

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 737**

51 Int. Cl.:

C07H 17/08 (2006.01)

C12P 19/62 (2006.01)

C12R 1/465 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.05.2011 PCT/CN2011/074658**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011 WO11147316**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2011 E 11786088 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2578596**

54 Título: **Levocarrimicina, composiciones farmacéuticas, procedimientos de preparación y utilizaciones de la misma**

30 Prioridad:

25.05.2010 CN 201010182027

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.09.2017

73 Titular/es:

**SHENYANG FUYANG PHARMACEUTICAL
TECHNOLOGY CO., LTD. (100.0%)
18-12 Yaoyang Street, Shenbei New District
Shenyang, Liaoning 110013 , CN**

72 Inventor/es:

**JIANG, YANG y
HAO, YUYOU**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 633 737 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Levocarrimicina, composiciones farmacéuticas, procedimientos de preparación y utilizaciones de la misma.

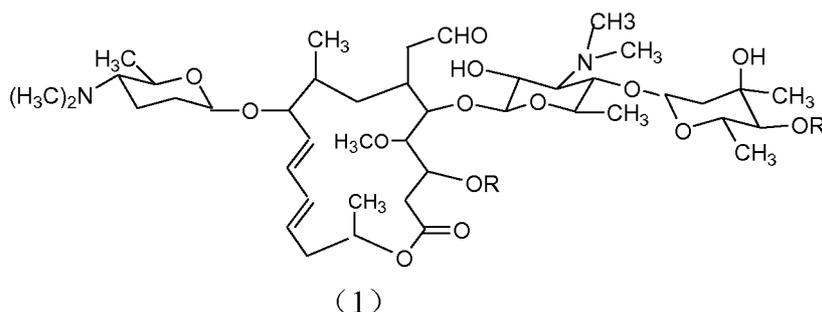
5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de los medicamentos en bruto de carrimicina y preparaciones farmacéuticas de los mismos, específicamente a un antibiótico macrólido producido mediante ingeniería genética, en particular a levocarrimicina, a sus procedimientos de preparación y a sus aplicaciones en la preparación de fármacos para tratar y prevenir enfermedades infecciosas.

Antecedentes de la invención

La carrimicina es un derivado nuevo de espiramicina desarrollado mediante la aplicación de tecnología de ingeniería genética que se denominó originariamente biotec-espiramicina (biotechspiramicyn) y que se denominaba anteriormente biotecmicina (biotechmycin) [patente nº: ZL97104440.6]. Según las "Rules for Chinese Approved Drug Names", y después de la revisión técnica y la confirmación de la Comisión de Farmacopea China, el nombre genérico chino de biotec-espiramicina se cambió por carrimicina. La carrimicina es un producto de fermentación de bacterias producidas mediante ingeniería genética. La estructura química de la carrimicina comprende principalmente 4"-isovalerilespiramicina, que incluye 4"-isovalerilespiramicina I, II, III, y aproximadamente 6 tipos de 4"-hidroxi-espiramicina acilada, por lo que la denominación química es 4"-acilespiramicina.

La fórmula estructural química del componente principal de carrimicina es tal como se muestra en la fórmula (1):



en la que:

	R	R'
Isovalerilespiramicina I	H	COCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Isovalerilespiramicina II	COCH ₃	COCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Isovalerilespiramicina III	COCH ₂ CH ₃	COCH ₂ CH(CH ₃) ₂

La carrimicina es un antibiótico macrólido con un anillo con 16 elementos que inhibe la síntesis de proteínas mediante combinación con el ribosoma de la bacteria.

Los resultados de ensayos *in vitro* muestran que la carrimicina es eficaz frente a bacterias gram-positivas, especialmente algunas bacterias resistentes a fármacos tales como *Staphylococcus aureus* con resistencia a β -lactama y *Staphylococcus aureus* con resistencia a eritrocina, y no posee ninguna resistencia cruzada a fármacos significativa con fármacos similares. No obstante, la carrimicina tiene actividad antibacteriana frente a *Mycoplasma* y *Chlamydia*, así como frente a algunas bacterias gram-negativas, tiene una buena permeabilidad en tejidos y una buena actividad antibacteriana frente a toxoplasmas epidémicos y legionela, y tiene además una función de inmunorregulación potencial. La actividad antibacteriana *in vivo* es mucho mejor que *in vitro* (documento ZL200310122420.9). Investigaciones clínicas muestran que la administración de comprimidos de 0,2-0,4 mg de carrimicina cada día durante 5-7 días es adecuada para tratar faringitis bacteriana aguda y tonsilitis supurativa aguda provocadas por estreptococos piogénicos; nasosinusitis bacteriana y bronquitis aguda provocadas por bacterias sensibilizadas; neumonía leve provocada por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Mycoplasma pneumoniae*; uretritis no gonocócica provocada por *Mycoplasma* y *Chlamydia*; enfermedades infecciosas tales como infección de la piel y de tejidos blandos, periodontitis y otitis media provocados por bacterias sensibilizadas. La tasa de eficacia total es del 92,68%. La carrimicina es segura y eficaz.

El estudio farmacocinético muestra que los componentes activos de la carrimicina son principalmente

isovalerilespiramicina I, II y III. La carrimicina se metaboliza rápidamente dando espiramicina *in vivo*. Según el AUC_{0-t} del fármaco parental isovalerilespiramicina I, II y II y el metabolito activo espiramicina I, II y III, la biodisponibilidad absoluta por administración oral es en promedio del 91,6%. Se ha informado que la biodisponibilidad absoluta de espiramicina por administración oral es del 30~40% (Frydman AM *et al.*, J Antimicrob Chemother.1988, 22 (supl. B):93-103). Esto demuestra que la isovalerilespiramicina mejora significativamente la biodisponibilidad del componente activo espiramicina. La dosis individual de carrimicina se elimina lentamente. Su $T_{1/2}$ es de entre 23~27 horas.

Investigaciones sobre los componentes activos de la carrimicina muestran que existe una pluralidad de átomos de carbono quirales en la estructura molecular de los componentes activos de la carrimicina: isovalerilespiramicina I, II y III. La quiralidad es un atributo básico de cuerpos tridimensionales y uno de los atributos esenciales de la naturaleza. Las macromoléculas biológicas, que incluyen proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y enzimas, como base importante del movimiento vital, tienen a menudo funciones fisiológicas importantes. El fármaco quiral es un par de enantiómeros de material objeto e imagen especular obtenido después de introducir la estructura molecular del fármaco en un centro quiral. Estos enantiómeros son básicamente iguales con respecto a sus propiedades fisicoquímicas, pero diferentes con respecto a su rotación óptica. Los enantiómeros se denominan respectivamente de tipo R (dextrorrotatorio) o de tipo S (sinistral) y racémicos. En los últimos 20 años, al ser más intensa la investigación farmacéutica, se ha comprobado que la diferencia de afinidad del enantiómero del fármaco con el receptor provocada por la diferencia de estereoselectividad del enantiómero del fármaco produce una gran diferencia en la acción farmacológica. El enantiómero con alta actividad entre fármacos quirales se denomina eutómero; mientras que el que tiene una baja actividad o carece de la misma se denomina distómero. En muchos casos, el distómero no solo no presenta una acción farmacológica, sino que incluso contrarresta la del eutómero. A veces tienen lugar reacciones secundarias tóxicas graves, lo que muestra la complejidad de la diferencia en la función farmacológica y determina la gran diferencia en el índice terapéutico de un enantiómero individual y del racemato del mismo. Por ejemplo, el efecto curativo de la bien conocida DL-(+)-sintomicina es la mitad del de D(-)-cloranfenicol; la actividad farmacéutica del isómero L del propranolol es 100 veces mayor que la del isómero D; la (-)-adanona es un analgésico potente mientras que la (+) no ejerce ningún efecto. También existen diferencias en la toxicidad. Por ejemplo, los dos enantiómeros de talidomida tienen un efecto de sedación similar en ratones, pero solo el isómero S(-) y la metabolina del mismo tienen embriotoxicina y teratogénesis; la ketamina es un anestésico y analgésico utilizado ampliamente, pero tiene efectos secundarios tales como alucinaciones. Algunos estudios demuestran que el S(+) es 3~4 veces más eficaz que el R(-) y que los efectos secundarios tóxicos están relacionados con este último. La gran diferencia en efectos curativos del fármaco quiral ha promovido la investigación y el desarrollo de fármacos quirales y el desarrollo de análisis de separación. Utilizando tecnología "quiral" podemos eliminar aquellos que no tienen ningún efecto o que tienen efectos secundarios tóxicos de fármacos eficaces y producir fármacos quirales puros con una estructura individual y orientada, produciendo así ingredientes farmacéuticos más puros, acelerando adicionalmente el efecto curativo y acortando el proceso de tratamiento. Por lo tanto, la investigación sobre fármacos quirales se ha convertido en una investigación de nuevos procedimientos para obtener nuevos medicamentos en todo el mundo. Los gobiernos nacionales y las empresas farmacéuticas han realizado grandes inversiones en campos tales como preparaciones de fármacos quirales, materiales quirales e intermedios quirales para investigación y desarrollo, a fin de lograr el dominio del mercado de la farmacia quiral. Además, con la mejora continua de la tecnología quiral, especialmente la utilización rápida y amplia de cromatografía líquida, se promueven el análisis de separación y la determinación de enantiómeros de fármacos quirales. Los fármacos quirales de enantiómeros individuales se han utilizado ampliamente.

Por medio de muchas investigaciones sobre si la carrimicina tiene actividad óptica también, el inventor está gratamente sorprendido al encontrar que ajustando y optimizando las condiciones de cultivo y de fermentación, el inventor ha conseguido accidentalmente una levocarrimicina con rotación óptica que tiene una mejor actividad antiinfecciosa. Por lo tanto, la presente invención proporciona levocarrimicina, procedimientos de preparación de la misma y sus usos en la preparación de fármacos para prevenir y tratar enfermedades infecciosas.

Los documentos CN 1 554 355 A y CN 1 405 299 A y YANG YALI *et al.*, "Determination of the components of bitespiramycin by HPLC", YAO HSEUH HSEUH PAO - ACTA PHARMACEUTICA SINICA, YAOXUE XUEBAO, CN, vol. 44, nº 10, 1 de enero de 2009, páginas 1183-1186, XP009173043, ISSN: 0513-4870, son documentos representativos del actual estado de la técnica.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona compuestos de levocarrimicina, composiciones farmacéuticas que contienen los mismos, procedimientos para su preparación y usos de las mismas, según las reivindicaciones siguientes.

El primer objetivo de la presente invención es proporcionar levocarrimicina, que tiene una rotación óptica y una mejor actividad antiinfecciosa al mismo tiempo.

El segundo objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica, conteniendo la

composición farmacéutica levocarrimicina con rotación óptica proporcionada por la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 El tercer objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento de preparación de levocarrimicina, estando caracterizado el procedimiento por un proceso de producción simplificado y un patrón de calidad fácil de controlar, y la levocarrimicina tiene un buen efecto, rotación óptica y una mejor actividad antiinfecciosa.

10 El cuarto objetivo de la presente invención es proporcionar la utilización de dicha levocarrimicina o dicha composición farmacéutica de levocarrimicina para la fabricación de un medicamento, en la que la composición farmacéutica de levocarrimicina tiene un buen efecto de resistencia a bacterias, *Chlamydia* y *Mycoplasma* y puede utilizarse como fármaco contra enfermedades infecciosas.

Para realizar el primer objetivo de la presente invención, se aplican las soluciones técnicas siguientes:

15 Una levocarrimicina, siendo la levocarrimicina una mezcla de isovalerilespiramicina III, II y I como componentes principales, que contiene un contenido determinado de isobutirilespiramicina III y II, butirilespiramicina III y II, propionilespiramicina III y II, así como acetilespiramicina III y II, siendo entre los mismos el contenido de la isovalerilespiramicina III no inferior al 30% en peso, el contenido total de isovalerilespiramicina III, II y I no inferior al 60% en peso y el contenido de acilespiramicina del 80-98% en peso, preferentemente del 85-98% en peso, de forma más preferida del 90-98% en peso y de la forma más preferida del 95-98% en peso; la rotación óptica específica de dicha levocarrimicina es $[\alpha]_D = -52^{\circ} \text{--} -57^{\circ}$ en la disolución de 0,02 g/ml de cloroformo a una temperatura de 25°C, preferentemente, $-54^{\circ} \text{--} -56^{\circ}$ y de forma más preferida de -55° .

25 El inventor ha realizado muchas investigaciones sobre la carrimicina. Ajustando y optimizando las condiciones de cultivo y fermentación, especialmente mediante un control estricto del pH durante la fermentación con un regulador del pH, las curvas de variación del pH en función del tiempo muestran tres fases continuas y cada fase satisface, respectivamente, una determinada fórmula, obteniéndose así la levocarrimicina con actividad óptica. La posible razón es que el contenido de componentes con actividad óptica se modificó bajo las condiciones de fermentación o la configuración óptica se modificó bajo las condiciones de fermentación.

30 El procedimiento de determinación de la rotación óptica específica de la levocarrimicina en la presente invención consiste en: pesar levocarrimicina preparada de la presente invención con precisión, añadir disolución de cloroformo y diluir en la disolución a aproximadamente 10 mg/ml; medir la rotación óptica utilizando la línea D del espectro del sodio (589,3 nm) con una longitud de medición de 1 dm y una temperatura de medición de 25°C y utilizar un polarímetro verificado con una precisión de 0,0001°.

35 El intervalo de fusión de la levocarrimicina de la presente invención es de 112-122°C, preferentemente de 114-120°C, de forma más preferida de 116-118°C.

40 El procedimiento de determinación del intervalo de fusión consiste en: disponer una cantidad apropiada de producto secado en un tubo capilar para realizar la determinación del punto de fusión; repetir la determinación 3 veces y obtener la media.

45 La levocarrimicina de la presente invención tiene rotación óptica. Según una investigación farmacológica moderna, la diferencia de afinidad del enantiómero del fármaco con el receptor provocada por la diferencia de estereoselectividad del enantiómero del fármaco produce una gran diferencia en la acción farmacológica. Los ensayos farmacodinámicos *in vivo* e *in vitro* demuestran que la levocarrimicina de la presente invención tiene un buen efecto antiinfeccioso y una buena actividad farmacológica simultáneamente, proporcionando así un nuevo fármaco para tratar enfermedades infecciosas y estableciendo una base para investigar la preparación farmacéutica quiral de carrimicina.

50 Los ensayos *in vivo* e *in vitro* demuestran que la levocarrimicina de la presente invención tiene una alta sensibilidad y una baja resistencia a fármacos. La levocarrimicina no solo es eficaz frente a *Staphylococcus aureus* resistente a fármacos, sino que también tiene un valor inestimable frente a la infección bacteriana provocada por abuso de antibióticos. Por ejemplo, el *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), infección por *Escherichia coli* provocada por β -lactamasa de espectro ampliado (ESBL) y enfermedades infecciosas provocadas por *Clostridium difficile* (C-diff) son todas debidas al abuso de antibióticos y se esperan controlar mediante el lanzamiento de la levocarrimicina.

55 La levocarrimicina también contiene espiramicina III y otros componentes, siendo entre los mismos el contenido de espiramicina III no superior al 1,0%, siendo el contenido total de componentes adicionales del 2,0-19% en peso, preferentemente del 2,0-14,0% en peso, de forma más preferida del 2,0-9,0% en peso y de la forma más preferida del 2,0-4,0% en peso.

65

En la presente invención, dichos componentes adicionales contienen al menos 3 homólogos mejorados de espiramicina.

5 La levocarrimicina de la presente invención es una mezcla de isovalerilespiramicina III, II y I como componentes principales, siendo entre los mismos dicha isovalerilespiramicina III un compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III, dicha isovalerilespiramicina II un compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II o dicha isovalerilespiramicina I un compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I;

10 cuando la isovalerilespiramicina III es un compuesto cristalino con la forma III de levoisovalerilespiramicina, dicho compuesto cristalino medido mediante la difracción de polvo de rayos X con radiación Cu-K- α tiene los picos característicos a 2θ de 8,0°, 10,0°, 11,2°, 11,7°, 16,4°, 19,1°, 19,6°, 20,0°, 21,4°, 22,9°, 23,6° y 29,4°;

15 cuando la isovalerilespiramicina II es un compuesto cristalino con la forma II de levoisovalerilespiramicina, dicho compuesto cristalino medido mediante la difracción de polvo de rayos X con radiación Cu-K- α tiene los picos característicos a 2θ de 10,0°, 11,6°, 16,4°, 17,3°, 19,1°, 21,2°, 22,1°, 22,7°, 26,4°, 26,9°, 27,5° y 31,5°;

20 cuando la isovalerilespiramicina I es un compuesto cristalino con la forma I de levoisovalerilespiramicina, dicho compuesto cristalino medido mediante la difracción de polvo de rayos X con radiación Cu-K- α tiene los picos característicos a 2θ de 7,6°, 8,0°, 10,0°, 11,4°, 16,4°, 17,0°, 17,5°, 17,9°, 19,5°, 22,7°, 23,7° y 24,4°.

25 Mediante una investigación adicional, el inventor ha descubierto que después de purificar y separar la levocarrimicina se obtienen composiciones individuales de isovalerilespiramicina III, II o I; se recristaliza una de las composiciones y se obtiene el compuesto cristalino de isovalerilespiramicina III, II o I; se mezcla uno de los compuestos cristalinos con levocarrimicina para proporcionar levocarrimicina en la que la isovalerilespiramicina III, II o I es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III, II o I. Ensayos farmacológicos *in vivo* demuestran que el efecto farmacológico de levocarrimicina en la que la isovalerilespiramicina III, II o I es un cristal de levoisovalerilespiramicina III, II o I es mucho mejor que el de la levocarrimicina pura.

30 Para realizar el segundo objetivo de la presente invención, se aplican las soluciones técnicas siguientes:

Una composición farmacéutica de levocarrimicina, conteniendo la composición farmacéutica de levocarrimicina dicha levocarrimicina y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 Entre dichas composiciones farmacéuticas de la presente invención, el contenido de la levocarrimicina es el de una cantidad segura y terapéuticamente eficaz y es del 10-90% en peso de la composición farmacéutica, preferentemente del 25-75% en peso y de forma más preferida del 40-60% en peso.

