(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 781 425**

(51) Int. CI.:

C07H 17/08 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
C12P 19/62 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2011 E 17166117 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3210990**

(54) Título: **Levoisovalerilespiramicina III y preparaciones, métodos de preparación y utilizaciones de la misma**

(30) Prioridad:

25.05.2010 CN 201010182111
25.05.2010 CN 201010182108
25.05.2010 CN 201010182109

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.09.2020

(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
ZHAO, XIAOFENG

(74) Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

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

Levoisovalerilespiramicina III y preparaciones, métodos de preparación y utilizaciones de la misma

Campo de la invención

La invención se refiere a un nuevo antibiótico macrólido producido por ingeniería genética, en particular a la levoisovalerilespiramicina III, y a cristales, preparaciones farmacéuticas y procedimientos de preparación de la misma, así como a sus utilizaciones en fármacos antiinfecciosos.

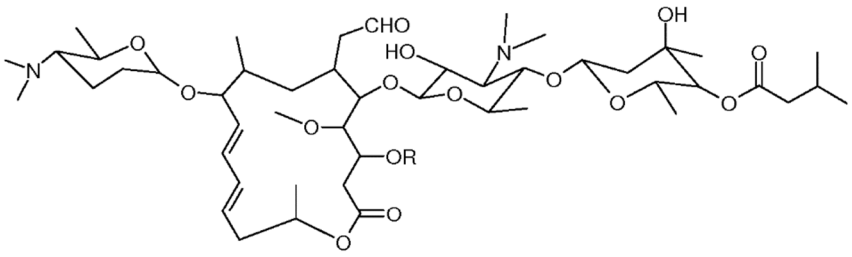
Antecedentes de la invención

Los antibióticos macrólidos ejercen un papel clínicamente importante dado que poseen una buena actividad frente a bacterias gram-positivas y también algunas bacterias gram-negativas, y poseen una buena permeabilidad tisular y una buena actividad antibacteriana frente a agentes causativos incontrolables tales como algunos toxoplasmas cada vez más epidémicos y legionela. Caracterizados por una rápida absorción por administración oral y pocas reacciones adversas, los antibióticos macrólidos no ejercen básicamente ningún efecto sobre el hígado y los riñones, pero tienen una función de inmunorregulación potencial. En los años noventa, se pensaba que los antibióticos macrólidos eran un competidor de fármacos de β-lactama en el tratamiento de infecciones del aparato respiratorio en adultos.

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. Un 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 actividad 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 es causante de 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 tiene ninguna acción farmacológica, sino que incluso contrarresta la del eutómero. A veces se producirán 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 que el de D(-)-cloranfenicol; la actividad farmacéutica del isómero L de propranolol es 100 veces mayor que la del isómero D; la (-)-adanona es un analgésico potente mientras que la (+) no tiene 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 embriotoxina y teratogénesis; la ketamina es un anestésico y analgésico utilizado ampliamente, pero tiene efectos secundarios tales como alucinaciones. Algunos estudios muestran que S(+) es 3 ~ 4 veces más eficaz que R(-) y los efectos secundarios tóxicos están relacionados con este último. La gran diferencia en el efecto curativo 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 sin ningún efecto o con efectos secundarios tóxicos de fármacos eficazmente 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 sobre 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.

La carrimicina es un derivado novedoso de espiramicina desarrollado mediante la aplicación de tecnología de ingeniería genética que se denominó originariamente biotec-espiramicina (*biotechspiramycin*) y que se denominaba anteriormente biotecmicina (*biotechmycin*) [patente Nº: ZL97104440.6]. Según las "Normas para nombres de fármacos aprobados chinos", y después de la revisión técnica y la confirmación de la Comisión de Farmacopea China, el nombre genérico de biotec-espiramicina se cambió por carrimicina (*carrimycin*). La estructura química de la carrimicina comprende principalmente 4"-isovalerilespiramicina, que incluye 4"-isovalerilespiramicina I, II, III, y aproximadamente 6 4"-hidroxi-espiramicinas aciladas, por lo que la denominación química es 4"-acilespiramicina.

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



(1)

en la que: R en la isovalerilespiramicina I es H;
R en la isovalerilespiramicina II es $COCH_3$, R en la isovalerilespiramicina III es $COCH_2CH_3$.

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.

El estudio farmacocinético muestra que los componentes eficaces de carrimicina con actividad son principalmente la 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 aparentemente la biodisponibilidad del componente activo espiramicina. La dosis individual de carrimicina se elimina lentamente. Su $T_{1/2}$ es de entre 23~27 horas.

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 tiene ninguna resistencia cruzada aparente con fármacos similares. Paralelamente, la carrimicina tiene actividad antibacteriana frente a *Mycoplasma* y *Chlamydia*, así como frente a algunas bacterias gram-negativas, tiene buena permeabilidad tisular y buena actividad antibacteriana frente a toxoplasmas epidémicos y legionela, y posee además una función potencial inmunorreguladora. La actividad antibacteriana in vivo es mucho mejor que la que posee in vitro (documento ZL200310122420.9). Investigaciones clínicas muestran que la administración de comprimidos de carrimicina de 200 mg~400 mg 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 pneumonia*, *Haemophilus influenza* y *Mycoplasma pneumonia*; uretritis no gonocócida 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%.

Investigaciones clínicas demuestran que la carrimicina es un antibiótico seguro y eficaz por administración oral. No obstante, la carrimicina es un producto obtenido mediante fermentación y es un fármaco multicomponente, siendo muy difícil separar adicionalmente y purificar fármacos multicomponentes. La HPLC actual puede separar las múltiples acilespirimicinas de una muestra de carrimicina; por ejemplo, el grado de separación de isovalerilespiramicina II e isobutirilespiramicina III, isobutirilespiramicina II y propionilespiramicina III, propionilespiramicina III y dicho componente, propionilespiramicina II y acetilespiramicina III es superior a 1,5 tal como se estipula en la Farmacopea China, mientras que el de acetilespiramicina III y dicho componente es de 1,2.

Mediante muchas investigaciones y ajustes y optimizaciones de condiciones de cultivo y de fermentación, el inventor ha obtenido una levocarrimicina que tiene una mejor actividad antiinfecciosa.

Actualmente, se utiliza la HPLC, y se ha determinado que la carrimicina comprende 9 componentes de acilespiramicina, que incluyen isovalerilespiramicina (I+II+III), que no deberá ser inferior al 60% en total, y acilespiramicina, que no deberá ser inferior al 80% en total. Es bastante difícil cumplir con la norma de control de calidad de inyección para antibióticos multicomponentes producidos mediante fermentación, pero la inyección hace efecto rápidamente en pacientes críticos y aquellos que no deberían tomar medicina por vía oral, por lo que la preparación de un componente individual de isovalerilespiramicina tiene una gran importancia. En la presente invención, mediante investigaciones adicionales sobre la levocarrimicina, se obtiene un componente individual de levoisovalerilespiramicina I con una pureza que alcanza el 98% en peso.

Los documentos CN 1 554 355 A y CN 1 405 299 A son representativos del estado de la técnica. SUN CHENGHANG et al. "Shengjimycins. A Group of Hybrid Antibiotics, 4"-Acylspiramycins", ACTINOMYCETOLOGICA, vol. 13, Nº 2, 1 de enero de 1999, páginas 120-125, XP055081598, ISSN: 0914-5818,

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 también representativos del actual estado de la técnica.

Sumario de la invención

Un primer objetivo de la presente invención es proporcionar levoisovalerilespiramicina III.

Un segundo objetivo de la presente invención es proporcionar una preparación que contiene levoisovalerilespiramicina III.

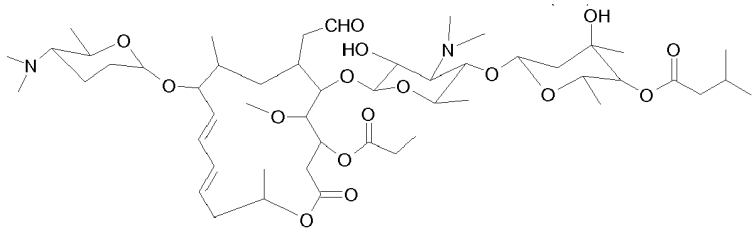
Un tercer objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento de preparación de levoisovalerilespiramicina III.

Un cuarto objetivo de la presente invención es proporcionar utilizaciones de la levoisovalerilespiramicina III.

Un quinto objetivo de la presente invención es proporcionar cristales de levoisovalerilespiramicina III, así como una preparación que contiene los cristales, respectivamente.

Con el objeto de lograr los objetivos de la presente invención, se utiliza el esquema técnico siguiente:

La presente invención se refiere a un compuesto de levoisovalerilespiramicina III, cuya fórmula estructural química se muestra como fórmula (I):



(III)

La rotación óptica específica $[\alpha]_D$ es -49º~51º (C=0,02 g/ml, $CHCl_3$, 25, λ=589,3 nm); y el punto de fusión es 116~118ºC;

La presente invención se refiere a una preparación de la levoisovalerilespiramicina III, en la que: la preparación comprende levoisovalerilespiramicina I, sal farmacéutica de isovalerilespiramicina III, isovalerilespiramicina III y coadyuvante farmacéuticamente aceptable, o una sal farmacéuticamente aceptable de isovalerilespiramicina III y coadyuvante farmacéuticamente aceptable, en la que la pureza de isovalerilespiramicina III es superior al 90% en peso , preferentemente superior al 95% en peso y de forma más preferida superior al 98% en peso;

Un primer esquema técnico preferido de la presente invención: la preparación de la presente invención es una preparación líquida, sólida, semisólida o gaseosa, en la que la preparación líquida comprende inyección, disolución para infusión, disolución, mezcla, jarabe, tintura, coloide, agua aromática, glicerita, disolución coloidal, mucílago, suspensión o emulsión; la preparación sólida comprende polvo para inyección, polvo para inyección liofilizado, comprimido, cápsula, polvos, gránulos, píldora, preparación sublimada o membrana; la preparación semisólida comprende pomada, apósito, supositorio, extracto o gel y la preparación gaseosa comprende aerosol o pulverización; preferentemente disolución para inyección, polvo para inyección o polvo liofilizado para inyección.

Un segundo esquema técnico preferido de la presente invención: la preparación de la presente invención que contiene levoisovalerilespiramicina III (dosis unitaria) en una cantidad de 10~1500 mg, preferentemente 50~1000 mg, de forma más preferida 100~500 mg.

Un tercer esquema técnico preferido de la presente invención: el porcentaje en peso de levoisovalerilespiramicina III en la preparación es el 10~95%, preferentemente el 50~95%, y de forma más preferida el 75~95%.

