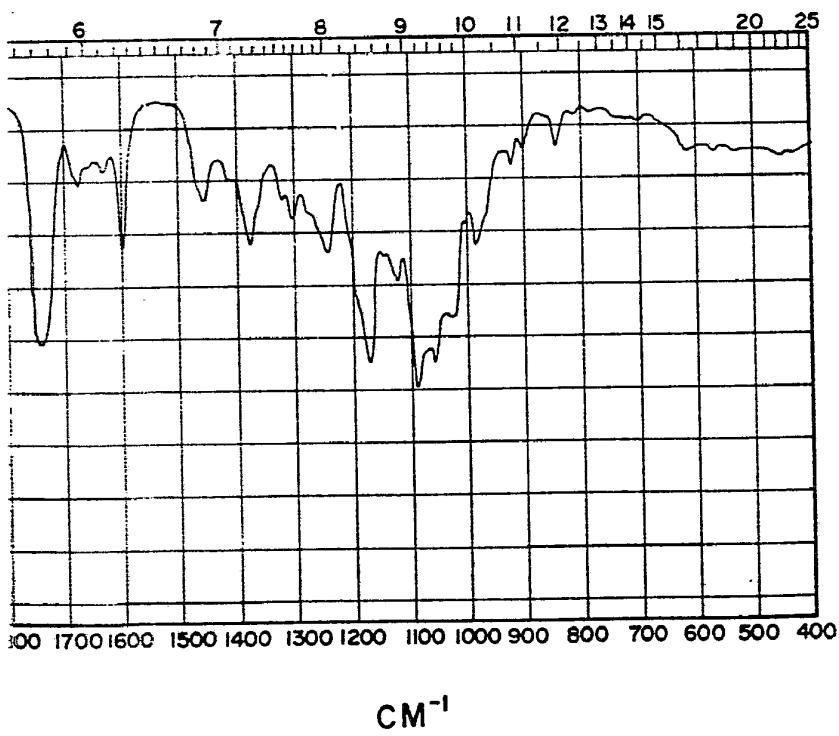
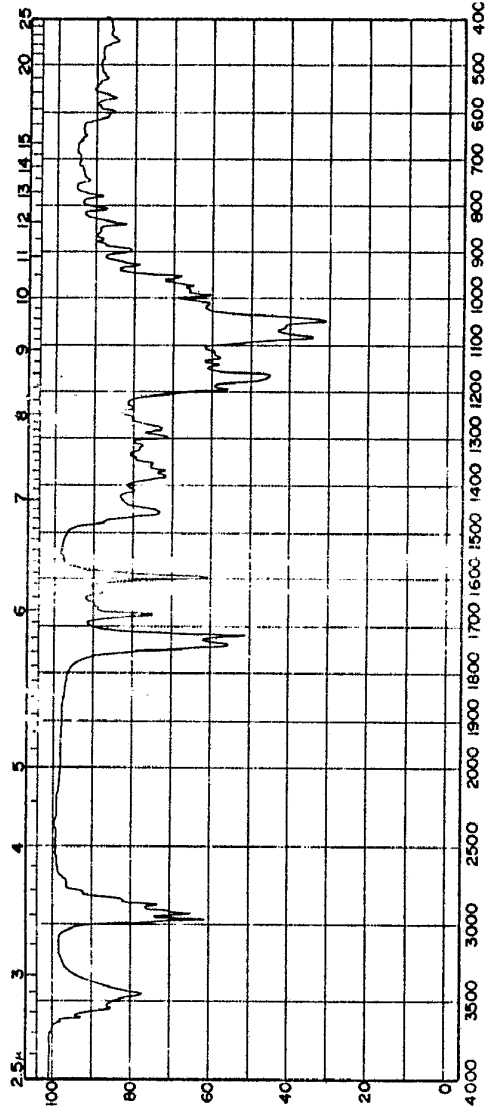


FIG.5



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
BERNARDO UÑEDA
P. P.

FIG.6



CM⁻¹

FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION
MADRID 30 Julio 1976
SERVICIO DE INVESTIGACION
P. N. 1

FIG.6

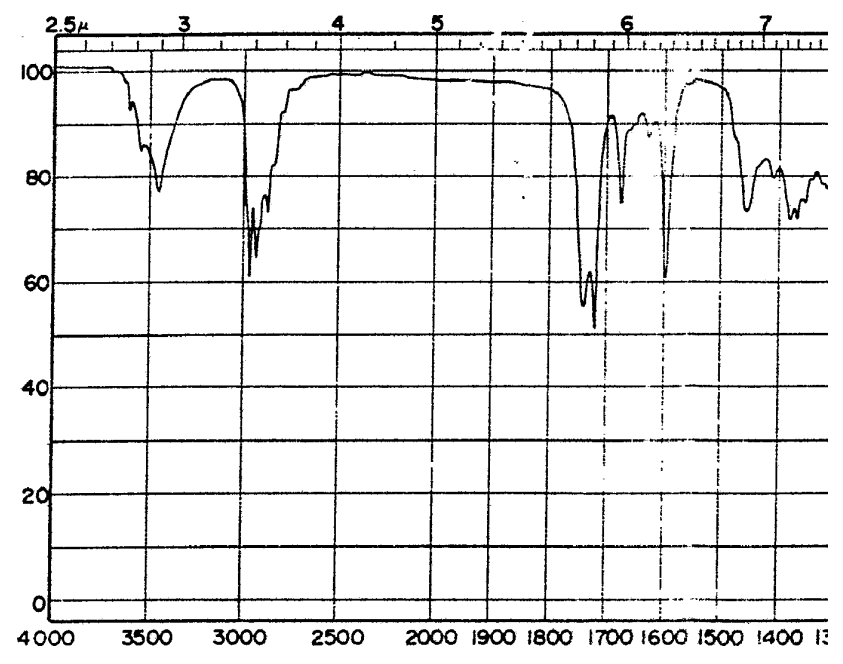
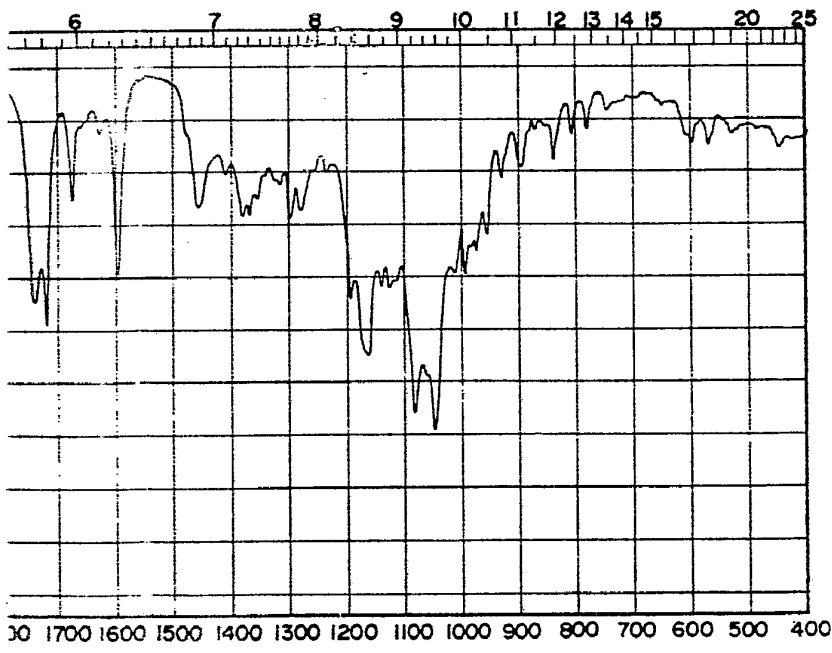


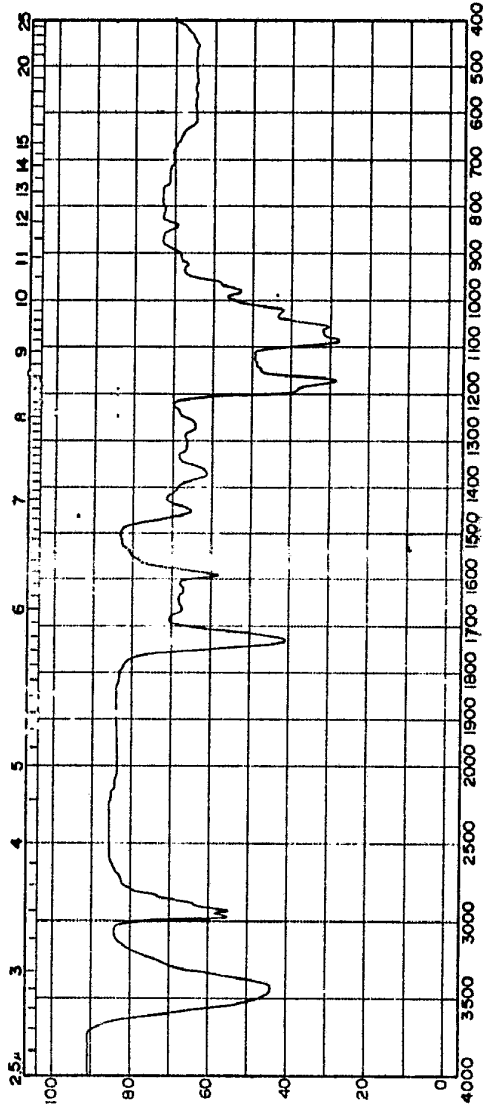
FIG.6



CM⁻¹

ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
BERNARDO UNGER
P. P.

FIG.7



CM^{-1}

ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 de Julio de 1976
PERINANDO UYEREA
P. R.

FIG. 7

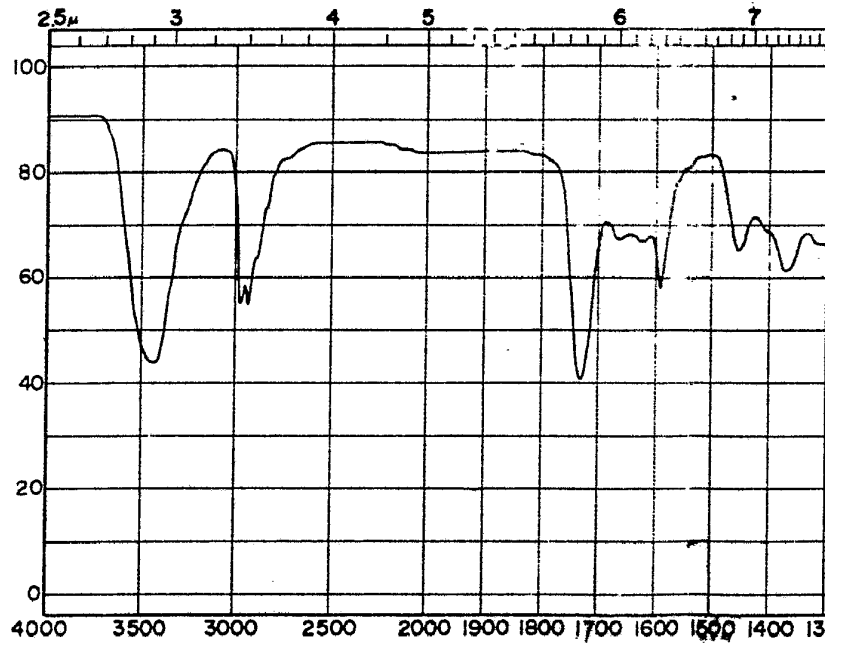
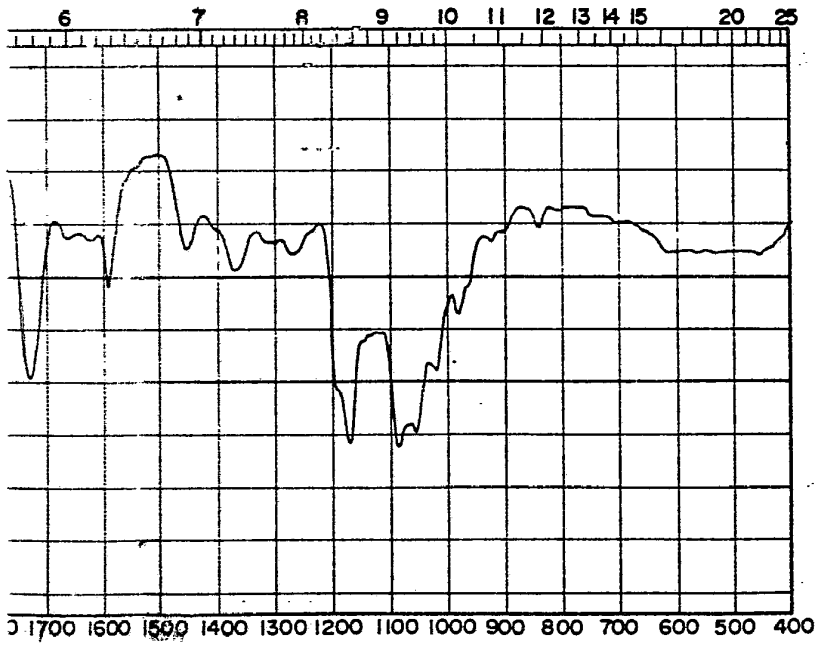


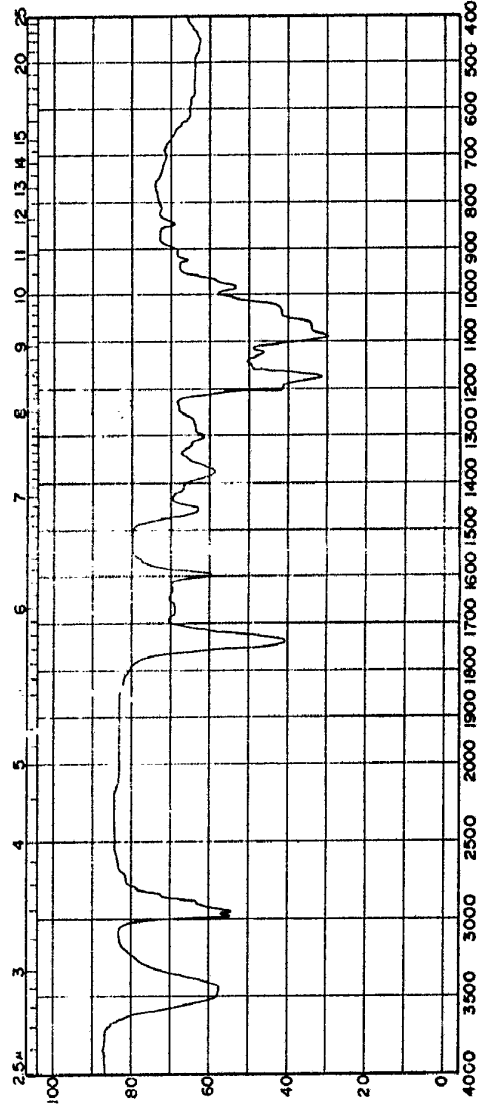
FIG.7



CM^{-1}

ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
BERNARDO UNOPIA
P. P.

FIG.8



CM⁻¹

ESCALA VARIABLE
MADRID 30 de Julio de 1976
F. J. G. G. G.