40 "Cantidad segura y terapéuticamente eficaz", tal como se utiliza en la presente invención, significa la cantidad suficiente de fármacos, compuestos, composiciones, productos o medicamentos que podría aliviar, revertir o tratar enfermedades de seres humanos y otros mamíferos y que no causa un daño grave a los tejidos de los mamíferos.

45 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" de la presente invención se refiere a vehículos farmacológicos convencionales en el campo de la farmacia, por ejemplo, diluyentes, excipientes tales como agua, materiales de carga tales como almidón y azúcar de caña; adhesivos tales como derivados de celulosa, alginato, gelatinas y polivinilpirrolidona; agente humectante tal como glicerina; disgregantes tales como agar, carbonato de calcio y bicarbonato de sodio; potenciadores de la absorción tales como un compuesto de amonio cuaternario; tensioactivos tales como hexadecanol; vehículos adsorbentes tales como caolín y bentonita; lubricantes tales como polvo de talco, estearato de calcio, Mg y polietilenglicol. Además, también pueden añadirse otros coadyuvantes tales como especias y edulcorantes a la composición farmacéutica.

50 Las composiciones de la presente invención pueden poseer cualquier cantidad segura y terapéuticamente eficaz de diluyentes, disgregante, lubricantes, material de carga, adhesivo, humectantes, potenciador de la absorción, tensioactivo, excipiente, o una cantidad segura y terapéuticamente eficaz de un vehículo farmacológico comúnmente utilizado en este campo.

55 La composición farmacéutica de levocarrimicina de la presente invención se presenta en forma de preparaciones que pueden aplicarse con fines farmacéuticos, y las preparaciones son preparaciones líquidas, sólidas, semisólidas o gaseosas.

60 Las preparaciones líquidas comprenden inyección, disolución de infusión, disolución, mezcla, jarabe, tintura o coloide,

65 Las preparaciones sólidas comprenden inyección de polvo, inyección de polvo liofilizado, comprimido, cápsula, polvo, gránulo, pastilla, preparaciones sublimadas o granulados;

Las preparaciones semisólidas comprenden pomada, apósito, supositorio, extracto o gel;

Las gaseosas comprenden aerosol o pulverización.

5 La composición farmacéutica de levocarrimicina de la presente invención, siendo entre las mismas el contenido de dicha levocarrimicina de 10~1500 mg por formulación unitaria, preferentemente, 100~1000 mg por formulación unitaria, preferentemente, 200~500 mg por formulación unitaria. Para realizar el tercer objetivo de la presente invención, se aplican las soluciones siguientes:

10 Un procedimiento de preparación de levocarrimicina, que incluye cultivo, fermentación y un proceso de extracción, consistiendo entre los mismos el cultivo y la fermentación en: cultivar las cepas fúngicas clonadas WSP-195 producidas mediante espiramicina que contienen el gen de 4"-isovaleril transferasa en un medio de cultivo inclinado, inocularlas en un medio de siembra, después inocularlas en un medio de fermentación después del cultivo, y controlar el proceso de fermentación mediante un regulador del pH. La fermentación se realiza a un pH de 6,0~9,0, preferentemente de 6,0~8,0 y de la forma más preferida de 6,0~7,5. Las curvas de variación del pH en función del tiempo muestran tres fases continuas; la primera fase satisface la fórmula $y_1=k_1x_1+6,0$, en la que $0,0227\leq k_1\leq 0,1364$, $0<x_1\leq 22$; la segunda fase satisface $y_2=k_2x_2+b_2$, en la que $-0,0735\leq k_2<0$, $6,5<b_2\leq 10,62$, $22\leq x_2\leq 56$; y la tercera fase satisface la fórmula $y_3=k_3x_3+b_3$, en la que $0<k_3\leq 0,0078$, $6,06\leq b_3<6,5$, $56\leq x_3\leq 120$.

20 En la presente invención, ajustando y optimizando las condiciones de cultivo y fermentación, especialmente controlando el pH durante la fermentación con un regulador del pH, las curvas de variación del pH en función del tiempo muestran tres fases continuas y cada fase satisface, respectivamente, una determinada fórmula, obteniéndose así la levocarrimicina con actividad óptica.

25 En la presente invención, el proceso de fermentación es clave, es necesario determinar regularmente el pH durante la totalidad del proceso de fermentación y este se controla añadiendo regulador del pH, siendo el regulador del pH uno cualquiera, o una combinación, de glucosa, ácido cítrico, ácido acético, ácido clorhídrico, agua amoniacal, hidróxido de sodio o hidróxido de potasio, preferentemente glucosa, ácido cítrico, ácido acético, agua amoniacal o una combinación de los mismos; de forma más preferida glucosa, agua amoniacal o una combinación de las mismas.

30 El procedimiento de preparación de la presente invención, en el que el proceso de extracción consiste en: procesar el licor de fermentación con sulfato de aluminio para obtener el filtrado, ajustar el pH a 8,5~9,0, extraer con acetato de butilo, lavar el extracto de acetato de butilo con agua no salina y NaH_2PO_4 al 1% respectivamente, después extraer con agua de pH 2,0~2,5 para obtener un extracto acuoso, ajustar el pH a 4,5~5,5, volatilizar y eliminar el acetato de butilo residual para obtener un extracto hídrico, filtrar y ajustar el pH a 8,5~9,0, obtener un precipitado, lavar el precipitado con agua purificada y secarlo para obtener levocarrimicina.

40 En dicho procedimiento de preparación de la presente invención, dicho medio de cultivo inclinado contiene el 2% de harina de soja, 1% de glucosa, 3% de almidón, 0,5% de CaCO_3 , 0,4% de NaCl y 2% de agar.

45 En dicho procedimiento de preparación de la presente invención, dicho medio de siembra contiene el 1,5% de harina de soja, 3,0% de almidón, 0,4% de NaCl, 0,5% de CaCO_3 , 0,3% de peptona y 0,05% de KH_2PO_4 .

50 En dicho procedimiento de preparación de la presente invención, dicho medio de fermentación contiene el 0,5% de glucosa, 6,0% de almidón, 0,5% de levadura en polvo, 2,0% de harina de pescado, 0,6% de NH_4NO_3 , 1,0% de NaCl, 0,5% de CaCO_3 , 0,05% de KH_2PO_4 , 0,1% de MgSO_4 , 0,5% de aceite de soja y 0,02% de agente desespumante.

55 En dicho procedimiento de preparación de la presente invención, el cultivo en el medio de cultivo inclinado dura 8~15 días a una temperatura de 28~38°C.

En dicho procedimiento de preparación de la presente invención, el cultivo en el medio de siembra dura 40~80 horas a una temperatura de 25~30°C.

En dicho procedimiento de preparación de la presente invención, la fermentación en el medio de fermentación dura 72~120 horas a una temperatura de 26~30°C.

60 Cuando la levocarrimicina contiene el cristal de isovalerilespiramicina I, II o III, dicho procedimiento de preparación comprende también las etapas siguientes:

a) Separar y purificar la levocarrimicina para obtener levoisovalerilespiramicina I, II o III;

65 b) Recristalizar la levoisovalerilespiramicina I, II o III para obtener el compuesto cristalino de

levoisovalerilespiramicina I, II o III;

- 5 c) Eliminar el acetonitrilo presente en la levocarrimicina después de separar y purificar levoisovalerilespiramicina I, II o III en la etapa a) mediante evaporación rotatoria, después extraer con una cantidad, una vez, de acetato de etilo y eliminar el acetato de etilo del extracto mediante evaporación rotatoria para obtener una muestra de pasta; redisolver la muestra obtenida con éter de petróleo y eliminar el éter de petróleo mediante evaporación rotatoria para obtener la levocarrimicina;
- 10 d) Mezclar el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I, II o III obtenido en la etapa b) con la levocarrimicina obtenida en la etapa c) para obtener la levocarrimicina en la que la isovalerilespiramicina I, II o III es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I, II o III.

El procedimiento de preparación de la presente invención, en el que dicho proceso de separación y purificación de la etapa a) consiste en:

15 Purificar la levocarrimicina obtenida en la separación preliminar con una cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa, preparar una columna cromatográfica con ODS, utilizar acetonitrilo y disolución tampón de acetato de amonio como fase móvil en una elución en gradiente; registrar el espectrograma UV separado mediante detección UV y recoger los picos diana de componentes de levoisovalerilespiramicina I, II o III:

20 Columna cromatográfica: columna cromatográfica preparativa ODS;

Fase móvil: acetonitrilo (A), disolución de acetato de amonio 100 mM (B);

25 Condición de gradiente: aplicar gradiente lineal de 0-60 min, siendo A el 25%-65%; y de 61-90 min, siendo A el 65%-90%;

Velocidad de flujo: 260 ml/min;

30 Volumen de inyección: 10 ml;

Concentración de muestreo: 0,5 g/ml;

35 Longitud de onda de medición: 231 nm;

Medio de recogida: recogida mediante activación UV;

40 Recoger la muestra de levoisovalerilespiramicina I según el tiempo de retención de 44,759 min de levoisovalerilespiramicina I; o recoger la muestra de levoisovalerilespiramicina II según el tiempo de retención de 43,34 min de levoisovalerilespiramicina II; o recoger la muestra de levoisovalerilespiramicina III según el tiempo de retención de 48,009 min de levoisovalerilespiramicina III; después eliminar el acetonitrilo mediante evaporación rotatoria, después extraer con una cantidad, una vez, de acetato de etilo y eliminar el acetato de etilo del extracto mediante evaporación rotatoria para obtener una muestra de pasta; redisolver la muestra obtenida con éter de petróleo y eliminar el éter de petróleo mediante evaporación rotatoria para obtener el polvo sólido blanco de levoisovalerilespiramicina I, II o III.

El procedimiento de preparación de la presente invención,

50 en el que cuando la isovalerilespiramicina I es un cristal de levoisovalerilespiramicina I, el cristal se obtiene mediante el proceso de recristalización siguiente: disolver el polvo sólido blanco de levoisovalerilespiramicina I en el disolvente mixto de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, añadir después agua pura con agitación, después de ello reducir la temperatura a 5°C-15°C con agitación continua, para obtener el cristal de la levoisovalerilespiramicina I, en el que la relación en volumen de acetato de etilo a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto es de 1:0,1-10:0,5-1, preferentemente de 1:2- 8:0,8-1;

55 Entre las mismas, la primera solución técnica preferida para la recristalización del cristal de levoisovalerilespiramicina I es: el volumen de agua pura añadido es 2-9 veces el de la suma de acetato de etilo, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, preferentemente 2,5-7,5 veces, y la velocidad de adición de agua es de 4-10 ml/minuto, preferentemente de 6-8 ml/minuto.

60 La segunda solución técnica preferida para la recristalización del cristal de levoisovalerilespiramicina I es: la relación en volumen de acetato de etilo a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto es 1:0,1-10:0,5-1, preferentemente 1:2-8:0,8-1.

65 La tercera solución técnica preferida para la recristalización del cristal de levoisovalerilespiramicina I es: la

velocidad de agitación cuando se añade agua pura es de 30–60 rpm, preferentemente de 45–60 rpm; después de añadir el agua pura la velocidad de agitación es de 10–30 rpm, preferentemente de 10–20 rpm.

5 La cuarta solución técnica preferida para la recristalización del cristal de levoisovalerilespiramicina I es: después de añadir agua pura la velocidad de enfriamiento es de 1–3°C por hora, preferentemente de 1–1,5°C por hora.

10 Cuando la isovalorilespiramicina II es un cristal de levoisovalerilespiramicina II, el cristal se obtiene mediante el proceso de recristalización siguiente: disolver el polvo sólido blanco de levoisovalerilespiramicina II en el disolvente mixto de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, añadir después agua pura con agitación, después de ello reducir la temperatura a 5°C–15°C con agitación continua, para obtener el cristal de levoisovalerilespiramicina II, en el que la relación en volumen de metanol absoluto a acetona anhidra a alcohol etílico absoluto en el disolvente mixto es de 1:0,1–10:0,5–1, preferentemente de 1:2– 8:0,8–1;

15 Entre las mismas, la primera solución técnica preferida para la recristalización del cristal de levoisovalerilespiramicina II es: el volumen de agua pura añadido es 2–9 veces el de la suma de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, preferentemente 2,5–7,5 veces; la velocidad de adición de agua es de 4–10 ml/minuto, preferentemente de 6–8 ml/minuto.

20 La segunda solución técnica preferida para la recristalización del cristal de levoisovalerilespiramicina II es: la relación en volumen de metanol absoluto a acetona anhidra a alcohol etílico absoluto en el disolvente mixto es de 1:0,1–10:0,5–1, preferentemente de 1:2–8:0,8–1.

25 La tercera solución técnica preferida para la recristalización del cristal de levoisovalerilespiramicina II es: la velocidad de agitación cuando se añade agua pura es de 30–60 rpm, preferentemente de 45–60 rpm; después de añadir el agua pura la velocidad de agitación es de 10–30 rpm, preferentemente de 10–20 rpm.

La cuarta solución técnica preferida para la recristalización del cristal de levoisovalerilespiramicina II es: después de añadir agua pura la velocidad de enfriamiento es de 1–3°C por hora, preferentemente de 1–1,5°C por hora.

30 Cuando la isovalorilespiramicina III es un cristal de levoisovalerilespiramicina III, el compuesto cristalino se obtiene mediante el proceso de recristalización siguiente: disolver el polvo sólido blanco de levoisovalerilespiramicina III en el disolvente mixto de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, añadir después agua pura con agitación, después de ello reducir la temperatura a 5°C–15°C con agitación continua, para obtener el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III, en el que la relación en volumen de metanol absoluto a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto es de 1:0,1–10:0,5–1, preferentemente de 1:2– 8:0,8–1;

40 Entre las mismas, la primera solución técnica preferida para la recristalización del cristal de levoisovalerilespiramicina III es: el volumen de agua pura añadido es 2–9 veces el de la suma de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, preferentemente 2,5–7,5 veces; la velocidad de adición de agua es de 4–10 ml/minuto, preferentemente de 6–8 ml/minuto.

45 La segunda solución técnica preferida para la recristalización del cristal de levoisovalerilespiramicina III es: la relación en volumen de metanol absoluto a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto es de 1:0,1–10:0,5–1, preferentemente de 1:2–8:0,8–1.

50 La tercera solución técnica preferida para la recristalización del cristal de levoisovalerilespiramicina III es: la velocidad de agitación cuando se añade agua pura es de 30–60 rpm, preferentemente de 45–60rpm; después de añadir el agua pura la velocidad de agitación es de 10–30 rpm, preferentemente de 10–20 rpm.

La cuarta solución técnica preferida para la recristalización del cristal de levoisovalerilespiramicina III es: después de añadir agua pura la velocidad de enfriamiento es de 1–3°C por hora, preferentemente de 1–1,5°C por hora.

55 La presente invención también proporciona la utilización de dicha levocarrimicina o dicha composición farmacéutica para fabricar un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

60 En la presente invención, dichas enfermedades infecciosas son las enfermedades provocadas por la infección por bacteria gram-positiva, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, estreptococo piogénico, *Micrococcus catarrhalis*, gonococo, *Bacillus influenzae*, legionela o bacterias anaerobias.

La presente invención también proporciona la utilización de dicha levocarrimicina y dicha composición farmacéutica para la fabricación de un medicamento antibacteriano, incluyendo dichas bacterias *Streptococcus pneumoniae*, estreptococo del grupo A, estreptococo piogénico, enterococo, *Staphylococcus aureus*, *S.*

epidermids, Catarrhal coccus, gonococo, Bacillus influenzae, Escherichia coli, Escherichia coli enterotoxigénica, Escherichia coli enteropatogénica, Escherichia coli enteroinvasiva, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, el bacilo *Proteus vulgaris*, el bacilo tifoideo, *Acinetobacter, Citrobacter, Serratia marcescens, S. Sonnei, Sh. flexneri, Tritirachium album*; legionela tal como *Legionella pneumophila, Legionella gormanii, Legionella bozemanii, Legionella dumoffii, Legionella jordanis* y *Legionella micdadei*; bacterias anaerobias tales como *Bacteroides fragilis, Bacteroides thetaiotaomicron, Bacteroides vulgatus, Bacteroides bacteroides, Bacteroides prevotella, Prevotella asaccharolyticus, Prevotella oralis, Fusobacteriumnu cleatum, Fusobacterium russii*, bifidobacterias, *Lactobacillus, Peptostreptococcus, Propionibacterium acnes, Clostridium perfringens* y hongos de tipo levadura.

El experto en la materia sabrá generalmente que la cantidad de componentes activos necesaria para el tratamiento cambia dependiendo de diversos factores, que incluyen la naturaleza de la enfermedad y la edad y la condición del paciente y que se determinará finalmente por parte del médico. Si las composiciones farmacéuticas de levocarrimicina de la presente invención se administran en formas farmacéuticas unitarias, el contenido de la levocarrimicina es de 10–1500 mg por forma farmacéutica unitaria, preferentemente de 100–1000 mg por forma farmacéutica unitaria y de forma más preferida de 200–500 mg por forma farmacéutica unitaria. La dosis necesaria puede administrarse todos los días mediante una dosis individual o en dosis divididas.

El ensayo farmacodinámico *in vitro* demuestra que los componentes activos presentes en la levocarrimicina o sus composiciones farmacéuticas proporcionados por la presente invención tienen actividad óptica y un efecto antiinfeccioso excelente. Los componentes activos no solo tienen una buena actividad antibacteriana frente a bacterias gram-positivas, especialmente *Staphylococcus aureus* que es resistente a eritrocina, β -lactamasa, *Streptococcus pneumoniae* y estreptococo piogénico, sino que también son eficaces frente a algunas bacterias negativas tales como *Catarrhal coccus, gonococo, Bacillus influenzae*, algunas legionelas y bacterias anaerobias, especialmente *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*.