La presente invención también se refiere a una preparación que contiene levoisovalerilespiramicina III:

La preparación comprende disolución para inyección, polvo para inyección o polvo liofilizado para inyección preparados con levoisovalerilespiramicina III y por lo menos uno de entre ácido cítrico, ácido adípico, ácido maleico.

En la que la relación molar de levoisovalerilespiramicina III a ácido cítrico es 1:0,8~1,2, la relación molar de

levoisovalerilespiramicina III a ácido adípico es 1:0,8~1,2 y la relación molar de levoisovalerilespiramicina III a ácido maleico es 1:0,8~1,2.

La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de levoisovalerilespiramicina III, que incluye: preparar levocarrimicina y purificar levoisovalerilespiramicina III.

En el que el proceso de preparación de levocarrimicina incluye: cultivar y fermentar biológicamente cepas fúngicas clonadas WSP-195 producidas mediante espiramicina que contienen el gen de 4"-isovaleril transferasa, y extraer el licor de fermentación; realizar la fermentación en condiciones de pH de 6,0~9,0, preferentemente de 6,0~8,0, y de forma más preferida de 6,0~7,5. Las curvas de variación de pH en función del tiempo muestra tres fases continuas, en las que 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 la fórmula $y_2=k_2x_2+b_2$, 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 $0<k_3\leq 0,0078$, $6,06\leq b_3<6,5$, $56\leq x_3\leq 120$. En la presente invención, ajustando y optimizando las condiciones de cultivo y de fermentación, especialmente controlando el pH durante la fermentación con un regulador del pH, las curvas de variación del pH en función del tiempo muestras tres fases continuas, y cada fase satisface respectivamente una determinada fórmula, obteniéndose así levocarrimicina con actividad óptica. Se obtiene levoisovalerilespiramicina III mediante separación.

Preferentemente, las condiciones de fermentación biológica de la presente invención son: cultivar las cepas fúngicas clonadas WSJ-195 producidas mediante espiramicina que contienen el gen de 4"-isovaleril transferasa en un medio de cultivo inclinado de agar 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 8~15 días a un pH de 6,5~7,5 y una temperatura de 28~38ºC, inocularlas después a un 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 de pescado y 0,05% de KH_2PO_4 y cultivar durante 40~80 horas a un pH de 6,5~7,5 y una temperatura de 25~30ºC, implantarlas en un 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 y cultivar durante 72~120 horas a pH6,5~7,5, temperatura de 26~30ºC y el 0,1~20% de cantidad de inoculación, para obtener un licor de fermentación.

El regulador del pH es por lo menos uno seleccionado de entre glucosa, ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido acético, amoniaco, hidróxido de sodio e hidróxido de potasio.

Preferentemente, el proceso de extracción del licor de fermentación biológica de la presente invención consiste en: procesar el licor de fermentación con sulfato de aluminio para obtener un filtrado, regular el pH del filtrado a 8,5~9,0, utilizar acetato de butilo para la extracción, limpiar el extracto de acetato de butilo con disolución no salina y NaH_2PO_4 al 1%, después utilizar agua de pH 2,0~2,5 para extracción para obtener un extracto acuoso, regular el pH del extracto acuoso a 4,5~5,5, volatilizar y eliminar el acetato de butilo residual para obtener un extracto acuoso, filtrar el extracto acuoso, regular el pH del filtrado a un pH de 8,5~9,0, precipitar el filtrado y lavar con agua purificada para obtener el producto húmedo y secarlo para obtener levocarrimicina.

En el que se aplica por lo menos uno de entre ácido clorhídrico, ácido acético, ácido cítrico, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, bicarbonato de sodio y carbonato de sodio para regular el valor del pH.

En el que el proceso de purificación de levoisovalerilespiramicina III incluye: purificar la muestra de levocarrimicina con un procedimiento cromatográfico, realizar una elución en gradiente y separar el pico diana del componente de levoisovalerilespiramicina III a través de una columna cromatográfica ODS en acetonitrilo y disolución tampón de acetato de amonio.

Preferentemente, durante la purificación de levoisovalerilespiramicina III, registrar el diagrama del espectro UV de levoisovalerilespiramicina III mediante cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa y detección UV y recoger la muestra de levoisovalerilespiramicina III en base a un tiempo de retención de 48,009 min.

De forma más preferida, durante la purificación de levoisovalerilespiramicina III, eliminar el acetonitrilo de la levoisovalerilespiramicina III recogida, correspondientemente con el procedimiento de evaporación rotatoria, utilizar después acetato de etilo para la extracción y eliminar el acetato de etilo del extracto por evaporación para obtener una muestra de pasta; redisolver la muestra obtenida con éter de petróleo, eliminar el éter de petróleo mediante evaporación para obtener correspondientemente el polvo blanco de levoisovalerilespiramicina III.

En el que la fase móvil es un disolvente mixto de acetonitrilo A y disolución de acetato de amonio 150 mM con un pH de 8,5.

Las condiciones requeridas para la purificación de levoisovalerilespiramicina III:

gradiente lineal: de 0~60 minutos, siendo A del 25%~65%, y de 61~90 minutos, siendo A del 65%~90%;

Velocidad de flujo: 260 ml/min;
Tamaño de muestra: 10 ml;
Concentración de la muestra: 0,5 g/ml;
Longitud de onda de medición: 231 nm;
Medio de recogida: recogida mediante activación UV.

La presente invención también se refiere a un compuesto cristalino de isovalerilespiramicina III, teniendo la difracción de polvo de rayos X del mismo medida mediante radiación Cu-K-alfa picos característicos a 2θ = 8,0º, 10,0º, 11,2º, 11,7º, 16,4º, 19,1º, 19,6º, 20,0º, 21,4º, 22,9º, 23,6º y 29,4º. El diagrama de difracción de polvo de rayos X se muestra en la Fig. 7.

El procedimiento para preparar el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III consiste en: disolver el compuesto sólido de levoisovalerilespiramicina I en un disolvente mixto de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, añadir agua pura y agitar la mezcla simultáneamente, enfriar a 5ºC~15ºC después de añadir agua pura, continuar agitando durante el enfriamiento, obtener después compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III.

En el que un primer esquema técnico preferido del procedimiento para preparar el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III es: el volumen de agua pura añadido es 2~9 veces el volumen total de metanol absoluto, 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.

Un segundo esquema técnico preferido del procedimiento para preparar el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III es: la relación en volumen de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra en el disolvente mixto es 1:0,1~10:0,5-1, preferentemente 1:2~8:0,8~1.

Un tercer esquema técnico preferido del procedimiento para preparar el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III es: la velocidad de agitación de añadir agua pura es de 30~60 rpm, preferentemente de 45~60 rpm; siendo la velocidad de agitación después de añadir agua pura de 10~30 rpm, preferentemente de 10~20 rpm.

Un cuarto esquema técnico preferido del procedimiento para preparar el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III es: la velocidad de enfriamiento después de añadir agua pura es de 1~3ºC/hora, preferentemente de 1~1,5ºC /hora.

Las moléculas en diferentes tipos de células de cristal son diferentes en una configuración, una conformación o una disposición estéricas, siendo así la solubilidad obviamente diferente, lo que da como resultado una situación en la que las preparaciones presentan tasas de digestión diferentes en el cuerpo humano, lo que afecta directamente a la absorción, la distribución, la excreción y el metabolismo de las preparaciones en el cuerpo humano y conduce finalmente a una diferencia en el efecto farmacéutico clínico debido a una disponibilidad biológica diferente. Mediante la comparación del efecto entre dicho cristal de levoisovalerilespiramicina III, se descubre que el efecto del cristal de la levoisovalerilespiramicina III que se prepara en la presente invención es superior al de la levoisovalerilespiramicina III.

La presente invención también se refiere a una preparación de compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III, que incluye compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III, sal farmacéutica de compuesto cristalino de isovalerilespiramicina III, compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III y coadyuvante farmacéuticamente aceptable, o sal farmacéutica de compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III y coadyuvante farmacéuticamente aceptable, en la que la pureza de la levoisovalerilespiramicina III es superior al 99% en peso.

La presente invención también se refiere a la utilización de isovalerilespiramicina III, compuesto cristalino, y la preparación del mismo en la preparación de un fármaco para tratar y/o prevenir enfermedades antiinfecciosas. Las enfermedades infecciosas incluyen 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 se refiere al uso de isovalerilespiramicina III, compuesto cristalino, y la preparación del mismo en la preparación de un fármaco antibiótico, compuesto cristalino, y la preparación del mismo en la preparación de un fármaco antibiótico. Las bacterias del presente documento incluyen *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*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *B. distasonis*, *B. prevotella*, *Prevotella asaccharolyticus*, *Prevotella oralis*, *Fusobacteriumnu nucleatum*, *Fusobacterium russii*, bifidobacterias, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium acnes*, *Clostridium perfringens* y hongos de tipo levadura.

A continuación se proporciona una descripción detallada adicional de la presente invención.

La presente invención se refiere a levoisovalerilespiramicina III, que se obtiene mediante ajuste y optimización de las condiciones de cultivo y fermentación y el control estricto del valor del pH de la disolución.

La levoisovalerilespiramicina III de la presente invención presenta una buena actividad antibacteriana, lo que añade una nueva variedad aplicable por inyección a los fármacos antibióticos y presenta una disolución nueva al problema técnico de la presente resistencia a antibióticos.

En la que el procedimiento de medición de la rotación específica de la levoisovalerilespiramicina III en la presente invención consiste en: pesar con precisión este producto, añadir cloroformo para su disolución, diluirlo en una disolución con 20 mg/ml, aplicar la línea D del espectro de sodio (589,3 nm) para medir la actividad óptica a una longitud de medición de 1 dm y una temperatura de 25ºC, y utilizar un polarímetro que tiene una lectura a 0,0001º y que se ha calibrado previamente.

El procedimiento de medición del punto de fusión de levoisovalerilespiramicina III en la presente invención consiste en: disponer levoisovalerilespiramicina III seca en una cantidad apropiada en un tubo capilar utilizado para la medición del punto de fusión, medir el punto de fusión, repetir la medición durante 3 veces para obtener un valor promedio.

La presente invención también se refiere a la preparación que contiene levoisovalerilespiramicina III, que incluye levoisovalerilespiramicina III y vehículo y/o coadyuvante farmacéuticamente aceptable, en la que la pureza de levoisovalerilespiramicina III es superior al 90% en peso, preferentemente superior al 95% en peso y de forma más preferida superior al 98% en peso.

La preparación que contiene levoisovalerilespiramicina III, o su compuesto cristalino, es preferentemente una disolución para inyección, polvo para inyección y polvo liofilizado para inyección. La preparación de un único componente que contiene levoisovalerilespiramicina III se convierte en disolución para inyección o polvo para inyección, de forma que la preparación de levoisovalerilespiramicina III de la presente invención pueda absorberse mejor por el cuerpo humano para lograr un efecto antiinfeccioso.