FIG.8

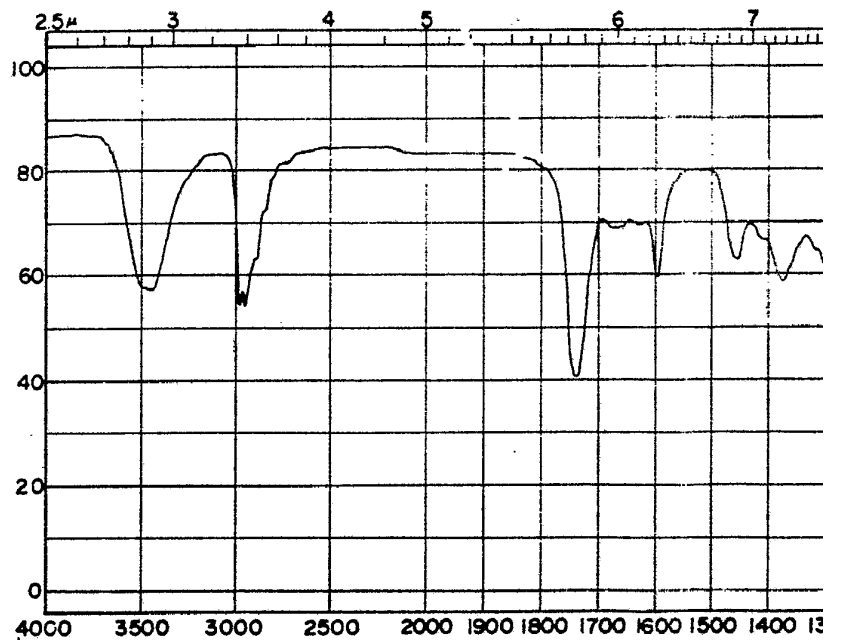
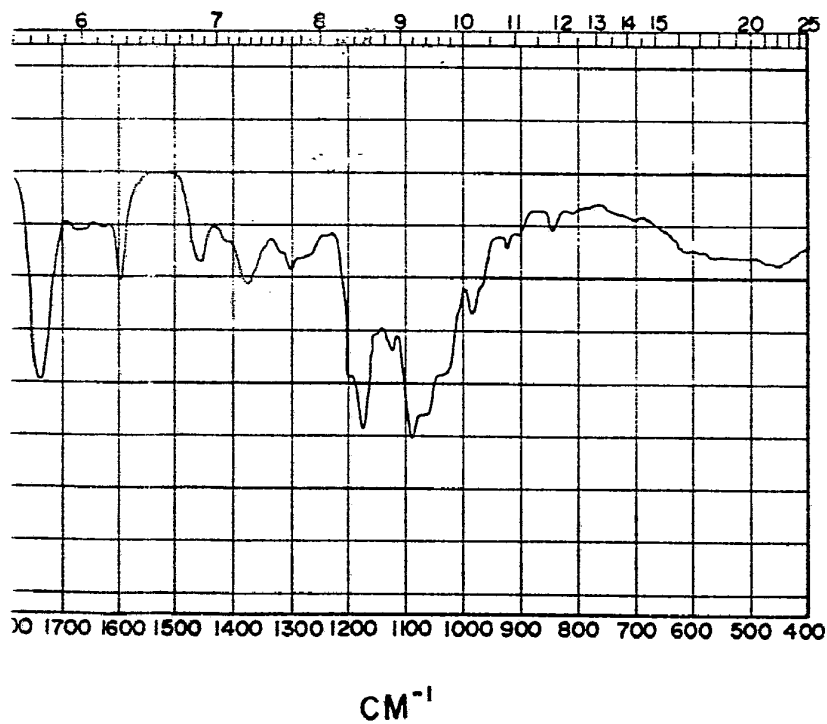
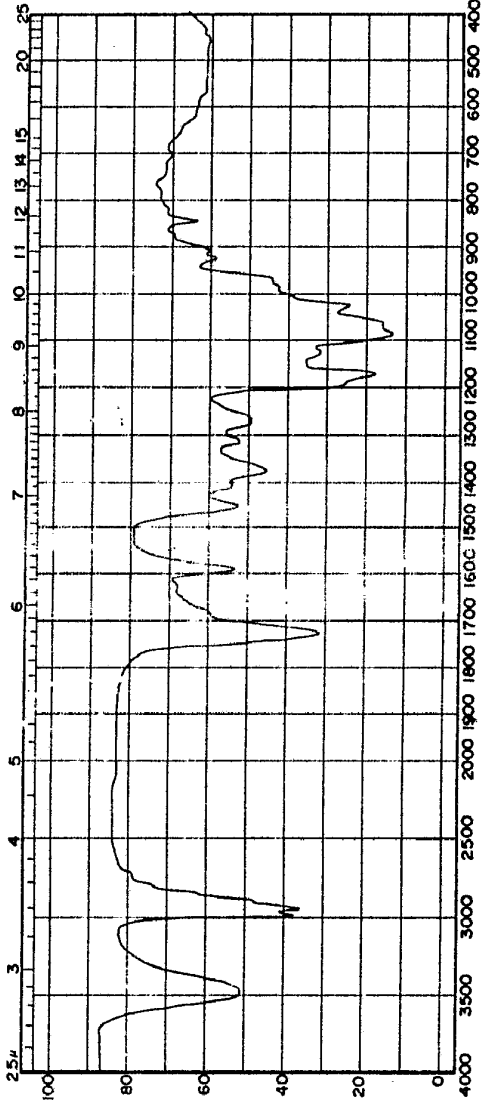


FIG.8



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
DR. CARRO LUCAS
P. P.

FIG. 9



CM⁻¹

ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 de Julio de 1926
REPOSICION SYSTEM
P.V.

FIG. 9

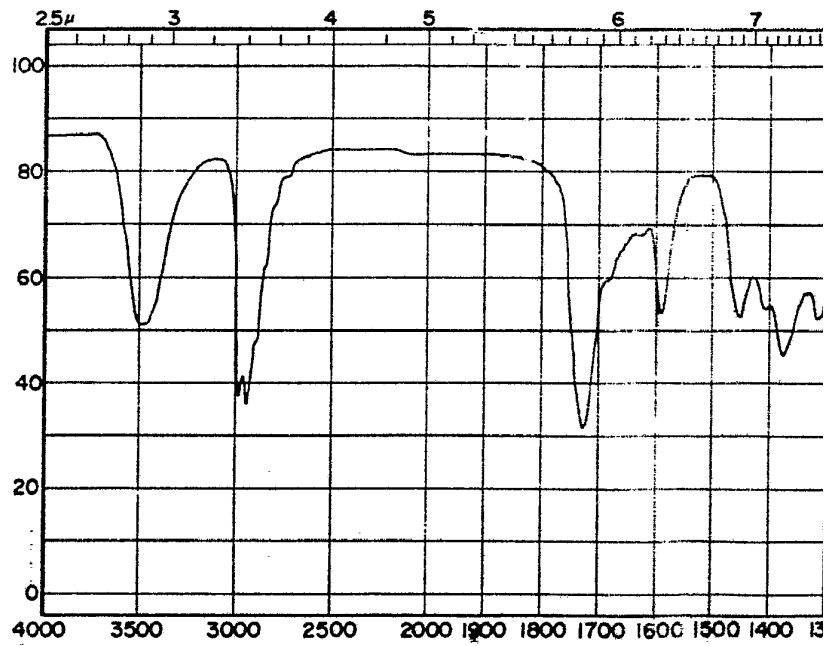
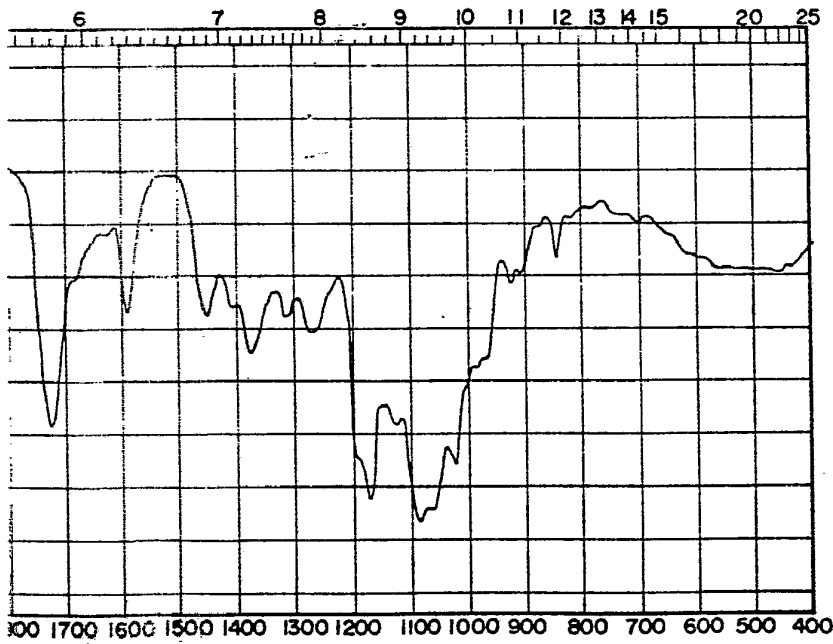


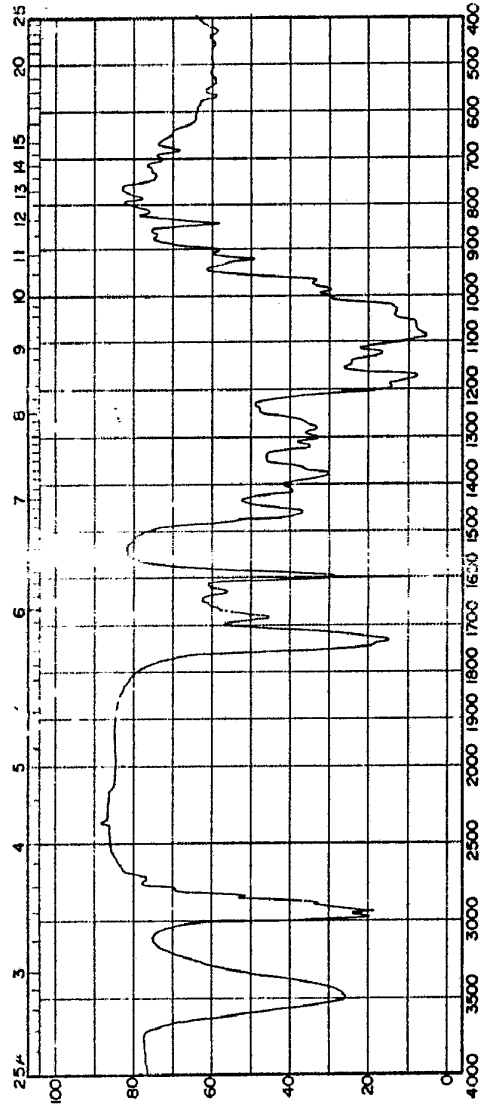
FIG. 9



CM⁻¹

ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
BERNARDO UNGRIA
P.E.

FIG.10



CM⁻¹

ESCALA VARIABLE
MADRID 30 JULIO DE 1976
P. P.

FIG.10

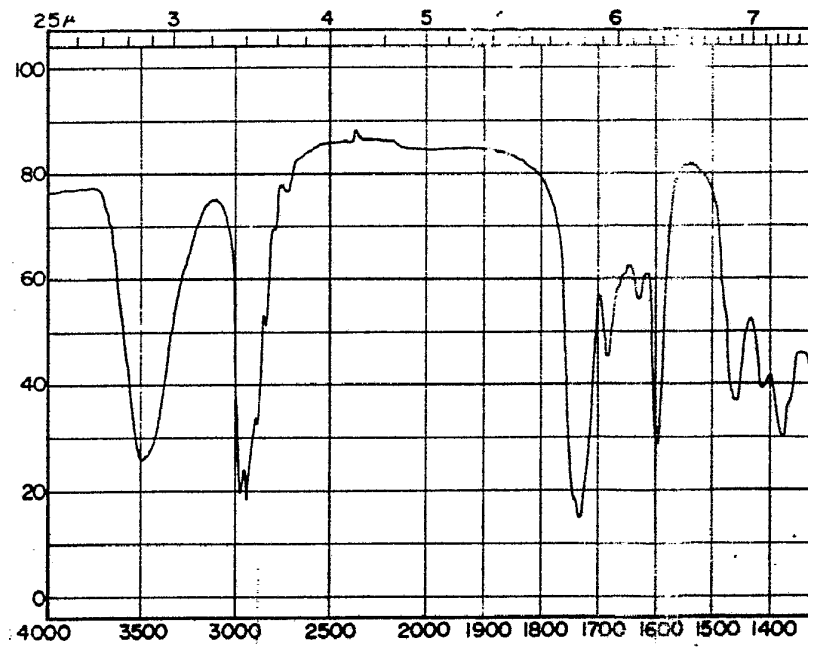
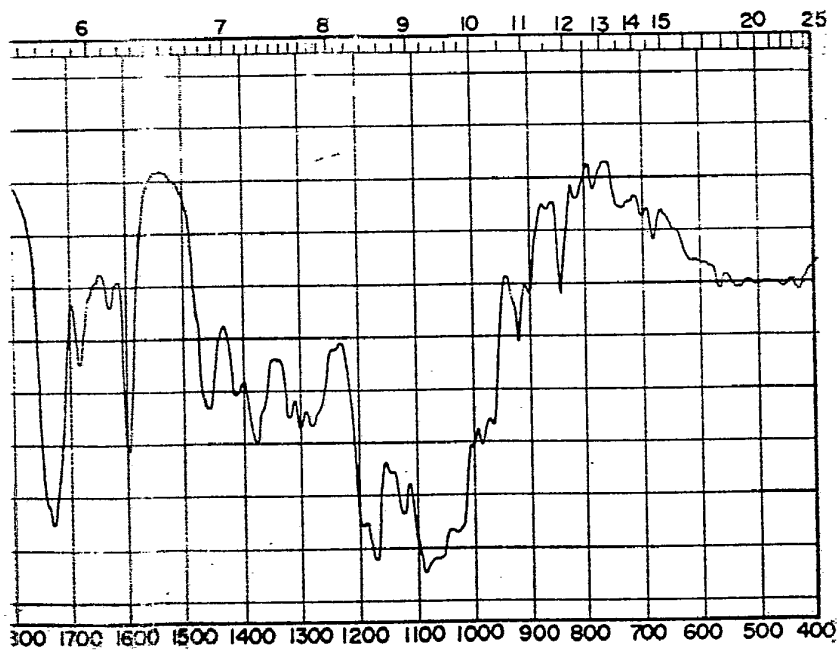


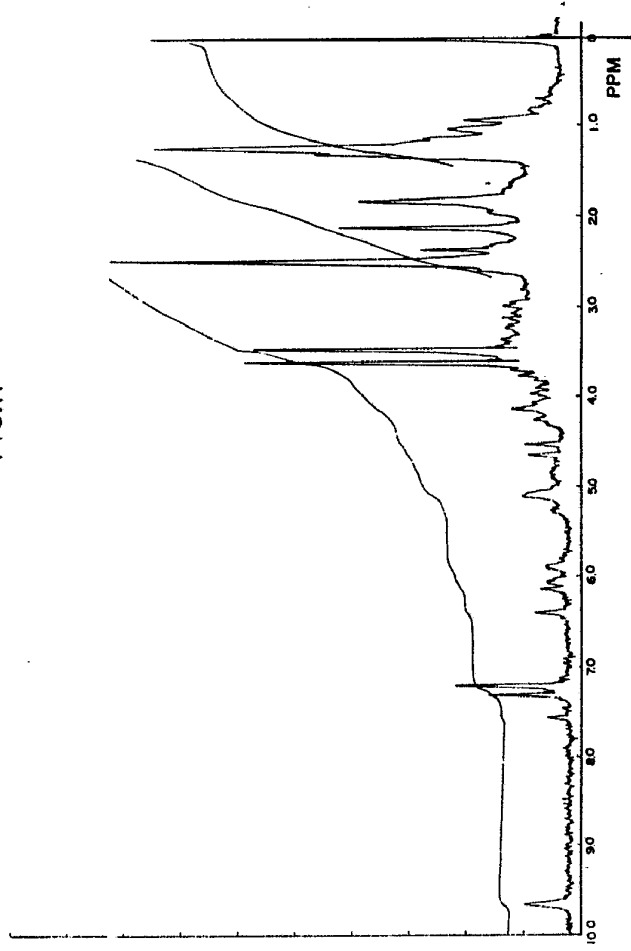
FIG.10



CM⁻¹

ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
BERNARDO CARRERA
P. P.