En comparación con la técnica anterior, la presente invención presenta las ventajas siguientes:

- 1) La levocarrimicina de la presente invención tiene actividad óptica; no obstante, según la investigación farmacológica moderna, la diferencia de afinidad del enantiómero del fármaco con el receptor provocada por la diferencia de estereoselectividad del enantiómero del fármaco es causante de una gran diferencia en la acción farmacológica. Ensayos farmacodinámicos *in vivo* e *in vitro* demuestra que la levocarrimicina de la presente invención tiene un efecto antiinfeccioso excelente y una buena actividad farmacológica simultáneamente, proporcionando así un nuevo fármaco para curar enfermedades infecciosas y estableciendo una base para la investigación y el desarrollo de fármacos quirales de carrimicina; ensayos farmacodinámicos *in vivo* muestran que la levocarrimicina, en la que la isovalerilespiramicina I, II o III es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I, II o III tiene una mejor función de protección para el efecto curativo de ratones infectados por 12 cepas de bacterias;
- 2) El procedimiento de preparación de levocarrimicina proporcionado en la presente invención, en el que ajustando y optimizando las condiciones de cultivo y fermentación, especialmente mediante control del pH durante la fermentación con un regulador del pH, las curvas de variación del pH en función del tiempo muestran tres fases continuas y cada fase satisface, respectivamente, una determinada fórmula, obteniéndose así la levocarrimicina con actividad óptica.
- 3) El procedimiento de preparación de levocarrimicina proporcionado en la presente invención, que se caracteriza por un proceso de producción simplificado, es adecuado para la producción industrial a gran escala.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es la curva de variación de valor del pH-tiempo durante la fermentación en el ejemplo 1 de la presente invención;

La figura 2 es la curva de variación de valor del pH-tiempo durante la fermentación en el ejemplo 2 de la presente invención;

La figura 3 es la curva de variación de valor del pH-tiempo durante la fermentación en el ejemplo 3 de la presente invención;

La figura 4 es el cromatograma líquido de componentes de carrimicina estándar, entre los que,

- 1- espiramicina III
- 2- monoacetilespiramicina II
- 3- monoacetilespiramicina III
- 4- propionilespiramicina II

- 5- propionilespiramicina III
- 6- (iso-)butirilespiramicina II
- 7- isovalerilespiramicina I
- 8- (iso-)butirilespiramicina III
- 9- isovalerilespiramicina II
- 10- isovalerilespiramicina III

La figura 5 es el cromatograma líquido de levocarrimicina proporcionada en el ejemplo 4 de la presente invención.

La figura 6 es el patrón de difracción de polvo de rayos X de compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I de la presente invención;

La figura 7 es el patrón de difracción de polvo de rayos X de compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II de la presente invención;

La figura 8 es el patrón de difracción de polvo de rayos X de compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III de la presente invención;

Descripción detallada de los ejemplos preferidos

Los siguientes son ejemplos de la presente invención y estos ejemplos tienen el objetivo de describir adicionalmente, más que limitar, la presente invención.

[Ejemplo 1] Preparación de levocarrimicina

1) Cultivo y fermentación

Cultivar las cepas fúngicas clonadas WSJ-195 producidas mediante espiramicina que contienen el gen de 4"-isovaleril transferasa en un medio de cultivo inclinado, inocularlas en un medio de siembra, después inocularlas en un medio de fermentación después del cultivo, y controlar el proceso de fermentación por medio de glucosa y agua amoniacal. La fermentación dura 120 h a un valor del pH de 6,0-9,0. Las curvas de variación del pH en función del tiempo muestran tres fases continuas, la primera fase satisface la fórmula $y_1=0,1364x_1+6,0$, en la que $0 < x_1 \leq 22$; la segunda fase satisface la fórmula $y_2=-0,0735x_2+10,64$, en la que $22 \leq x_2 \leq 56$; la tercera fase satisface la fórmula $y_3=0,0078x_3+6,06$, en la que $56 \leq x_3 \leq 120$, véase la figura 1 para la curva de variación; obtener el caldo de fermentación.

2) Extracción

Procesar el caldo de fermentación con sulfato de aluminio para obtener un filtrado, ajustar el pH a 9,0, extraer con acetato de butilo, lavar el extracto de acetato de butilo con agua no salina y NaH_2PO_4 al 1% respectivamente, después extraer con agua de pH 2,5 para obtener un extracto acuoso, ajustar el pH a 4,5, volatilizar y eliminar el acetato de butilo residual para obtener un extracto hídrico, filtrar y ajustar el pH a 8,5, obtener un precipitado, lavar el precipitado con agua purificada y secarlo para obtener levocarrimicina.

[Ejemplo 2] Preparación de levocarrimicina

1) Cultivo y fermentación

Cultivar las cepas fúngicas clonadas WSJ-195 producidas mediante espiramicina que contienen el gen de 4"-isovaleril transferasa en un medio de cultivo inclinado, inocularlas en un medio de siembra, después inocularlas en un medio de fermentación después del cultivo, y controlar el proceso de fermentación por medio de glucosa e hidróxido de sodio. La fermentación dura 110 h en condiciones de valor del pH de 6,0-8,0. Las curvas de variación del pH en función del tiempo muestran tres fases continuas, la primera fase satisface la fórmula $y_1=0,0909x_1+6,4$, en la que $0 < x_1 \leq 22$; la segunda fase satisface la fórmula $y_2=-0,0441x_2+7,8$, en la que $22 \leq x_2 \leq 56$; y la tercera fase satisface la fórmula $y_3=0,0078x_3+6,06$, en la que $56 \leq x_3 \leq 110$, véase la figura 2 para la curva de variación; obtener el caldo de fermentación.

2) Extracción

Procesar el caldo de fermentación con sulfato de aluminio para obtener un filtrado, ajustar el pH a 8,9, extraer con acetato de butilo, lavar el extracto de acetato de butilo con agua no salina y NaH_2PO_4 al 1% respectivamente, después extraer con agua de pH 2,2 para obtener un extracto acuoso, ajustar el pH a 4,2, volatilizar y eliminar el acetato de butilo residual para obtener un extracto hídrico, filtrar y ajustar el pH a 8,5, obtener un precipitado, lavar el precipitado con agua purificada y secarlo para obtener levocarrimicina.

[Ejemplo 3] Preparación de levocarrimicina1) Cultivo y fermentación

5 Cultivar las cepas fúngicas clonadas WSJ-195 producidas mediante espiramicina que contienen el gen de 4"-
isovaleril transferasa en un medio de cultivo inclinado, inocularlas en un medio de siembra, después inocularlas
en un medio de fermentación después del cultivo, y controlar el proceso de fermentación por medio de glucosa y
ácido cítrico. La fermentación dura 115 h en condiciones de valor del pH de 6,0-7,5. Las curvas de variación del
10 pH en función del tiempo muestran tres fases continuas, la primera fase satisface la fórmula $y_1=0,0682x_1+6,0$, en
la que $0 < x_1 < 22$; la segunda fase satisface la fórmula $y_2=-0,0294x_2+8,147$, en la que $22 < x_2 < 56$; la tercera fase
satisface la fórmula $y_3=0,0078x_3+6,06$, en la que $56 < x_3 < 115$, véase la figura 3 par la curva de variación; obtener
el caldo de fermentación.

2) Extracción

15 Procesar el caldo de fermentación con sulfato de aluminio para obtener un filtrado, ajustar el pH a 8,6, extraer
con acetato de butilo, lavar el extracto de acetato de butilo con agua no salina y NaH_2PO_4 al 1%
respectivamente, después extraer con agua de pH 2,3 para obtener un extracto acuoso, ajustar el pH a 5,2,
20 volatilizar y eliminar el acetato de butilo residual para obtener un extracto hídrico, filtrar y ajustar el pH a 8,7,
obtener un precipitado, lavar el precipitado con agua purificada y secarlo para obtener levocarrimicina.

[Ejemplo 4] Preparación de levocarrimicina1) Cultivo y fermentación

25 Cultivar las cepas fúngicas clonadas WSJ-195 producidas mediante espiramicina que contienen el gen de 4"-
isovaleril transferasa en un medio de cultivo inclinado que contiene el 2% de harina de soja, 1% de glucosa, 3%
de almidón, 0,5% de CaCO_3 , 0,4% de NaCl y 2% de agar durante 15 días a 28°C, inocularlas en medio de
siembra que contiene el 1,5% de harina de soja, 3,0% de almidón, 0,4% de NaCl , 0,5% de CaCO_3 , 0,3% de
30 peptona y 0,05% de KH_2PO_4 durante 80 horas a 25°C, inocularlas después en medio de fermentación que
contiene el 0,5% de glucosa, 6,0% de almidón, 0,5% de levadura en polvo, 2,0% de harina de pescado, 0,6% de
 NH_4NO_3 , 1,0% de NaCl , 0,5% de CaCO_3 , 0,05% de KH_2PO_4 , 0,1% de MgSO_4 , 0,5% de aceite de soja y 0,02% de
desespumante con un tamaño de inoculación del 0,1%, y controlar el proceso de fermentación mediante glucosa
y agua amoniacal. La fermentación dura 120 h a un valor del pH de 6,0-9,0. Las curvas de variación del pH en
35 función del tiempo muestran tres fases continuas, la primera fase satisface la fórmula $y_1=0,1364x_1+6,0$, en la que
 $0 < x_1 \leq 22$; la segunda fase satisface la fórmula $y_2=-0,0735x_2+10,64$, en la que $22 \leq x_2 \leq 56$; y la tercera fase satisface
la fórmula $y_3=0,0078x_3+6,06$, en la que $56 \leq x_3 \leq 120$, y se obtiene el caldo de fermentación.

2) Extracción

40 Procesar el caldo de fermentación con sulfato de aluminio para obtener un filtrado, ajustar el pH a 8,5, extraer
con acetato de butilo, lavar el extracto de acetato de butilo con agua no salina y NaH_2PO_4 al 1%
respectivamente, después extraer con agua de pH 2,0 para obtener un extracto acuoso, ajustar el pH a 4,5,
45 volatilizar y eliminar el acetato de butilo residual para obtener un extracto hídrico, filtrar y ajustar el pH a 8,5,
obtener un precipitado, lavar el precipitado con agua purificada, secarlo para obtener levocarrimicina.

[Ejemplo 5] Preparación de levocarrimicina1) Cultivo y fermentación

50 Cultivar las cepas fúngicas clonadas WSJ-195 producidas mediante espiramicina que contienen el gen de 4"-
isovaleril transferasa en un medio de cultivo inclinado que contiene el 2% de harina de soja, 1% de glucosa, 3%
de almidón, 0,5% de CaCO_3 , 0,4% de NaCl y 2% de agar durante 8 días a 38°C, inocularlas en medio de siembra
que contiene el 1,5% de harina de soja, 3,0% de almidón, 0,4% de NaCl , 0,5% de CaCO_3 , 0,3% de peptona y
55 0,05% de KH_2PO_4 durante 40 horas a 30°C, inocular después en medio de fermentación que contiene el 0,5% de
glucosa, 6,0% de almidón, 0,5% de levadura en polvo, 2,0% de harina de pescado, 0,6% de NH_4NO_3 , 1,0% de
 NaCl , 0,5% de CaCO_3 , 0,05% de KH_2PO_4 , 0,1% de MgSO_4 , 0,5% de aceite de soja y 0,02% de desespumante
con un tamaño de inoculación del 20%, y controlar el proceso de fermentación mediante glucosa y agua
amoniacal. La fermentación dura 115 h a un valor del pH de 6,0-7,5 a 30°C. Las curvas de variación del pH en
60 función del tiempo muestran tres fases continuas, la primera fase satisface la fórmula $y_1=0,0682x_1+6,0$, en la que
 $0 < x_1 \leq 22$; la segunda fase satisface la fórmula $y_2=-0,0294x_2+8,147$, en la que $22 \leq x_2 \leq 56$; la tercera fase satisface
la fórmula $y_3=0,0078x_3+6,06$, en la que $56 \leq x_3 \leq 115$, véase la figura 3 para la curva de variación; obtener el caldo
de fermentación.

2) Extracción

Procesar el caldo de fermentación con sulfato de aluminio para obtener un filtrado, ajustar el pH a 9,0, extraer con acetato de butilo, lavar el extracto de acetato de butilo con agua no salina y NaH_2PO_4 al 1% respectivamente, después extraer con agua de pH 2,5 para obtener un extracto acuoso, ajustar el pH a 4,5-5,5, volatilizar y eliminar el acetato de butilo residual para obtener un extracto hídrico, filtrar y ajustar el pH a 9,0, obtener un precipitado, lavar el precipitado con agua purificada y secarlo para obtener levocarrimicina.

[Ejemplo 6] Preparación de levocarrimicina1) Cultivo y fermentación

Cultivar las cepas fúngicas clonadas WSJ-195 producidas mediante espiramicina que contienen el gen de 4"-isovaleril transferasa en un medio de cultivo inclinado que contiene el 2% de harina de soja, 1% de glucosa, 3% de almidón, 0,5% de CaCO_3 , 0,4% de NaCl y 2% de agar durante 12 días a 30°C, inocularlas en medio de siembra que contiene el 1,5% de harina de soja, 3,0% de almidón, 0,4% de NaCl , 0,5% de CaCO_3 , 0,3% de peptona y 0,05% de KH_2PO_4 durante 60 horas a 28°C, inocularlas después en medio de fermentación que contiene el 0,5% de glucosa, 6,0% de almidón, 0,5% de polvo de levadura, 2,0% de harina de pescado, 0,6% de NH_4NO_3 , 1,0% de NaCl , 0,5% de CaCO_3 , 0,05% de KH_2PO_4 , 0,1% de MgSO_4 , 0,5% de aceite de soja y 0,02% de desespumante con un tamaño de inoculación del 10%, y controlar el proceso de fermentación mediante glucosa y agua amoniacal. La fermentación dura 90 h a un valor del pH de 6,0-7,5 a 28°C. Las curvas de variación del pH en función del tiempo muestran tres fases continuas, la primera fase satisface la fórmula $y_1=0,0682x_1+6,0$, en la que $0 < x_1 \leq 22$; la segunda fase satisface la fórmula $y_2=-0,0294x_2+8,147$, en la que $22 \leq x_2 \leq 56$; la tercera fase satisface la fórmula $y_3=0,0078x_3+6,06$, en la que $56 \leq x_3 \leq 90$, véase la figura 3 para la curva de variación; obtener el caldo de fermentación.

2) Extracción

Procesar el caldo de fermentación con sulfato de aluminio para obtener un filtrado, ajustar el pH a 8,7, extraer con acetato de butilo, lavar el extracto de acetato de butilo con agua no salina y NaH_2PO_4 al 1% respectivamente, después extraer con agua de pH 2,2 para obtener un extracto acuoso, ajustar el pH a 5,0, volatilizar y eliminar el acetato de butilo residual para obtener un extracto hídrico, filtrar y ajustar el pH a 8,7, obtener un precipitado, lavar el precipitado con agua purificada y secarlo para obtener levocarrimicina.

[Ejemplo 7] Preparación de levocarrimicina1) Cultivo y fermentación

Cultivar las cepas fúngicas clonadas WSJ-195 producidas mediante espiramicina que contienen el gen de 4"-isovaleril transferasa en un medio de cultivo inclinado que contiene el 2% de harina de soja, 1% de glucosa, 3% de almidón, 0,5% de CaCO_3 , 0,4% de NaCl y 2% de agar durante 10 días a 35°C, inocularlas en medio de siembra que contiene el 1,5% de harina de soja, 3,0% de almidón, 0,4% de NaCl , 0,5% de CaCO_3 , 0,3% de peptona y 0,05% de KH_2PO_4 durante 55 horas a 26°C, inocularlas después en medio de fermentación que contiene el 0,5% de glucosa, 6,0% de almidón, 0,5% de levadura en polvo, 2,0% de harina de pescado, 0,6% de NH_4NO_3 , 1,0% de NaCl , 0,5% de CaCO_3 , 0,05% de KH_2PO_4 , 0,1% de MgSO_4 , 0,5% de aceite de soja y 0,02% de desespumante con un tamaño de inoculación del 15%, y controlar el proceso de fermentación mediante glucosa y agua amoniacal. La fermentación dura 115 h a un valor del pH de 6,0-7,5 a 27°C. Las curvas de variación del pH en función del tiempo muestran tres fases continuas, la primera fase satisface la fórmula $y_1=0,0682x_1+6,0$, en la que $0 < x_1 \leq 22$; la segunda fase satisface la fórmula $y_2=-0,0294x_2+8,147$, en la que $22 \leq x_2 \leq 56$; la tercera fase satisface la fórmula $y_3=0,0078x_3+6,06$, en la que $56 \leq x_3 \leq 110$, véase la figura 3 par la curva de variación; obtener el caldo de fermentación.

2) Extracción

Procesar el caldo de fermentación con sulfato de aluminio para obtener un filtrado, ajustar el pH a 8,6, extraer con acetato de butilo, lavar el extracto de acetato de butilo con agua no salina y NaH_2PO_4 al 1% respectivamente, después extraer con agua de pH 2,3 para obtener un extracto acuoso, ajustar el pH a 4,8, volatilizar y eliminar el acetato de butilo residual para obtener un extracto hídrico, filtrar y ajustar el pH a 8,8, obtener un precipitado, lavar el precipitado con agua purificada y secarlo para obtener levocarrimicina.