La preparación que contiene levoisovalerilespiramicina III de la presente invención incluye la dosis unitaria siguiente: 10~1500 mgl de evoisovalerilespiramicina III, preferentemente 50~1000 mg y de forma más preferida 100~500 mg.

La preparación que contiene compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III de la presente invención incluye la dosis unitaria siguiente: 10~1500 mg de compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III, preferentemente 50~1000 mg y de forma más preferida 100~500 mg.

El porcentaje en peso de levoisovalerilespiramicina III en la preparación que contiene levoisovalerilespiramicina III de la presente invención es del 10~90%, preferentemente del 50~90% y de forma más preferida del 75%~90%.

El porcentaje en peso del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III en la preparación que contiene cristal de compuesto de levoisovalerilespiramicina III en la presente invención es del 10~90%, preferentemente del 50~90% y de forma más preferida del 75%~90%.

La preparación para administración oral de la presente invención puede contener excipientes habituales, tales como adhesivo, material de carga, diluyentes, agente de compresión de comprimidos, agente lubricante, disgregante, colorante, condimento o humectante, y el comprimido, si es necesario, puede recubrirse. En la que el material de carga aplicable incluye celulosa, manitol, lactosa y otros materiales de carga similares; el agente de disgregación aplicable incluye almidón, polivinilpirrolidona y derivados de almidón tales como almidón-glicolato de sodio; el disgregante aplicable incluye, por ejemplo, estearato de magnesio y el humectante farmacéuticamente aceptable incluye laurilsulfato de sodio.

La preparación sólida para administración oral de la presente invención puede prepararse mediante procedimientos comunes tales como mezclado, rellenado y compresión.

La preparación líquida para administración oral de la presente invención puede estar en forma de, por ejemplo, suspensión basada en agua o en aceite, disolución, emulsión, jarabes o elixir, o puede ser un producto seco que puede duplicarse mediante agua u otro vehículo aplicable antes de su utilización. Esta preparación líquida puede

contener aditivos convencionales, tales como agente de suspensión tal como sorbitol, jarabe, metilcelulosa, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio o grasa hidrogenada comestible, y emulsionante, tal como lecitina, oleato de sorbitán o goma arábiga; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceite comestible), tales como aceite de almendra, aceite de coco fraccionado y éster de aceite tal como glicerina, propilenglicol o etanol; conservantes, tales como parabenos o 4-hidroxibenzoato de propilo o ácido sórbico; además puede contener agentes saborizantes convencionales o colorantes, si es necesario.

La inyección de la presente invención puede contener cualquier vehículo y/o excipiente medicinal habitual, agente estabilizante, antioxidante, agente complejante o conservantes medicinales, agente amortiguador o anestésicos locales y similares. La inyección se prepara mediante un procedimiento de preparación convencional.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables en la preparación de la presente invención se seleccionan de: manitol, sorbitol, pirosulfito de sodio, bisulfito de sodio, tiosulfito de sodio, clorhidrato de cisteína, ácido mercaptoacético, metionina, vitamina C, EDTA disódico, EDTA sódico-cálcico, carbonato monobásico, acetato, fosfato o su disolución acuosa, ácido muriático, ácido acético, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, aminoácido, cloruro de sodio, cloruro de potasio, lactato de sodio, xilitol, maltosa, glucosa, fructosa, dextrano, glicina, almidón, azúcar, lactosa, manitol, derivados de silicio, celulosa y sus derivados, alginato, gelatina, polivinilpirrolidona, glicerina, tween-80, agar, carbonato de calcio, bicarbonato de calcio, tensioactivo, polietilenglicol, ciclodextrina, β-ciclodextrina, materiales de fosfolípidos, caolín, polvos de talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, etc.

La utilización y la dosificación de la preparación de la presente invención se basan en las situaciones prácticas de los pacientes. Puede administrarse por vía oral o inyectarse 1~3 veces con 1~20 dosis cada vez al día.

Los efectos beneficiosos de la presente invención son:

(1) la levoisovalerilespiramicina III de la presente invención tiene un buen rendimiento antibacteriano. Según estudios farmacológicos modernos, debido a la diferencia en la estereoselectividad de enantiómeros de fármacos, la afinidad de un fármaco a cada receptor es también diferente, lo que tiene como consecuencia grandes diferencias en la acción farmacológica. Por lo tanto, la levoisovalerilespiramicina III de la presente invención tiene una fuerte actividad farmacológica;

(2) las moléculas de diferentes tipos de células cristalinas son diferentes con respecto a su configuración estérica, conformación y disposición, por lo que la solubilidad es obviamente diferente, lo que tiene como consecuencia una situación en la que las preparaciones tienen diferentes velocidades de digestión en el cuerpo humano, lo que afecta directamente a la absorción, la distribución, la excreción y el metabolismo de las preparaciones en el cuerpo humano y finalmente produce diferencias en su efecto farmacéutico clínico debido a una biodisponibilidad diferente. Mediante la comparación del efecto entre el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina I preparado en la invención y la levoisovalerilespiramicina III, se ha descubierto que el efecto de cristales de levoisovalerilespiramicina III preparados en la presente invención es superior al de la levoisovalerilespiramicina III;

(3) la inyección que contiene un componente individual de levoisovalerilespiramicina III, o la inyección que contiene un componente individual del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III, proporciona la posibilidad de una forma farmacéutica, que puede tener efecto rápidamente y ser fácilmente aceptado por pacientes críticamente enfermos o aquellos que no pueden tomar fármacos por vía oral;

(4) la preparación que contiene un componente individual de levoisovalerilespiramicina III o la preparación que contiene un componente individual del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III de la presente invención tienen un proceso de producción estable y un patrón de calidad controlado fácilmente, aplicándose a la producción industrial a gran escala.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa el cromatograma recogido por activación ultravioleta de levoisovalerilespiramicina III en la forma de realización 1;

La figura 2 representa la curva de variación del valor del pH en función del tiempo del proceso de fermentación en la forma de realización 1 de la presente invención;

La figura 3 representa la curva de variación del valor del pH en función del tiempo del proceso de fermentación en la forma de realización 2 de la presente invención;

La figura 4 representa la curva de variación del valor del pH en función del tiempo del proceso de fermentación en la forma de realización 3 de la presente invención;

La figura 5 representa el diagrama de difracción de polvo de rayos X de levoisovalerilespiramicina I;

La figura 6 representa el diagrama de difracción de polvo de rayos X de levoisovalerilespiramicina II;

La figura 7 representa el diagrama de difracción de polvo de rayos X de levoisovalerilespiramicina III de la presente invención.

Formas de realización

Forma de realización 1 Separación y preparación de levoisovalerilespiramicina III

(1) fermentación biológica: cultivar las cepas fúngicas clonadas WSJ-195 producidas mediante espiramicina que contienen el gen de 4"-isovaleril transferasa en un medio de cultivo inclinado de agar 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 8~15 días a un pH de 6,5~7,5 y una temperatura de 28~38ºC, inocularlas después a un 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 de pescado y 0,05% de KH_2PO_4 que se va a cultivar durante 40~80 horas a un pH de 6,5~7,5 y una temperatura de 25~30ºC, implantarlas en un 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 que se va a cultivar durante 72~120 horas a 26~30ºC y al 0,1~20% de cantidad de inoculación, después obtener el licor de fermentación.

En la que, controlando de forma estricta el valor del pH de la disolución mediante ajuste y optimización de las condiciones de cultivo y fermentación; la fermentación tiene lugar durante 120 h en condiciones del pH de 6,0~9,0, y las curvas de variación del pH con respecto la tiempo muestran tres fases continuas, de las que 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 $56\leq x_3\leq 120$. La figura 2 muestra las curvas. Se obtiene un licor de fermentación.

(2) extracción del licor de fermentación biológica: procesar el licor de fermentación obtenido en la etapa (1) con sulfato de aluminio para obtener un filtrado, regular el pH a 8,5, utilizar acetato de butilo para la extracción, limpiar el extracto de acetato de butilo respectivamente con disolución no salina y NaH_2PO_4 al 1%, después utilizar agua de pH 2,0 para la extracción para obtener un extracto acuoso, regular el pH a 4,5, volatilizar y eliminar el acetato de butilo residual para obtener un extracto acuoso, filtrar y regular el pH a un pH de 8,5, precipitar el filtrado y lavar con agua purificada para obtener el producto húmedo y secarlo para obtener levocarrimicina.

(3) purificación de levoisovalerilespiramicina III: purificar la muestra separada preliminarmente con cromatografía líquida preparativa, eluir gradualmente utilizando una columna cromatográfica ODS en acetonitrilo y disolución tampón de acetato de amonio, y registrar el diagrama del espectro ultravioleta de separación mediante detección UV y registrar el pico diana del componente de levoisovalerilespiramicina III.

Columna cromatográfica: columna cromatográfica preparada con ODS;

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

Condiciones del gradiente: gradiente lineal de 0~60 minutos, siendo A el 25%~65%, y de 61~90 minutos, siendo A el 65%~90%;

Velocidad de flujo: 260 ml/min;

Tamaño de muestra: 10 ml;

Concentración de la muestra: 0,5 g/ml;

Longitud de onda de medición: 231 nm;

Medio de recogida: recogida mediante activación UV.

Recoger la muestra de levoisovalerilespiramicina III basada en un tiempo de retención de 48,009 min.

Eliminar el acetonitrilo de la levoisovalerilespiramicina III recogida con el procedimiento de evaporación rotatoria, después utilizar acetato de etilo duplicado para la extracción, eliminar el acetato de etilo del extracto mediante evaporación rotatorio y obtener la muestra de pasta; redisolver la muestra obtenida en éter de petróleo, eliminar el

éter de petróleo mediante evaporación rotatoria para obtener correspondientemente el polvo blanco de levoisovalerilespiramicina III.

Forma de realización 2 Separación y preparación de levoisovalerilespiramicina III

(1) fermentación biológica: cultivar las cepas fúngicas clonadas WSJ-195 producidas mediante espiramicina que contienen el gen de 4"-isovaleril transferasa en un medio de cultivo inclinado de agar 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 un pH de 7,2 y una temperatura de 32ºC, inocularlas después a un 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 de pescado y 0,05% de KH_2PO_4 y cultivar durante 70 horas a un pH de 7,2 y una temperatura de 27ºC, implantarlas en un 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 y cultivar durante 100 horas a un pH de 6,0~9,0, una temperatura de 26ºC y el 12% de cantidad de inoculación, obtener después el licor de fermentación. La fermentación tiene lugar durante 110 h a un pH de 6,0~8,0, y las curvas de variación del pH en función del tiempo muestran tres fases continuas, de las que la primera fase satisface la fórmula $y_1=0,0909x_1+6,4$, en la que $0<x_1<22$; la segunda fase satisface la fórmula $y_2=-0,0441x_2+7,8$, en la que $22<x_2<56$; y la tercera fase satisface la fórmula $y_3=0,0078x_3+6,06$, en la que $56\leq x_3\leq 110$. La figura 3 muestra las curvas. Se obtiene un licor de fermentación. Véase la figura 3 para las curvas de control específicas.