FIG.II



ESCALA VARIABLE
MADR. 30 de Julio DE 19.76
P.R. *[Signature]*

FIG. II

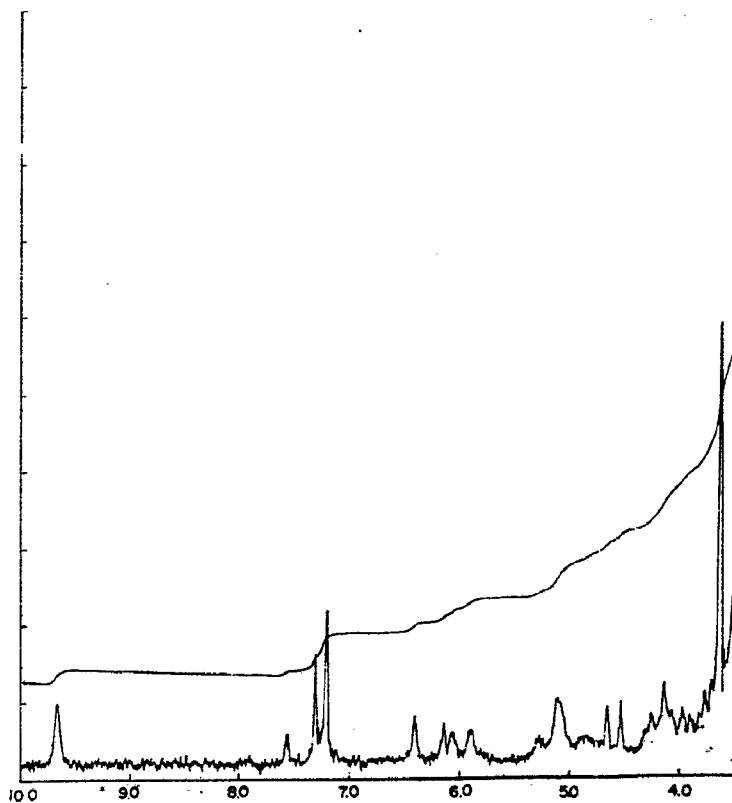
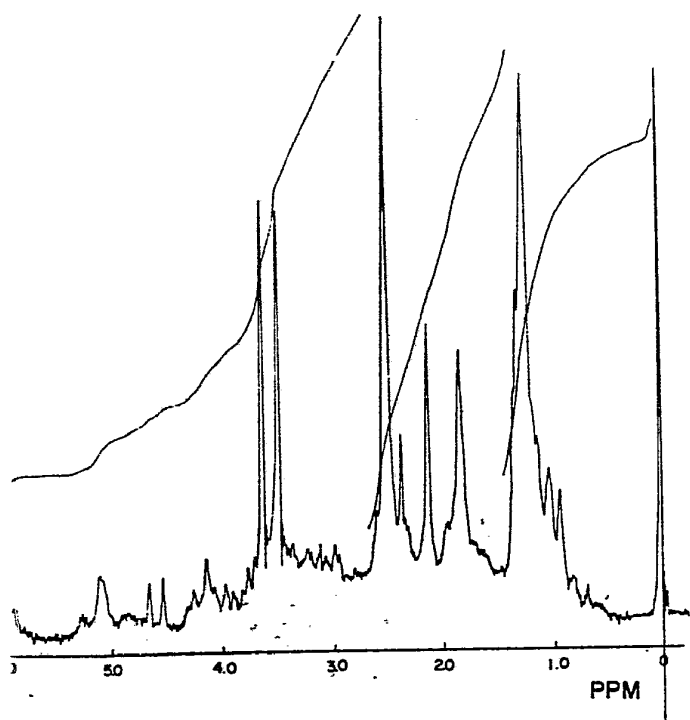
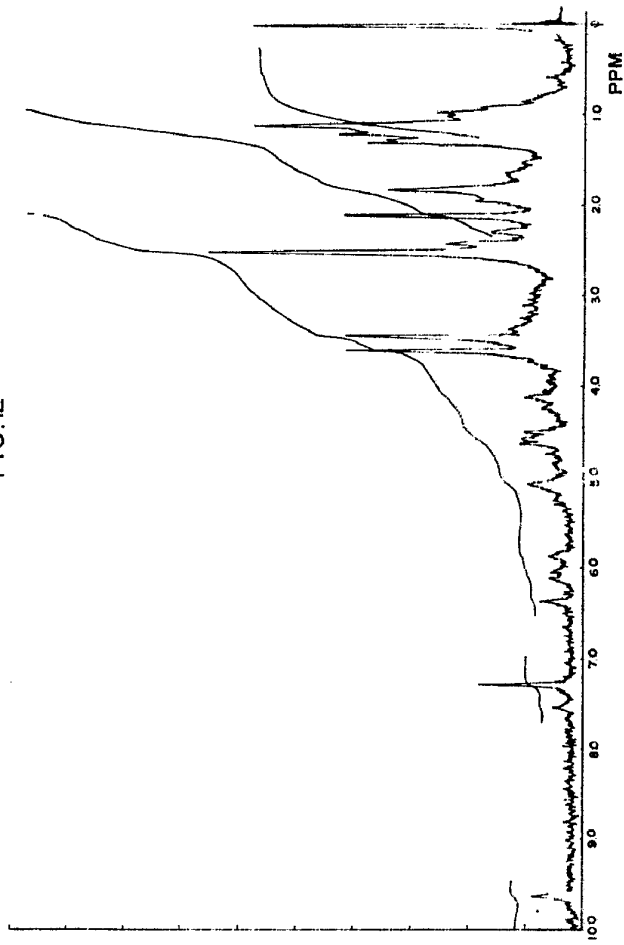


FIG. II



ESCALA VARIABLE
MADR... 30 DE Julio DE 1976
R. P.

FIG.12



ESCALA VARIABLE
MADRID 30 Julio DE 1976
SANRAKU

FIG. 12

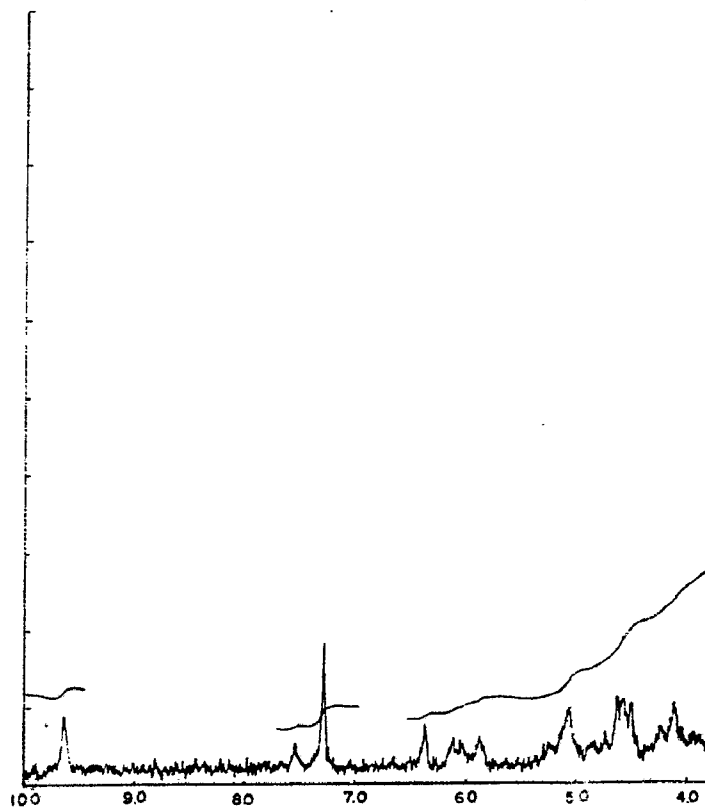
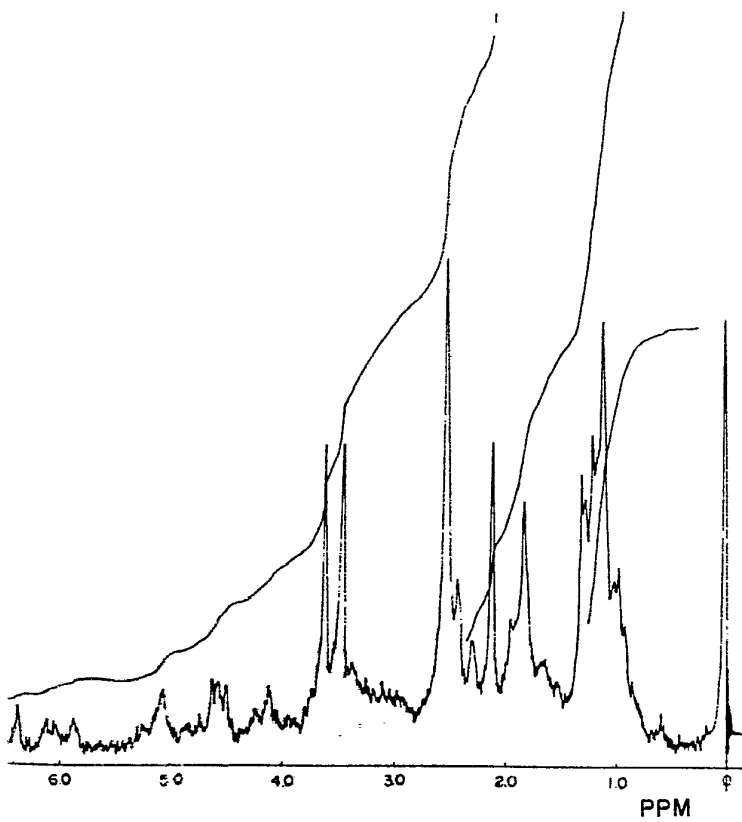


FIG. 12



ESCALA VARIABLE
MADRID. 30 de Julio. DE 19.76
BOL. M. DO. UNCRIA
P. P.

FIG.13

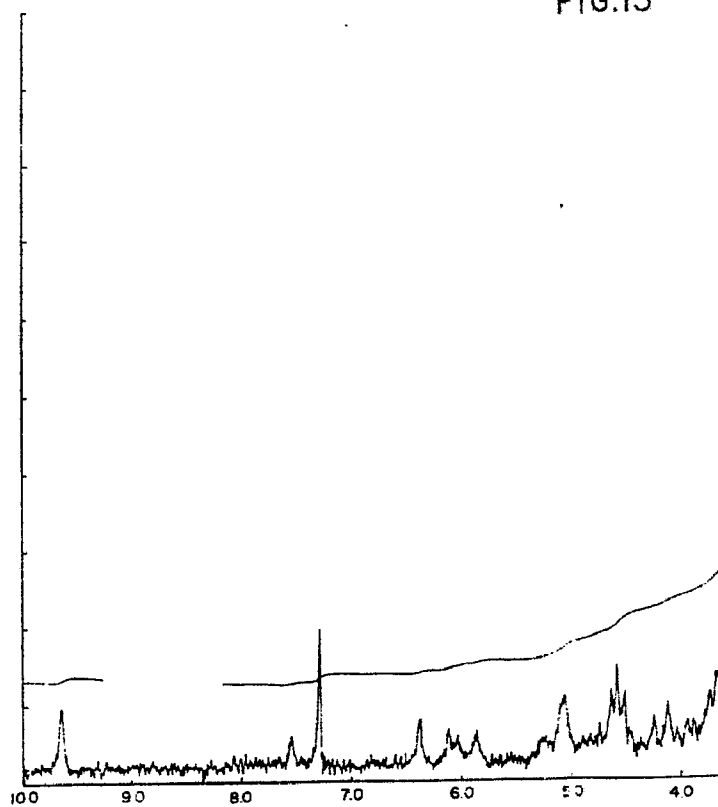
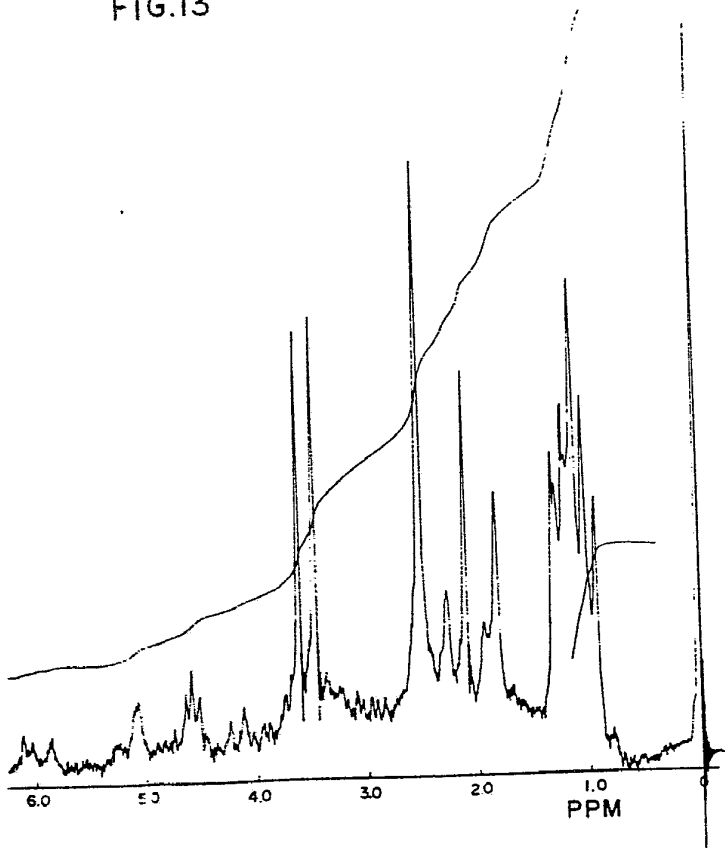
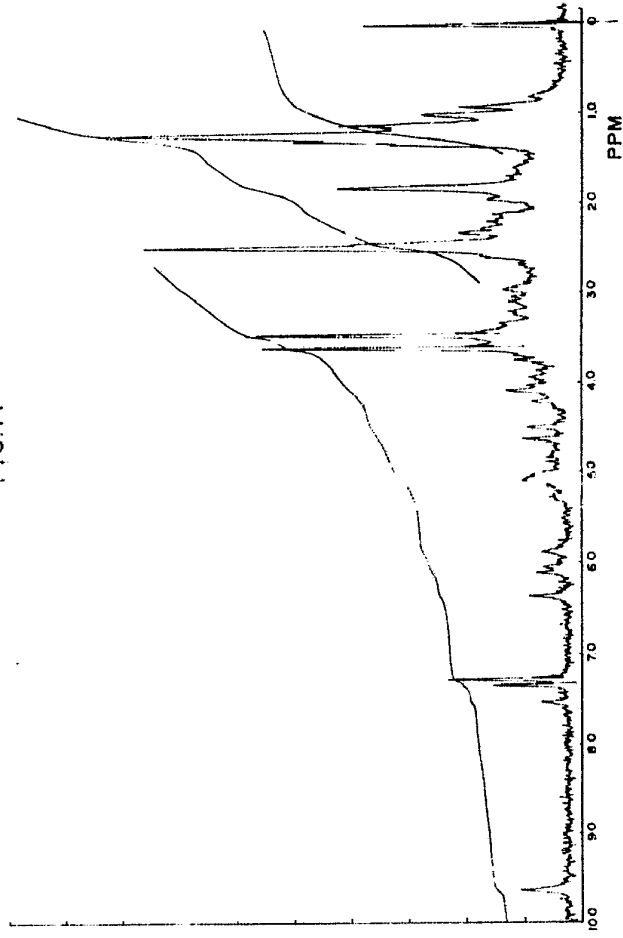


FIG.13



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
EDUARDO UNGRIA
P.P.