[Ejemplo 8] Preparación de levocarrimicina1) Cultivo y fermentación

Cultivar las cepas fúngicas clonadas WSJ-195 producidas mediante espiramicina que contienen el gen de 4"-isovaleril transferasa en un medio de cultivo inclinado que contiene el 2% de harina de soja, 1% de glucosa, 3%

de almidón, 0,5% de CaCO₃, 0,4% de NaCl y 2% de agar durante 13 días a 36°C, inocularlas en medio de siembra que contiene el 1,5% de harina de soja, 3,0% de almidón, 0,4% de NaCl, 0,5% de CaCO₃, 0,3% de peptona y 0,05% de KH₂PO₄ durante 75 horas a 27°C, inocularlas después en medio de fermentación que contiene el 0,5% de glucosa, 6,0% de almidón, 0,5% de polvo de levadura, 2,0% de harina de pescado, 0,6% de NH₄NO₃, 1,0% de NaCl, 0,5% de CaCO₃, 0,05% de KH₂PO₄, 0,1% de MgSO₄, 0,5% de aceite de soja y 0,02% de desespumante con un tamaño de inoculación del 0,5%, y controlar el proceso de fermentación mediante glucosa y agua amoniacal. La fermentación dura 98 h a un valor del pH de 6,0-7,5 a 29°C. Las curvas de variación del pH en función del tiempo muestran tres fases continuas, la primera fase satisface la fórmula $y_1=0,0909x_1+6,4$, en la que $0 < x_1 \leq 22$; la segunda fase satisface la fórmula $y_2=-0,0441x_2+7,8$, en la que $22 \leq x_2 \leq 56$; la tercera fase satisface la fórmula $y_3=0,0078x_3+6,06$, en la que $56 \leq x_3 \leq 110$, véase la figura 2 para la curva de variación; obtener el caldo de fermentación.

2) Extracción

Procesar el caldo de fermentación con sulfato de aluminio para obtener un filtrado, ajustar el pH a 8,9, extraer con acetato de butilo, lavar el extracto de acetato de butilo con agua no salina y NaH₂PO₄ al 1% respectivamente, después extraer con agua de pH 2,4 para obtener un extracto acuoso, ajustar el pH a 4,6, volatilizar y eliminar el acetato de butilo residual para obtener un extracto hídrico, filtrar y ajustar el pH a 8,6 para obtener un precipitado, lavar el precipitado con agua purificada y secarlo para obtener levocarrimicina.

[Ejemplo 9] Procedimiento de determinación cuantitativa por HPLC de levocarrimicina

Determinar mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (Apéndice V D de la Farmacopea China 2005 (2))

Aplicar la columna cromatográfica Venusil XBP C18 (L) 150 Å (200 mm x 4,6 mm, 5 um) (AGELA TECHNOLOGIES), la fase móvil A es acetonitrilo, la fase móvil B es disolución de acetato de amonio a 0,01 mol·l⁻¹ (ajustar el valor del pH a 7,0 con agua amoniacal), gradiente de elución según la tabla siguiente; la longitud de onda es de 232 nm, la velocidad de flujo es de 1,0 ml·min⁻¹, la temperatura de columna es de 25°C y el volumen de inyección es de 20 µl.

Tiempo (min)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	35	65
15	50	50
50	65	35
51	35	65
70	35	65

Las condiciones cromatográficas y el ensayo de adecuabilidad al sistema se referirán al cromatograma líquido de componente carrimicina estándar (figura 4). Ajustar las condiciones cromatográficas y, si es necesario, cambiar las condiciones del gradiente de elución de la fase móvil para hacer el componente levocarrimicina de la muestra consecuente con los espectros del componente carrimicina estándar (figura 4).

Solución de muestra estándar: pesar una cantidad apropiada de producto estándar de forma precisa, diluirla con el licor mixto de disolución de 0,01 mol/l de acetato de amonio (ajustar el valor del pH a 7,0 con agua amoniacal) y acetonitrilo en una proporción de 65:35 a una concentración de 0,4 mg/ml-0,6 mg/ml como la disolución de muestra estándar y agitar bien para usos futuros.

Solución de muestra de ensayo: pesar 50 mg de muestra de ensayo de forma precisa, diluirlos con el licor mixto de disolución de 0,01 mol/l de acetato de amonio (ajustar el valor del pH a 7,0 con agua amoniacal) y acetonitrilo (proporción de 65:35) a 50 ml como la disolución de producto de muestra y agitar bien para usos futuros.

Calcular en base al área del pico de isovalerilespiramicina III mediante un procedimiento estándar externo. La isovalerilespiramicina III no deberá ser inferior al 30%, la isovalerilespiramicina (I+II+III) no deberá ser inferior al 60%; el contenido total de 9 componentes de espiramicina de acilación no deberá ser inferior al 80%, la cantidad de espiramicina III no deberá ser superior al 1,0% y el contenido total de otros componentes desconocidos no deberá ser superior al 5,0%. La fórmula de cálculo es la siguiente:

$$\text{Isovalerilespiramicina III (\%)} = A_{\text{isovaleril III}} \times W_S \times P / A_S \times W_T \times 100\%$$

$$\text{Isovalerilespiramicina I + II + III (\%)} = A_{\text{isovaleril I}} + A_{\text{isovaleril II}} + A_{\text{isovaleril III}} \times A_S \times P / A_S \times W_T \times 100\%$$

$$\text{Contenido total de espiramicina de acilación (\%)} = A_{\text{acetil II}} + A_{\text{acetil III}} + A_{\text{propionil II}} + A_{\text{propionil III}} + A_{\text{isobutiril II}} + A_{\text{isobutiril III}} + A_{\text{isovaleril II}} + A_{\text{isovaleril III}} + A_{\text{acetil III}} + A_{\text{isovaleril III}} \times W_S \times P / A_S \times W_T \times 100\%$$

$$\text{Espiramicina III (\%)} = A_{\text{espiral III}} \times W_S \times P / A_S \times W_T \times 100\%$$

$$\text{Componentes desconocidos (\%)} = A_W \times W_S \times P / A_S \times W_T \times 100\%$$

En las que:

- W_S peso de la muestra estándar, g;
- A_S área de pico de isovalerilepiramicina III en la muestra estándar;
- W_T peso de la muestra de ensayo, g;
- A_W área total de pico de componentes desconocidos en la muestra de ensayo;
- P pureza de isovalerilepiramicina III en la muestra de ensayo.

[Ejemplo 10] Detección por HPLC del componente levocarrimicina

Extraer los ocho lotes de caldos de fermentación de levocarrimicina fermentada mediante el proceso de extracción de levocarrimicina proporcionado en el ejemplo 4 y el procedimiento de detección cuantitativa por HPLC proporcionado en el ejemplo 9, mostrándose las condiciones de detección por HPLC de cada componente obtenido en la tabla 1 y el cromatograma líquido en la figura 5.

Tabla 1 Condiciones de detección por HPLC de ocho lotes de componentes de levocarrimicina

Porcentaje de contenido %	1	2	3	4	5	6	7	8	Valor promedio
isv-III	35,71	34,40	34,80	32,19	35,71	35,80	35,59	35,44	34,96
isv-II	24,67	24,93	24,36	24,85	20,02	23,91	23,87	23,76	23,80
isv-I	2,30	2,94	4,07	3,18	3,46	2,90	3,40	3,00	3,16
bu-III	3,56	2,75	3,54	3,50	3,50	3,90	4,10	4,00	3,61
ibu-III	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bu-II	0,99	1,00	-	1,15	1,07	1,20	1,30	1,20	0,99
ibu-II	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pr-III	7,91	8,09	7,65	8,19	8,24	8,40	8,70	8,50	8,21
pr-II	2,91	2,65	3,07	3,72	3,90	5,40	5,11	5,36	4,02
ac-III	1,50	1,19	1,07	0,96	1,14	1,36	1,68	1,29	1,27
ac-II	2,84	2,92	3,05	3,08	3,47	1,89	3,18	3,09	2,94
isv total	62,68	62,27	63,23	60,22	59,19	62,61	62,86	62,20	61,91
acilación total	82,39	80,87	81,61	80,82	80,51	84,76	86,93	85,64	82,94

La detección anterior también se realiza para la levocarrimicina preparada en otros ejemplos de la presente invención y el cromatograma líquido obtenido es como se muestra en la figura 5.

[Ejemplo 11] Determinación de la rotación específica de levocarrimicina

Pesar con precisión una cantidad apropiada de levocarrimicina preparada en los ejemplos de la presente invención, añadir cloroformo para disolver y diluir para obtener una disolución de 0,02 g/ml en cloroformo, y determinar la rotación específica con la línea D (589,3 nm) del espectro de sodio con una longitud de determinación de 1 dm, temperatura de determinación de 25°C, polarímetro con lectura a 0,0001° después de haberlo calibrado.

Tabla 2 Resultado de investigación de la rotación específica

Número de ejemplo	1	2	3	4	5	6	7	8
$[\alpha]^{25}$	-52°	-55,2°	-57°	-56°	-54°	-55,3°	55,1°	55,4°

[Ejemplo 12] Comprimidos de levocarrimicina (calculado en 1000 comprimidos)

Formulación:	Polvo bruto de levocarrimicina proporcionado por el ejemplo 4	1000 g
	Hidroxipropilcelulosa poco sustituida (5%)	92,5 g
	Sodio-carboximetil-almidón (3%)	55,5 g
	Estearato de magnesio (1%)	18,5 g
	Almidón	Peso total-peso de otros coadyuvantes brutos materiales
	Peso total	1850 g

Proceso de preparación: Pesar una cantidad apropiada de almidón, diluirla a una concentración del 15%, calentarla hasta obtener una pasta, y convertirla en adhesiva; hacer pasar el material principal carrimicina y materiales coadyuvantes almidón, hidroxipropilcelulosa poco sustituida, carboximetil-almidón sódico y estearato

de magnesio a través de un tamiz de malla 100 respectivamente, y pesar los materiales principal y coadyuvantes necesarios según la formulación; después mezclar la carrimidina, el almidón, la hidroxipropilcelulosa poco sustituida uniformemente, añadir pasta de almidón del 15% de concentración de almidón para fabricar un material blando, granulación con un tamiz de malla 14, secar a 50-60°C, controlar la humedad al 3-5%, alisar granúlos con un tamiz de malla 14, añadir carboximetil-almidón sódico, estearato de magnesio y mezclar, después determinar el contenido de granúlos, calcular el peso de cada comprimido según el contenido de granúlos, comprimido (Φ9 mm de perforación retusa), detectar diferencias de peso de comprimidos; envasar los comprimidos que cumplen los requisitos después de la inspección.

10 **[Ejemplo 13] Cápsulas de levocarrimicina (calculadas en 10000 cápsulas)**

Formulación: Polvo bruto de levocarrimicina en el ejemplo 4	1000 g
Almidón (para fines farmacéuticos)	1080-peso de polvo bruto de carrimicina
Cápsulas farmacéuticas nº 3	1000 cápsulas
Parafina líquida	50 ml

15 Proceso de preparación: Respectivamente, pesar el material principal carrimicina y material coadyuvante almidón farmacéutico según la formulación del proceso, añadirlos a un mezclador para realizar un mezclado completo durante 1,5-2 horas; los datos obtenidos del contenido de muestra analizados deberán estar básicamente de acuerdo con los datos teóricos (el peso en cada cápsula es de aproximadamente 0,105 g), respectivamente disponer las cápsulas farmacéuticas nº 3 que cumplen los requisitos y los materiales brutos bien mezclados en una máquina rellenaadora según los requerimientos operacionales de la máquina rellenaadora de cápsulas automática, realizar una inspección de la diferencia de las cápsulas rellenas (dentro de ±10%, <0,3 g), y la disolución deberá cumplir los requerimientos; disponer las cápsulas que cumplen los requisitos en una máquina de pulido y añadir parafina líquida para realizar un pulido durante 15-20 min, y después sacar las cápsulas e inspeccionar las cajas de envasado del producto acabado.

25 **[Ejemplo 14] Comprimidos recubiertos con azúcar de levocarrimicina (calculado en 10000 comprimidos)**

Fórmula: La misma que en el ejemplo 12

30 Proceso de preparación: Operar como en el procedimiento del ejemplo 12, disponer los núcleos de comprimidos que cumplen los requisitos en un recipiente de recubrimiento con azúcar, disponer lentamente el jarabe preparado (concentración del 65-70%) en el recipiente, y después elevar la temperatura a aproximadamente 40°C, añadir una cantidad apropiada de talco y realizar un secado con aire forzado durante 20-30 min; después de que los comprimidos obtengan un sobrecubrimiento mediante repetición de las etapas anteriores varias veces, realizar el recubrimiento de azúcar durante 15-20 min; después de que los comprimidos obtengan un recubrimiento de azúcar disponer la pasta de color preparada en el jarabe y mezclar, y después verterla en un recipiente y mezclar durante 15-20 min cada vez para obtener el comprimido recubierto con azúcar.

35 **[Ejemplo 15] Jarabe seco de levocarrimicina (calculado en 10000 bolsas)**

Formulación: Polvo bruto de levocarrimicina en el ejemplo 4	1250 g
Ácido cítrico (0,5%) (cittrato)	15 g
Sacarosa	Peso total – peso de otros materiales coadyuvantes
Peso total	500 g
Pigmento (curcumina)	aproximadamente 1 g

40 Proceso de preparación: Respectivamente triturar el polvo bruto de carrimicina, ácido cítrico, sacarosa con un triturador de flujo de aire de alta velocidad para dar granúlos de forma que el 85% de los mismos pueda pasar a través de un tamiz de malla 300, y el 15% pase a través de un tamiz de malla 180, correspondientemente pesar una cantidad apropiada del polvo fino triturado según la formulación y después mezclarlos adecuadamente durante 1-1,5 horas; determinar su contenido, calcular el volumen de envasado (el contenido de envasado teórico es de 500 mg en cada bolsa), y después disponer la mezcla en una máquina conformadora-rellenaadora-selladora, y envasarla con papel de aluminio. Envasar el producto según los requerimientos operacionales de la máquina envasadora, con una diferencia del contenido de envasado limitada dentro del intervalo de ±5%, inspeccionar después del envasado y después realizar el envasado de lo que cumpla los requisitos.

45 **[Ejemplo 16] Comprimidos recubiertos entéricos de levocarrimicina (calculado en 10000 comprimidos)**

50 Formulación: Remitirse al ejemplo 12.

55 Proceso de preparación: Preparar los núcleos de los comprimidos según el ejemplo 12; disponer los núcleos de comprimidos que cumplen los requisitos en un recipiente de recubrimiento con azúcar, utilizar jarabe al 60-70% y polvo de talco para disponer tres capas de recubrimiento de base y después disponer la capa de aislamiento, añadir disolución en alcohol de zeína al 10%, secar durante 10-15 min con el procedimiento de rotación, y

después añadir ftalato de dietilo, acetona, acetato-ftalato de celulosa y disolución alcohólica, es decir, la disolución de recubrimiento entérico, en el recipiente y secar 2-3 veces y 10-15 min cada vez mediante un procedimiento con rodillo; después de determinar que cumplen los requisitos mediante examen, realizar el recubrimiento de azúcar según el ejemplo 7.

5 **[Ejemplo 17] Comprimidos recubiertos gástricos de levocarrimicina (calculado en 10000 comprimidos)**

Formulación: Remitirse al ejemplo 12.

10 Proceso de preparación: preparar los núcleos de comprimidos según el ejemplo 12; disponer los núcleos de comprimidos que cumplen los requisitos en una máquina de recubrimiento de alta eficacia y después preparar el polvo de recubrimiento (incluido el liposoluble y el hidrosoluble) que cumple los requisitos en la disolución de recubrimiento según los requerimientos y después disponer la disolución de recubrimiento en el coloide para la trituración y filtrar para su utilización. Precalear el recipiente de recubrimiento de alta eficacia relleno con núcleos de comprimidos, con una velocidad de rotación controlada dentro de 5-10 rpm y una temperatura de 15 45-60°C, pulverizar la disolución de recubrimiento en el recipiente con un pulverizador de aerosol (>300 de malla) y secar durante 25-35 minutos, realizar el proceso repetidamente durante 8-12 veces, hasta que el recubrimiento sea uniforme y finalmente envasar los comprimidos que cumplen los requisitos después del secado.

20 **[Ejemplo 18] Gránulos de levocarrimicina (calculado en 10000 bolsas)**

Formulación: Polvo bruto de levocarrimicina del ejemplo 5	1250 g
Polvo azucarado	20000 g
Dextrina	9000 g
5% de PVP-K30	Cantidad apropiada

25 Proceso de preparación: cribar el polvo bruto de carrimicina, azúcar en polvo y dextrina con un tamiz de malla 120, pesar polvo bruto de carrimicina, azúcar en polvo y dextrina según la formulación y mezclarlos uniformemente; convertir el material mezclado uniformemente anterior en un material blando con el 5% de mucílago PVP-K30; preparar el material en gránulos con un granulador oscilante, secar a 70°C, alisar gránulos y después envasarlos después de haber inspeccionado que cumplen los requisitos.

30 **[Ejemplo 19] Polvo para inyección liofilizado de levocarrimicina**

35 Pesar 500 mg de polvo bruto de levocarrimicina preparado en el ejemplo 6, mezclarlo con la misma cantidad de moles ácido adípico y después disolverlos en 5 ml de agua para obtener una disolución transparente de color amarillo claro, con un valor del pH de 4,6-5,6. Añadir 40 mg de manitol como material de apoyo liofilizado, congelar rápidamente durante 9 h a una temperatura reducida, y liofilizar para obtener aglomerados sueltos de color amarillo claro. Disolverlo con 10 ml de agua estéril antes de su uso.

[Ejemplo 20] Polvo para inyección liofilizado de levocarrimicina

40 Pesar 500 mg de polvo bruto de levocarrimicina preparado en el ejemplo 4, mezclarlo con la misma cantidad de moles de ácido cítrico y después disolverlos en 5 ml de agua para obtener una disolución transparente de color amarillo claro, con un pH de 4,6-5,6. Añadir 40 mg de manitol como material de apoyo liofilizado, congelar rápidamente durante 9 h a una temperatura reducida, y liofilizar para obtener aglomerados sueltos de color amarillo claro. Disolverlo con 10 ml de agua estéril antes de su uso.

45 **[Ejemplo 21] Polvo para inyección liofilizado de levocarrimicina**

50 Pesar 500 mg de polvo bruto de levocarrimicina preparado en el ejemplo 5, mezclarlo con la misma cantidad de moles de ácido maleico y después disolverlos en 5 ml de agua para obtener una disolución transparente de color amarillo claro, con un pH de 4,6-5,6. Añadir 40 mg de manitol como material de apoyo liofilizado, congelar rápidamente durante 9 h a una temperatura reducida, y liofilizar para obtener aglomerados sueltos de color amarillo claro. Disolverlo con 10 ml de agua estéril antes de su utilización.