(2) extracción del licor de fermentación biológica: procesar el licor de fermentación de la etapa (1) con sulfato de aluminio para obtener un filtrado, regular el pH a 8,6, utilizar acetato de butilo para la extracción, limpiar el extracto de acetato de butilo respectivamente con disolución no salina y NaH_2PO_4 al 1%, después utilizar agua con un pH de 2,3 para la extracción para obtener un extracto acuoso, regular el pH a 5,0, volatilizar y eliminar el acetato de butilo residual para obtener un extracto acuoso, filtrar y regular el pH a un pH de 8,6, precipitar el filtrado y lavar con agua purificada para obtener el producto húmedo y secarlo para obtener levocarrimicina.

(3) purificación de levoisovalerilespiramicina III: purificar la muestra separada preliminarmente mediante cromatografía líquida preparativa, eluir gradualmente a través de una columna cromatográfica preparativa ODS en acetonitrilo y disolución tampón de acetato de amonio, registrar el diagrama del espectro ultravioleta de separación mediante detección UV y recoger el pico diana del componente de levoisovalerilespiramicina III.

Columna cromatográfica: columna cromatográfica preparativa ODS;

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

Condiciones de gradiente: gradiente lineal de 0~60 minutos, siendo A del 25%~65%, y de 61~90 minutos, siendo A del 65%~90%;

Velocidad de flujo: 260 ml/min;

Tamaño de muestra: 10 ml;

Concentración de la muestra: 0,5 g/ml;

Longitud de onda de medición: 231 nm;

Medio de recogida: recogida mediante activación UV.

Recoger la muestra de levoisovalerilespiramicina III basada en un tiempo de retención de 48,009 min.

Eliminar acetonitrilo en la levoisovalerilespiramicina III recogida con el procedimiento de evaporación rotatoria, después utilizar acetato de etilo duplicado para la extracción, eliminar el acetato de etilo del extracto mediante evaporación rotatoria, y obtener la muestra de pasta; redisolver la muestra obtenida en éter de petróleo, eliminar el éter de petróleo mediante evaporación rotatoria para obtener correspondientemente el polvo blanco de levoisovalerilespiramicina III.

Forma de realización 3 Separación y preparación de levoisovalerilespiramicina III

(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 de agar, inocularlas a un medio de siembre que se va a cultivar y después inocularlas a un medio de fermentación, y la fermentación

tiene lugar durante 115 h a un pH de 6,0~7,5 que se controla mediante glucosa y ácido cítrico durante el proceso de fermentación. Las curvas de variación del pH en función del tiempo muestran tres fases continuas, de las que la primera fase satisface la fórmula $y_1=0,0682x_1+6,0$, en la que $0<x_1\leq22$; la segunda fase satisface la fórmula $y_2=-0,0294x_2+8,147$, en la que $22\leq x_2\leq56$; y la tercera fase satisface la fórmula $y_3=0,0078x_3+6,06$, en la que $56<x_3<115$. La figura 4 muestra las curvas. Se obtiene un licor de fermentación.

(2) extracción del licor de fermentación biológica: procesar el licor de fermentación de la etapa (1) con sulfato de aluminio para obtener un filtrado, regular el pH a 8,6, utilizar acetato de butilo para la extracción, limpiar el extracto de acetato de butilo respectivamente con disolución no salina y NaH_2PO_4 al 1%, después utilizar agua con un pH de 2,3 para la extracción para obtener un extracto acuoso, regular el pH a 5,0, volatilizar y eliminar el acetato de butilo residual para obtener un extracto acuoso, filtrar y regular el pH a un pH de 8,6, precipitar el filtrado y lavar con agua purificada para obtener el producto húmedo y secarlo para obtener levocarrimicina.

(3) purificación de levoisovalerilespiramicina III: purificar la muestra separada preliminarmente mediante cromatografía líquida preparativa, eluir gradualmente a través de una columna cromatográfica preparativa ODS en acetonitrilo y disolución tampón de acetato de amonio, registrar el diagrama del espectro ultravioleta de separación mediante detección UV y recoger el pico diana del componente de levoisovalerilespiramicina III.

Columna cromatográfica: aplicar una columna cromatográfica preparativa ODS;

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

Condiciones de gradiente: gradiente lineal de 0~60 minutos, siendo A del 25%~65%, y de 61~90 minutos, siendo A del 65%~90%;

Velocidad de flujo: 260 ml/min;

Tamaño de muestra: 10 ml;

Concentración de la muestra: 0,5 g/ml;

Longitud de onda de detección: 231 nm;

Procedimiento de recogida: recogida mediante activación UV;

Recoger la muestra de levoisovalerilespiramicina III basada en un tiempo de retención de 48,009 min;

Eliminar acetonitrilo de la levoisovalerilespiramicina IIII recogida con el procedimiento de evaporación rotatoria, después utilizar el acetato de etilo doblado para la extracción, eliminar el acetato de etilo del extracto mediante evaporación rotatorio para obtener la muestra de pasta; redisolver la muestra obtenida en éter de petróleo, eliminar el éter de petróleo con evaporación rotatoria para obtener el polvo blanco de levoisovalerilespiramicina III.

Forma de realización 4 Preparación de disolución de isovalerilespiramicina III para inyección

(1) mezclar uniformemente 100 mg de isovalerilespiramicina III con igual cantidad de moles de ácido adípico, y disolverlos en 1~5 ml de agua destilada para obtener una disolución transparente de color amarillo claro, con un pH de 4,6~5,6.

(2) añadir carbón activado que es el 0,1% de la disolución en volumen a la disolución preparada en la etapa (1) y filtrar la disolución;

(3) sellar, esterilizar, inspeccionar y envasar en condiciones asépticas.

Forma de realización 5 Preparación de polvo de levoisovalerilespiramicina III para inyección

(1) mezclar uniformemente 100 mg de isovalerilespiramicina III **y ácido maleico con mol igual**, y disolver en 1~5 ml de agua destilada para obtener una disolución transparente y de color amarillo claro, con un pH de 4,6~5,6.

(2) añadir carbón activado que es el 0,1% de la disolución en volumen a la disolución preparada en la etapa (1) y filtrar la disolución;

(3) añadir 30~150 mg de manitol como material de apoyo de la liofilización; congelar rápidamente durante 9 h

a baja temperatura y secar para obtener un aglomerado suelto de color amarillo claro, después taponar, inspeccionar y envasar en condiciones asépticas.

Forma de realización 6 Cápsulas de levoisovalerilespiramicina III (calculado en 1000 cápsulas)

Fórmula: Polvo bruto de levoisovalerilespiramicina III	100 g
Almidón (para uso farmacéutico)	108- peso de polvo bruto de levoisovalerilespiramicina III
Cápsula farmacéutica Nº 3	100 cápsulas
Parafina líquida	5 ml

Proceso de preparación: pesar el principio activo levoisovalerilespiramicina III, coadyuvante almidón (para uso farmacéutico) respectivamente según la formula y después disponerlos en una mezcladora para un mezclado completo durante 1,5-2 horas; los datos del contenido de la muestra detectados deberán ser básicamente consecuentes con los datos teóricos (aproximadamente 0,105 g por cada cápsula). Llenar la cápsula Nº 3 farmacéutica conformante y el material mixto que se va a rellenar en la máquina rellenadora según los requerimientos de la operación de la máquina de cápsulas totalmente automática; detectar diferencias de las cápsulas rellenas (dentro de un intervalo de ±10%, <0,3 g) y la velocidad de disolución, disponer las cápsulas conformantes en una máquina de pulido y añadir parafina líquida para el pulido durante 15-20 minutos y después extraerlas para la detección de la caja de envase del producto acabado.

Forma de realización 7 Jarabe de levoisovalerilespiramicina III (calculado en 1000 bolsas)

Fórmula: Polvo bruto de levoisovalerilespiramicina I	125 g
Ácido cítrico (0,5%)	1,5 g
Azúcar de caña	Peso total – otros materiales coadyuvantes y en bruto
Peso total	50 g
Pigmento(curcumina)	aproximadamente 0,1 g

Proceso de preparación: triturar polvo bruto de levoisovalerilespiramicina III, ácido cítrico y azúcar de caña dando gránulos correspondientemente con una trituradora neumática de alta velocidad, con el 85% de gránulos a través de un tamiz de malla 300 y el 15% de gránulos a través de un tamiz de malla 180, y después pesar el polvo fino triturado según la fórmula y mezclar totalmente durante 1-1,5 horas, medir el contenido y calcular la cantidad de llenado (500 mg por bolsa teóricamente), después llenar la mezcla en el embolsador, rellenar el papel de aluminio y dispensar la mezcla según los requerimientos operacionales del dispensador, con una diferencia de llenado dentro de un intervalo de ±5%, y examinarlas para determinar si cumplen los requerimientos después del llenado y finalmente envasar.

Forma de realización 8 Gránulos de levoisovalerilespiramicina III (calculado en 1000 bolsas)

Fórmula: Polvo bruto de levoisovalerilespiramicina III	125 g
Azúcar en polvo	2.000 g
Dextrina	900 g
5% de PVP-K30	Apropiado

Proceso de preparación: cribar el polvo bruto de levoisovalerilespiramicina III, azúcar en polvo y dextrina con un tamiz de malla 120, pesar polvo bruto de levoisovalerilespiramicina III, azúcar en polvo y dextrina según la fórmula 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 los gránulos a 70ºC, clasificar los gránulos y después envasarlos después de que se haya inspeccionado que cumplen los requerimientos.

Forma de realización 9

Convertir adicionalmente el polvo sólido blanco de levoisovalerilespiramicina III del Ejemplo 1 en cristal.

Procedimiento de preparación de compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III:

1. En primer lugar disolver levoisovalerilespiramicina III sólida en la forma de realización 1 en un disolvente mixto de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, con una proporción en volumen de 1:10:1;

2. Después añadir agua pura y agitar la mezcla simultáneamente, y 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 de adición de agua pura de 30 rpm;

3. Enfriar a 5ºC con una velocidad de 1ºC/**h** después de añadir agua pura, continuar agitando con 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 cristalino de levoisovalerilespiramicina III medida mediante radiación Cu-Kα presenta los picos característicos a 2θ que son 8,0º, 10,0º, 11,2º, 11,7º, 16,4º, 19,1º, 19,6º, 20,0º, 21,4º, 22,9º, 23,6º y 29,4º, y el espectro de difracción de rayos X es como se muestra en la figura 7.