FIG. 14



ESBOY A. V. M. B. S. L. E.
MADRID, 30 Julio 1976

FIG.14

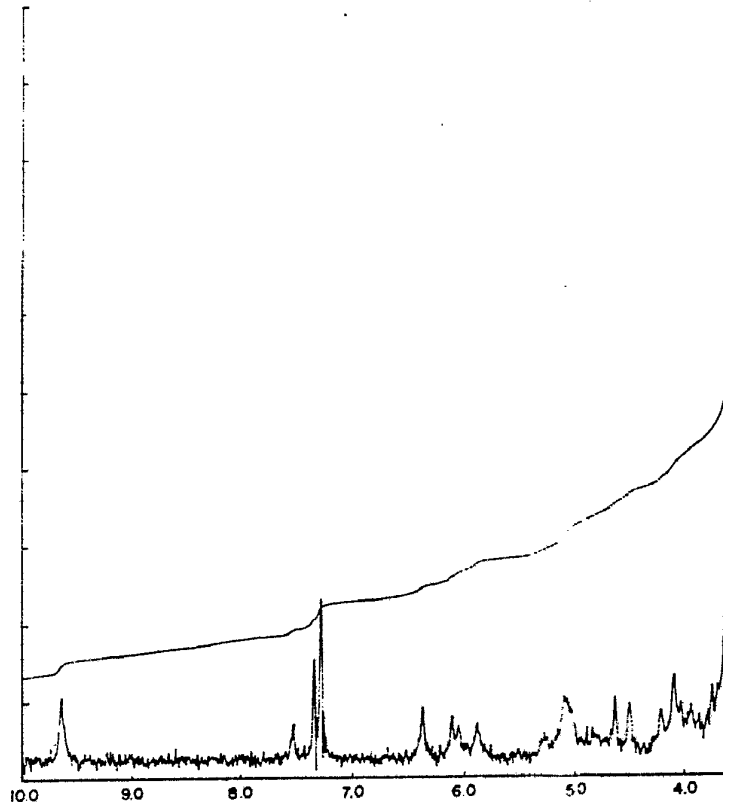
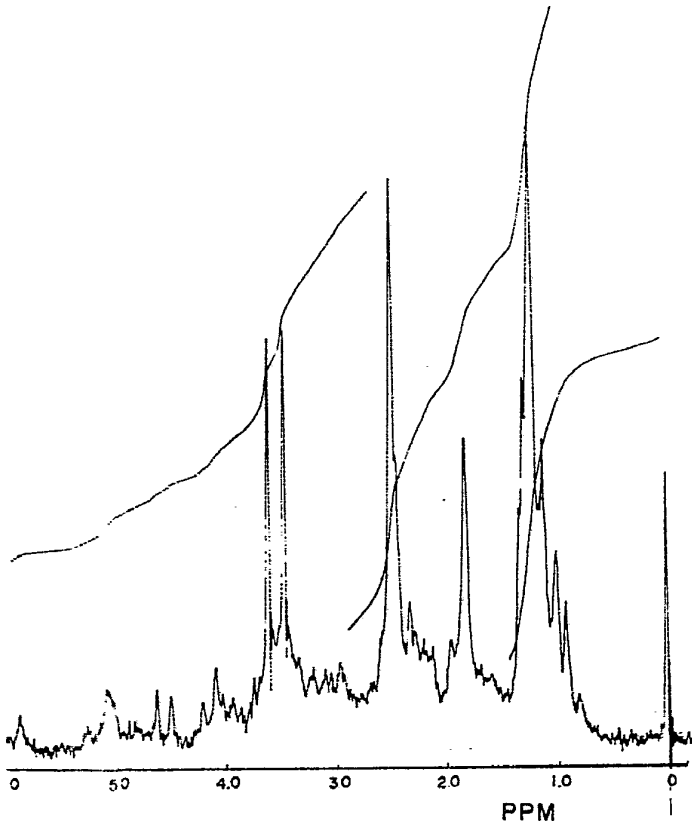


FIG.14



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
EST. QUÍMICA
P. P.

A handwritten signature or set of initials, possibly 'R. P.', written in dark ink over the typed text.

FIG.15

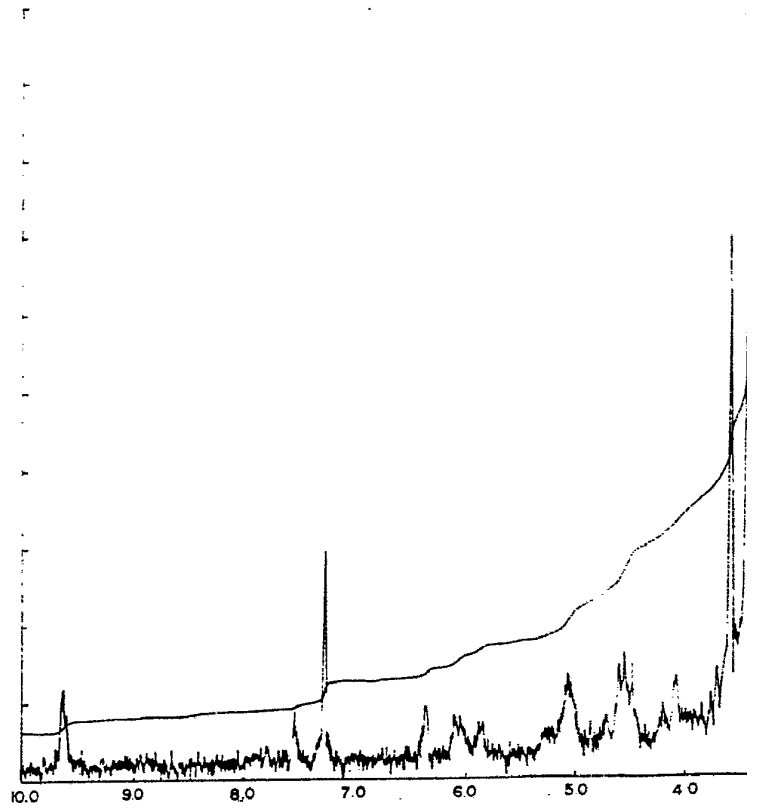
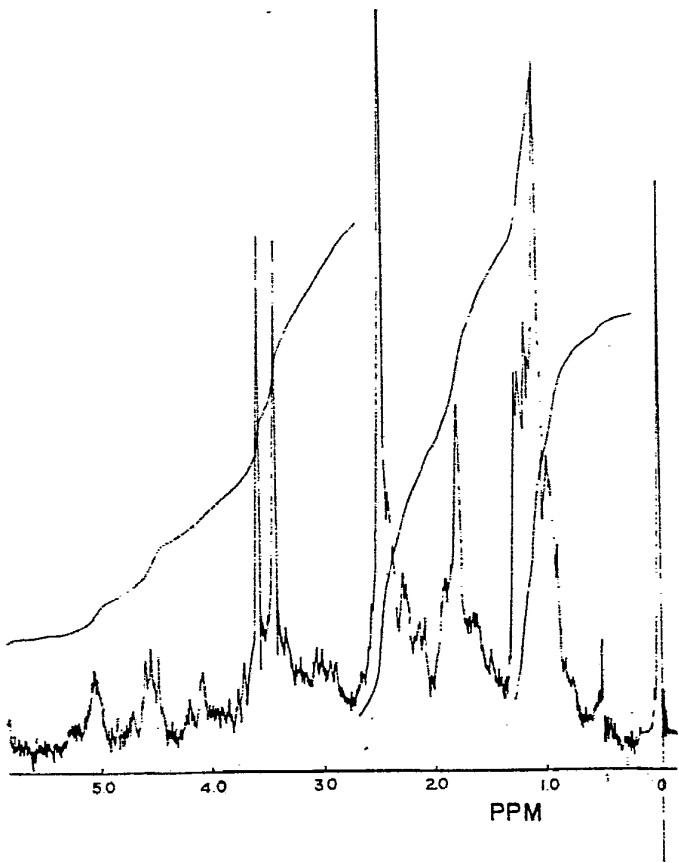
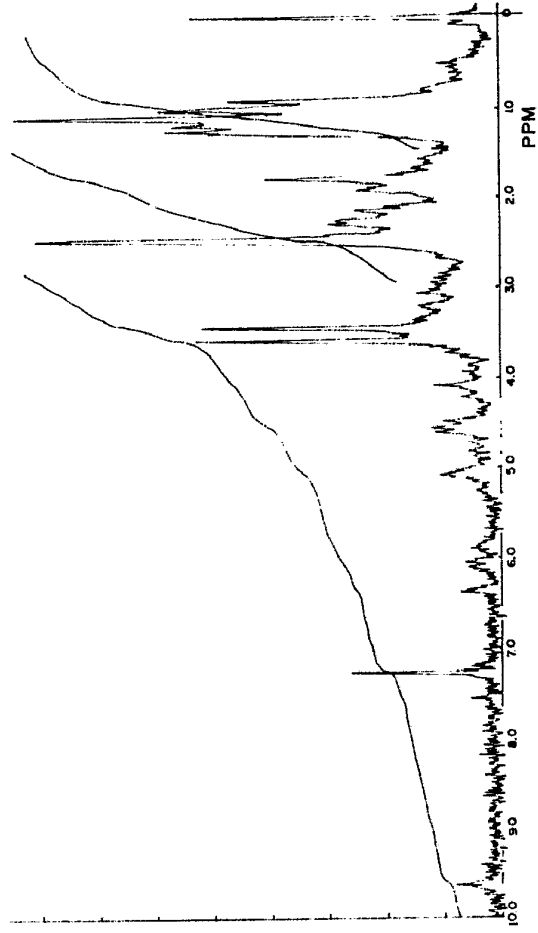


FIG.15



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 de Julio de 1926
BIBLIOTECA
P.P.

FIG.16



REVISADO POR EL INGENIERO
MADRID, 30 DE JULIO DE 1976
E. S. GARCIA

FIG.16

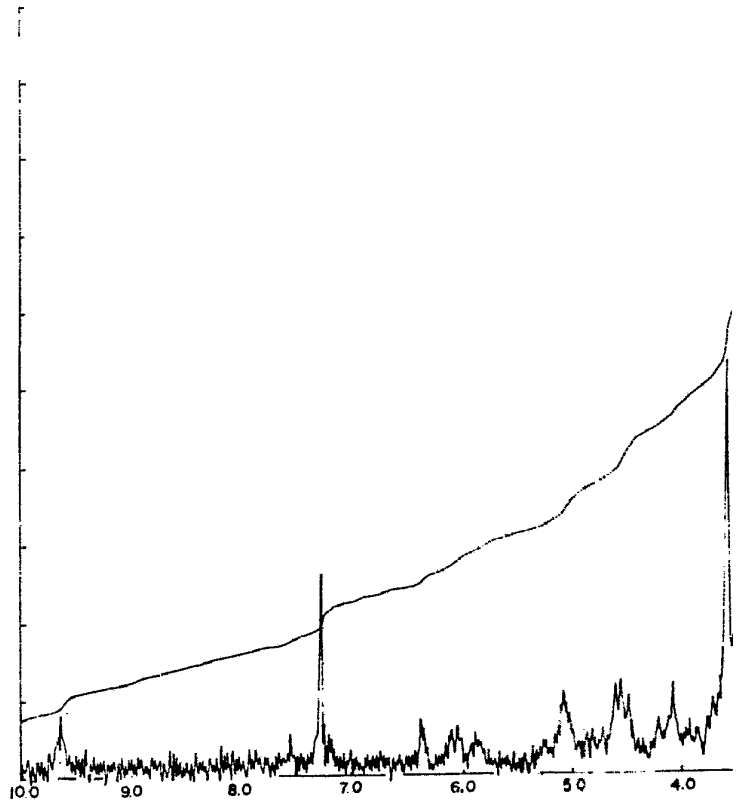
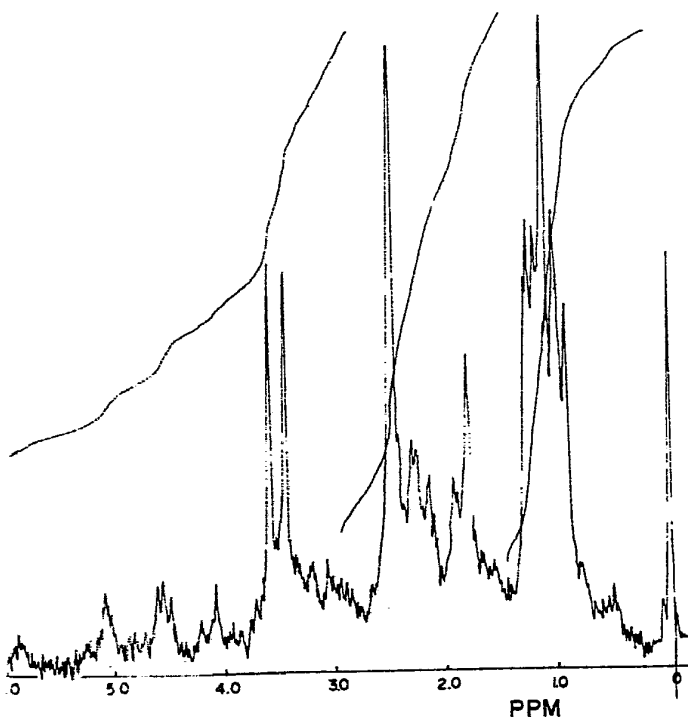
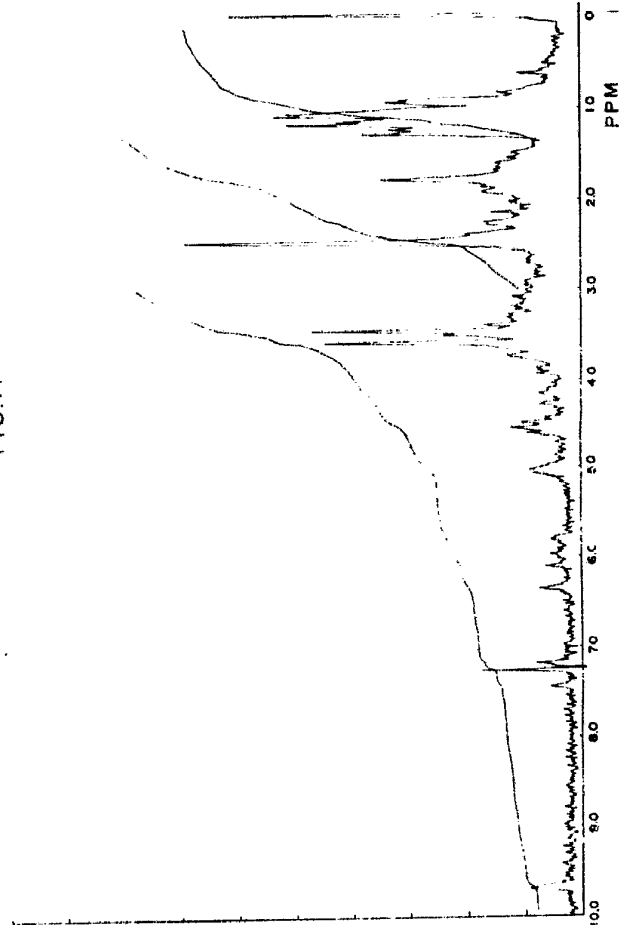


FIG.16



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
E. P. R. DOUGRIS

FIG.17



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 OCT 1976
JULIO DE 1976
P. F. GARCIA