55 **[Ejemplo 22] Preparación de levocarrimicina en la que la isovalerilespiramicina I es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I**

Separar y purificar la levocarrimicina obtenida en el ejemplo 1.

60 Purificación de levoisovalerilespiramicina I: Purificar la muestra obtenida en la separación preliminar con una HPLC preparativa, preparar una columna cromatográfica con ODS, utilizar acetonitrilo y disolución tampón de acetato de amonio como fase móvil en una elución en gradiente; registrar el espectrograma UV separado mediante detección UV y recoger los picos diana de componentes de levoisovalerilespiramicina I:

Columna cromatográfica: columna cromatográfica preparativa ODS;

Fase móvil: Acetonitrilo (A), disolución de acetato de amonio 100 mM (B);

Condición de gradiente: aplicar gradiente lineal de 0–60min, siendo A el 25%–65%; y de 61–90 min, siendo A el 65%–90%;

Velocidad de flujo: 260 ml/min

Volumen de inyección: 10 ml;

Concentración de muestreo: 0,5 g/ml;

Longitud de onda de medición: 231 nm;

Medio de recogida: recogida mediante activación UV;

Recoger la muestra de levoisovalerilespiramicina I según el tiempo de retención (RT) de 44,759 min de la levoisovalerilespiramicina I, después eliminar acetonitrilo mediante evaporación rotatoria, extraer con una cantidad, una vez, de acetato de etilo, y eliminar el acetato de etilo del extracto mediante evaporación rotatoria para obtener una muestra de pasta; redisolver la muestra de pasta con éter de petróleo y eliminar el éter de petróleo mediante evaporación rotatoria para obtener el polvo sólido blanco de levoisovalerilespiramicina I.

Recristalizar adicionalmente el polvo sólido blanco de levoisovalerilespiramicina I para obtener el compuesto cristalino. Siendo el procedimiento de recristalización el siguiente:

(1) Disolver el compuesto sólido de levoisovalerilespiramicina I obtenido en el ejemplo 1 en el disolvente mixto de acetato de etilo, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, siendo la relación en volumen de acetato de etilo a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto de 1:10:1;

(2) Después añadir agua pura y agitar la mezcla simultáneamente, siendo el volumen de agua pura añadida 2,5 veces el volumen total de acetato de etilo, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra; siendo la velocidad de adición del agua de 4 ml/min; y siendo la velocidad de agitación durante la adición de agua pura de 30 rpm;

(3) Enfriar a 5°C a una velocidad de 1°C/h después de la adición de agua pura, continuar con la agitación a una velocidad de 10 rpm durante el enfriamiento para obtener el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I.

La difracción de polvo de rayos X del compuesto de levoisovalerilespiramicina I medida mediante radiación X de Cu-K α tiene picos característicos a 2 θ de 7,6°, 8,0°, 10,0°, 11,4°, 16,4°, 17,0°, 17,5°, 17,9°, 19,5°, 22,7°, 23,7° y 24,4°, y el espectro de difracción de polvo de rayos X es tal como se muestra en la figura 6.

Eliminar el acetonitrilo de la levocarrimicina residual después de la separación y la purificación de componentes de levoisovalerilespiramicina I mediante evaporación rotatoria, después extraer con una cantidad, una vez, de acetato de etilo, y eliminar el acetato de etilo del extracto mediante evaporación rotatoria para obtener una muestra de pasta; redisolver la muestra de pasta con éter de petróleo, y eliminar el éter de petróleo mediante evaporación rotatoria para obtener la levocarrimicina; después mezclar la levocarrimicina con el compuesto cristalino anterior de levoisovalerilespiramicina I para obtener la levocarrimicina, en la que la isovalerilespiramicina I es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I.

[Ejemplo 23] Preparación de levocarrimicina en la que la isovalerilespiramicina I es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I

Aparte de las etapas que son similares a las del ejemplo 22, la diferencia en el procedimiento de recristalización es la siguiente:

(1) Disolver el compuesto sólido de levoisovalerilespiramicina I en el disolvente mixto de acetato de etilo, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, siendo la relación en volumen de acetato de etilo a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto de 1:10:1;

(2) Después añadir agua pura y agitar la mezcla simultáneamente, siendo el volumen de agua pura añadida 9 veces el volumen total de acetato de etilo, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra; siendo la velocidad de adición del agua de 10 ml/min; y siendo la velocidad de agitación durante la adición de agua pura de 60 rpm;

- (3) Enfriar a 15°C a una velocidad de 3°C/h después de la adición de agua pura, y continuar con la agitación a una velocidad de 10 rpm durante el enfriamiento para obtener el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I.

5 La difracción de polvo de rayos X del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I medida mediante radiación Cu-K α es similar a la de la figura 6.

10 **[Ejemplo 24] Preparación de levocarrimicina en la que la isovalerilespiramicina I es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I**

Otras etapas operacionales son las mismas que en el ejemplo 22. Lo que es diferente es la recristalización, que se realiza de la forma siguiente:

- 15 1. En primer lugar, disolver el compuesto sólido de levoisovalerilespiramicina I en el disolvente mixto de acetato de etilo, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, siendo la relación en volumen de acetato de etilo a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto de 1: 5: 0,8;
- 20 2. Después añadir agua pura y agitar la mezcla simultáneamente, siendo el volumen de agua pura añadida 7,5 veces el volumen total de acetato de etilo, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra; siendo la velocidad de adición del agua de 6 ml/min; y siendo la velocidad de agitación durante la adición de agua pura de 40 rpm;
- 25 3. Enfriar a 10°C a una velocidad de 2°C/h después de la adición de agua pura, y continuar con la agitación a una velocidad de 15 rpm durante el enfriamiento para obtener el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I.

30 El espectro de difracción de polvo de rayos X del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I medido mediante radiación Cu-K α es similar al de la figura 6.

30 **[Ejemplo 25] Preparación de levocarrimicina en la que la isovalerilespiramicina I es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I**

35 Otras etapas operacionales son las mismas que en el ejemplo 22. Lo que es diferente es la recristalización, que se realiza de la forma siguiente:

- 40 (1) En primer lugar, disolver el compuesto sólido de levoisovalerilespiramicina I en el disolvente mixto de acetato de etilo, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, siendo la relación en volumen de acetato de etilo a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto de 1: 2: 1;
- 45 (2) Después añadir agua pura y agitar la mezcla simultáneamente, siendo el volumen de agua pura añadida 7,5 veces el volumen total de acetato de etilo, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra; siendo la velocidad de adición del agua de 8 ml/min; y siendo la velocidad de agitación durante la adición de agua pura de 45 rpm;
- (3) Enfriar a 12°C a una velocidad de 2,5°C/h después de la adición de agua pura, y continuar con la agitación a una velocidad de 20 rpm durante el enfriamiento para obtener el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I.

50 El espectro de difracción de polvo de rayos X del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I medido mediante radiación Cu-K α es similar al de la figura 6.

55 **[Ejemplo 26] Preparación de levocarrimicina en la que la isovalerilespiramicina I es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I**

Otras etapas operacionales son las mismas que en el ejemplo 22. Lo que es diferente es la recristalización, que se realiza de la forma siguiente:

- 60 (1) En primer lugar, disolver el compuesto sólido de levoisovalerilespiramicina I en el disolvente mixto de acetato de etilo, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, siendo la relación en volumen de acetato de etilo a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto de 1: 5: 0,8;
- 65 (2) Después añadir agua pura y agitar la mezcla simultáneamente, siendo el volumen de agua pura añadida 5 veces el volumen total de acetato de etilo, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra; siendo la velocidad de adición del agua de 7 ml/minuto; y siendo la velocidad de agitación durante la adición de agua pura de 60 revoluciones/minuto;

- (3) Enfriar a 12°C a una velocidad de 1,2°C/h después de la adición de agua pura, y continuar con la agitación a una velocidad de 15 rpm durante el enfriamiento para obtener el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I.

5 El espectro de difracción de polvo de rayos X del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I medido mediante radiación Cu-K α es similar al de la figura 6.

10 **[Ejemplo 27] Preparación de levocarrimicina en la que la isovalerilespiramicina II es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II**

Purificar la levocarrimicina obtenida en el ejemplo 2. Las etapas de operación detalladas son las mismas que en el ejemplo 22. Lo que es diferente es la muestra de levoisovalerilespiramicina II, que se recoge según el tiempo de retención RT de 43,34 de levoisovalerilespiramicina II.

15 Recristalizar adicionalmente el polvo sólido blanco de levoisovalerilespiramicina II para obtener el compuesto cristalino. Siendo el procedimiento de recristalización el siguiente:

- 20 (1) En primer lugar, disolver el compuesto sólido de levoisovalerilespiramicina II obtenido en el ejemplo 2 en el disolvente mixto de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, siendo la relación en volumen de metanol absoluto a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto de 1: 10: 1;

- 25 (2) Después añadir agua pura y agitar la mezcla simultáneamente, siendo el volumen de agua pura añadida 2,5 veces el volumen total de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra; siendo la velocidad de adición del agua de 4 ml/min; y siendo la velocidad de agitación durante la adición de agua pura de 30 rpm;

- 30 (3) Enfriar a 5°C a una velocidad de 1°C/h después de la adición de agua pura, y continuar con la agitación a una velocidad de 10 rpm durante el enfriamiento para obtener el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II.

35 La difracción de polvo de rayos X del compuesto de levoisovalerilespiramicina II medida mediante radiación X de Cu-K α tiene picos característicos a 2 θ de 10,0°, 11,6°, 16,4°, 17,3°, 19,1°, 21,2°, 22,1°, 22,7°, 26,4°, 26,9°, 27,5° y 31,5, y el espectro de difracción de polvo de rayos X es tal como se muestra en la figura 7.

40 Eliminar acetonitrilo de levocarrimicina que se purifica y se separa de las composiciones de levoisovalerilespiramicina III mediante evaporación rotatoria, después extraer la levocarrimicina con una vez de acetato de etilo, y eliminar el acetato de etilo del extracto mediante evaporación rotatoria para obtener una muestra de pasta; redisolver las muestras de pasta en éter de petróleo, y después eliminar el éter de petróleo mediante evaporación rotatoria para obtener levocarrimicina; después mezclar la levocarrimicina y el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II para producir la levocarrimicina en la que la isovalerilespiramicina II es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II.

45 **[Ejemplo 28] Preparación de levocarrimicina en la que la isovalerilespiramicina II es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II**

Otras etapas operacionales son las mismas que en el ejemplo 27. Lo que es diferente es la recristalización, que se realiza de la forma siguiente:

- 50 (1) En primer lugar, disolver el compuesto sólido de levoisovalerilespiramicina II en el disolvente mixto de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, siendo la relación en volumen de metanol absoluto a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto de 1: 10: 0,8;

- 55 (2) Después añadir agua pura y agitar la mezcla simultáneamente. El volumen de agua pura añadida es 9 veces el volumen total de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra; siendo la velocidad de adición del agua de 10 ml/min; y siendo la velocidad de agitación durante la adición de agua pura de 60 rpm;

- 60 (3) Enfriar a 15°C a una velocidad de 3°C/h después de la adición de agua pura, y continuar con la agitación a una velocidad de 10 rpm durante el enfriamiento para obtener el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II.

65 El espectro de difracción de polvo de rayos X del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II medido mediante radiación Cu-K α es similar al de la figura 7.

[Ejemplo 29] Preparación de levocarrimicina en la que la isovalerilespiramicina II es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II

Otras etapas operacionales son las mismas que en el ejemplo 27. Lo que es diferente es la recristalización, que se realiza de la forma siguiente:

- (1) En primer lugar, disolver el compuesto sólido de levoisovalerilespiramicina II en el disolvente mixto de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, siendo la relación en volumen de metanol absoluto a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto de 1:5:1;
- (2) Después añadir agua pura y agitar la mezcla simultáneamente. El volumen de agua pura añadida es 7,5 veces el volumen total de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra; siendo la velocidad de adición del agua de 6 ml/min; y siendo la velocidad de agitación durante la adición de agua pura de 40 rpm;
- (3) Enfriar a 10°C a una velocidad de 2°C/h después de la adición de agua pura, y continuar con la agitación a una velocidad de 15 rpm durante el enfriamiento para obtener el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II.

El espectro de difracción de polvo de rayos X del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II medido mediante radiación Cu-K α es similar al de la figura 7.

[Ejemplo 30] Preparación de levocarrimicina en la que la isovalerilespiramicina II es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II

Otras etapas operacionales son las mismas que en el ejemplo 27. Lo que es diferente es la recristalización, que se realiza de la forma siguiente:

- (1) En primer lugar, disolver el compuesto sólido de levoisovalerilespiramicina II en el disolvente mixto de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, siendo la relación en volumen de metanol absoluto a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto de 1: 3: 1;
- (2) Después añadir agua pura y agitar la mezcla simultáneamente. El volumen de agua pura añadida es 7,5 veces el volumen total de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra; siendo la velocidad de adición del agua de 8 ml/min; y siendo la velocidad de agitación durante la adición de agua pura de 45 rpm;
- (3) Enfriar a 12°C a una velocidad de 2,5°C/h después de la adición de agua pura, y continuar con la agitación a una velocidad de 20 rpm durante el enfriamiento para obtener el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II.

El espectro de difracción de polvo de rayos X del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II medido mediante radiación Cu-K α es similar al de la figura 7.

[Ejemplo 31] Preparación de levocarrimicina en la que la isovalerilespiramicina II es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II

Otras etapas operacionales son las mismas que en el ejemplo 27. Lo que es diferente es la recristalización, que se realiza de la forma siguiente:

- (1) En primer lugar, disolver el compuesto sólido de levoisovalerilespiramicina II en el disolvente mixto de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, siendo la relación en volumen de metanol absoluto a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto de 1: 6: 0,8;
- (2) Después añadir agua pura y agitar la mezcla simultáneamente. El volumen de agua pura añadida es 5 veces el volumen total de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra; siendo la velocidad de adición del agua de 7 ml/min; y siendo la velocidad de agitación durante la adición de agua pura de 60 rpm;
- (3) Enfriar a 12°C a una velocidad de 1,2°C/h después de la adición de agua pura, y continuar con la agitación a una velocidad de 15 rpm durante el enfriamiento para obtener el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II.

El espectro de difracción de polvo de rayos X del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II medido mediante radiación Cu-K α es similar al de la figura 7.

[Ejemplo 32] Preparación de levocarrimicina en la que la isovalerilespiramicina III es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III

Purificar la levocarrimicina producida en el ejemplo 3. Las etapas de operación detalladas son las mismas que en el ejemplo 22. Recoger las muestras de levoisovalerilespiramicina III según el tiempo de retención de 48,009 de la levoisovalerilespiramicina III.

Recristalizar adicionalmente el polvo sólido blanco de levoisovalerilespiramicina III para obtener el compuesto cristalino. Siendo el procedimiento de recristalización el siguiente:

- (1) En primer lugar, disolver el compuesto sólido de levoisovalerilespiramicina III producido en el ejemplo 3 en el disolvente mixto de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, siendo la relación en volumen de metanol absoluto a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto de 1: 10: 1;
- (2) Después añadir agua pura y agitar la mezcla simultáneamente, siendo el volumen de agua pura añadida 2,5 veces el volumen total de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra; siendo la velocidad de adición del agua de 4 ml/min; y siendo la velocidad de agitación durante la adición de agua pura de 30 rpm;
- (3) Enfriar a 5°C a una velocidad de 1°C/h después de la adición de agua pura, y continuar con la agitación a una velocidad de 10 rpm durante el enfriamiento para obtener el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III.

La difracción de polvo de rayos X del compuesto de levoisovalerilespiramicina III medida mediante radiación X de Cu-K α tiene picos característicos a 2θ de 8,0°, 10,0°, 11,2°, 11,7°, 16,4°, 19,1°, 19,6°, 20,0°, 21,4°, 22,9°, 23,6° y 29,4°, y el espectro de difracción de polvo de rayos X es tal como se muestra en la figura 8.

Evaporar acetonitrilo de levocarrimicina purificada y separada de las composiciones de levoisovalerilespiramicina III mediante evaporación rotatoria, después extraer la levocarrimicina con una vez de acetato de etilo, y evaporar el acetato de etilo mediante evaporación rotatoria para obtener las muestras de pasta; redissolver las muestras de pasta en éter de petróleo, y después evaporar el éter de petróleo mediante evaporación rotatoria para obtener la levocarrimicina; después mezclar la levocarrimicina y el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III para producir la levocarrimicina en la que la isovalerilespiramicina III es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III.

[Ejemplo 33] Preparación de levocarrimicina en la que la isovalerilespiramicina III es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III

Otras etapas operacionales son las mismas que en el ejemplo 32. Lo que es diferente es la recristalización, que se realiza de la forma siguiente:

- (1) En primer lugar, disolver el compuesto sólido de levoisovalerilespiramicina III en el disolvente mixto de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, siendo la relación en volumen de metanol absoluto a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto de 1: 10: 1;
- (2) Después añadir agua pura con agitación. El volumen de agua pura añadida es 9 veces el volumen total de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra; siendo la velocidad de adición del agua de 10 ml/min; y siendo la velocidad de agitación durante la adición de agua pura de 60 rpm;
- (3) Enfriar a 15°C a una velocidad de 3°C/h después de la adición de agua pura, y continuar con la agitación a una velocidad de 10 rpm durante el enfriamiento para obtener el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III.

El espectro de difracción de polvo de rayos X del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III medido mediante radiación Cu-K α es similar al de la figura 8.

[Ejemplo 34] Preparación de levocarrimicina en la que la isovalerilespiramicina III es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III

Otras etapas operacionales son las mismas que en el ejemplo 32. Los modos diferentes de recristalización son los siguientes:

- (1) Disolver el compuesto en estado sólido de levoisovalerilespiramicina III en el disolvente mixto que está compuesto por metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, siendo la relación en volumen de metanol absoluto a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto de 1:5:0,8;

(2) Añadir agua pura con agitación, siendo el volumen del agua pura añadida 7,5 veces el volumen total de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra; se añadirá agua pura a una velocidad de 6 ml/min; la velocidad de agitación durante la adición de agua pura es de 40 rpm;

5

(3) Enfriar a 10°C a una velocidad de 2°C/h después de añadir agua pura, y mantener la agitación durante el enfriamiento a una velocidad de 15 rpm; se obtiene el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III.