Forma de realización 10

Convertir adicionalmente la levoisovalerilespiramicina III en polvo sólido blanco en la forma de realización 2 en cristal.

Procedimiento de preparación de compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III:

1. En primer lugar disolver levoisovalerilespiramicina III sólida en un disolvente mixto de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, con una proporción en volumen de 1:10:1;

2. A continuación añadir agua pura y agitar la mezcla simultáneamente, y siendo el volumen de agua pura añadida 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 de adición de agua pura de 60 rpm;

3. Enfriar a 5ºC con una velocidad de 3ºC/h después de añadir agua pura, continuar agitando con 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 cristalino de levoisovalerilespiramicina III medida mediante radiación Cu-Kα es similar a la figura 7.

Forma de realización 11

Convertir adicionalmente la levoisovalerilespiramicina III en polvo sólido blanco en la forma de realización 2 en cristal.

Procedimiento de preparación de compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III:

1. En primer lugar disolver levoisovalerilespiramicina III sólida en un disolvente mixto de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, con una proporción en volumen de 1:5:0,8;

2. A continuación añadir agua pura y agitar la mezcla simultáneamente, y siendo el volumen de agua pura añadida 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 de adición de agua pura de 40 rpm;

3. Enfriar a 10ºC con una velocidad de 2ºC/h después de añadir agua pura, continuar agitando con una velocidad de 15 rpm durante el enfriamiento, para obtener el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III.

La difracción de polvo de rayos X del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III medida mediante radiación Cu-Kα es similar a la figura 7.

Forma de realización 12

Convertir adicionalmente el polvo sólido blanco de levoisovalerilespiramicina III en la forma de realización 3 en cristal.

Procedimiento de preparación de compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III:

1. En primer lugar disolver levoisovalerilespiramicina III sólida en un disolvente mixto de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, con una proporción en volumen de 1:2:1;

2. A continuación añadir agua pura y agitar la mezcla simultáneamente, y siendo el volumen de agua pura añadida 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 de adición de agua pura de 45 rpm;

3. Enfriar a 12ºC con una velocidad de 2,5ºC/h después de añadir agua pura, continuar agitando con una velocidad de 20 rpm durante el enfriamiento, para obtener el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III.

La difracción de polvo de rayos X del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III medida mediante radiación Cu-Kα es similar a la figura 7.

Forma de realización 13 Procedimiento de preparación de disolución para inyección del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III

Convertir el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III en la forma de realización 4 en una disolución para inyección con el procedimiento de preparación mencionado.

Forma de realización 14 Procedimiento de preparación de polvo para inyección del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III

Convertir el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III en la forma de realización 10 en polvo para inyección con el procedimiento de preparación mencionado.

Forma de realización 15 Procedimiento de preparación de comprimidos del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III

Convertir el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III en la forma de realización 11 en comprimidos, con el procedimiento de preparación mencionado.

Forma de realización 16 Procedimiento de preparación de cápsulas del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III

Convertir el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III en la forma de realización 12 en cápsulas, con el procedimiento de preparación mencionado.

Ensayo 1 Ensayo de toxicidad aguda de levoisovalerilespiramicina III

1. Procedimiento de ensayo:

Se administran por vía oral fármacos tanto a ratones como a ratas (levoisovalerilespiramicina III preparada en la forma de realización 1)

Después de observar los ratones y las ratas durante dos días antes del ensayo, se lleva a cabo el ensayo sobre aquellos que no presentan condiciones anormales. No se da nada de alimento a los ratones y las ratas durante la noche antes del ensayo. Según el resultado de la predicción, se administran 4000 mg/kg de fármacos experimentales a ratones y ratas mediante administración intragástrica, sin que se produzca ninguna muerte. En este ensayo, se administran fármacos a ratones y ratas respectivamente para lograr 4000 mg/kg, en el que a los ratones se administran 100 mg/ml, con capacidad de administración intragástrica de 0,6-0,8 ml cada uno, mientras que a las ratas se administran 173 mg/ml, con capacidad de administración intragástrica de 0,8~1,0 ml/50 g. Se observan aquellos a los que se administró fármaco durante una semana para determinar reacciones tóxicas y muertes.

II. Ver tabla 1 y la tabla 2 para resultados del ensayo

Tabla 1 Toxicidad aguda de fármacos experimentales en ratones mediante administración oral (DL_{50})

Fármaco experimental	Dosis (mg/kg)	Cantidad	mortalidad	Tasa de mortalidad (%)	DL_{50} (mg/kg)
Levoisovaleril-espiramicina III	4000	20	7	35	>4000

Tabla 2 Toxicidad aguda de fármacos experimentales en ratas mediante administración oral (DL_{50})

Fármaco experimental	Dosis (mg/kg)	Cantidad	mortalidad	Tasa de mortalidad (%)	DL_{50} (mg/kg)
Levoisovaleril-espiramicina III	4500	20	3	15	>4500

Se llevó a cabo también el mismo ensayo para levoisovalerilespiramicina III o preparaciones de levoisovalerilespiramicina III preparadas en otras formas de realización de la presente invención, siendo los resultados obtenidos similares.

Ejemplo de ensayo 2: Efecto *in vivo* de levoisovalerilespiramicina III y su compuesto cristalino

Tomar la levoisovalerilespiramicina III en la forma de realización 1 y el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III en la forma de realización 10, y el procedimiento de ensayo es el mismo que en el ejemplo de prueba 2.

Se hace referencia a la tabla 7 y la tabla 8 para los resultados del ensayo *in vivo:*

Tabla 7: Comparación de los efectos curativos de 5 antibióticos sobre ratones con infección abdominal de 6 cepas de estreptococos

Organismo de ensayo	Dosis de provocación (UFC/0,5 ml/rata)	Fármaco	MIC (μg/ml)	DE_{50}(mg/kg)
Streptococcus pneumoniae$_3$	$6,4\times10^4$	isovalerilespiramicina III	0,12	8,99
		cristal de isovalerilespiramicina III	0,12	6,45
		carrimichina	0,12	10,41
		azitromicina	0,12	18,29
		acetil-espiramicina	0,5	66,96
		eritrocina	1	85,08
Streptococcus pneumoniae 18	$9,6\times10^4$	isovalerilespiramicina III	0,03	8,98
		cristal de isovalerilespiramicina III	0,03	8,68
		carrimichina	0,03	10,06
		azitromicina	0,06	14,87
		acetil-espiramicina	0,06	37,93
		eritrocina	0,06	57,08
Streptococcus pneumoniae57	$8,8\times10^4$	isovalerilespiramicina III	0,06	13,10
		cristal de isovalerilespiramicina III	0,06	11,08
		carrimichina	0,12	16,02
		azitromicina	0,12	19,02
		acetil-espiramicina	1	398,01
		eritrocina	0,25	102,33
estreptococo piogénico 772	$6,9\times10^3$	isovalerilespiramicina III	0,06	24,61
		cristal de isovalerilespiramicina III	0,06	22,81
		carrimichina	0,12	26,30
		azitromicina	0,25	46,89
		acetil-espiramicina	0,25	98,11
		eritrocina	0,5	101,33
estreptococo piogénico 102	$7,8\times10^4$	isovalerilespiramicina III	0,12	63,21
		cristal de isovalerilespiramicina III	0,12	52,91
		carrimichina	0,25	87,84
		azitromicina	0,5	159,06
		acetil-espiramicina	0,5	227,07
		eritrocina	0,5	361,01
estreptococo piogénico 119	$4,9\times10^4$	isovalerilespiramicina III	0,12	52,77
		cristal de isovalerilespiramicina III	0,12	49,94
		carrimichina	0,25	68,48
		azitromicina	0,25	68,48
		acetil-espiramicina	0,5	117,53
		eritrocina	0,5	233,72

Tabla 8: Comparación de efectos curativos de 5 antibióticos sobre ratones con infección abdominal de enterococos y staphylococcus aureus

Organismo de ensayo	Dosis de provocación (UFC/0,5ml/rata)	Fármaco	MIC (μg/ml)	DE_{50}(mg/kg)
Enterococcus32	$5,4\times10^4$	isovalerilespiramicina III	0,25	70,16
		cristal de isovalerilespiramicina III	0,25	65,89
		carrimichina	0,5	89,29
		azitromicina	1	146,51
		acetil-espiramicina	1	130,34
		eritrocina	2	175,23
Staphylococcus aureus16	$5,2\times10^3$	isovalerilespiramicina III	0,25	20,87
		cristal de isovalerilespiramicina III	0,25	19,29
		carrimichina	0,5	31,98
		azitromicina	0,5	31,98
		acetil-espiramicina	1	43,58
		eritrocina	1	82,36
Staphylococcus aureus76	$5,8\times10^4$	isovalerilespiramicina III	0,25	22,26
		cristal de isovalerilespiramicina III	0,25	18,71
		carrimichina	0,5	31,50
		azitromicina	1	58,79
		acetil-espiramicina	1	66,63
		eritrocina	1	64,17
Staphylococcus aureus12	$4,8\times10^4$	isovalerilespiramicina III	1	108,04
		cristal de isovalerilespiramicina III	1	105,24
		carrimichina	2	120,35
		azitromicina	2	120,35
		acetil-espiramicina	2048	>500
		eritrocina	256	266,11
Staphylococcus aureus21	$4,2\times10^4$	isovalerilespiramicina III	0,5	38,90
		cristal de isovalerilespiramicina III	0,5	36,09
		carrimichina	1	59,30
		azitromicina	4	142,99
		acetil-espiramicina	2048	>500
		eritrocina	4	213,67

Resultados del ensayo *in vivo*:

Remitirse a la Tabla 7 y a la Tabla 8 para los efectos curativos del compuesto cristalino de isovalerilespiramicina III sobre ratones infectados con 12 cepas de bacterias, que muestra un buen efecto protector; un mejor efecto protector que la isovalerilespiramicina III.

Se realiza el mismo ensayo para el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III o preparaciones del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III preparados en otras formas de realización de la presente invención, siendo los resultados similares.