FIG.17

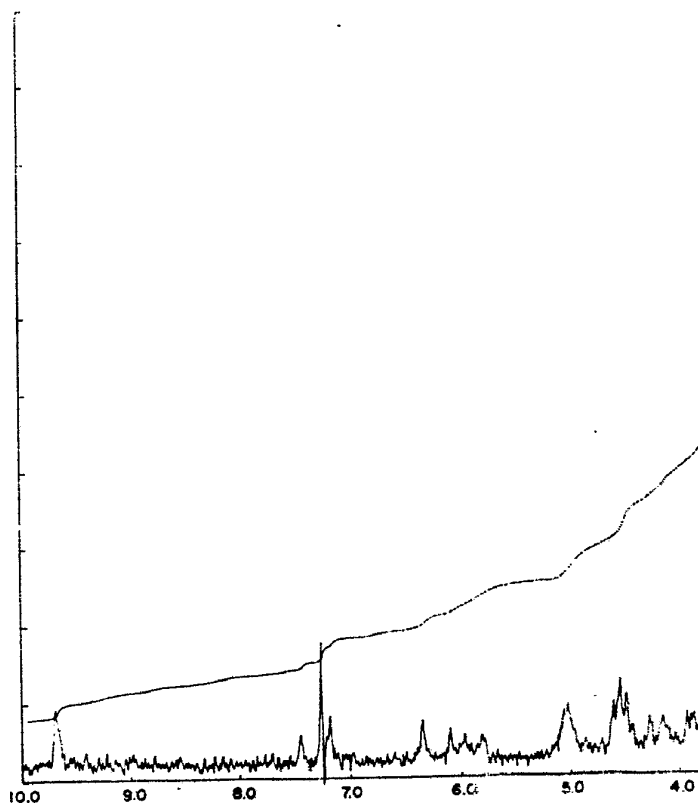
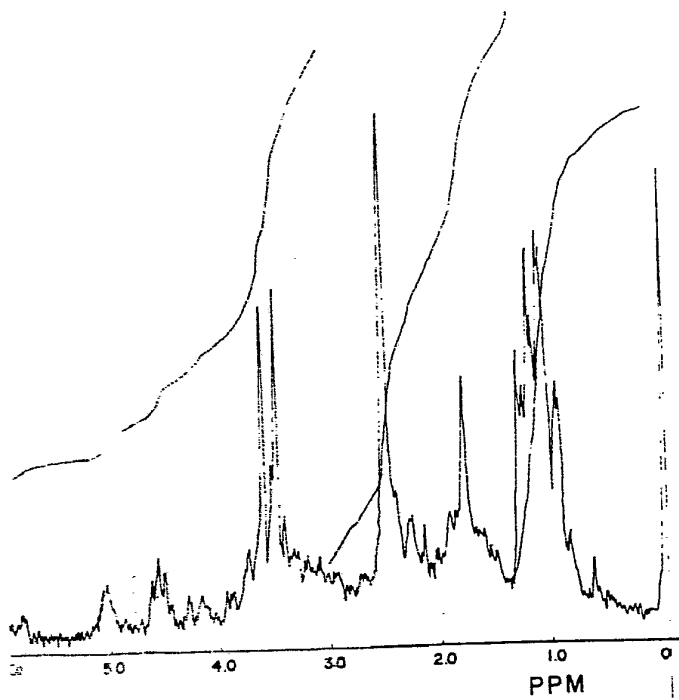
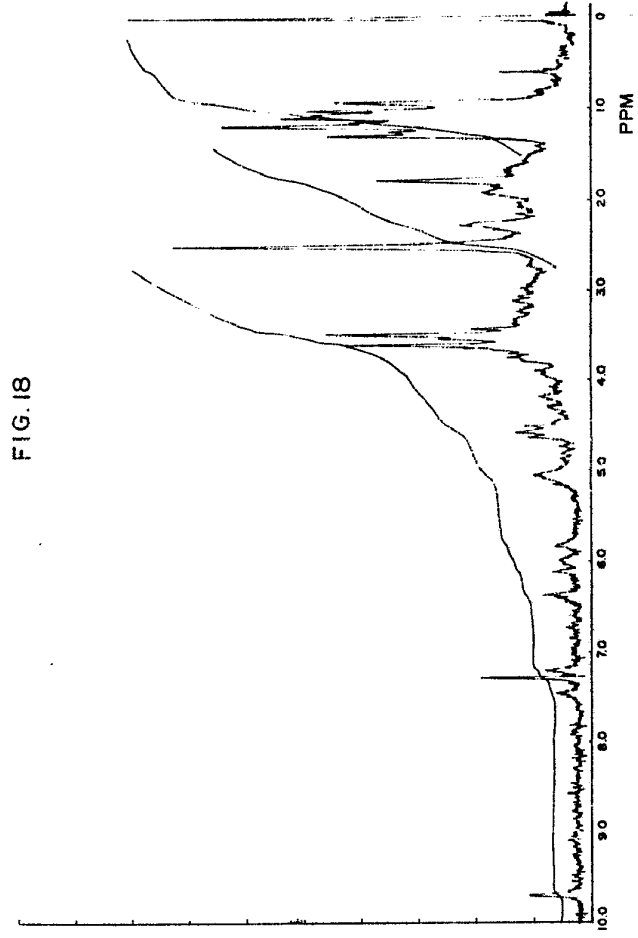


FIG.17



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1975
BERNARDO UNGRÍA
P.P.



ESPECTROGRAMA
MADRID, 30 Julio 1976
P. P. 000 UNKMA

FIG. 18

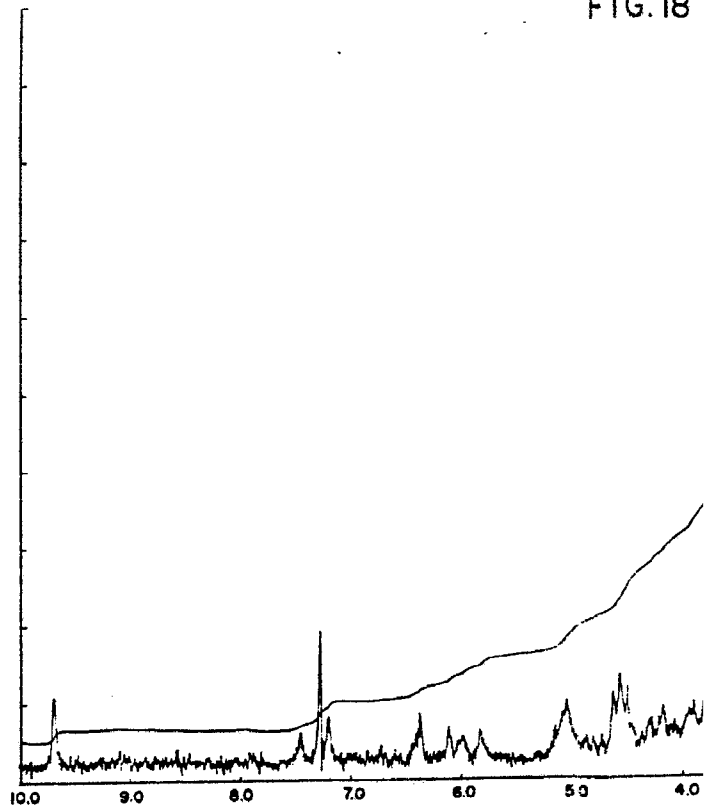
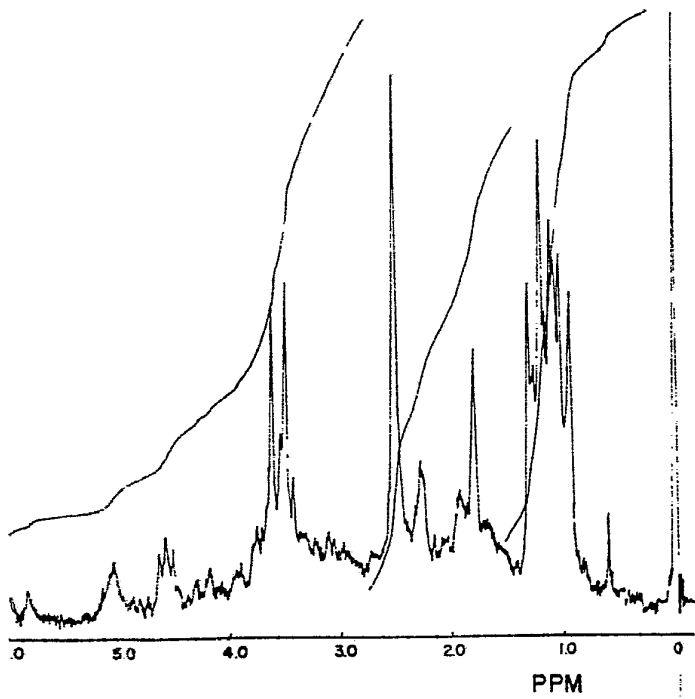
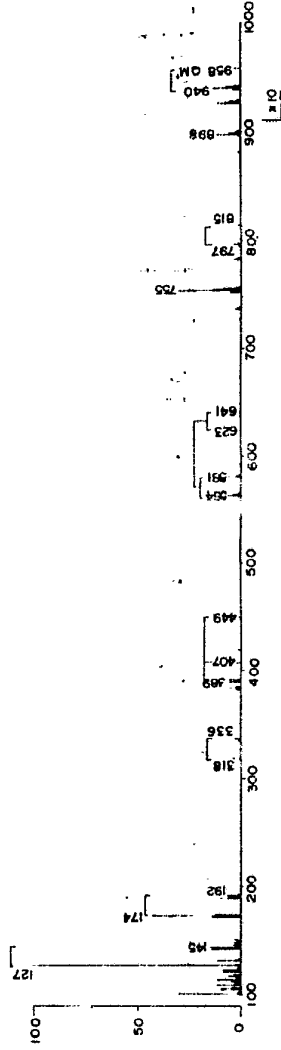


FIG. 18



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
BERNARDO UNGRIA
P. P.

FIG.19



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE JULIO DE 1926

P. P. 1926 L. 26 A. H.



FIG.19

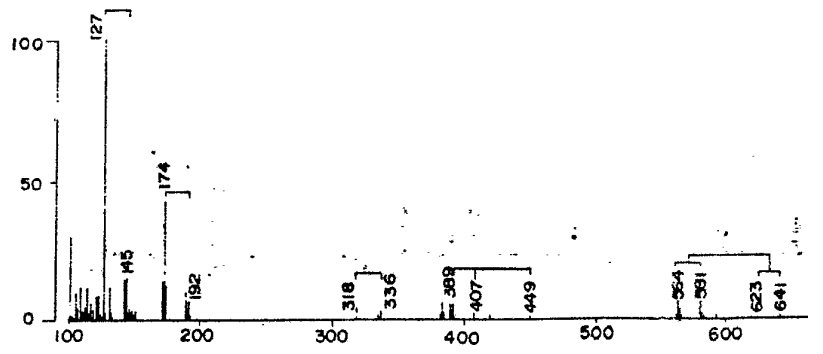
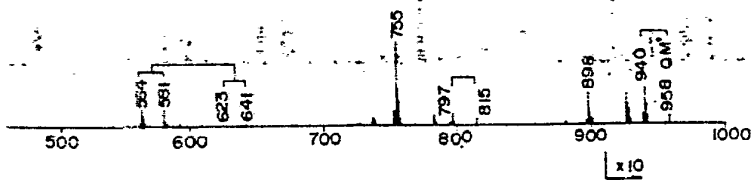
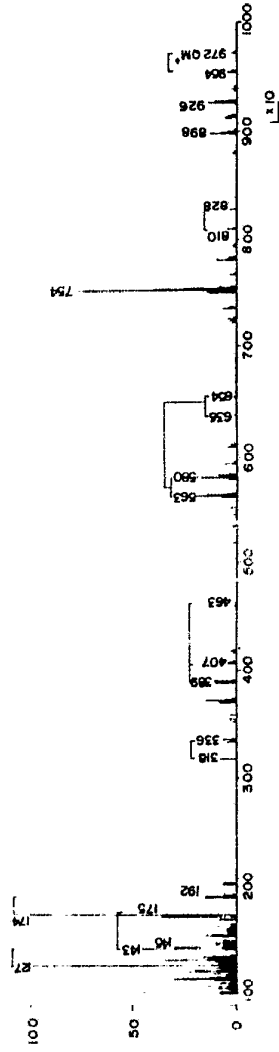


FIG. 19



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
BERNARDO UNGRÍA
P. P.

FIG. 20



ESCALA VARIABLE
 MEDIO, 30 JULIO 061976
 P. P. ESCALA

FIG.20

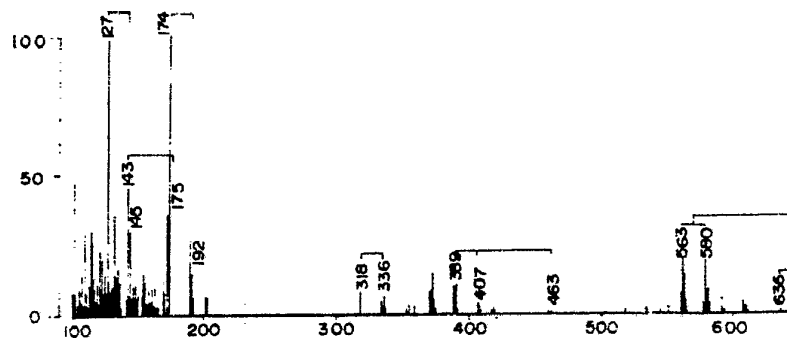
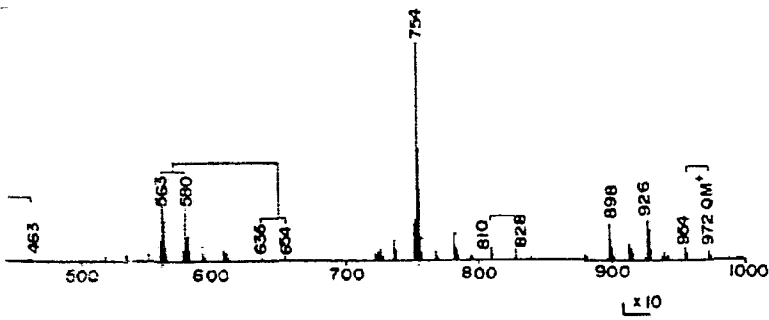
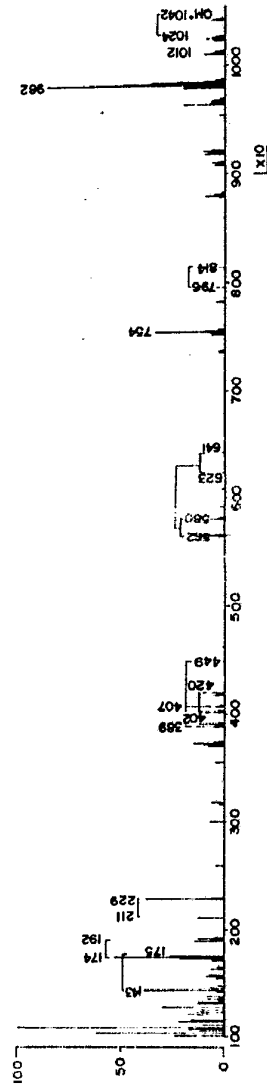


FIG.20



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
BERNARDO UNGRÍA
P. P.

FIG. 21



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
BERNABEO UNGOIA
P. P.

FIG. 21

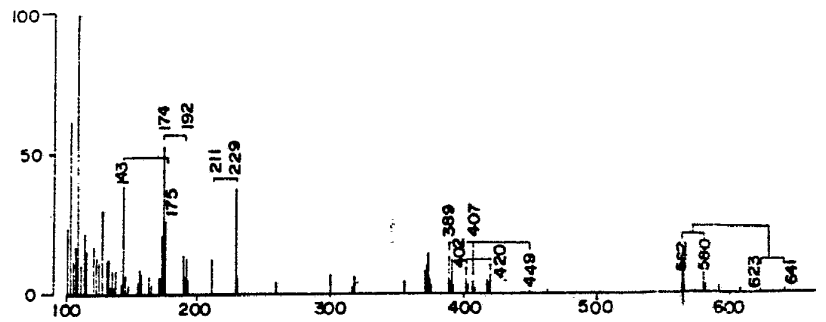
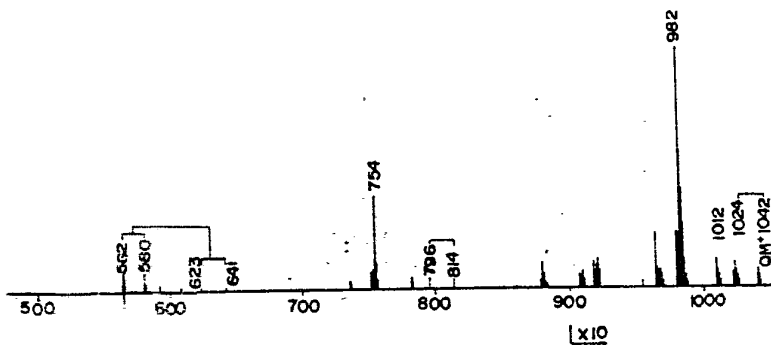


FIG. 21



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
BERNARDO UNGRIA
P. P.