10 Los patrones de difracción de polvo de rayos X del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III medidos mediante radiación Cu-K α son similares a los de la figura 8.

[Ejemplo 35] Preparación de levocarrimicina en la que la isovalerilespiramicina III es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III

15

Otras etapas operacionales son las mismas que en el ejemplo 32 y los modos diferentes de recristalización son los siguientes:

(1) Disolver el compuesto en estado sólido de levoisovalerilespiramicina III en el disolvente mixto que está compuesto por metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, siendo la relación en volumen de metanol absoluto a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto de 1:2:1;

20

(2) Añadir agua pura con agitación, siendo el volumen del agua pura añadida 7,5 veces el volumen total de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra; se añadirá agua pura a una velocidad de 8 ml/min; la velocidad de agitación durante la adición de agua pura es de 45 rpm;

25

(3) Enfriar a 12°C a una velocidad de 2,5°C/h después de añadir agua pura mientras se mantiene la agitación a una velocidad de 20 rpm para obtener el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III.

30 Los patrones de difracción de polvo de rayos X del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III medidos mediante radiación Cu-K α son similares a los de la figura 8.

[Ejemplo 36] Preparación de levocarrimicina en la que la isovalerilespiramicina III es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III

35

Otras etapas operacionales son las mismas que en el ejemplo 32 y los modos diferentes de recristalización son los siguientes:

(1) Disolver el compuesto en estado sólido de levoisovalerilespiramicina III en el disolvente mixto que está compuesto por metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, siendo la relación en volumen de metanol absoluto a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto de 1:5:0,8;

40

(2) Añadir agua pura con agitación, siendo el volumen del agua pura añadida 5 veces el volumen total de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra; se añadirá agua pura a una velocidad de 7ml/min; la velocidad de agitación durante la adición de agua pura es de 60 rpm;

45

(3) Enfriar a 12°C a una velocidad de 1,2°C/h después de añadir agua pura mientras se mantiene la agitación a una velocidad de 15 rpm para obtener el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III.

50 Los patrones de difracción de polvo de rayos X del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III medidos mediante radiación Cu-K α son similares a los de la figura 8.

[Ejemplo 37] Comprimido de levocarrimicina que contiene el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I

55

La formulación y el procedimiento de preparación son los mismos que en el ejemplo 12. La diferencia es que el polvo de levocarrimicina es el polvo de levocarrimicina obtenido en el ejemplo 22, en el que la isovalerilespiramicina I es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I.

[Ejemplo 38] Comprimido de levocarrimicina que contiene el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II

60

La formulación y el procedimiento de preparación son los mismos que en el ejemplo 12. La diferencia es que el polvo de levocarrimicina es el polvo de levocarrimicina obtenido en el ejemplo 27, en el que la isovalerilespiramicina II es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II.

65

[Ejemplo 39] Comprimido de levocarrimicina que contiene el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III

La formulación y el procedimiento de preparación son los mismos que en el ejemplo 12. La diferencia es que el polvo de levocarrimicina es el polvo de levocarrimicina obtenido en el ejemplo 32, en el que la isovalerilespiramicina III es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III.

[Ejemplo 40] Cápsula de levocarrimicina que contiene el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I

La formulación y el procedimiento de preparación son los mismos que en el ejemplo 13. La diferencia es que el polvo de levocarrimicina es el polvo de levocarrimicina obtenido en el ejemplo 23, en el que la isovalerilespiramicina I es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I.

[Ejemplo 41] Cápsula de levocarrimicina que contiene el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II

La formulación y el procedimiento de preparación son los mismos que en el ejemplo 13. La diferencia es que el polvo de levocarrimicina es el polvo de levocarrimicina obtenido en el ejemplo 28, en el que la isovalerilespiramicina II es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II.

[Ejemplo 42] Cápsula de levocarrimicina que contiene el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III

La formulación y el procedimiento de preparación son los mismos que en el ejemplo 13. La diferencia es que el polvo de levocarrimicina es el polvo de levocarrimicina obtenido en el ejemplo 33, en el que la isovalerilespiramicina III es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III.

Los coadyuvantes y los procedimientos de preparación utilizados para otras preparaciones de levocarrimicina, en el que la isovalerilespiramicina I, II o III es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I, II o III son los mismos que anteriormente.

[Ejemplo de ensayo 1] Farmacodinámica *in vivo*

Procedimiento de ensayo: preparación del líquido de bacterias infeccioso: disponer el líquido de bacterias almacenado en el refrigerador a -80°C en el exterior del mismo durante 1 h a temperatura ambiente, y respectivamente extraer 0,1 ml de líquido de bacterias de *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pyogenes* y *enterococcus* en 2 ml de caldo MH (añadir el 10% de suero de caballo inactivado); inocular 0,1 ml de líquido de bacterias de staphylococcus aureus a los 2 ml de caldo MH según el procedimiento anterior, disponer el líquido en una incubadora a 37°C durante 18 h para obtener el líquido de bacterias original, diluir el líquido de bacterias original con mucina gástrica al 5%, tomar el 100% de cantidad de bacterias letal si el animal se infecta como líquido de bacterias infeccioso.

Se planificó la administración oral para la medicación clínica de levocarrimicina, seleccionándose así la administración intragástrica para el ensayo de levocarrimicina. Después de una inyección intraperitoneal de 0,5 ml de cantidad bacteriana letal a la cavidad abdominal de ratones, los ratones padecen los síntomas siguientes, tales como actividad reducida, reposo, pérdida de pelo, etc. Enema con 0,2 ml para cada ratón después de 0,5-6 h de infección; no se produce ninguna reacción adversa. Observar la mortalidad de los animales dentro de un periodo de siete días y calcular la dosis protectora media (DE₅₀) de fármacos para ratones infectados y comparar el efecto protector de fármacos mediante orden de Bliss.

Los resultados del ensayo *in vivo* son como se muestran en la tabla 3 y la tabla 4

Tabla 3 Comparación del efecto curativo de cuatro antibióticos a los ratones cuya cavidad abdominal estaba infectada por 6 cepas de estreptococos

Organismo de ensayo	Dosis de provocación (UFC/0,5ml/ratón)	Fármacos	MIC (µg/ml)	DE ₅₀ (mg/kg)
Streptococcus pneumonia ₃	6,4×10 ⁴	Carrimicina	0,12	10,41
		Isovaleril I es un compuesto cristalino	0,12	8,99
		Isovaleril II es un compuesto cristalino	0,12	8,39
		Isovaleril III es un compuesto cristalino	0,12	8,99
		Azitromicina	0,5	18,29
		Acetil-espíamicina	0,5	66,96

Organismo de ensayo	Dosis de provocación (UFC/0,5ml/ratón)	Fármacos	MIC (µg/ml)	DE ₅₀ (mg/kg)
		Eritrocina	1	85,08
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ₁₈	9,6×10 ⁴	Carrimicina	0,03	10,06
		Isovaleril I es un compuesto cristalino	0,03	9,94
		Isovaleril II es un compuesto cristalino	0,03	9,08
		Isovaleril III es un compuesto cristalino	0,03	8,98
		Azitromicina	0,06	14,87
		Acetil-espíramicina	0,06	37,93
		Eritrocina	0,06	57,08
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ₅₇	8,8×10 ⁴	Carrimicina	0,12	16,02
		Isovaleril I es un compuesto cristalino	0,06	13,60
		Isovaleril II es un compuesto cristalino	0,06	13,86
		Isovaleril III es un compuesto cristalino	0,06	12,81
		Azitromicina	0,25	19,66
		Acetil-espíramicina	1	398,01
		Eritrocina	0,25	102,33
<i>Streptococcus pyogenes</i> ₇₇₂	6,9×10 ³	Carrimicina	0,12	26,30
		Isovaleril I es un compuesto cristalino	0,06	26,15
		Isovaleril II es un compuesto cristalino	0,06	23,37
		Isovaleril III es un compuesto cristalino	0,06	23,37
		Azitromicina	0,25	46,89
		Acetil-espíramicina	0,25	98,11
		Eritrocina	0,5	101,33
<i>Streptococcus pyogenes</i> ₁₀₂	7,8×10 ⁴	Carrimicina	0,25	87,84
		Isovaleril I es un compuesto cristalino	0,12	69,67
		Isovaleril II es un compuesto cristalino	0,12	64,10
		Isovaleril III es un compuesto cristalino	0,12	64,10
		Azitromicina	0,5	159,06
		Acetil-espíramicina	0,5	227,07
		Eritrocina	0,5	361,01
<i>Streptococcus pyogenes</i> ₁₁₉	4,9×10 ⁴	Carrimicina	0,25	68,48
		Isovaleril I es un compuesto cristalino	0,12	61,87
		Isovaleril II es un compuesto cristalino	0,12	59,91
		Isovaleril III es un compuesto cristalino	0,12	59,91
		Azitromicina	0,5	98,98
		Acetil-espíramicina	0,5	117,53
		Eritrocina	0,5	233,72

Tabla 4 Comparación del efecto curativo de 4 antibióticos a la cavidad abdominal de ratones infectados por *enterococcus* y *staphylococcus aureus*

Organismo de ensayo	Dosis de provocación (UFC/0,5ml/ratón)	Fármacos	MIC (µg/ml)	DE ₅₀ (mg/kg)
<i>Enterococcus</i> ₃₂	5,4×10 ⁴	Carrimicina	0,5	89,29
		Isovaleril I es un compuesto cristalino	0,5	85,15
		Isovaleril II es un compuesto cristalino	0,25	68,54
		Isovaleril III es un compuesto cristalino	0,25	68,54
		Azitromicina	1	146,51
		Acetil-espíramicina	1	130,34
		Eritrocina	2	175,23
<i>Staphylococcus aureus</i> ₁₆	5,2×10 ³	Carrimicina	0,5	31,98
		Isovaleril I es un compuesto cristalino	0,5	25,97
		Isovaleril II es un compuesto cristalino	0,25	26,02
		Isovaleril III es un compuesto cristalino	0,25	26,02
		Azitromicina	1	75,80
		Acetil-espíramicina	1	43,58
		Eritrocina	1	82,36

Organismo de ensayo	Dosis de provocación (UFC/0,5ml/ratón)	Fármacos	MIC (µg/ml)	DE ₅₀ (mg/kg)
<i>Staphylococcus aureus</i> 76	5,8×10 ⁴	Carrimicina	0,5	31,50
		Isovaleril I es un compuesto cristalino	0,5	26,50
		Isovaleril II es un compuesto cristalino	0,25	25,16
		Isovaleril III es un compuesto cristalino	0,25	25,16
		Azitromicina	1	58,79
		Acetil-espíramicina	1	66,63
		Eritrocina	1	64,17
<i>Staphylococcus aureus</i> 12	4,8×10 ⁴	Carrimicina	2	120,35
		Isovaleril I es un compuesto cristalino	1	114,53
		Isovaleril II es un compuesto cristalino	1	109,59
		Isovaleril III es un compuesto cristalino	1	109,59
		Azitromicina	4	217,36
		Acetil-espíramicina	2048	>500
		Eritrocina	256	266,11
<i>Staphylococcus aureus</i> 21	4,2×10 ⁴	Carrimicina	1	59,30
		Isovaleril I es un compuesto cristalino	0,5	42,67
		Isovaleril II es un compuesto cristalino	0,5	47,65
		Isovaleril III es un compuesto cristalino	0,5	47,65
		Azitromicina	4	142,99
		Acetil-espíramicina	2048	>500
		Eritrocina	4	213,67

Los resultados de los ensayos *in vivo* indican: el efecto curativo de levocarrimicina en ratones infectados por 12 cepas de bacterias tal como se muestra en la tabla 3 y la tabla 4; los resultados muestran que tiene un buen efecto protector; y la levocarrimicina en la que la levoisovalerilesíramicina I, II o III es el compuesto cristalino de levoisovalerilesíramicina I, II o III muestra un mejor efecto protector.

El mismo ensayo se realiza también sobre la levocarrimicina o preparaciones de levocarrimicina preparadas en otros ejemplos de la presente invención y los resultados son similares.

[Ejemplos de ensayo 2] Farmacodinámica *in vitro*

Determinación de aislados clínicos:

Procedimiento de ensayo: aplicar procedimientos de dilución de placa dobles: verter el medio de cultivo de agar fundido cuantitativo en la placa que contiene series de concentraciones del fármaco para mezclarlo con el líquido (añadir el 5% de sangre de cabra exenta de fibra en estreptococo y enterococo para obtener medio basal sanguíneo y añadir el 7% de sangre de cabra exenta de fibra en medio de *Bacillus influenzae* y gonococo para obtener el medio basal de chocolate), diluir el líquido de bacterias recién cultivado a 10⁶ UFC/ml después de la solidificación, inocular el agar de cubeta de la levocarrimicina obtenido del ejemplo 4 y grupo de control de azitromicina, acetil-espíramicina y eritrocina mediante un dispositivo de inoculación de varios puntos, cultivarlos a 37°C durante 18 h; disponer el gonococo en una incubadora con el 5% de CO₂ durante 24 h; disponer legionela en una incubadora con el 5% de CO₂ durante 48 h; disponer bacterias anaerobias en una caja anaeróbica a 37°C durante 48 h. Observar que la concentración mínima de fármaco antibacteriano que inhibe el crecimiento de bacterias es la concentración inhibidora mínima (MIC) y calcular la MIC₅₀ y la MIC₉₀ de los fármacos para compararlas con las de los fármacos de control.

Notas:

La MIC₅₀ inhibe el 50% de la concentración inhibidora mínima para el crecimiento de bacterias;
 La MIC₉₀ inhibe el 90% de la concentración inhibidora mínima para el crecimiento de bacterias.
 Los resultados de ensayo se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 5. Distribución sensible de aislados clínicos por carrimicina

Cepa y número de cepa	Fármacos	Alcance de MIC (µg/ml)	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (112)	Carrimicina	0,005->64	0,12	4
	Azitromicina	0,005->64	0,25	8
	Acetil-espíramicina	0,005->64	0,12	>64

Cepa y número de cepa	Fármacos	Alcance de MIC (µg/ml)	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)
	Eritrocina	0,005->64	0,25	64
<i>Streptococcus pyogenes</i> (93)	Carrimicina	0,06->64	0,25	64
	Azitromicina	0,25->64	0,5	>64
	Acetil-espiramicina	0,005->64	0,25	>64
	Eritrocina	0,06->64	0,5	>64
<i>Enterococcus</i> (106)	Carrimicina	0,5->64	2	64
	Azitromicina	0,25->64	8	>64
	Acetil-espiramicina	0,12->64	4	>64
	Eritrocina	0,5->64	4	>64
<i>Staphylococcus aureus</i> (155)	Carrimicina	0,06->64	2	64
	Azitromicina	0,5->64	2	>64
	Acetil-espiramicina	0,12->64	64	>64
	Eritrocina	0,12->64	1	>64
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (115)	Carrimicina	0,12->64	2	>64
	Azitromicina	0,12->64	8	>64
	Acetil-espiramicina	0,03->64	64	>64
	Eritrocina	0,06->64	8	>64
<i>Bacillus influenzae</i> (37)	Carrimicina	0,03-32	0,12	1
	Azitromicina	0,03->64	0,25	2
	Acetil-espiramicina	0,03->64	0,12	4
	Eritrocina	0,03->64	0,06	32
<i>Gonococcus</i> (10)	Carrimicina	0,12-16	2	8
	Azitromicina	0,12-64	2	8
	Acetil-espiramicina	0,12-64	4	8
	Eritrocina	0,12-64	1	8

El mismo ensayo se realiza también sobre la levocarrimicina o preparaciones de levocarrimicina preparadas en otros ejemplos de la presente invención y los resultados son similares.

5 [Ejemplo de ensayo 3] Determinación *in vitro* de anti-*chlamydia trachomatis* y *chlamydia pneumoniae*

Procedimientos de ensayo:

- 10 1. Cultivar las líneas celulares HEP-2 y McCoy en una placa de cultivo celular de 96 pocillos (Costar Company) respectivamente, 37°C y 5% de CO₂, durante 48 h para producir células en monocapa.
- 15 2. Diluir las bacterias a 10000-20000 ufi (unidad de formación de cuerpos de inclusión)/ml, aplicar 0,1 ml/pocillo de inoculación. Inocular la placa de cultivo celular de McCoy con *Chlamydia trachomatis* serotipo B/TW-5/OT y D/UW-3/Cx e inocular la placa de cultivo celular HEP-2 con *Chlamydia pneumoniae* CWL-029. En primer lugar, absorber el líquido de cultivo celular en la placa de cultivo de 96 pocillos, y después inocular la placa a 0,1 ml/pocillo. De entre los mismos, no inocular 4 pocillos de A11-D11 y 2 pocillos de C12 y D12 con bacterias.
- 20 3. Después de la inoculación, centrifugar la placa de cultivo celular de 96 pocillos con una máquina centrifugadora de Beckman-Coulter Company, fuerza centrífuga x1500 g, temperatura de centrifugación 35°C y tiempo de centrifugación de 60 min.
- 25 4. Después de la centrifugación, absorber *Chlamydia trachomatis* o *Chlamydia pneumoniae* inoculada, y añadir 4 fármacos antibióticos de dilución seriada en la misma respectivamente, es decir, la levocarrimicina producida en el ejemplo 4 de la presente invención; la acetil-espiramicina, la eritrocina y la azitromicina, 0,1 ml/pocillo.
- 30 5. Cultivar en placa de ensayo sensible a fármacos de *Chlamydia trachomatis* a 37°C y el 5% de CO₂ durante 48 h y en placa de ensayo sensible a fármacos de *chlamydia pneumoniae* durante 72 h. Después de cultivar, absorber la disolución de fármaco antibiótico y lavarla dos veces con PBS (0,01 M, pH 7,4), y después disponerla en el 100% de metanol a temperatura ambiente durante 15 min.
- 35 6. Identificación por tinción de inmunofluorescencia indirecta: añadir anticuerpo monoclonal resistente a *Chlamydia trachomatis* (clon N54) y anticuerpo monoclonal resistente a *Chlamydia pneumoniae* (clon P33) purificados a una placa de ensayo sensible a fármacos de *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia*

pneumoniae respectivamente, e incubar en una caja húmeda a 50 µl/pocillo y 37°C durante 30 min. Lavar la placa con un lavador de placas 4 veces, y después añadir anticuerpo fluorescente anti-rata de conejo (Sigma Company), 50 µl/pocillo. Incubar y lavar la placa utilizando el mismo procedimiento y en las mismas condiciones. Añadir glicerina de montaje, 100 µl/pocillo y observar los resultados con el microscopio de fluorescencia invertido Nikon (Diaphot-200).