Ejemplo de ensayo 3 Ensayo farmacodinámico *in vitro*:

I. Determinación de aislados clínicos:

Procedimiento de ensayo: procedimiento de dilución doble con agar: verter cuantitativamente al medio agar de fusión en una placa que contiene series de concentraciones de fármacos para mezclarlo con el fármaco líquido (añadir el 5% de sangre de oveja desfibrinada a *streptococcus* y *enterococcus* para obtener un medio sanguíneo; añadir el 7% de sangre de oveja desfibrinada a *Hemophilus influenza* y añadir el 7% de sangre de oveja desfibrinada a medio de *gonococcus* para obtener un medio de chocolate); después la mezcla se solidifica, se diluye a 10^6 UFC/ml con líquido de cultivo de bacterias nuevo, después se inocula mediante un instrumento de inoculación de varios puntos a la placa de agar que contiene agentes antibacterianos que se van a cultivar durante 18 h a 37; disponer el *gonococcus* en una incubadora con el 5% de CO_2 para cultivarlo durante 24 h; disponer la legionela en una incubadora con el 5% de CO_2 para cultivarla durante 48 h; disponer las bacterias anaerobias en una caja anaerobia para cultivarlas durante 48 h a 37ºC. Observar la concentración mínima de los fármacos antibacterianos para inhibir el crecimiento de bacterias, es decir, concentración inhibidora mínima (MIC) y calcular la MIC_{50} y la MIC_{90} de los fármacos y compararlas con las de los fármacos de control.

Nota: MIC_{50} representa una concentración inhibidora mínima para la inhibición del 50% del crecimiento bacteriano;

MIC_{90} representa una concentración inhibidora mínima para la inhibición del 90% del crecimiento bacteriano;

Véase la Tabla 9 para los resultados del ensayo:

Tabla 9: Comparación de la distribución sensitiva de aislados clínicos entre isovalerilespiramicina III y otros antibióticos

Tipo y número de cepa de la bacteria	Fármaco	Intervalo de MIC (µg/ml)	MIC_{50} (µg/ml)	MIC_{90} (µg/ml)
Streptococcus pneumoniae (112)	isovalerilespiramicina III	0,005->64	0,12	4
	carrimichina	0,005->64	0,12	4
	azitromicina	0,005->64	0,25	8
	acetil-espiramicina	0,005->64	0,12	>64
	eritrocina	0,005->64	0,25	64
estreptococo piogénico (93)	isovalerilespiramicina III	0,06->32	0,25	32
	carrimichina	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
enterococcus (106)	isovalerilespiramicina III	0,12->64	2	64
	carrimichina	0,5->64	2	64
	azitromicina	0,25->64	8	>64
	Acetil-espiramicina	0,12->64	4	>64
	eritrocina	0,5->64	4	>64
Staphylococcus aureus (155)	isovalerilespiramicina III	0,06->64	2	32
	carrimichina	0,06->64	2	64
	azitromicina	0,5->64	2	>64
	acetil-espiramicina	0,12->64	64	>64
	eritrocina	0,12->64	1	>64
S, epidermidis (115)	isovalerilespiramicina III	0,12->32	1	32
	carrimichina	0,12->64	2	>64
	azitromicina	0,12->64	8	>64
	aAcetil-espiramicina	0,03->64	64	>64
	eritrocina	0,06->64	8	>64
Hemophilus influenzae (37)	isovalerilespiramicina III	0,03-32	0,12	1
	carrimichina	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
gonococcus (10)	isovalerilespiramicina III	0,12-16	1	4
	carrimichina	0,12-16	2	8
	azitromicina	0,12-64	2	8
	acetil-espiramicina	0,12-64	4	8
	eritrocina	0,12-64	1	8

II. Determinación de *Chlamydia Trachomatis* y *Chlamydia Pneumoniae* in vitro

Procedimientos de ensayo:

1. Implantar líneas celulares HEp-2 y McCoy respectivamente en placa de cultivo de 96 pocillos (Costar Company) en un entorno de 37ºC y el 5% de CO_2 para cultivarlas durante 48 horas a fin de obtener células en monocapas.

2. Diluir cepas que se van a inocular a 10000~20000 ufi (unidades formadoras de inclusión)/ml, 0,1 ml/pocillo para la inoculación. Inocular *Chlamydia Trachomatis* serotipo B/TW-5/OT y D/UW-3/Cx a una placa de cultivo celular McCoy y *Chlamydia Pneumoniae* CWL-029 a una placa de cultivo celular HEp-2. En primer lugar, absorber el líquido de cultivo celular de una placa de cultivo de 96 pocillos, e inocular según el patrón de 0,1 ml/pocillo. En dicha placa, 4 pocillos A11-D11 y 2 pocillos C12 y D12 no se inocularán.

3. Después de la inoculación, utilizar una máquina centrifugadora J-6MC de Beckman-Coulter Company para centrifugar la placa de cultivo celular de 96 pocillos con una fuerza centrífuga de × 1500 g, una temperatura de centrifugación de 35ºC y un tiempo de centrifugación de 60 minutos.

4. Después de la centrifugación, absorber *Chlamydia Trachomatis* o *Chlamydia Pneumoniae* inoculadas, y añadir respectivamente 4 clases de antibióticos de dilución seriada, 0,1 ml/pocillo.

5. Cultivar la placa de ensayo sensible a fármaco de *Chlamydia Trachomatis* durante 48 horas y la placa de ensayo sensible a fármaco de *Chlamydia Pneumoniae* durante 72 horas en un entorno de 37ºC y el 5% de CO_2. Después del cultivo, absorber la disolución de antibióticos, lavar 2 veces con PBS (0,01 M, pH 7,4), y mantener en alcohol metílico al 100% durante 15 minutos a temperatura ambiente.

6. Identificación por tinción de inmunofluorescencia indirecta: respectivamente, añadir anticuerpo monoclonal de *Chlamydia Trachomatis* (clon N54) y anticuerpo monoclonal de *Chlamydia Pneumoniae* (clon P33) purificados a las placas de ensayo sensibles a fármaco de *Chlamydia Trachomatis* y *Chlamydia Pneumoniae*, 50 µl/pocillo; incubar durante 30 minutos en una caja húmeda a 37ºC; después, utilizar el lavador de placas para lavar las placas 4 veces, después añadir anticuerpos de fluorescencia anti-ratón de conejo (Sigma Company), 50 µl/pocillo; incubar y lavar del mismo modo en las mismas condiciones. Añadir glicerina de montaje, 100 µl/pocillo; finalmente, 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).

Tabla 10: Comparación de la MIC de 5 tipos de antibióticos macrólidos sobre *Chlamydia Trachomatis* y *Chlamydia Pneumoniae* en un efecto *in vitro*

	Levoisovalerilespiramicina III (forma de	Carrimicina	Acetilespiramicina (A T-SPM)	Eritrocina (EM)	Azitromicina (AM)
Chlamydia Trachomatis	0,25 µg/ml	0,25 µg/ml	4 µg/ml	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml
Chlamydia Trachomatis	0,25 µg/ml	0,25 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml
Chlamydia Pneumoniae	0,016 µg/ml	0,016 µg/ml	0,5 µg/ml	≤0,016 µg /ml	0,032 µg/ml

1. Para *Chlamydia Trachomatis* serotipo B/TW-5/OT, la levoisovalerilespiramicina III tiene un efecto superior a carrimicina, eritrocina y azitromicina in vitro, y la acetil-espiramicina (MIC es 4 μg/ml) tiene un efecto relativamente deficiente.

2. Para *Chlamydia Trachomatis* serotipo D/UW-3/Cx, la levoisovalerilespiramicina III tiene un efecto similar a carrimicina y azitromicina in vitro, con MIC 0,25 μg/ml, siendo sensible; a continuación se encuentra la eritrocina (0,5 μg/ml); y la acetil-espiramicina (MIC es 2 μg/ml) tiene un efecto relativamente deficiente;

3. Para *Chlamydia Pneumoniae* CWL-029, azitromicina, carrimicina, levoisovalerilespiramicina III son relativamente sensibles; la acetil-espiramicina (MIC 0,5 μg/ml) es relativamente deficiente.

4. En general, el efecto de levoisovalerilespiramicina sobre *Chlamydia* es superior al de otros fármacos de ensayo.

III. *Mycoplasma Urealyticum* y *Mycoplasma Pneumoniae* in vitro

1. Procedimientos de ensayo: añadir U-PPLO, 0,8 ml, a cada pocillo de la placa de cultivo celular de 12 pocillos aséptica (añadir 0,9 ml al pocillo de control de inóculo y 1,0 ml al pocillo de control del medio).

2. Añadir 10^4 CCU/ml de inóculo Uu, 0,1 ml, a cada pocillo experimental. La dosis final en el pocillo es de 10^3 CCU/ml (al pocillo de control del medio no se le añadirá inóculo).

3. Dividir en 3 grupos (100 μg/ml, 10 μg/ml y 1 μg/ml de disolución madre antibiótica), usar una punta aséptica para añadir antibiótico para el ensayo a cada pocillo: 100 μl, 50 μl, 25 μl, 12,5 μl según el gradiente de concentración de degradación doble. (A los pocillos de control de inóculo y del medio no se les añadirá antibiótico, y, paralelamente, se gestiona el pocillo de control de antibiótico).

4. Mezclar todos los pocillos uniformemente. Sellar la placa de cultivo mediante cintas y disponerla en una caja a 37ºC para el cultivo.

5. A las 17-24 horas después del ensayo, observar y registrar la situación de crecimiento de Uu. Cuando el pocillo de control de inóculo Uu presenta un crecimiento positivo, la concentración antibiótica mínima que puede suprimir el crecimiento de Uu, es el MIC de la muestra. La MIC después del ensayo es la MIC final (24 h).

Determinar la MIC de cepas de *Mycoplasma Urealyticum* y *Mycoplasma Pneumoniae* 4 veces y los resultados son:

La MIC de levoisovalerilespiramicina III es 0,025~0,125 μg/ml.
La MIC de carrimicina es 0,025~0,125 μg/ml.
La MIC de acetil-espiramicina es 0,5 μg/ml.
La MIC de eritrocina es 5 μg/ml.
La MIC de azitromicina es 0,025~0,125 μg/ml.

Los resultados anteriores indican que la levoisovalerilespiramicina III y la carrimicina tienen un efecto de resistencia a Uu favorable, que es similar al efecto de la azitromicina, superior al de la acetil-espiramicina, y el efecto de la eritrocina es el más deficiente entre todas las muestras.

El mismo resultado se obtiene para levoisovalerilespiramicina III en otras formas de realización de la presente invención o preparaciones que contienen levoisovalerilespiramicina III, siendo los resultados similares.

Ejemplo de ensayo 4 Ensayo clínico de levoisovalerilespiramicina III

La eficacia y la seguridad de levoisovalerilespiramicina III (de la forma de realización 1) y azitromicina en el tratamiento de infecciones respiratorias agudas en adultos provocadas por bacterias sensibles, incluidas faringitis bacteriana aguda, tonsilitis supurativa, traqueobronquitis aguda y neumonía leve, etc.

Aplicar un ensayo de control de simulación doble, de doble ciego, aleatorio, multicentrado, que se lleva a cabo en 5 hospitales concurrentemente según el programa de ensayo clínico unificado.