FIG. 22

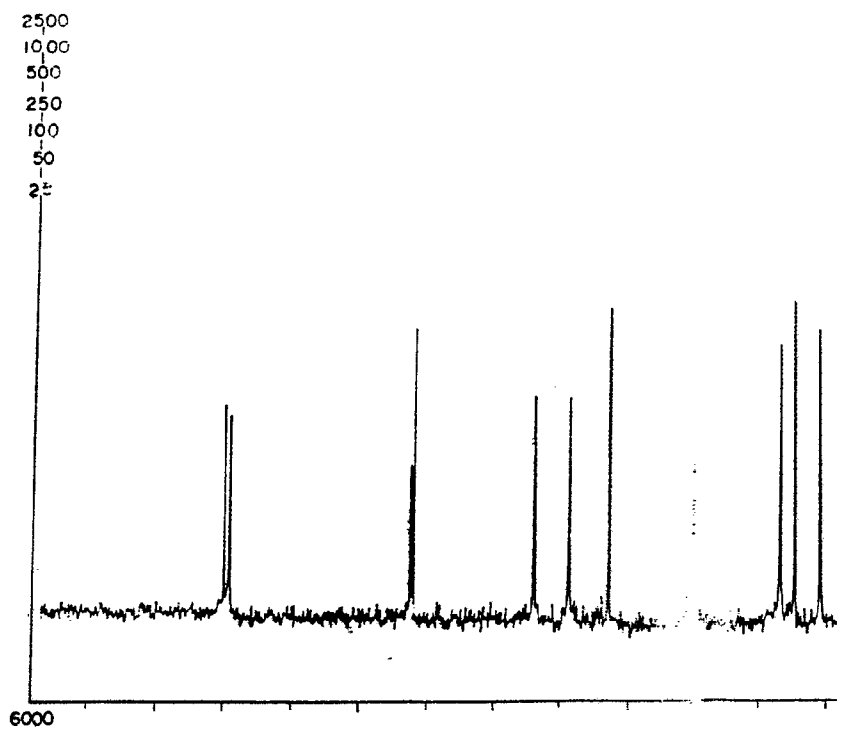
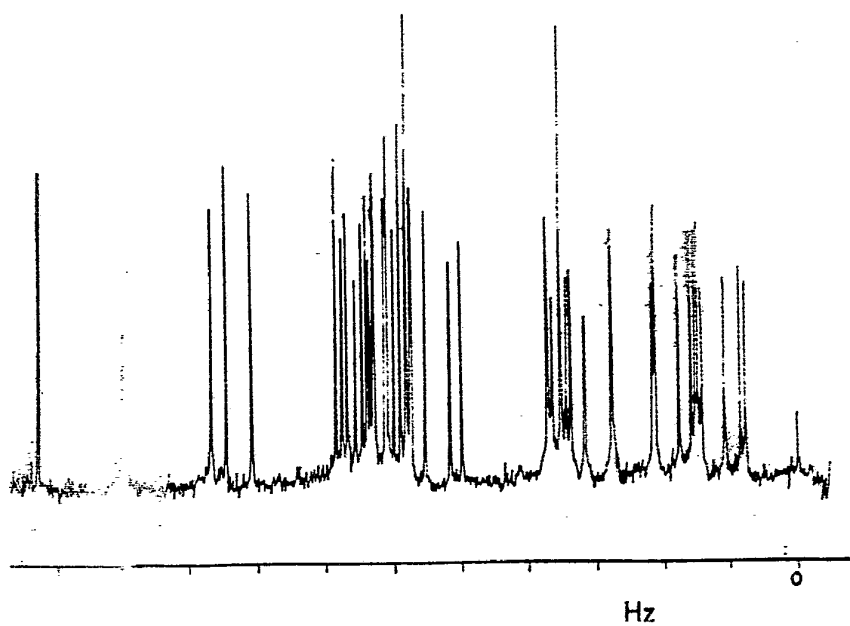
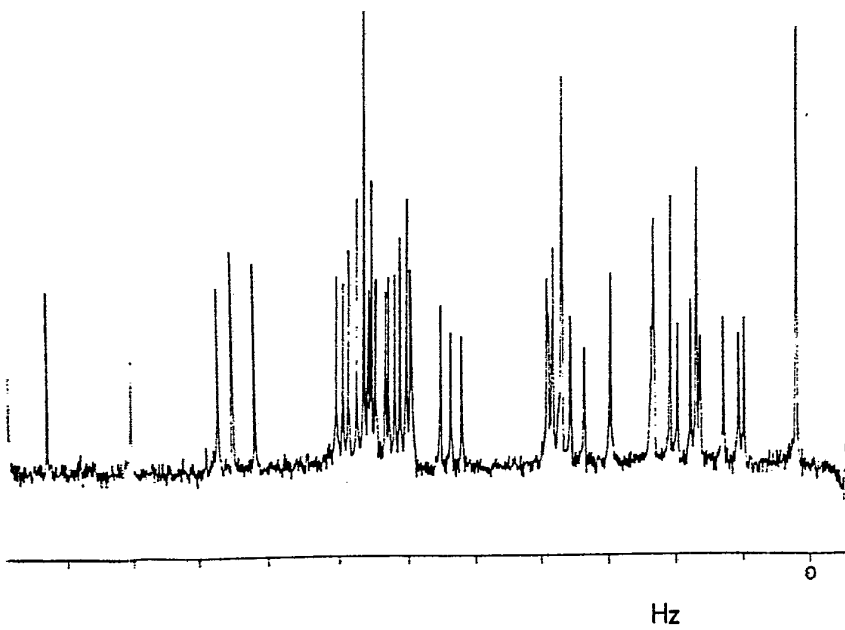


FIG. 22

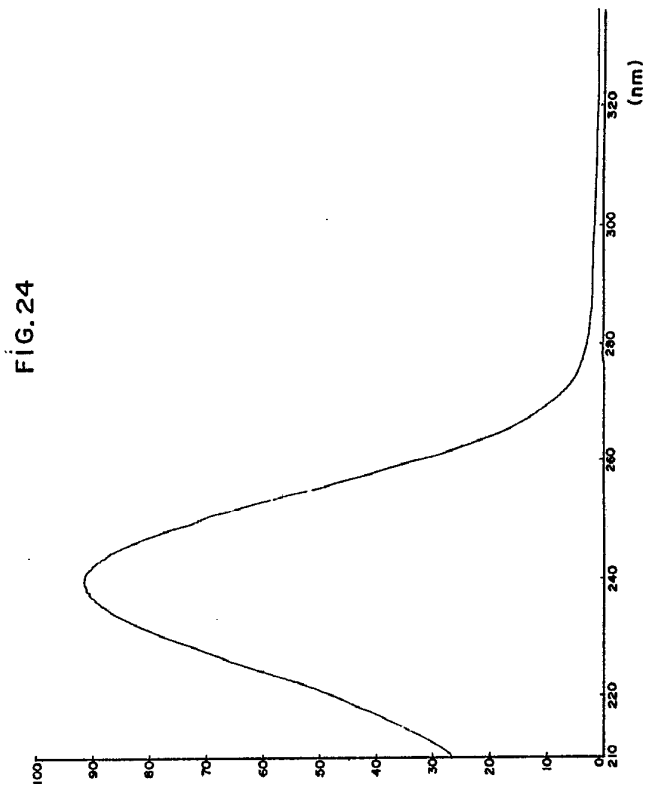


ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
BERNARDO UNGRÍA
P. F.

FIG. 23



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
BERNARDO UNGER
P. P.



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE JULIO DE 1976

F. P. ...
...

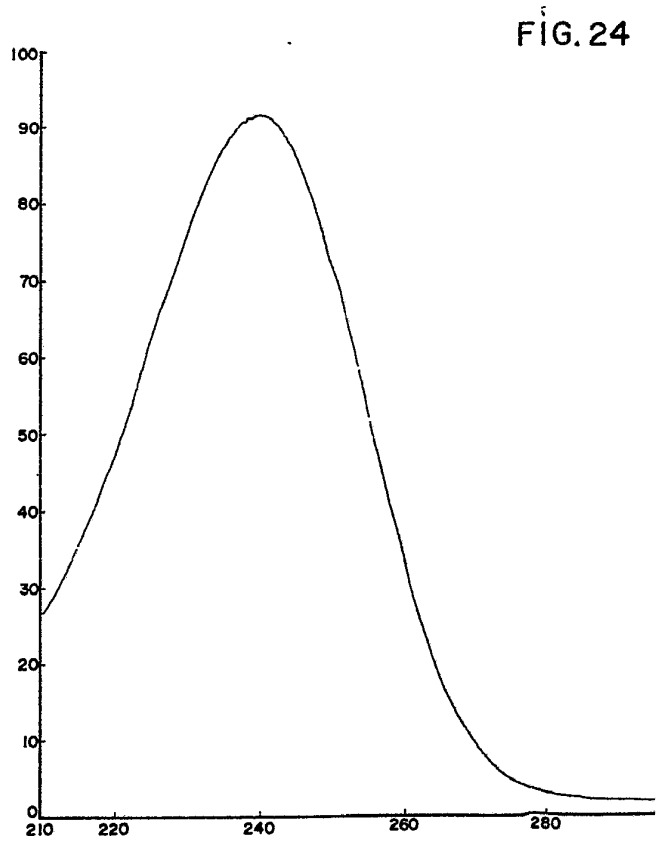
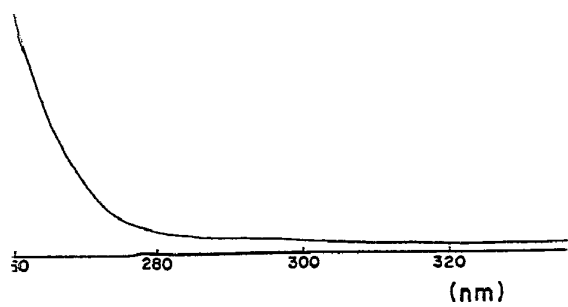
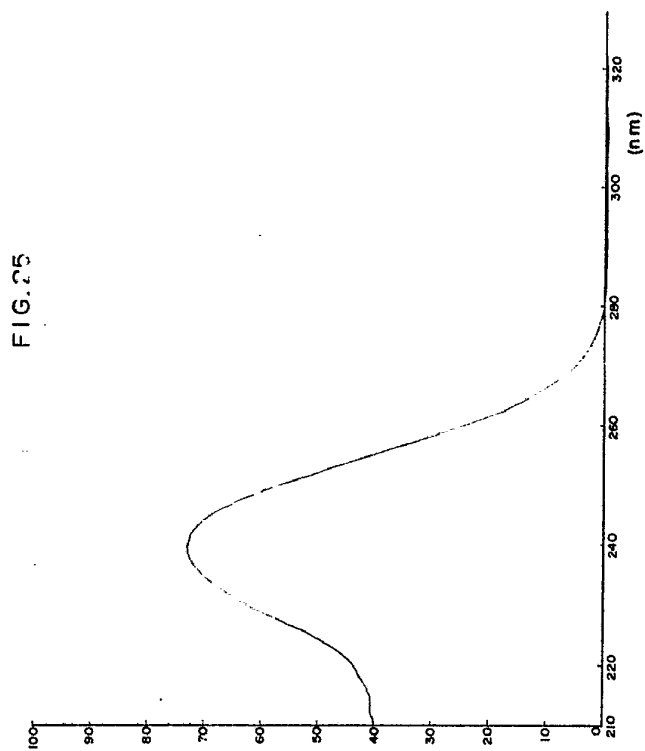


FIG. 24



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
LEONARDO UCRÍA
F. P.



ESCALA VARIABLE
MADRID 30 DE JULIO DE 1976
E. B. G. U. O. S. R.

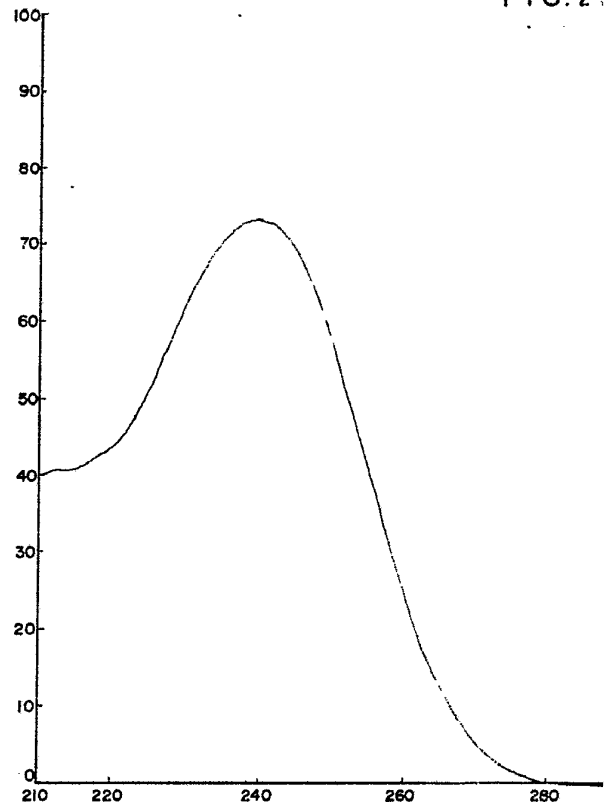
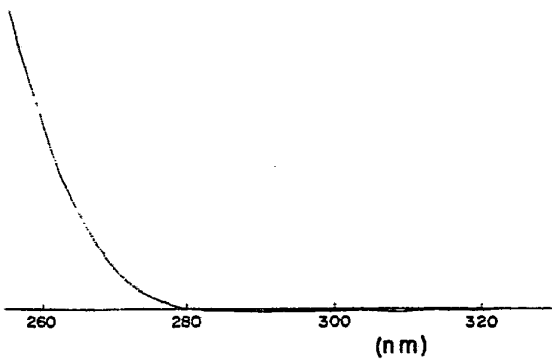
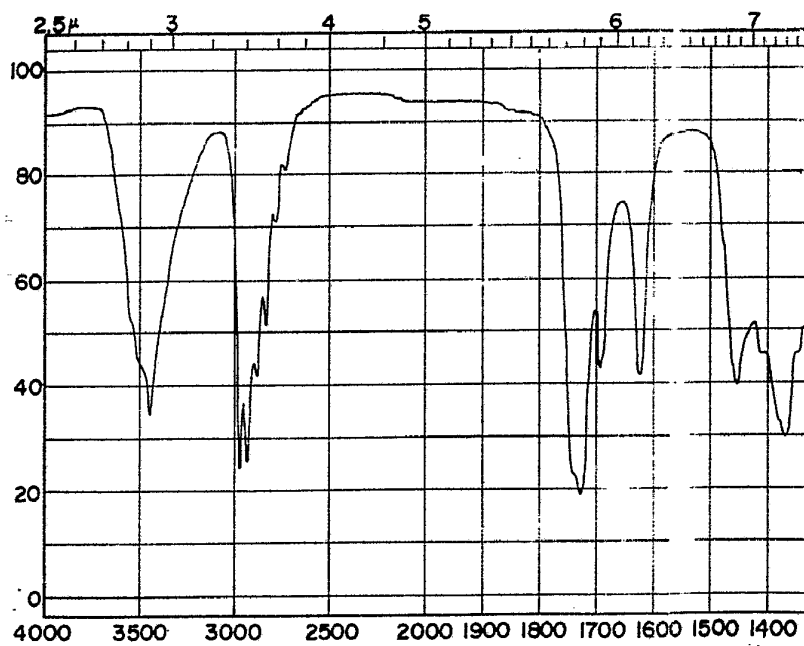


FIG. 25



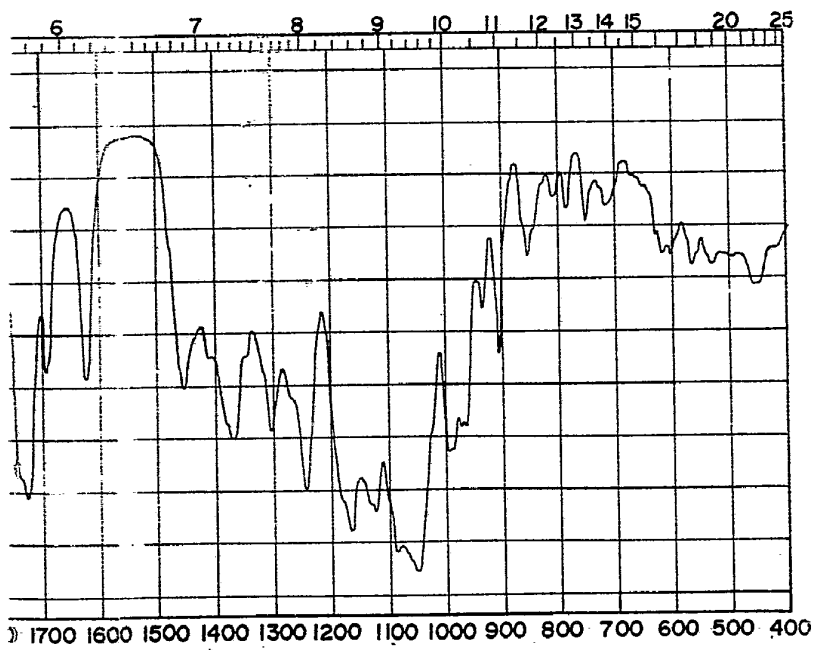
ESCALA VARIABLE
MADRID 30 DE Julio DE 1976
BETI UNCRÍA
G. P.