7. Definición de MIC: Se refiere a la concentración diluida mínima de antibiótico que hace que el crecimiento de cuerpos de inclusión de *Chlamydia Trachomatis* o *Chlamydia Pneumoniae* en placas de ensayo de 96 pocillos se suprima completamente (No se encuentra ninguna incursión de tinción de fluorescencia en los pocillos).

Los resultados de ensayo son los siguientes:

Tabla 6 Concentración inhibitoria mínima (MIC) *in vitro* inhibición de cuatro antibióticos macrólidos frente a *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia pneumoniae*

	Carrimicina µg/ml	Acetil-espíramicina (AT-SPM) µg/ml	Eritrocina (EM) µg/ml	Azitromicina (AM) µg/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i> B/TW-5/OT	0,25	4	0,5	0,5
<i>Chlamydia trachomatis</i> D/UW-3/Cx	0,25	2	0,5	0,25
<i>Chlamydia pneumoniae</i> CWL-029	0,016	0,5	≤0,016	0,032

- Para *Chlamydia trachomatis* serotipo B/TW-5/OT, la MIC de la carrimicina es 0,25 µg/ml, la eritrocina y la azitromicina (0,5 µg/ml) vienen en segundo lugar y la acetil-espíramicina (MIC es 4 µg/ml) viene en último lugar.
- Para *Chlamydia trachomatis* serotipo D/UW-3/Cx, el efecto *in vitro* de carrimicina y azitromicina es el mismo, la MIC es 0,25 µg/ml, siendo sensible; la eritrocina (0,5 µg/ml) viene en segundo lugar y la acetil-espíramicina (la MIC es 2 µg/ml) viene en último lugar.
- Para *Chlamydia pneumoniae* CWL-029, el efecto *in vitro* de la carrimicina y la eritrocina es el más sensible, MIC ≤ 0,016 µg/ml, la azitromicina (la MIC es 0,032 µg/ml) es más sensible; la acetil-espíramicina (la MIC es 0,5 µg/ml) es deficiente.
- En general, el efecto de levocarrimicina de la presente invención frente a *Chlamydia* es mejor que el de otros fármacos experimentales.

El mismo ensayo se realiza también sobre la levocarrimicina o preparaciones de levocarrimicina preparadas en otros ejemplos de la presente invención y los resultados son similares.

[Ejemplo de ensayo 4] *Urealyticum* y *chlamydia pneumoniae* en plasma antiurea *in vitro*

- Procedimiento de ensayo: añadir U-PPLO, 0,8 ml, en placa de cultivo celular de 12 pocillos estéril (añadir 0,9 ml en pocillo de control de líquido de bacterias y 1,0 ml en pocillos de control de medio de cultivo).
- Añadir 10⁴CCU/ml de Uu de líquido de bacterias, 0,1 ml en cada uno de los pocillos experimentales, siendo la cantidad final de bacterias en los pocillos de 10³CCU/ml (no añadir líquido de bacterias en el pocillo de control de medio de cultivo).
- Dividir en 3 grupos (100 µg/ml, 10 µg/ml y 1 µg/ml de disolución madre antibiótica). Añadir antibióticos experimentales (levocarrimicina del ejemplo 6 de la presente invención, acetil-espíramicina, eritrocina y azitromicina) a cada uno de los pocillos experimentales con una punta estéril según un gradiente de concentración de degradación doble: 100 µl, 50 µl, 25 µl y 12,5 µl. (No añadir antibióticos al pocillo de control de líquido de bacterias y al pocillo de control de medio de cultivo. Paralelamente, se gestiona el pocillo de control de antibiótico).
- Mezclar los pocillos anteriores uniformemente, sellar la placa de cultivo con cinta adhesiva y después cultivar a 37°C en una incubadora.
- Observar y registrar el crecimiento de Uu en 17-24 h después del ensayo. Cuando el pocillo de control de líquido de bacterias Uu muestra un crecimiento positivo, la concentración de antibiótico mínima que puede inhibir el crecimiento de Uu es la MIC de la muestra. La MIC después del ensayo es la MIC final (24 h). Determinar la MIC de cepas de *urealyticum* en plasma anti-urea 4 veces y los resultados son los siguientes:

Carrimicina 0,025-0,125 µg/ml,

Acetil-espiramicina 0,5 µg/ml,

Eritrocina 5 µg/ml,

Azitromicina 0,025-0,125 µg/ml.

5

10

Los resultados anteriores muestran que la carrimicina tiene una buena función anti-Uu, que es similar a la función de azitromicina y mejor que la de acetil-espiramicina. La función anti-Uu de la eritrocina en este ensayo es la más deficiente.

El mismo ensayo se realiza también sobre la levocarrimicina o preparaciones de levocarrimicina preparadas en otros ejemplos de la presente invención y los resultados son similares.

REIVINDICACIONES

1. Levocarrimicina, en la que dicha levocarrimicina es una mezcla de isovalerilespiramicina III, II y I como componentes principales y contiene determinadas isobutirilespiramicina III y II, butirilespiramicina III y II, propionilespiramicina III y II, así como acetilespiramicina III y II, siendo, entre las mismas, el contenido de la isovalerilespiramicina III no inferior a 30% en peso, el contenido total de la isovalerilespiramicina III, II y I no inferior a 60% en peso y el contenido de la acilespiramicina 80 a 98% en peso; siendo la rotación óptica específica de dicha levocarrimicina $[\alpha]_D = -52^\circ$ a -57° en la disolución de 0,02 g/ml de cloroformo a temperatura de 25°C,
- en la que la isovalerilespiramicina III es un compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III, la isovalerilespiramicina II es un compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II, la isovalerilespiramicina I es un compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I;
- en la que el compuesto cristalino de isovalerilespiramicina III medido mediante la difracción de polvo de rayos X con radiación Cu-K-alfa presenta unos picos característicos de 2θ a 8,0°, 10,0°, 11,2°, 11,7°, 16,4°, 19,1°, 19,6°, 20,0°, 21,4°, 22,9°, 23,6° y 29,4°;
- el compuesto cristalino de isovalerilespiramicina II medido mediante la difracción de polvo de rayos X con radiación Cu-K-alfa presenta unos picos característicos de 2θ a 10,0°, 11,6°, 16,4°, 17,3°, 19,1°, 21,2°, 22,1°, 22,7°, 26,4°, 26,9°, 27,5° y 31,5°;
- el compuesto cristalino de isovalerilespiramicina I medido mediante la difracción de polvo de rayos X con radiación Cu-K-alfa presenta unos picos característicos de 2θ a 7,6°, 8,0°, 10,0°, 11,4°, 16,4°, 17,0°, 17,5°, 17,9°, 19,5°, 22,7°, 23,7° y 24,4°.
2. Levocarrimicina según la reivindicación 1, en la que dicha levocarrimicina contiene espiramicina III y otros componentes, siendo entre los mismos el contenido de espiramicina III no superior a 1,0% y el contenido total de otros componentes 2,0 a 19% en peso.
3. Levocarrimicina según la reivindicación 2, en la que dicho punto de fusión de dicha levocarrimicina es de 112 a 122°C.
4. Levocarrimicina según la reivindicación 3, en la que dicho punto de fusión de dicha levocarrimicina es de 114 a 120°C.
5. Levocarrimicina según la reivindicación 2, en la que el contenido total de otros componentes es 2,0 a 9% en peso.
6. Composición farmacéutica de levocarrimicina, en la que dicha composición farmacéutica de levocarrimicina contiene la levocarrimicina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende las formas cristalinas de isovalerilespiramicina III, II, I según la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Composición farmacéutica de levocarrimicina según la reivindicación 6, en la que el contenido de dicha levocarrimicina es 10 a 90% en peso de la composición farmacéutica.
8. Procedimiento de preparación para la levocarrimicina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que incluye el cultivo, la fermentación y un proceso de extracción, en el que dichos cultivo y fermentación consisten en:
- cultivar las cepas fúngicas clonadas WSJ-195 producidas mediante espiramicina que contienen el gen de 4"-isovaleril transferasa en un medio de cultivo inclinado, inocularlas en un medio de siembra, inocularlas a continuación en un medio de fermentación después del cultivo, y controlar el proceso de fermentación mediante un regulador del pH; controlar el pH a de 6,0 a 9,0; las curvas de variación para el pH con tiempo muestran tres fases continuas, la primera fase cumple la fórmula $y_1=k_1x_1+6,0$, en la que $0,0227\leq k_1\leq 0,1364$, $0<x_1\leq 22$; la segunda fase cumple $y_2=k_2x_2+b_2$, en la que $-0,0735\leq k_2<0$, $6,5<b_2\leq 10,62$, $22\leq x_2\leq 56$; y la tercera fase cumple la fórmula $y_3=k_3x_3+b_3$, en la que $0<k_3\leq 0,0078$, $6,06\leq b_3<6,5$, $56\leq x_3\leq 120$; y el procedimiento de preparación comprende asimismo las etapas siguientes:
- separar y purificar la levocarrimicina para obtener levoisovalerilespiramicina I, II o III;
 - recristalizar la levoisovalerilespiramicina I, II o III para obtener el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I, II o III;
 - eliminar el acetonitrilo en la levocarrimicina residual después de separar y purificar la levoisovalerilespiramicina I, II o III en la etapa a) mediante evaporación rotatoria, extraer a continuación

con una cantidad de una vez de acetato de etilo y eliminar el acetato de etilo en el extracto mediante evaporación rotatoria para obtener una muestra de pasta; redissolver la muestra obtenida con éter de petróleo, y eliminar el éter de petróleo mediante evaporación rotatoria para obtener la levocarrimicina;

- 5 d) mezclar el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I, II o III obtenido en la etapa b) con la levocarrimicina obtenida en la etapa c) para obtener la levocarrimicina en la que la isovalerilespiramicina I, II o III es el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I, II o III;

consistiendo dichas separación y purificación en la etapa a) en:

10 purificar la levocarrimicina obtenida en la separación preliminar con una cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa, preparar una columna cromatográfica con ODS, utilizar acetonitrilo y disolución amortiguadora de acetato de amonio como fase móvil en una elución en gradiente; registrar el espectrograma UV separado mediante detección UV y recoger los picos diana de los componentes de levoisovalerilespiramicina I, II o III:

columna cromatográfica: columna cromatográfica preparativa ODS;

20 fase móvil: acetonitrilo (A), disolución de acetato de amonio 100 mM (B);

condición de gradiente: adoptar un gradiente lineal durante 0 a 60 min, siendo A 25% a 65%; y 61 a 90 min, siendo A 65% a 90%;

25 velocidad de flujo: 260 ml/min;

volumen de inyección: 10 ml;

concentración de muestreo: 0,5 g/ml;

30 longitud de onda de medición: 231 nm;

modo de recoger: recogida mediante activación UV;

35 recoger la muestra de levoisovalerilespiramicina I según el tiempo de retención de 44,759 min de levoisovalerilespiramicina I; o recoger la muestra de isovalerilespiramicina II según el tiempo de retención de 43,34 min de isovalerilespiramicina II; o recoger la muestra de levoisovalerilespiramicina III según el tiempo de retención de 48,009 de levoisovalerilespiramicina III; eliminar a continuación acetonitrilo mediante evaporación rotatoria, extraer con una cantidad de una vez de acetato de etilo y eliminar el acetato de etilo del extracto mediante evaporación rotatoria para obtener una muestra de pasta; redissolver la muestra obtenida con éter de petróleo y eliminar el éter de petróleo mediante evaporación rotatoria para obtener el polvo sólido blanco de levoisovalerilespiramicina I, II o III;

45 en el que el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I se obtiene mediante el proceso de recristalización siguiente: disolver el polvo sólido blanco de levoisovalerilespiramicina I en el disolvente mixto de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, añadir a continuación agua pura mientras se agita, a continuación reducir la temperatura a de 5°C a 15°C mientras se agita continuamente para obtener el compuesto cristalino de la levoisovalerilespiramicina I, en el que la relación en volumen de acetato de etilo a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto es de 1:0,1 a 10:0,5 a 1;

50 el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II se obtiene mediante el proceso de recristalización siguiente: disolver el polvo sólido blanco de levoisovalerilespiramicina II en el disolvente mixto de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, añadir a continuación agua pura mientras se agita, a continuación reducir la temperatura a de 5°C a 15°C mientras se agita continuamente, para obtener el compuesto cristalino de la levoisovalerilespiramicina II, en el que la relación en volumen de metanol absoluto a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto es de 1:0,1 a 10:0,5 a 1;

60 el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III se obtiene mediante el proceso de recristalización siguiente: disolver el polvo sólido blanco de levoisovalerilespiramicina III en el disolvente mixto de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, añadir a continuación agua pura mientras se agita, a continuación, reducir la temperatura a de 5°C a 15°C mientras se agita continuamente, para obtener el compuesto cristalino de la levoisovalerilespiramicina III, en el que la relación en volumen de metanol absoluto a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto es de 1:0,1 a 10:0,5 a 1.

65 9. Procedimiento de preparación según la reivindicación 8, en el dicho proceso de extracción consiste en: tratar el licor de fermentación con sulfato de aluminio para obtener el filtrado, ajustar el pH a de 8,5 a 9,0, extraer con acetato de butilo, lavar el extracto de acetato de butilo con agua no salina y NaH₂PO₄ al 1% respectivamente,

extraer a continuación con agua de pH 2,0 a 2,5 para obtener un extracto acuoso, ajustar el pH a de 4,5 a 5,5, volatilizar y eliminar el acetato de butilo residual para obtener un extracto hidratado, filtrar y ajustar el pH a de 8,5 a 9,0, obtener un precipitado, lavar el precipitado con agua purificada y secarlo para obtener levocarrimicina.

- 5 10. Procedimiento de preparación según la reivindicación 8, en el que el cultivo en el medio de cultivo inclinado se prolonga durante 8 a 15 días a una temperatura de 28 a 38°C; el cultivo en el medio de siembra se prolonga durante 40 a 80 horas a una temperatura de 25 a 30°C; y la fermentación en el medio de fermentación se prolonga durante 72 a 120 horas a una temperatura de 26 a 30°C.
- 10 11. Procedimiento de preparación según la reivindicación 8, en el que, en el proceso de fermentación, el pH se controla a de 6,0 a 8,0.
12. Procedimiento de preparación según la reivindicación 8, en el que,
- 15 en el proceso de preparar el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I, la relación en volumen de acetato de etilo a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto es de 1:2 a 8:0,8 a 1;
- en el proceso de preparar el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina II, la relación en volumen de metanol absoluto a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto es de 1:2 a 8:0,8 a 1;
- 20 en el proceso de preparar el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III, la relación en volumen de metanol absoluto a alcohol etílico absoluto a acetona anhidra en el disolvente mixto es de 1:2 a 8:0,8 a 1.
- 25 13. Utilización de dicha levocarrimicina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o dicha composición farmacéutica de levocarrimicina según la reivindicación 6 o 7 para fabricar un medicamento para el tratamiento y la prevención de enfermedades infecciosas.
- 30 14. Utilización según la reivindicación 13, en la que dichas enfermedades infecciosas son las enfermedades provocadas por infección de una bacteria gram-positiva, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, estreptococo piogénico, *Micrococcus catarrhalis*, gonococo, *Bacillus influenzae*, legionela o anaerobio.
- 35 15. Utilización según la reivindicación 13, o utilización de dicha composición farmacéutica de levocarrimicina según la reivindicación 6 o 7 para fabricar un medicamento antibacteriano, incluyendo dichas bacterias *Streptococcus pneumoniae*, estreptococo del grupo A, estreptococo piogénico, enterococo, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Catarrhal coccus*, gonococo, *Bacillus influenzae*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* enterotoxinógena, *Escherichia coli* enteropatógena, *Escherichia coli* enteroinvasiva, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, el bacilo *Proteus vulgaris*, el bacilo tifoideo, *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Serratia marcescens*, *S. Sonnei*, *Sh. flexneri*, *Tritirachium album*; legionela como *Legionella pneumophila*, *Legionella gormanii*, *Legionella bozemanii*, *Legionella dumoffii*, *Legionella jordanis* y *Legionella micdadei*; anaerobio como *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides bacteroides*, *Bacteroides prevotella*, *Prevotella asaccharolyticus*, *Prevotella oralis*, *Fusobacteriumnu cleatum*, *Fusobacterium russii*, bifidobacterias, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium acnes*, *Clostridium perfringens* y hongos de tipo levadura.
- 45