I. Patrones de selección del sujeto

1. Pacientes de 18 a 65 años de edad (hombres y mujeres);

2. Infecciones respiratorias agudas sensibles provocadas por bacterias sensibles que incluyen faringitis bacteriana aguda, tonsilitis supurativa aguda, traqueobronquitis aguda, neumonía leve y nasosinusitis aguda, etc;

3. Cualquier sujeto deberá firmar un consentimiento informado antes de ser seleccionado.

4. Todos los sujetos deberán utilizar medios anticonceptivos en el periodo de investigación y dentro de un periodo de por lo menos 3 meses después de haber recibido la dosis.

II. Patrones de exclusión del sujeto

1. Aquellos que tienen insuficiencia hepática o renal (Cr en sangre>1,5 mg/dl y ALT> límite superior normal)

2. Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia

3. Aquellos que tienen enfermedades del aparato gastrointestinal que no pueden tomar fármacos por vía oral.

4. Aquellos que han tomado fármacos antibacterianos dentro de un periodo de una semana antes de la selección.

5. Alcohólicos crónicos.

Según las estadísticas de los resultados de ensayos realizadas por expertos en estadística, la eficacia clínica (FAS) es:

El efecto de levoisovalerilespiramicina III y azitromicina es respectivamente 92,30% y 89,61%.

Aclaramiento de patógenos:

El aclaramiento de patógenos de levoisovalerilespiramicina III y azitromicina es respectivamente 97,56% y 92,86%.

Reacción adversa:

La reacción adversa de levoisovalerilespiramicina III y azitromicina es respectivamente 2,5% y 7,6%.

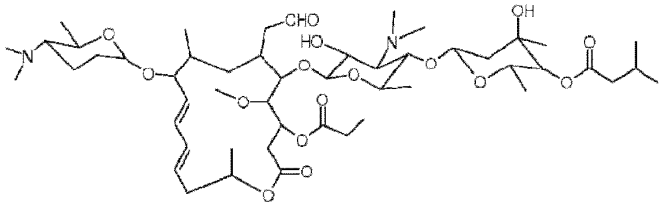
Los ensayos clínicos indican que la levoisovalerilespiramicina III son fármacos antiinfecciosos novedosos seguros y eficaces.

En algunos ensayos realizados para levoisovalerilespiramicina III en las otras formas de realización de la presente invención o preparaciones que contienen levoisovalerilespiramicina III los resultados son similares.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III, en el que,

la fórmula estructural química de la levoisovalerilespiramicina III se representa como la fórmula (III), en condiciones de cloroformo como disolvente, una temperatura de 25ºC y una concentración de 0,02 g/ml, la rotación óptica específica $[\alpha]_D$ medida es -49º~-51º y el punto de fusión es 116ºC~118ºC;



(III).

en el que la difracción de polvo de rayos X del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina, medida mediante radiación Cu-K-alfa presenta los picos característicos a 2θ = 8,0º, 10,0º, 11,2º, 11,7º, 16,4º, 19,1º, 19,6º, 20,0º, 21,4º, 22,9º, 23,6º y 29,4º.

2. Preparación que contiene el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III según la reivindicación 1, en la que la preparación contiene compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III, una sal farmacéutica de compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III, compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III y un adyuvante farmacéuticamente aceptable, o una sal farmacéutica de compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III y un adyuvante farmacéuticamente aceptable, en la que la pureza del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III es superior a 90% en peso,

preferentemente, la pureza del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III es de más de 95% en peso;

más preferentemente, la pureza del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III es de más de 98% en peso.

3. Preparación según la reivindicación 2, en la que: la preparación comprende la dosis unitaria siguiente: el contenido de compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III es 10~1500 mg;

preferentemente, el contenido de compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III es 50~1000 mg;

más preferentemente, el contenido de compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III es 100~500 mg.

4. Preparación según la reivindicación 2 o 3, en la que: el porcentaje en peso de compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III es 10~95%;

preferentemente, el porcentaje en peso de compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III es 50~95%;

más preferentemente, el porcentaje en peso de compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III es 75~95%.

5. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en la que: la composición incluye disolución para inyección, polvo para inyección o polvo liofilizado preparados mediante compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III y por lo menos uno de ácido cítrico, ácido adípico y ácido maleico.

6. Procedimiento para preparar compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III según la reivindicación 1, en el que,

disolver un compuesto de levoisovalerilespiramicina III sólido en un disolvente mixto de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra, añadir agua pura y agitar la mezcla simultáneamente, enfriar a 5ºC~15ºC tras añadir agua pura, continuar agitando durante el enfriamiento, obtener a continuación un compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III, en el que la relación en volumen de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra en el disolvente mixto es 1: 0,1~10 : 0,5~1;

preferentemente, la relación en volumen de metanol absoluto, alcohol etílico absoluto y acetona anhidra en el disolvente mixto es de 1:2~8 : 0,8~1.

7. Procedimiento para preparar compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III según la reivindicación 6, en el que un procedimiento para preparar un compuesto de levoisovalerilespiramicina III comprende:

preparar levocarrimicina y purificar levoisovalerilespiramicina III, en el que el proceso para preparar la levocarrimicina incluye:

cultivar y fermentar biológicamente cepas fúngicas clonadas WSJ-195 producidas mediante espiramicina que contienen el gen de 4"-isovaleril transferasa y extraer un licor de fermentación;

la fermentación transcurre en condiciones de pH de 6,0~9,0, en el que las curvas de variación del pH con tiempo muestran tres fases continuas, en el que 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 la fórmula $y_2=k_2x_2+b_2$, 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 $0<k_3\leq 0,0078$, $6,06\leq b_3<6,5$, $56\leq x_3\leq 120$,

la etapa para purificar la levoisovalerilespiramicina III incluye: purificar la muestra de levocarrimicina con un procedimiento cromatográfico, realizar una elución en gradiente y separar el pico diana de componente de levoisovalerilespiramicina III mediante una columna cromatográfica ODS en acetonitrilo y una disolución amortiguadora de acetato de amonio,

en la purificación de la levoisovalerilespiramicina III, eliminar el acetonitrilo en la levoisovalerilespiramicina III recogida con el procedimiento de evaporación rotatoria, utilizar a continuación acetato de etilo para la extracción, eliminar el acetato de etilo en el extracto por evaporación para obtener una muestra de pasta; redisolver la muestra con éter de petróleo, eliminar el éter de petróleo mediante evaporación para obtener respectivamente el polvo blanco de levoisovalerilespiramicina III.

8. Procedimiento para preparar el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III según la reivindicación 7, en el que un proceso de cultivo del procedimiento para preparar la levocarrimicina es:

cultivar las cepas fúngicas clonadas WSJ-195 producidas mediante espiramicina que contienen el gen de 4"-isovaleril transferasa en un medio de cultivo de agar inclinado que contiene 2% de harina de torta de soja, 1% de glucosa, 3% de almidón, 0,5% de $CaCO_3$, 0,4% de NaCl y 2% de agar durante 8 a 15 días con un pH de 6,5~7,5 y una temperatura de 28~38ºC, inocular a continuación a un medio de siembra que contiene 1,5% de harina de torta de soja, 3,0% de almidón, 0,4% de NaCl, 0,5% de $CaCO_3$, 0,3% de peptona de pescado y 0,05% de KH_2PO_4 y cultivar durante 40~80 horas con un pH de 0,5~7,5 y una temperatura de 25 a 30ºC, implantar a un medio de fermentación que contiene 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 y cultivar durante 72~120 horas a 26~30ºC, una cantidad de inoculación de 0,1~20%, para obtener el licor de fermentación.

9. Procedimiento para preparar el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III según la reivindicación 7 u 8, en el que la etapa para extraer el licor de fermentación biológica incluye:

tratar el licor de fermentación con sulfato de aluminio para obtener un filtrado, regular el pH del filtrado a 8,5~9,0, utilizar acetato de butilo para la extracción, limpiar el extracto de acetato de butilo con disolución no salina y NaH_2PO_4 al 1%, utilizar a continuación agua de pH 2,0~2,5 para la extracción para obtener un extracto acuoso, regular el pH a 4,5~5,5, volatilizar y eliminar el acetato de butilo residual para obtener un extracto de agua, filtrar y regular el pH a un pH de 8,5~9,0, precipitar el filtrado y lavar con agua purificada para obtener el producto húmedo y secarlo para obtener levocarrimicina.

10. Procedimiento para preparar el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III según la reivindicación 7, en el que en la purificación de levoisovalerilespiramicina III se registra el diagrama del espectro UV de la levoisovalerilespiramicina III mediante cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa y detección UV y se recoge la muestra de levoisovalerilespiramicina III sobre la base de un tiempo de retención de 48,009 min.

11. Procedimiento para preparar el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III según la reivindicación 7, en el que la fase móvil es un disolvente mixto de acetonitrilo A y disolución de acetato de amonio 150 mM con un pH de 8,5,

siendo las condiciones requeridas para la purificación de levoisovalerilespiramicina III:

gradiente lineal: 0~60 minutos, siendo A 25%~65%; y 61~90 minutos, siendo A 65%~90%;
velocidad de flujo: 260 ml/min;
tamaño de muestra: 10 ml;
concentración de la muestra: 0,5 g/ml;
longitud de onda de medición: 231 nm;
modo de recoger: recogida mediante activación UV.

12. Procedimiento para preparar el compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III según la reivindicación 7,

transcurriendo la fermentación en la condición de pH 6,0~8,0,

preferentemente, la fermentación transcurre en la condición de pH 6,0~7,5.

13. Utilización del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III según la reivindicación 1 o la preparación según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la fabricación de fármacos para tratar y/o prevenir enfermedades infecciosas.

14. Utilización del compuesto cristalino de levoisovalerilespiramicina III según la reivindicación 1 o la preparación según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la fabricación de antibiótico activo contra bacterias que incluyen *Streptococcus pneumoniae*, estreptococo del grupo A, estreptococo piogénico, enterococo, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermids*, *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*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *B. distasonis*, *B. prevotella*, *Prevotella asaccharolyticus*, *Prevotella oralis*, *Fusobacteriumnu cleatum*, *Fusobacterium russll*, bifidobacterias, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium acnes*, *Clostridium perfringens* u hongos de tipo levadura.