FIG. 26



CM^{-1}

FIG. 26



CM⁻¹

ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 de Julio DE 1976
BENITO DE GUERRA
P. P.

FIG. 27

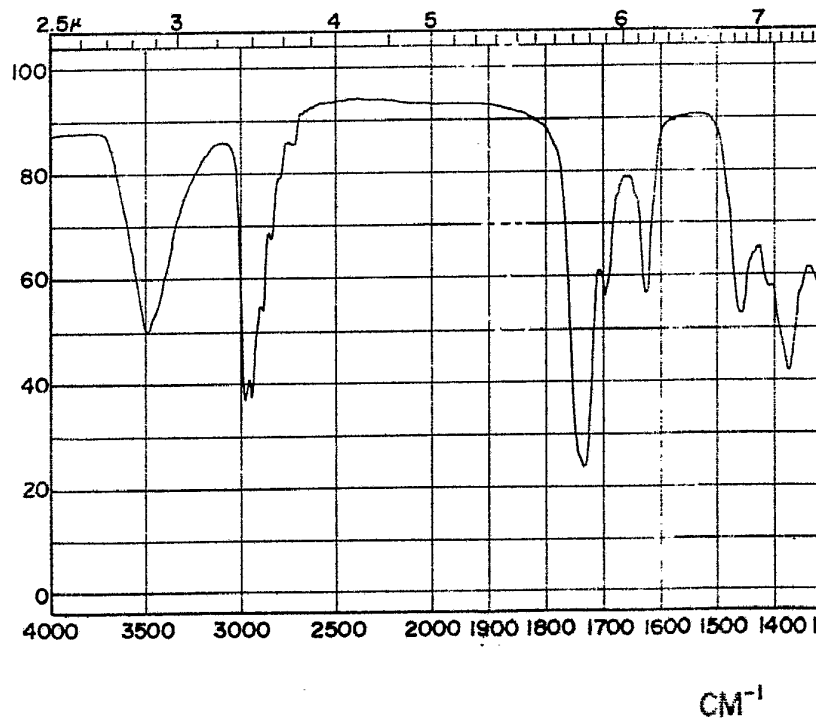
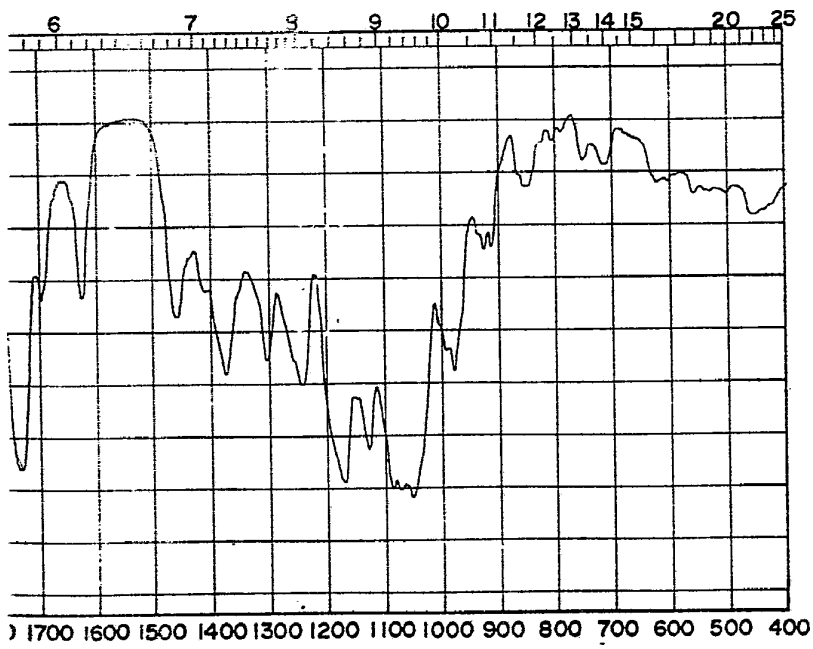


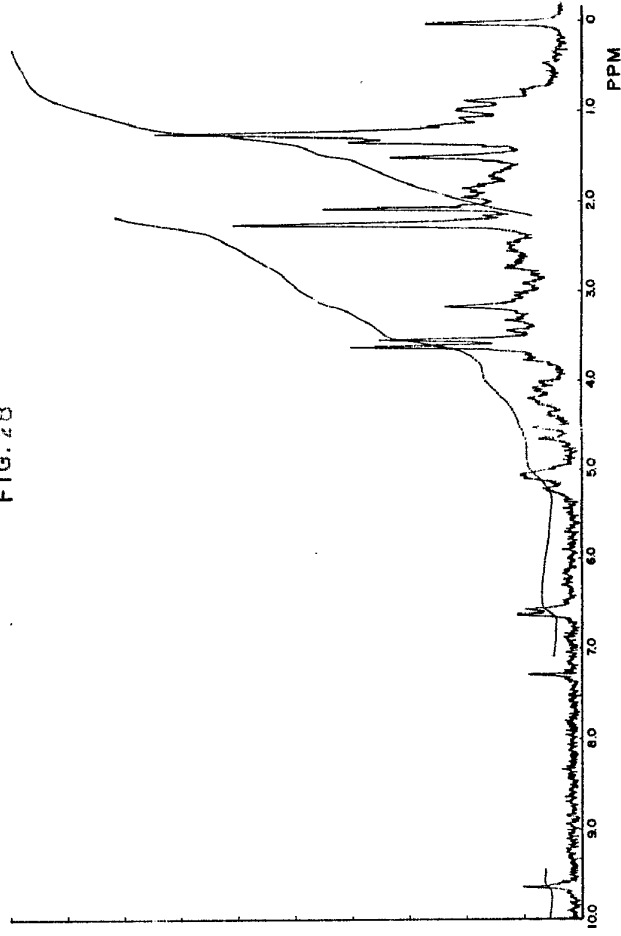
FIG.27



CM⁻¹

ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 19 76
BERNARDO URSERÁ
P. P.

FIG. 28



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 JULIO DE 1976
E.S. GARCIA

FIG. 28

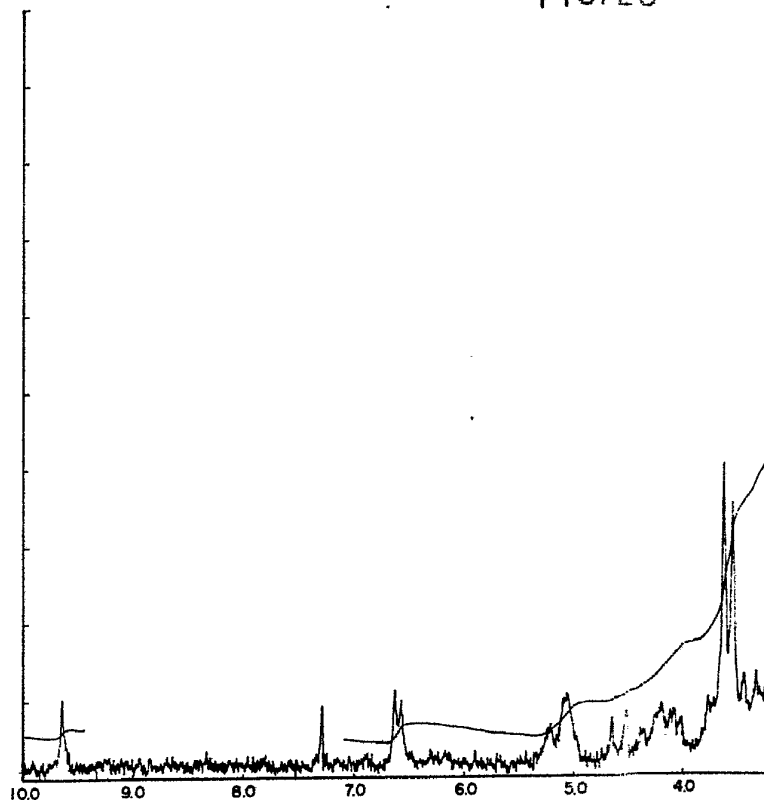
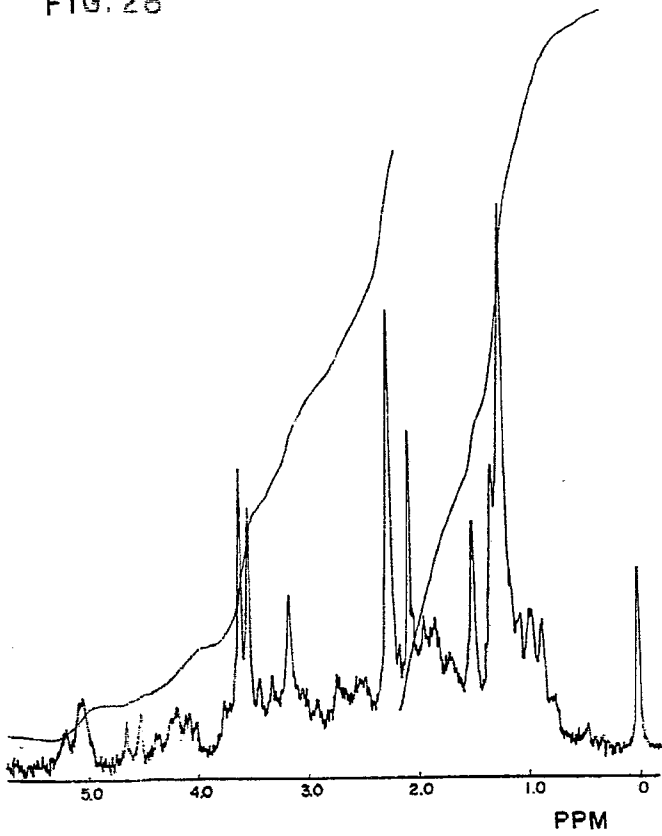


FIG. 28



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
BERNARDINO
P. P.

FIG. 29

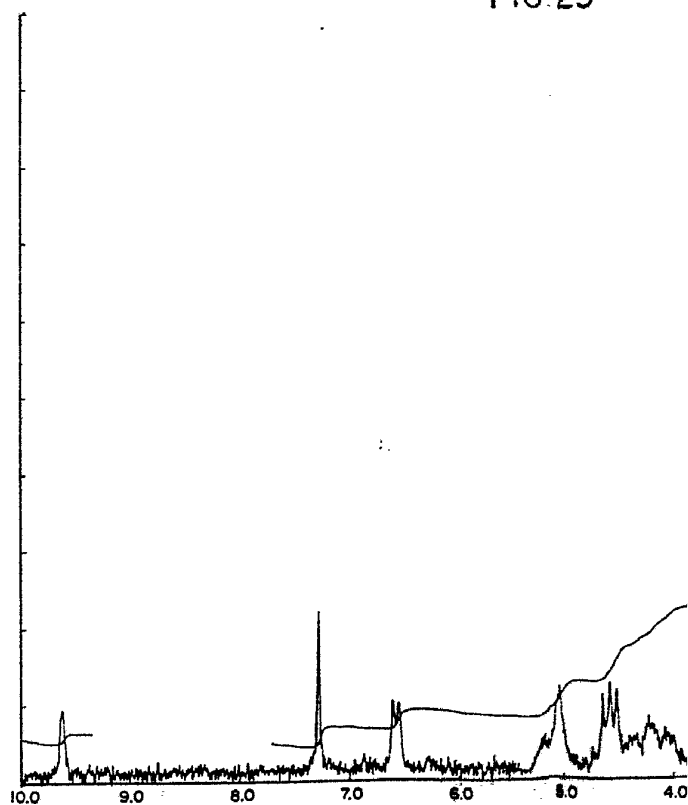
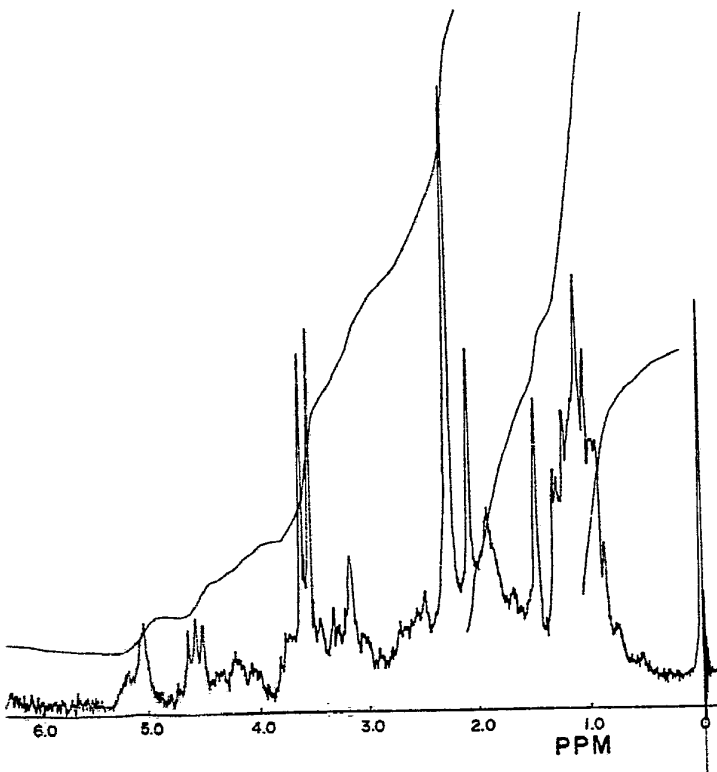


FIG. 29



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
BERNARDO UYERIA
S. P.

FIG. 30

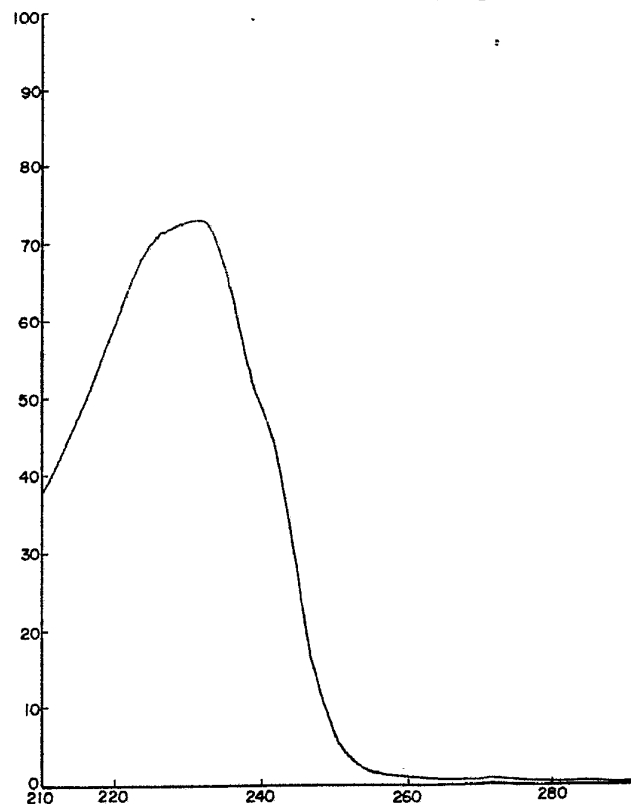


FIG. 30



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
BERNARDO URRÍA
R. P.