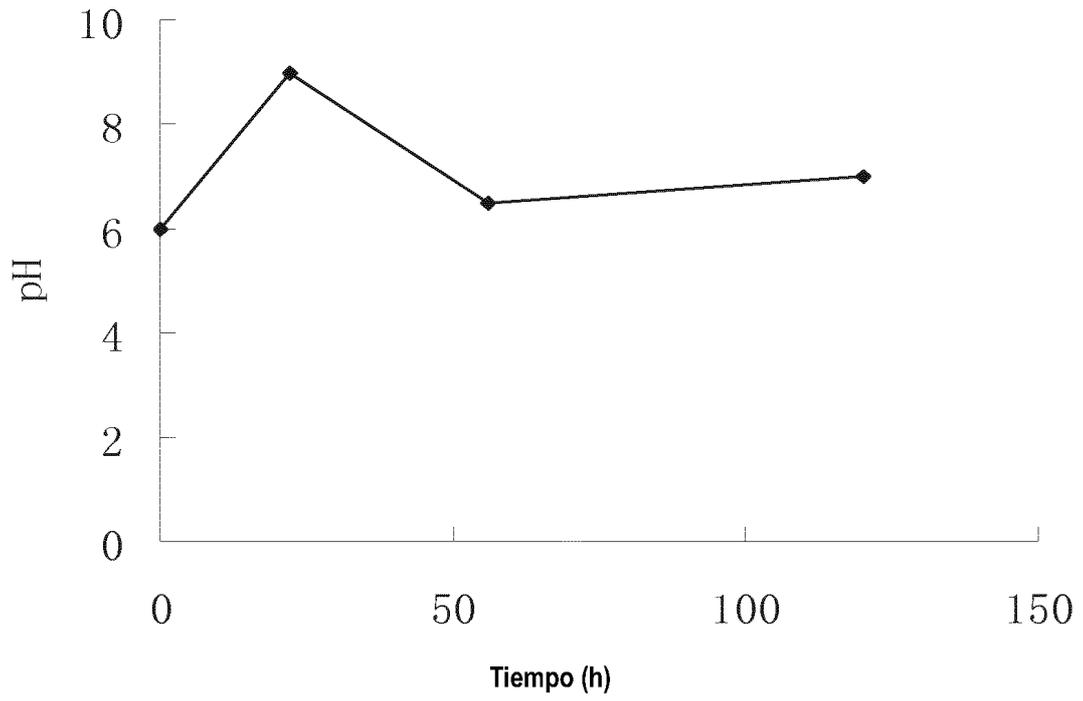


Fig.1

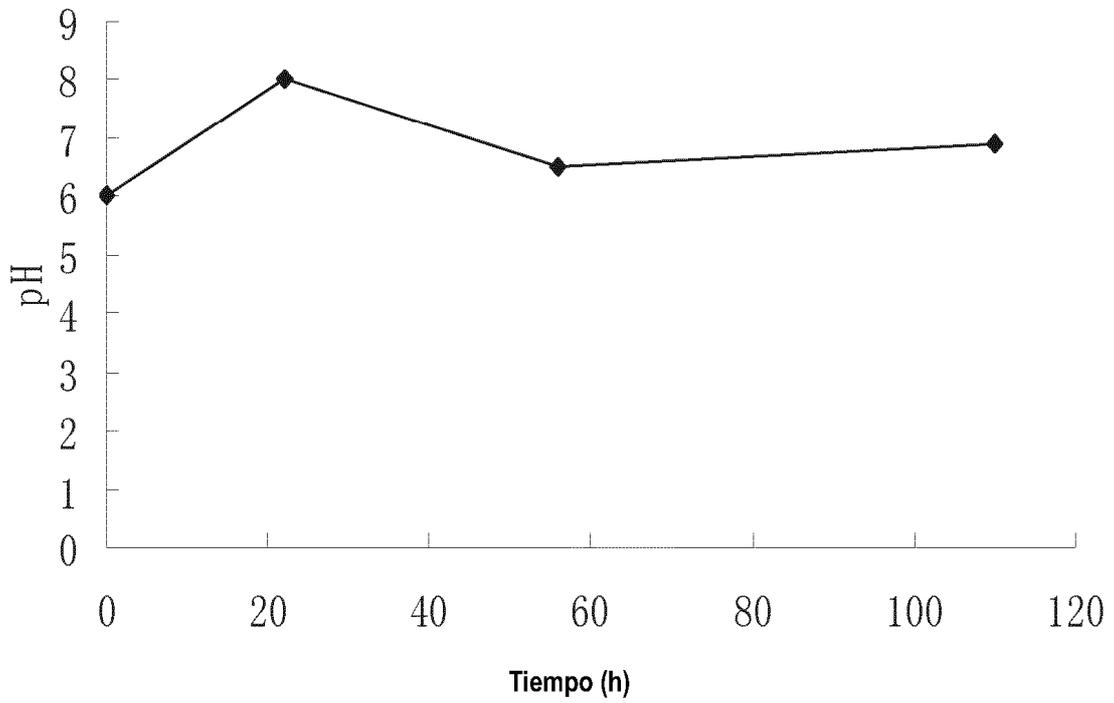


Fig.2

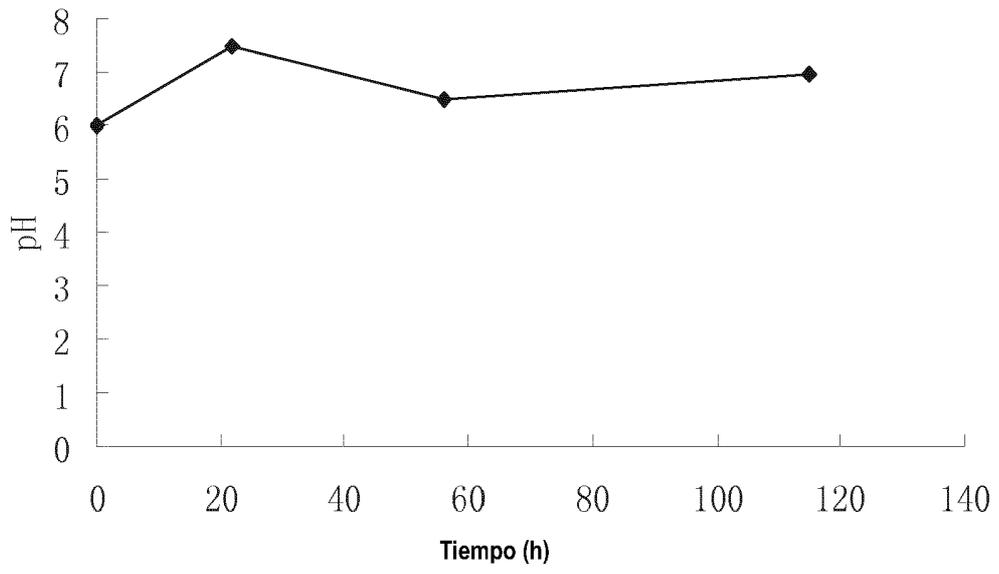


Fig.3

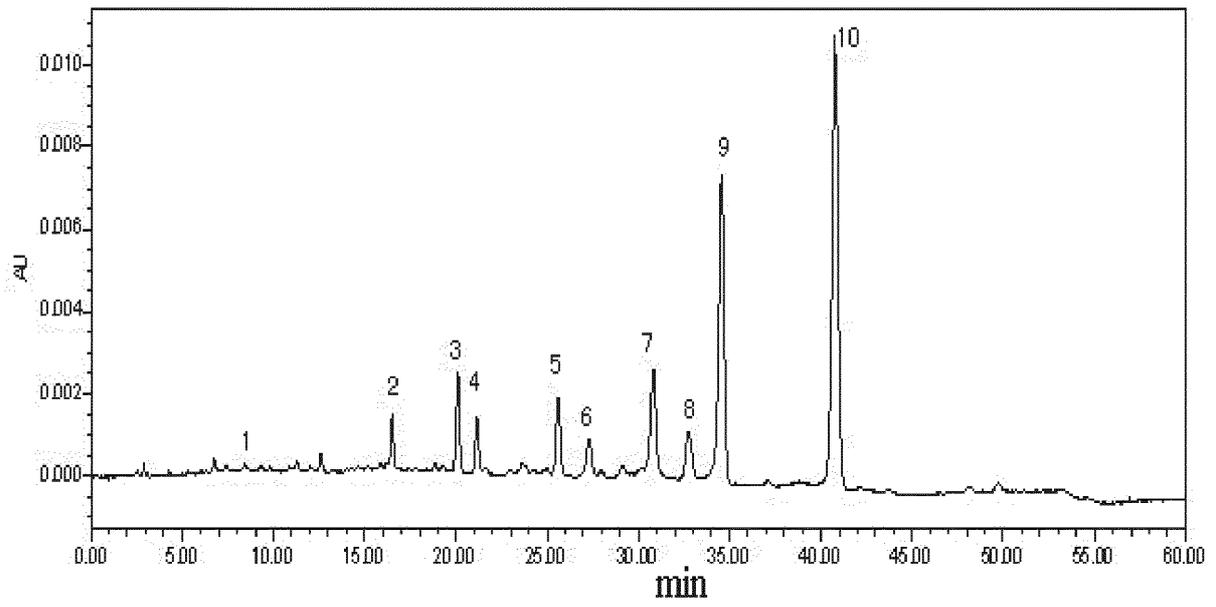


Fig.4

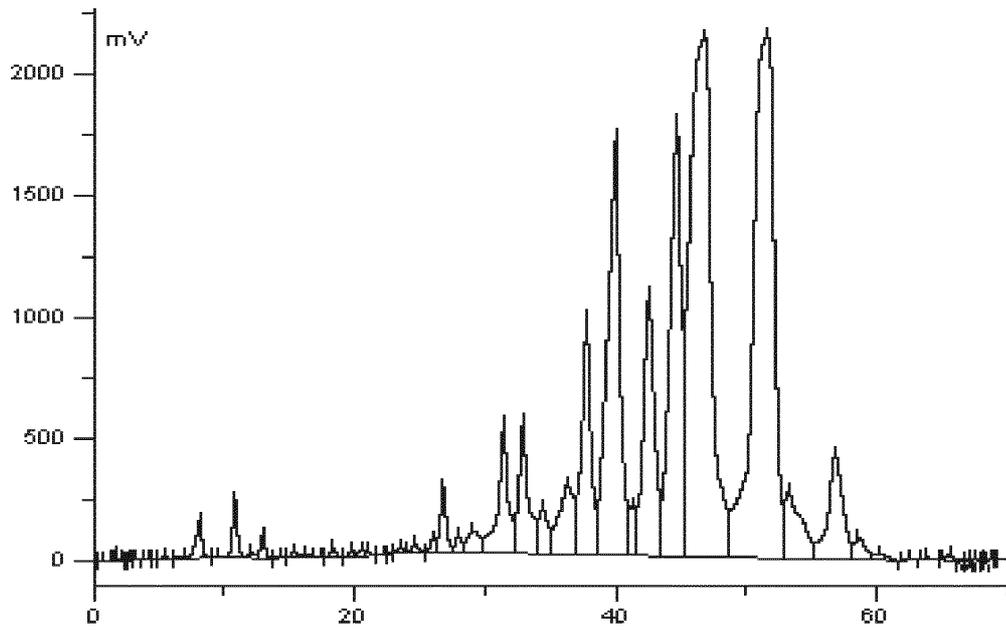


Fig.5

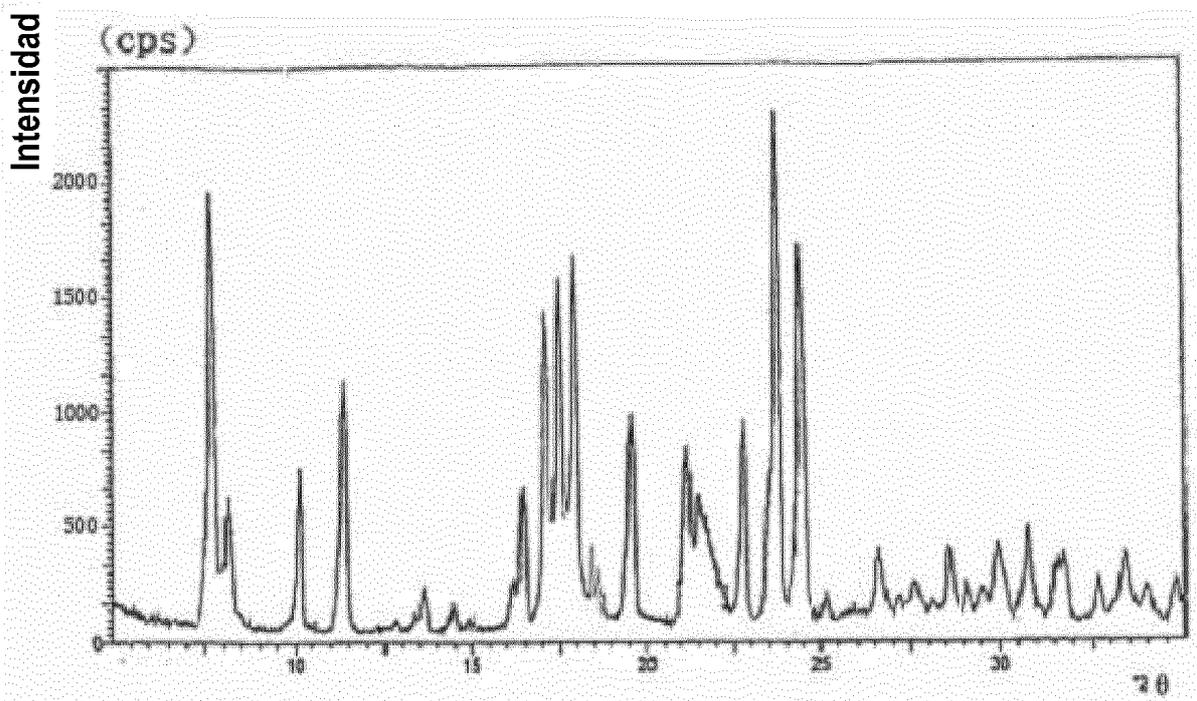


Fig.6

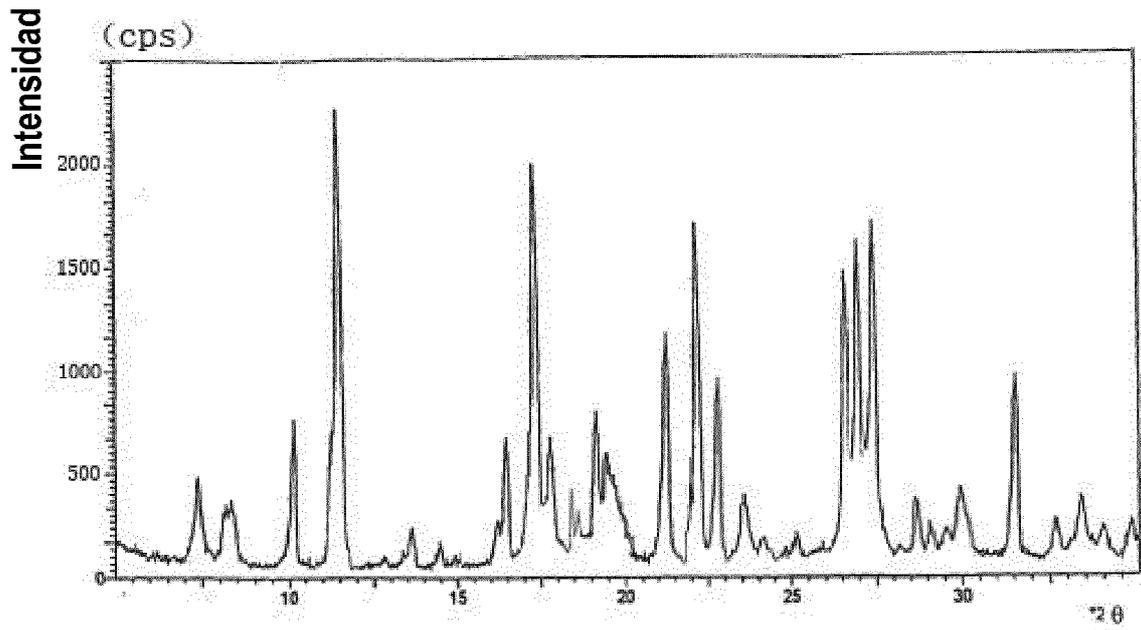


Fig.7

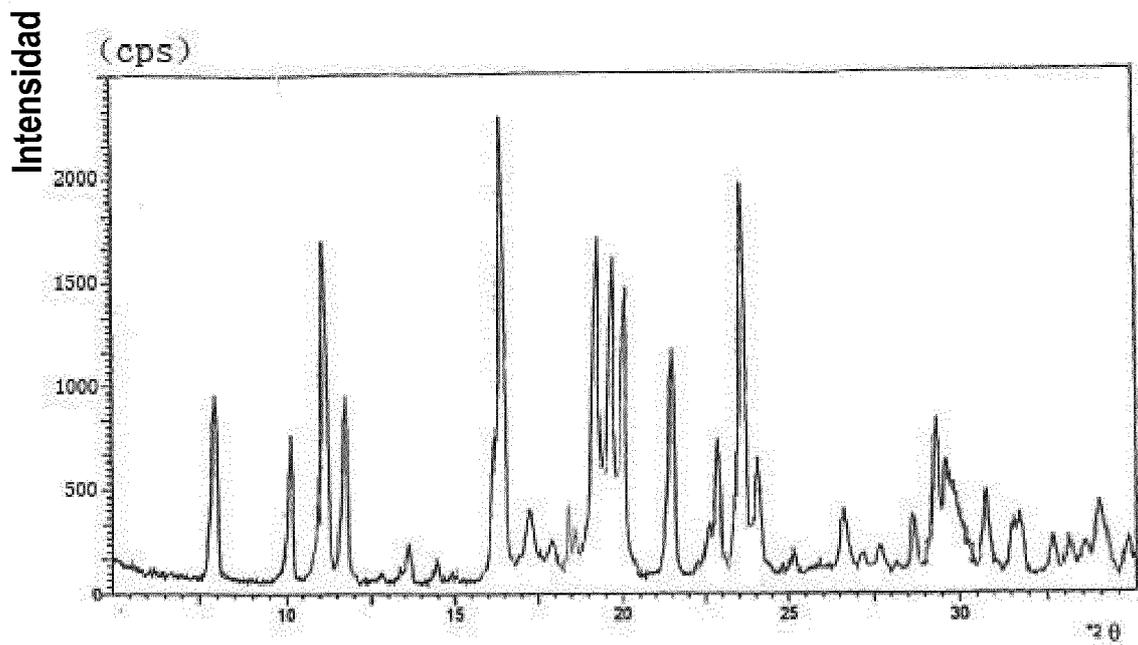


Fig.8