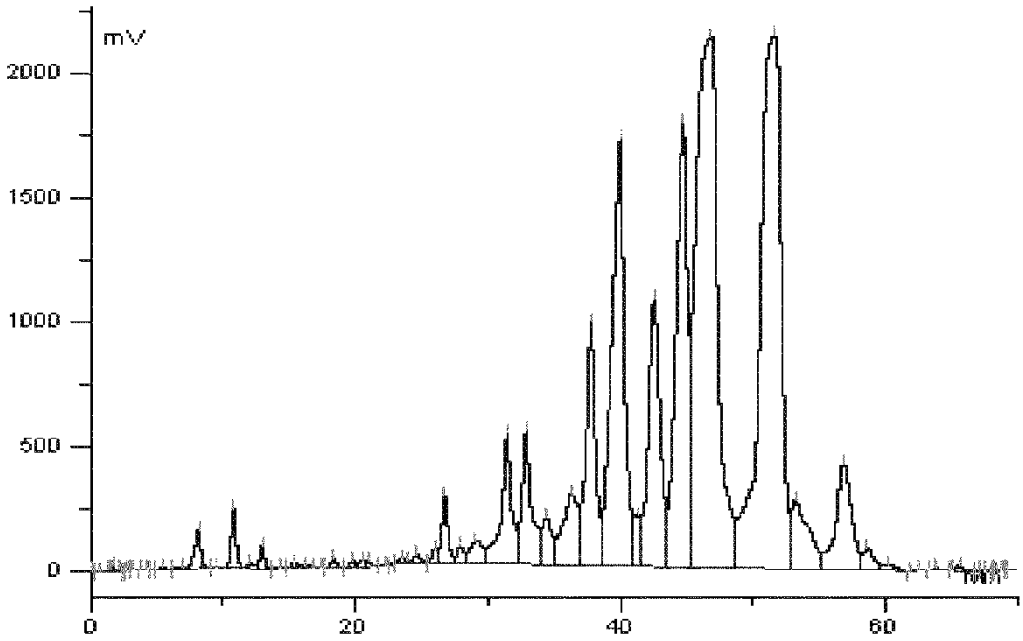


Fig. 1

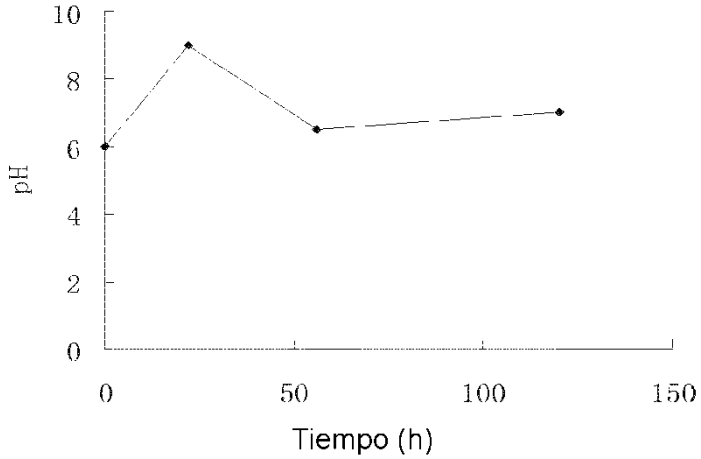


Fig. 2

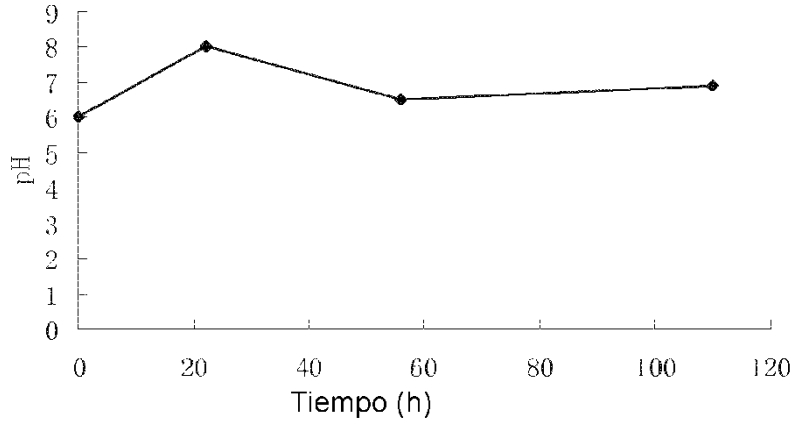


Fig. 3

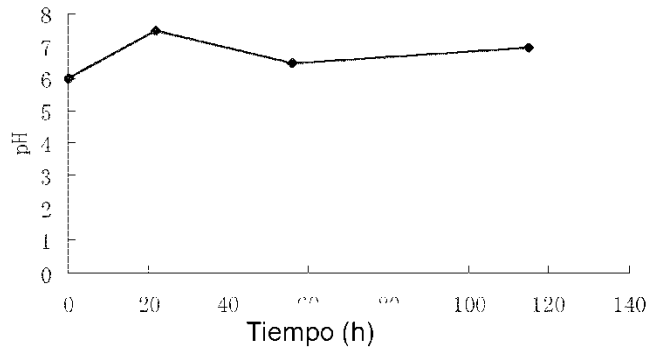


Fig. 4

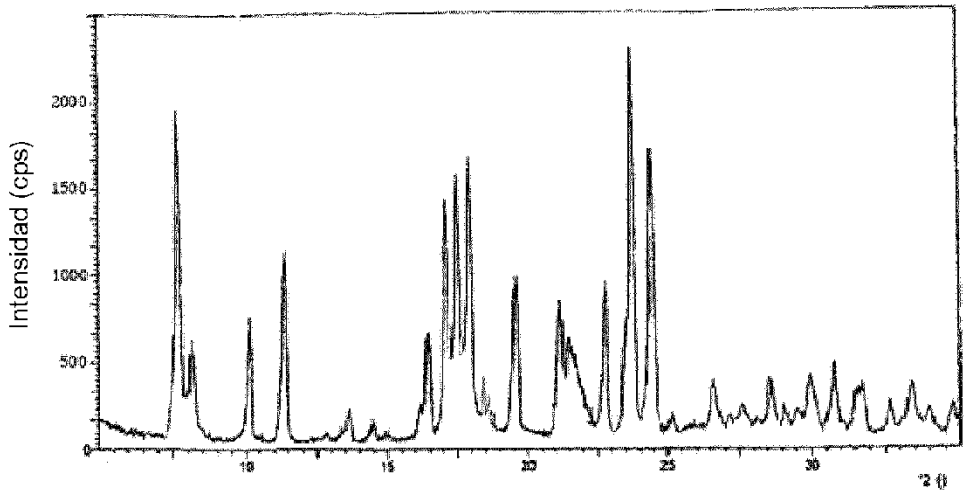


Fig. 5

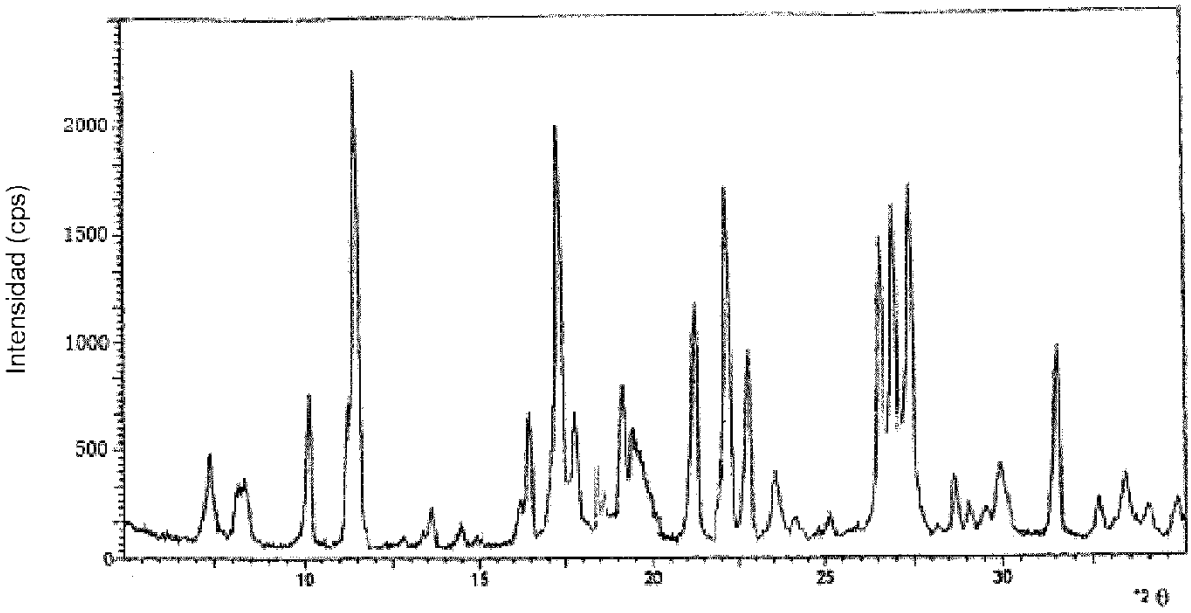


Fig. 6

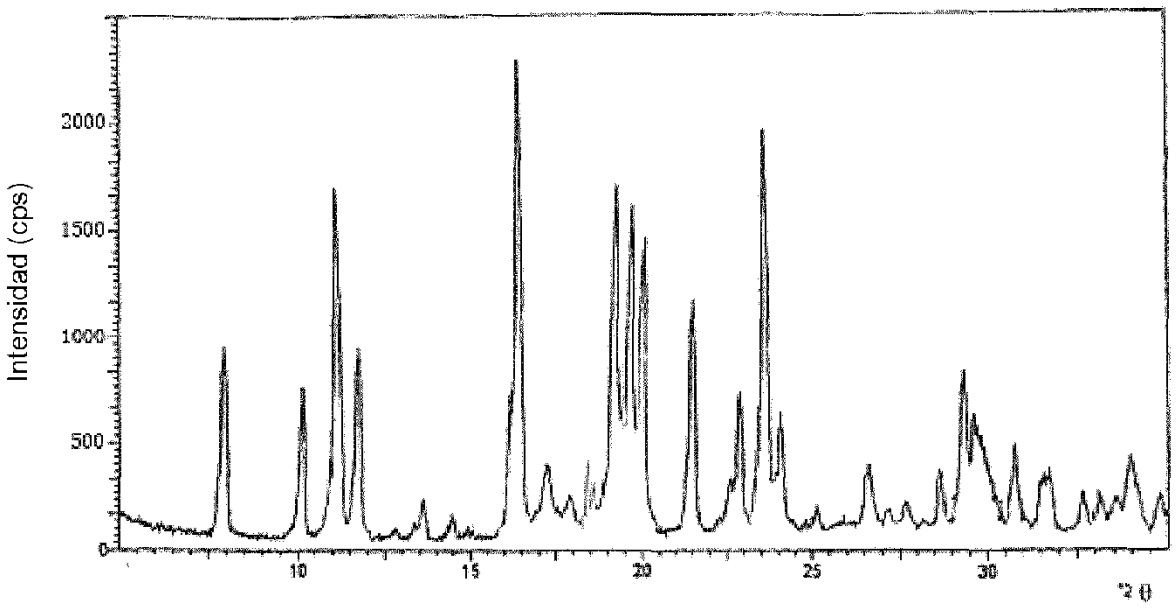


Fig. 7