FIG. 3

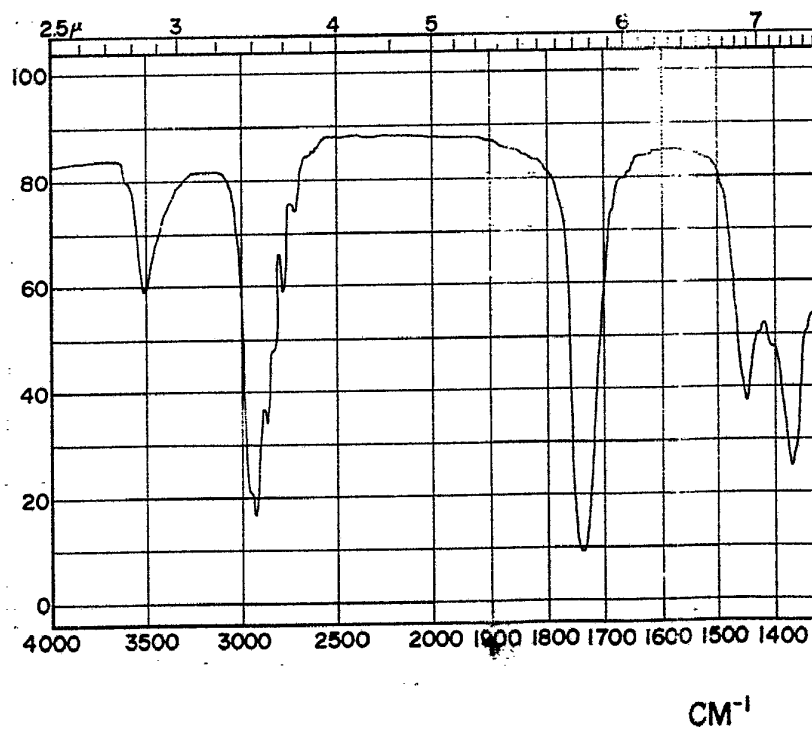
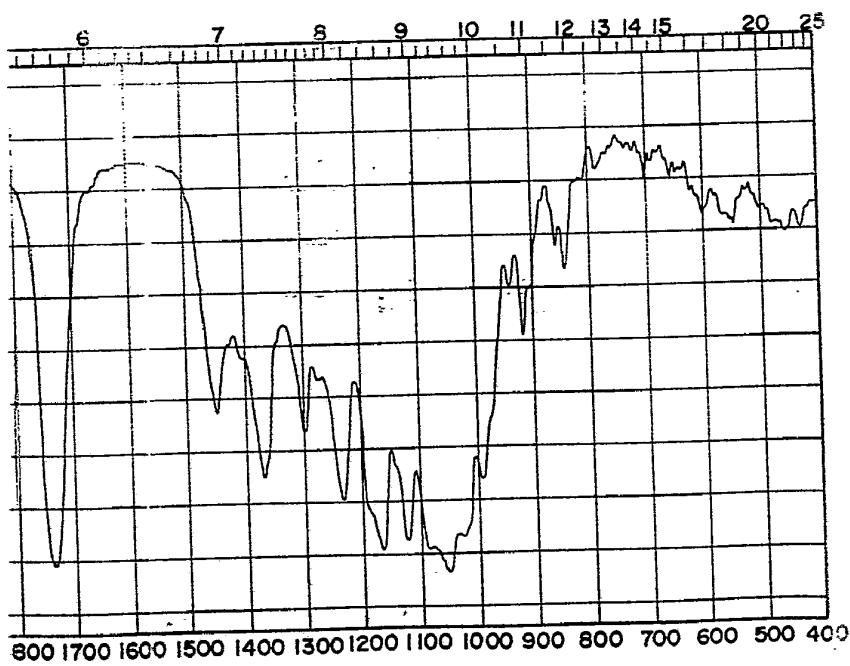


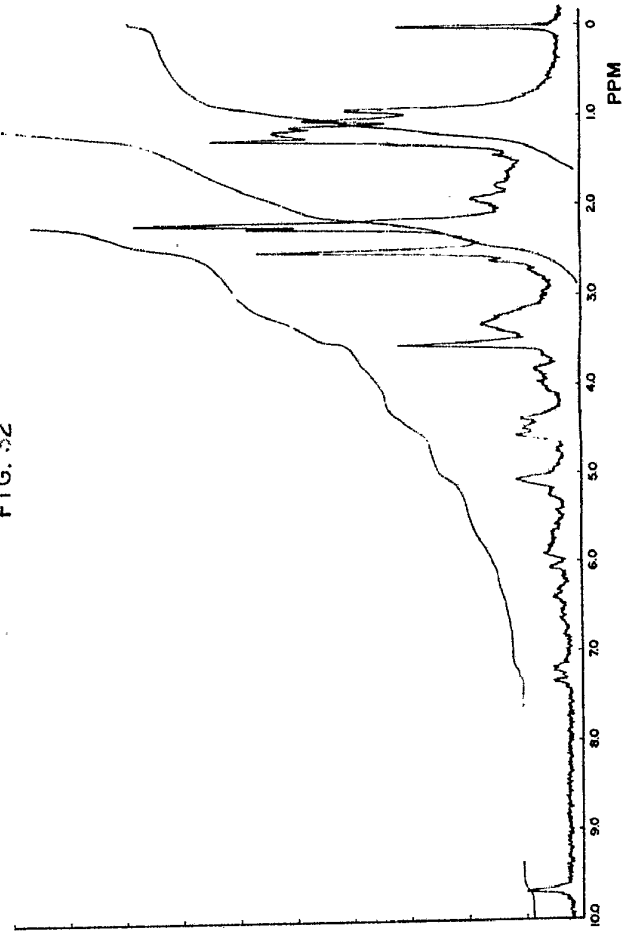
FIG. 31



CM⁻¹

ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976.
BERNARDO UNGRÍA
P. P.

FIG. 32



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE JULIO DE 1976
E. R. 100 ORIGINAL

FIG. 32

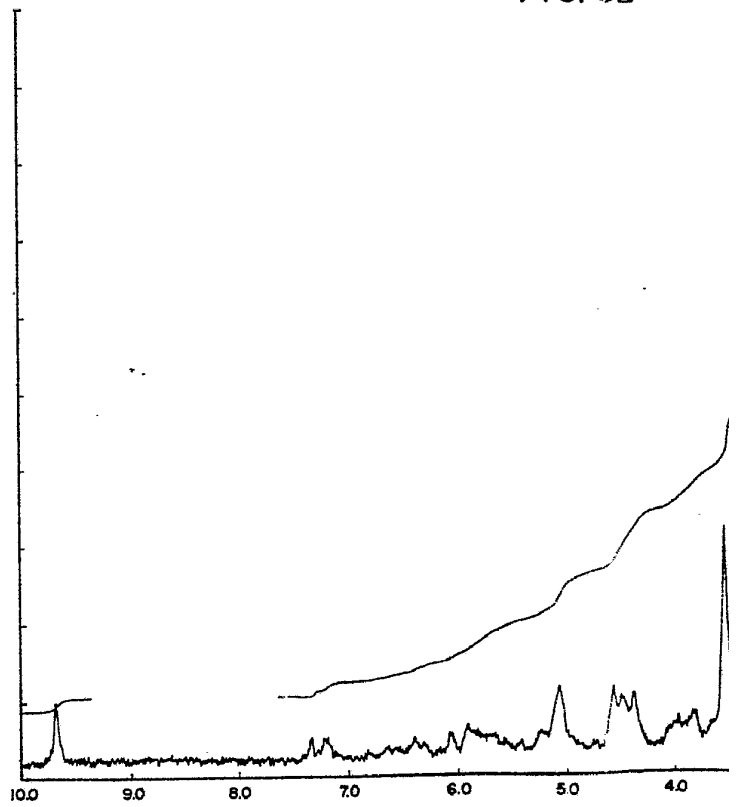
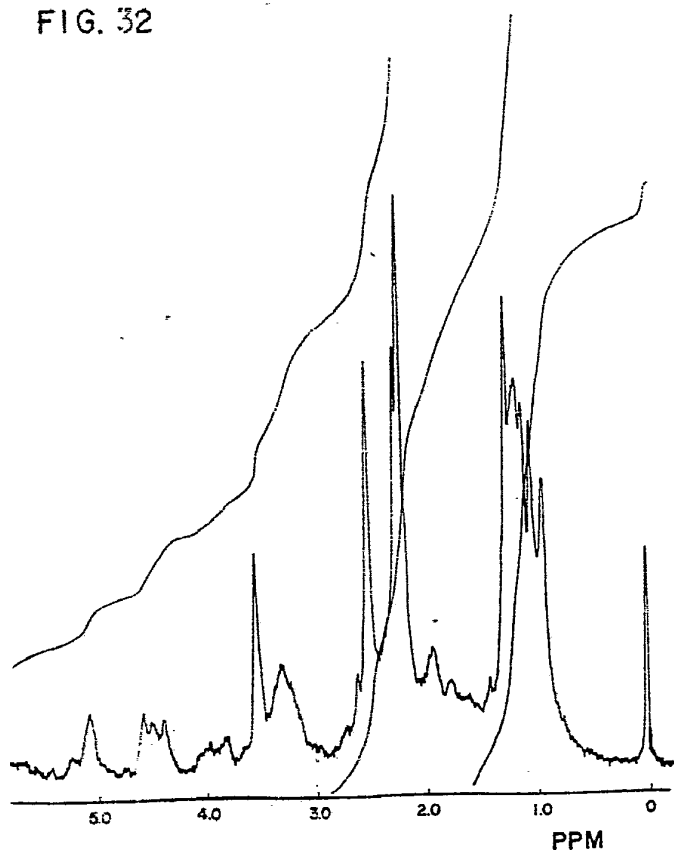
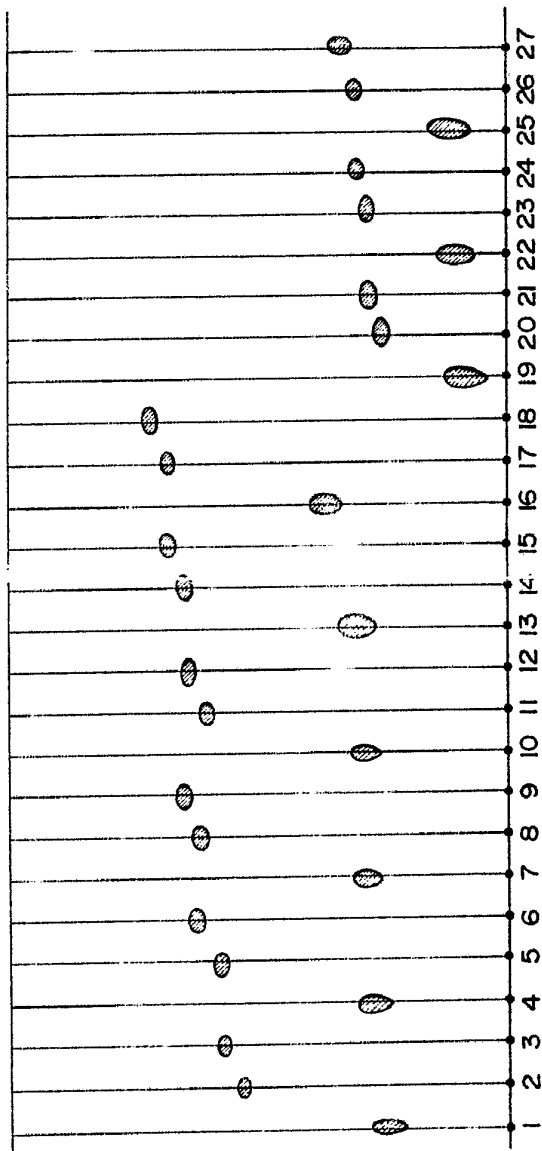


FIG. 32



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
BERNARDO UNGRÍA
R. R.

FIG. 33



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE JULIO DE 1976
FERNANDO VICEREA
F. M.

FIG. 3

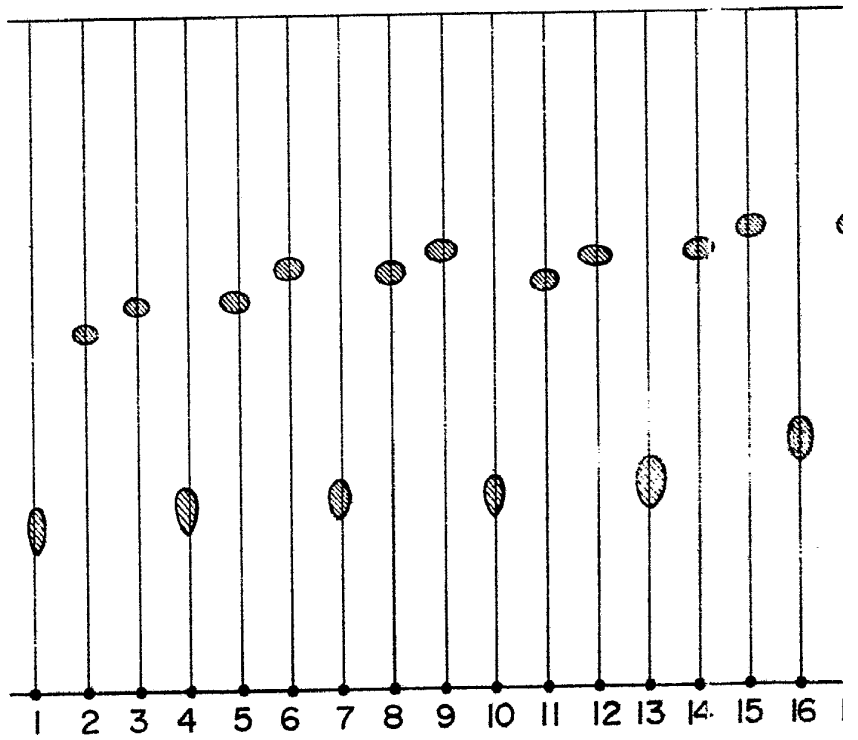
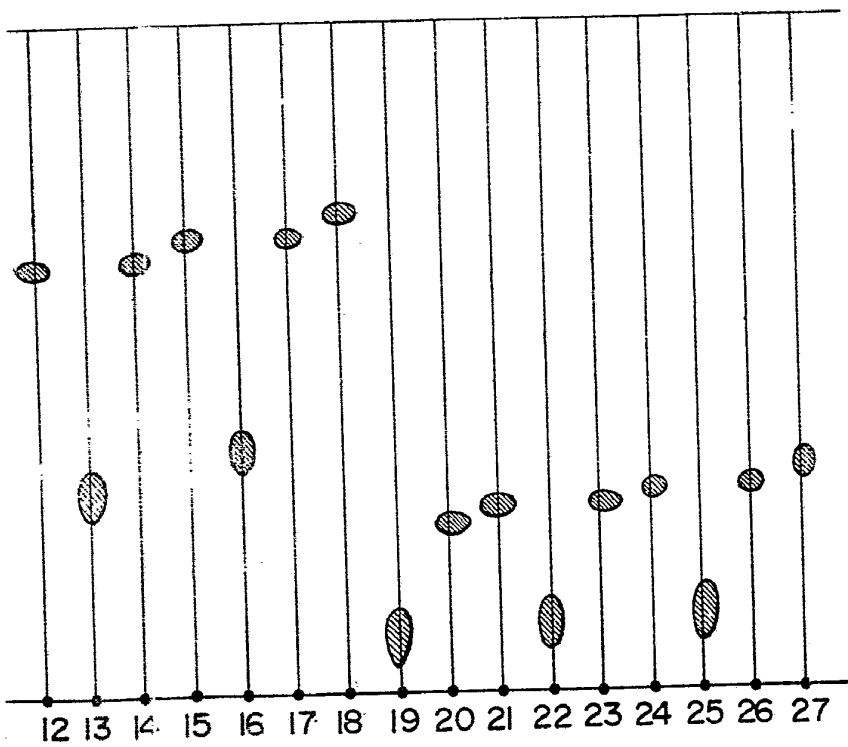


FIG. 33



ESCALA VARIABLE
MADRID, 30 DE Julio DE 1976
BERNARDO UNGRÍA
P. P.